



**Universidad Nacional del Litoral**  
**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**

**TRABAJO DE TESIS**

para optar al título de

**Doctor en Ciencias Biológicas**

Tema

**MODELADO DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR POR ZONA.**  
**APLICACIONES BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS**

Autor: **Bioq. MARIA V. PIAGGIO**

Director: **Dr. JULIO A. DEIBER**

Lugar de realización: **Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química**  
**(INTEC-UNL-CONICET)**

Miembros del Jurado: **Dra. Nora Vizioli**  
**Dra. María Fernanda Silva**  
**Dr. Carlos Bregni**  
**Dr. Carlos Brondino**

Setiembre, 2007

# **TESIS DOCTORAL**

**MODELADO DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR POR ZONA.**

**APLICACIONES BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS**

**AÑO 2007**

# AGRADECIMIENTOS

*A mi Director, el Dr. Julio A. Deiber por brindarme ampliamente sus conocimientos, por su constante ayuda e incansable guía durante el desarrollo de la Tesis.*

*A todos los integrantes del Grupo de Reología y Fenómenos de Transporte del INTEC, en especial a la Licenciada Marta B. Peirotti por su valiosa colaboración.*

*Al Hospital de Niños Dr. O. Alassia, en particular al Bioq. José F. López Vinuesa, Jefe del Servicio de Laboratorio, por brindarme la posibilidad de acceder al equipo de electroforesis capilar.*

*Al INTEC por permitirme el ingreso a sus instalaciones y el uso de sus servicios.*

*A los integrantes de la Cátedra de Bioquímica Básica de Macromoléculas con quienes comparto las actividades docentes desde hace muchos años.*

*Al Secretario de Ciencia y Técnica, Dr. Juan Claus, a los integrantes del Comité Académico del Doctorado y al personal administrativo de esta Facultad, por facilitarme en todo momento las tareas y trámites relacionados con el doctorado.*

*A los miembros del Jurado, Dra. Vizioli, Dra Silva, Dr. Bregni y Dr. Brondino por su excelente predisposición para actuar como evaluadores de esta Tesis.*

*A todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron para la concreción de esta Tesis Doctoral.*

# PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES

De este trabajo de Tesis Doctoral surgieron las publicaciones y presentaciones a Congresos que se mencionan a continuación.

## Publicaciones \*

- “Modeling the electropherogram of small charged molecules in capillary zone electrophoresis”. M. V. Piaggio y J. A. Deiber. *Lat. Am. Appl. Res.* 33: 171-178 (2003).
- “Modeling the zeta potential of silica capillaries in relation to the background electrolyte composition”. Claudio L. A. Berli, María V. Piaggio y Julio A. Deiber. *Electrophoresis* 24, 1587-1595 (2003).
- “Theoretical relation between the tube zeta potential and the background electrolyte composition in capillary electrophoresis”. Claudio L. A. Berli, María V. Piaggio y Julio A. Deiber. *Progr. Colloid Polym. Sci.* 128: 21-24 (2004).
- “Effect of background electrolyte on the estimation of protein hydrodynamic radius and net charge through capillary zone electrophoresis”. María V. Piaggio, Marta B. Peirotti y Julio A. Deiber. *Electrophoresis* 26: 3232-3246 (2005).
- “Exploring the evaluation of net charge, hydrodynamic size and shape of peptides through experimental electrophoretic mobilities obtained from CZE”. María V. Piaggio, Marta B. Peirotti y Julio A. Deiber. *Electrophoresis* 27: 4631-4647 (2006).
- “On the application of CZE to the study of protein denaturation”. María V. Piaggio, Marta B. Peirotti y Julio A. Deiber. *Electrophoresis* 28: 2223-2234 (2007).
- “Determination of the microenvironment-pH and charge and size characteristics of amino acids through their electrophoretic mobilities determined by CZE”. María V. Piaggio, Marta B. Peirotti y Julio A. Deiber. *Electrophoresis* 28: 3658-3676 (2007).
- “Hydration, charge, size and shape characteristics of peptides from their CZE analyses”. Marta B. Peirotti, María V. Piaggio y Julio A. Deiber. *J. Sep. Sci.* (en prensa).

---

\* Se incluyen copias de los trabajos publicados en cuadernillo anexo a la Tesis.

## **Actas de Congresos**

- “Modeling the Electropherogram of Capillary Zone Electrophoresis”. M. V. Piaggio y J. A. Deiber. 3<sup>rd</sup> MERCOSUR Congress on Process Systems Engineering, 1<sup>st</sup> MERCOSUR Congress on Chemical Engineering (ENPROMER), Vol. III, pp. 1333-1338 (2001).
- “Estimación de la carga efectiva de proteínas mediante electroforesis capilar por zona. Análisis de la teoría de regulación de cargas”. XXV Congreso Argentino de Química, pp. 535-538 (2004).
- “Análisis de la distribución de pesos moleculares de gelatinas vía CZE, PAGE-SDS y viscosidad intrínseca”. Olivares, María L.; Piaggio, María V.; Peirotti, Marta B. y Deiber, Julio A. XXV Congreso Argentino de Química, pp. 527-530 (2004).
- “Analysis of globular protein denaturation through capillary zone electrophoresis”. M. V. Piaggio y J. A. Deiber. Proceedings of ARCHIPOL’2005: III Argentine-Chilean Polymer Symposium, VII Argentine Polymer Symposium y VII Chilean Symposium of Polymer Chemistry and Physical-Chemistry, pp. 351-352 (2005).
- “Analysis and Stability of Electroosmotic Flow in Capillary Zone Electrophoresis”. M. V. Piaggio y J. A. Deiber. Proceedings of the 2006 International Symposium on Electrohydrodynamics (ISEHD), pp. 165-168 (2006).

## **Presentaciones orales y posters**

- “A simple theoretical model for capillary zone electrophoresis method development and separation optimization parameters”. María V. Piaggio y Julio A. Deiber. 6<sup>to</sup>. Simposio Latinoamericano en Aplicaciones de la Electroforesis Capilar y Tecnología del Microchip en Biotecnología, Biomedicina, Biofarmacia e Industria (LACE 2000). Punta del Este, Uruguay, 2 al 5 de diciembre de 2000.
- “Modeling the Electropherogram of Capillary Zone Electrophoresis”. María V. Piaggio y Julio A. Deiber en el 3<sup>rd</sup> MERCOSUR Congress on Process Systems Engineering, 1<sup>st</sup> MERCOSUR Congress on Chemical Engineering, (ENPROMER). Santa Fe, Argentina, 16 al 20 de setiembre de 2001.
- “La electroforesis Capilar: Una nueva herramienta para el diagnóstico clínico”. Piaggio, M. V.; López Cortez, M.; Ruatta, J.; Millán, A.; y Sartore, A. X Jornadas de Pediatría de la Región Litoral Santa Fe, 3, 4, 5 y 6 de octubre de 2001.
- “Cuantificación de fenilalanina en suero por electroforesis capilar”. Piaggio, M. V. y Zurbriggen, M. L. XI Congreso Nacional de Medicina. Jornadas de Ciencias Bioquímicas del Litoral. Santa Fe, 1 al 4 de mayo de 2002.

- “Modelo para la separación de aminoácidos por electroforesis capilar por zona”. María V. Piaggio y Julio A. Deiber. Congreso Argentino de Química. Santa Fe, 7 al 9 de agosto de 2002.
- “Detection of Two Cases of Bisalbuminemia by Capillary Zone Electrophoresis”. Piaggio, M. V. y J. A. Deiber. 8° Simposio Latinoamericano en Aplicaciones de la Electroforesis Capilar y Tecnología del Microchip en Biotecnología, Biomedicina, Biofarmacia e Industria (LACE 2002). Mar del Plata, 7 al 10 de diciembre de 2002.
- “A computational capillary electrophoresis model system for the separation of amino acids: perturbation analysis studies for the pH and ionic strength to improve resolution”. Piaggio, M. V. y J. A. Deiber. 8° Simposio Latinoamericano en Aplicaciones de la Electroforesis Capilar y Tecnología del Microchip en Biotecnología, Biomedicina, Biofarmacia e Industria (LACE 2002). Mar del Plata, 7 al 10 de diciembre de 2002.
- “Analysis of gelatin samples extracted from the hide and skin sources by capillary electrophoresis”. Piaggio, M. V.; Peirotti, M. B. y J. A. Deiber, 8° Simposio Latinoamericano en Aplicaciones de la Electroforesis Capilar y Tecnología del Microchip en Biotecnología, Biomedicina, Biofarmacia e Industria (LACE 2002). Mar del Plata 7 al 10 de diciembre de 2002.
- “Analysis of charge and friction coefficient of gelatin chains by capillary electrophoresis”. María V. Piaggio, Marta B. Peirotti y Julio A. Deiber. 11th International Conference on Surface and Colloid Science. Foz de Iguazú, 11 al 19 de setiembre de 2003.
- “Theoretical relation between the zeta potential and the background electrolyte composition in capillary electrophoresis”. Claudio A. Berli, María V. Piaggio y Julio A. Deiber. 11th International Conference on Surface and Colloid Science. Foz de Iguazú, 11 al 19 de setiembre de 2003.
- “Electroforesis capilar y escaleras de carga para la evaluación de propiedades fisicoquímicas de proteínas”. Piaggio, María V., Peirotti Marta B. y Deiber, Julio A. XIV Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Termas de Río Hondo. Santiago del Estero, 11 al 14 de abril de 2005.
- “Análisis de la carga neta de péptidos mediante electroforesis capilar”. Piaggio, María V., Peirotti, Marta B. y Deiber, Julio A. III Encuentro Bioquímico del Litoral. VI Jornadas de Comunicaciones Técnico-Científicas de la FBCB-UNL. Santa Fe, 16 al 18 de junio de 2005.



## RESUMEN

En los últimos 15 años, la electroforesis capilar por zona (CZE) se aplicó intensivamente en la separación y caracterización de diferentes analitos. En este sentido, un problema relevante es aquel asociado específicamente con la formulación adecuada de la solución electrolítica (BGE) para una separación particular de la CZE. Por consiguiente, uno de los requerimientos básicos es controlar el pH, la fuerza iónica, la viscosidad, la permitividad eléctrica y la temperatura, como propiedades relevantes del BGE para conseguir que los analitos se encuentren en un estado apropiado de carga eléctrica, el cual se puede definir para diferentes propósitos en la investigación. En este contexto de análisis, la interpretación del electroferograma a través de las teorías electrocinéticas disponibles en la literatura es un requerimiento práctico. Consecuentemente, la inclusión de modelos de la CZE con diferentes grados de complejidad puede satisfacer estas necesidades. En efecto, el modelado de la CZE sirve para diferentes propósitos, y dependiendo de ellos, es posible considerar una variedad amplia de fenómenos.

En esta Tesis, se consideran primero las ecuaciones de balance de las propiedades fisicoquímicas más relevantes que son el marco de referencia a lo largo de todo el trabajo para obtener las ecuaciones específicas que se utilizan en los modelos propuestos. Estas ecuaciones se presentan en forma general, para luego aplicarlas rigurosamente en la descripción del flujo electroosmótico (EOF) y la migración electroforética de analitos. Se presentan así las ecuaciones de balances de masa y de cantidad de movimiento de soluciones electrolíticas acopladas a efectos térmicos y eléctricos. Asimismo, se consideran los balances de energía, carga eléctrica y especies iónicas, partiendo de la bibliografía fundamental del tema. A través de las ecuaciones propuestas se describen y cuantifican los fenómenos electrocinéticos principales que conforman un modelo básico, permitiendo evaluar con cierta aproximación el electroferograma de un analito o de una mezcla de analitos que deben ser separados mediante la CZE.

Por consiguiente, el propósito inicial de esta Tesis es presentar un modelo básico de la CZE (no-ideal y lineal, en el sentido que la difusión molecular está presente y la difusión por electromigración es despreciable) que sirva para el desarrollo de métodos de separaciones prácticas que involucran, en principio, moléculas cargadas y pequeñas. Este modelo se basa en principios y ecuaciones dinámicas que contiene propiedades

fisicoquímicas verdaderas del BGE y de los analitos. Consecuentemente, el modelo se resuelve numéricamente permitiendo simular la separación de analitos de bajo peso molecular a través del electroferograma resultante, comparando bien con los datos experimentales.

Dentro del contexto del modelo propuesto, se presenta un análisis teórico de la relación entre el potencial zeta del tubo capilar y la composición del BGE que se encuentra típicamente en la CZE. El modelo que incluye los parámetros fisicoquímicos relevantes de la interfaz capilar-solución se deriva en el marco de la teoría de Poisson-Boltzmann y se valida experimentalmente. Este modelo se aplica a capilares que contienen grupos ácidos en la pared interna, los cuales dan origen a las cargas superficiales. Los capilares de sílice que se emplean usualmente en la CZE son casos típicos. En adición, el estudio se extiende a capilares poliméricos orgánicos sintéticos para probar la validez del modelo con materiales menos convencionales. Se encuentra que el modelo en ambas situaciones describe satisfactoriamente los datos experimentales del potencial zeta de tubo para un rango amplio de pH y fuerza iónica.

Creciendo en complejidad, el modelo básico amplía sus capacidades, originando los modelos extendidos de esta Tesis (LLCEM y PLLCEM), los cuales permiten la estimación del radio hidrodinámico y la carga neta de proteínas cuando están disponibles los datos de las movilidades de la CZE para un protocolo particular, el grupo de  $pK$  de los aminoácidos cargados y otros datos básicos. Es relevante mencionar que la carga neta de proteínas se determina considerando el fenómeno de regulación de cargas, el cual está asociado con la extensión de la ionización de los grupos residuales de los aminoácidos debido a la diferencia que existe entre el pH cercano a la molécula y aquel que corresponde al seno de la solución. Es importante señalar que estos modelos también proveen un marco racional para interpretar adecuadamente los efectos de las propiedades del BGE (pH, fuerza iónica, permitividad eléctrica y viscosidad) sobre el radio hidrodinámico y la carga neta de proteínas. Con el fin de ilustrar las predicciones de estos modelos se usan datos experimentales de movilidades electroforéticas disponibles en la literatura, como así también datos propios para protocolos de trabajo bien definidos. Las predicciones numéricas de la carga neta de proteínas a través de estos modelos comparan bien con resultados reportados en la literatura, incluyendo aquellos que se encuentran asintóticamente a través de las técnicas de escaleras de carga de proteínas y de los modelos detallados (PBMCM). Los cálculos provistos por el LLCEM y el PLLCEM indican que el

radio hidrodinámico es sensible a los cambios de la carga neta y en consecuencia no se puede suponer constante, en general. Un aspecto crucial que se debe señalar es la estimación adecuada de la permitividad eléctrica dentro del dominio de la proteína-solvente, el cual permanece como un tópico bajo investigación tanto para los modelos detallados como simples. En un contexto más amplio, los modelos propuestos aquí permiten obtener una estimación de los  $\Delta pK_i$  asociados con los grupos cargados en el ambiente proteína-solvente. El estudio particular asociado con la molécula de albúmina y mutaciones puntuales, ilustra una vez más, las capacidades de los modelos para caracterizar analitos a través de la evaluación de parámetros fisicoquímicos, en el contexto de la CZE. No obstante, se presentan y discuten varias limitaciones asociadas con los modelos para la estimación de la carga neta y el radio hidrodinámico de proteínas a partir de la estructura de la proteína, la secuencia de aminoácidos y las movilidades electroforéticas experimentales. Estas conclusiones muestran requerimientos claros para futuras investigaciones.

En adición, se explora la validez del LLCCEM y el PLLCEM para analizar las movilidades electroforéticas de péptidos. Estos modelos que se aplicaron antes a proteínas globulares, se adaptan y se usan para péptidos. Se discuten los efectos de las variaciones en los  $pK$  sobre la carga neta, la hidratación, el tamaño hidrodinámico y la forma de los péptidos. Se pone énfasis en el hecho que estos parámetros están físicamente acoplados, y en consecuencia una variación en la carga neta puede producir un cambio apreciable en el tamaño hidrodinámico de los péptidos. Dentro del marco de la CZE, se supone que los péptidos tienen un volumen hidrodinámico asociado con partículas esféricas y esferoidales. Se estudian los efectos sobre la carga neta y el tamaño hidrodinámico de las interacciones electrostáticas entre pares de grupos cargados en la cadena y la permitividad eléctrica en el dominio del péptido. Las predicciones de los modelos propuestos están en concordancia con los resultados reportados previamente en la literatura. Asimismo, se describen varias limitaciones concernientes a estos modelos y también varios tópicos para considerar en futuras investigaciones. Se puede expresar aquí que el uso del tamaño hidrodinámico y la forma de un péptido en lugar de la masa molar para evaluar el coeficiente de fricción del péptido, es una alternativa relevante que puede ayudar a interpretar el fenómeno de hidratación al nivel de información factible de lograr a partir de datos experimentales de la CZE. Esta estimación se obtiene en forma relativamente fácil a partir de los modelos propuestos en esta Tesis. Se observa que el fenómeno de regulación de cargas en la

electroforesis de péptidos se describe apropiadamente al nivel de la aproximación de “campo electrostático promedio”, conduciendo a una carga neta menor que aquellos valores calculados con las constantes de disociación de referencia y sin considerar el fenómeno de regulación de cargas. Aunque los modelos usados aquí presentan una distinción clara entre los péptidos de acuerdo a su tamaño, forma y carga neta como se ilustra numéricamente, es también claro que varias incertidumbres asociadas con los valores asignados al  $pK$  del grupo carboxilo terminal necesitan ser removidas en estudios futuros.

Asimismo, se explora la CZE como una alternativa interesante para el estudio de los procesos de plegado/desplegado de proteínas. En efecto, se usan las movilidades electroforéticas experimentales que se obtienen a partir de la CZE para estudiar la estabilidad conformacional de proteínas a través de un modelo. Su uso comprende primero la evaluación de parámetros relevantes de los micro-estados de la proteína como la energía libre electrostática, además de la energía libre conformacional clásica, y segundo la expresión de los datos experimentales primarios concernientes a la transición del plegado/desplegado en parámetros conformacionales más específicos como el radio hidrodinámico, el número de carga neta y la hidratación. Se eliminan los efectos espurios (variaciones de viscosidad, pH y fuerza iónica del BGE) que son intrínsecos a la evaluación experimental de las movilidades de los estados de la proteína como consecuencia del agregado del agente desnaturizante. Para ilustrar esta propuesta se estudian casos de desnaturización térmica y química (agregado de urea) de proteínas. Se presentan consideraciones termodinámicas teóricas relevantes de la transición del plegado/desplegado de proteínas, donde la energía libre electrostática se incluye explícitamente en la energía libre efectiva. Se encuentra que esta transición involucra un incremento marcado del radio hidrodinámico y de la hidratación de la proteína.

Por último se analizan e interpretan los datos experimentales de las movilidades electroforéticas efectivas de 20 aminoácidos que se reportan en la literatura con los modelos fisicoquímicos LLCCEM y PLLCEM propuestos en esta Tesis, los cuales proveen estimaciones de cantidades acopladas como el factor de forma hidrodinámica, el radio hidrodinámico equivalente (tamaño), la carga neta, los valores actuales de los  $pK$  y las cargas parciales de los grupos ionizantes, el número de hidratación y el pH cercano a la molécula (pH-microambiente). Se anticipa que el modelado de la movilidad electroforética de los aminoácidos requiere una consideración cuidadosa de la forma hidrodinámica

acoplada a la hidratación. En el rango de pH bajo que se estudia aquí, se encuentran distintos comportamientos hidrodinámicos de estos analitos. Asimismo, se presentan varias limitaciones concernientes al modelado simple de las movilidades electroforéticas de aminoácidos para investigación futura.

Este trabajo de Tesis demuestra que la CZE, además de ser una herramienta analítica ampliamente usada, tiene un alto potencial para la estimación de las propiedades fisicoquímicas como: el radio hidrodinámico, el coeficiente de difusión, la carga eléctrica efectiva, el potencial zeta, la forma y la hidratación de los analitos, cuando el electroferograma se modela e interpreta a través de las ecuaciones de los fenómenos de transporte acopladas a los efectos electrocinéticos. Más específicamente en esta Tesis se presenta: 1) Un modelo de la CZE (no-ideal y lineal) que involucra moléculas cargadas y pequeñas, el cual se valida con datos experimentales o de la bibliografía. 2) Este modelo provee predicciones cuantitativas de interés práctico para la interpretación del electroferograma de un analito o de una mezcla de analitos. 3) Es posible extender el modelo a analitos más complejos como péptidos y proteínas, incluyendo el fenómeno de regulación de cargas, lo cual conduce a conclusiones relevantes sobre el cálculo de la carga neta, el radio hidrodinámico, la forma, la hidratación, el pH cercano a la molécula y la estimación de las variaciones en los  $pK$  de los grupos cargados. 4) El uso de parámetros conformacionales como el radio hidrodinámico, la carga neta y la hidratación pueden ser útiles para estudiar el proceso de desnaturalización y la estabilidad conformacional de proteínas bajo la acción de diferentes agentes desnaturalizantes, a partir de medidas sencillas de la movilidad electroforética que se obtienen mediante la CZE. 5) El uso combinado de experiencias prácticas y modelos fisicoquímicos de la CZE, como los que se presentan aquí, ayudan a ampliar la información que es capaz de brindar esta técnica separativa aplicable a diferentes tipos de analitos y en un espectro amplio de BGEs.

# ABSTRACT

In the last 15 years, capillary zone electrophoresis (CZE) was applied intensively in the separation and characterization of different analytes. In this sense, a relevant problem to be solved is that specifically associated with the appropriate formulation of the background electrolyte (BGE) for a particular separation of the CZE. Therefore, one of the basic requirements is to control pH, ionic strength, viscosity, electrical permittivity and temperature, as relevant BGE properties, to set the analytes in the appropriate state of electrical charge, which may be defined for different research purposes. Within this context of analysis, the electropherogram interpretation through electrokinetic theories available in the literature is also a practical requirement. Consequently, the inclusion of CZE models with different levels of complexity may satisfy these needs. In fact, the modeling of CZE is useful for different purposes, and depending on them it is possible to consider a wide variety of phenomena.

In this Thesis, first the balance equations of relevant physicochemical properties are considered as the main framework throughout the whole work, to obtain thus the specific equations that are used in the proposed models. These equations are presented in general forms in order to apply them rigorously in the description of the electroosmotic flow (EOF) and the electrophoretic migration of analytes. Thus the mass and momentum balances of the BGE are presented, coupled to thermal and electrical effects. Also, the energy, electrical charge and ionic species are considered by starting from the fundamental literature of the subject. The main electrokinetic phenomena conforming a basic model are described and quantified through the proposed equations allowing thus to evaluate with a good approximation the electropherogram of an analyte, or a mixture of analytes to be separated through CZE.

Therefore, the initial purpose of this Thesis is to present a basic CZE model (non ideal and lineal, in the sense that molecular diffusion is present and electromigration diffusion is negligible) that is useful to develop methods of practical separations involving, in principle, small charged molecules. This model is based on principles and dynamic equations that contain true physicochemical properties of BGE and analytes. Consequently, the model is solved numerically to simulate the resulting electropherogram associated with

the separation of low molecular weight analytes. Validation of the model is obtained with experimental data.

Within the framework of the model proposed, a theoretical analysis of the relation between capillary tube zeta potential and typical BGE compositions is presented. The model, which includes the relevant physicochemical properties involving the capillary-BGE interface, is derived from the Poisson-Boltzmann theory and is also validated experimentally. This model is applied to capillaries that contain acid groups on the internal wall, yielding surface electrical charges. The fused silica capillary used in CZE is a typical example. In addition, the study is extended to synthetic polymer capillaries to probe the model validity with less conventional materials. It is thus found that the model describes satisfactorily the tube zeta potential within a wide range of pH and ionic strength for both situations.

By increasing the modeling complexity the basic model increases its prediction capabilities, yielding in this way the so-called extended models of this Thesis (LLCEM y PLLCEM); which allow one the estimation of the hydrodynamic radius and the net electrical charge of proteins when data of the CZE electrophoretic mobilities for a given protocol, the  $pK$  set of the ionizing amino acid residues and other basic data are available. It is relevant to indicate that the net charge of proteins is determined by considering the charge regulation phenomenon, which is associated with the degree of ionization of charged amino acid residual due to the existence of a difference between the pH near molecule and that value in the bulk of the BGE. Thus, these models also provide a rational framework to interpret appropriately the effect of BGE properties (pH, ionic strength, electrical permittivity and viscosity) on the hydrodynamic radius and the net charge of proteins. With the purpose to illustrate the predictions of these models, experimental electrophoretic mobility data available in the literature, as well as those carried out in this Thesis for a well defined protocol, are used. The numerical predictions of protein net charges through these models compare well with results reported in the literature, including those found asymptotically by using protein charge ladder techniques and those designated as detailed models (PBMCM). Results provided by the LLCEM and PLLCEM indicate that the value of the hydrodynamic radius is sensitive to changes in net charge, and therefore, it cannot be assumed as constant in general. A crucial aspect to be pointed out here is that the appropriate estimation of the electrical permittivity within the protein-solvent domain is rather open and it remains as a topic for research for both simple and

more detailed models. In a wider context of analysis the models proposed here allow one to obtain an estimation of  $\Delta pK_i$  associated with the ionizing groups within the protein-solvent. The particular study related with albumin and its point mutations, illustrates once more the capabilities of the models to characterize analytes through the evaluation of physicochemical parameters, within the CZE context. Nevertheless, several limitations associated with the models to estimate the net charge and hydrodynamic radius of proteins by starting from structure, amino acid sequence and experimental electrophoretic mobility, are presented and discussed. These conclusions show clear requirements for future researches on the subject.

In addition, the validity of the LLCCEM and PLLCEM to analyze the electrophoretic mobilities of peptides are explored. These models, already applied to globular proteins are adapted and used for peptides. The effects of  $pK$  variations on the net charge, hydration, hydrodynamic size and shape are deeply discussed. Special emphasis is placed on the fact that these parameters are physically coupled and hence a variation of net charge may cause an appreciable change in the hydrodynamic size of peptides. Within the framework of the CZE, it is assumed that peptides have a hydrodynamic volume associated with spherical and spheroid particles. It is also studied the effects of the electrostatic interactions between pairs of ionizing groups in the chain and the electrical permittivity within the peptide domain on the net charge and the hydrodynamic size of peptides. The model predictions compare well with results reported in the literature. In addition, the limitations of these models and also several aspects to be investigated in the future are described. It may be indicated here that the use of the peptide hydrodynamic size and shape instead of the molar mass to evaluate the peptide friction coefficient is an interesting alternative that may help to interpret the hydration phenomenon at the level of information accessible via experimental CZE. This estimation is quite easily obtained from the models proposed in this Thesis. It is also observed that the charge regulation phenomenon in the electrophoresis of peptides is described appropriately within the mean field electrostatic approximation, yielding a lower net charge value than those calculated with reference dissociation constants when this important phenomenon is neglected. Although the models used here present a clear distinction among peptides by means of sizes, shapes and net charges, as it is illustrated numerically, it is also clear that several uncertainties associated with the values of dissociation constants assigned to terminal carboxylic groups must be removed in future studies.

In addition, it is explored the use of the CZE, as an interesting alternative of conventional methods, for the study of the folding-unfolding processes of proteins. In fact the experimental electrophoretic mobilities obtained through CZE are used to study the conformational stability of proteins through a well set model, which comprises firstly the evaluation of relevant parameters describing the protein microstates, like the electrostatic free energy apart from the classical conformational free energy, and secondly the conversion of the raw experimental data involving the folding-unfolding transition into more specific parameters like hydrodynamic radius, net charge number and hydration. Further, undesired effects (variation of viscosity, pH and ionic strength of the BGE) are eliminated, which are intrinsic to the experimental evaluation of protein states mobilities as a consequence of adding a denaturant agent. To illustrate this proposal, cases involving thermal and chemical (addition of urea) protein denaturations are studied. Relevant theoretical thermodynamic considerations related to the folded-unfolded transition are presented, where electrostatic free energy is included explicitly into the effective free energy. It is thus found that this transition involves a sharp increase of the protein hydrodynamic radius and hydration.

Finally, experimental data involving the electrophoretic mobilities of the 20 amino acids, which are reported in the literature, are analyzed and interpreted with the LLCCEM and PLLCEM proposed in this Thesis, which provide estimations of coupled properties like hydrodynamic shape factor, equivalent hydrodynamic radius (size), net charge, actual values of  $pK$  and partial charges of ionizing groups, hydration number and the pH near molecule (pH-microenvironment). It is pointed out here that the modeling of the amino acid electrophoretic mobilities requires a careful consideration of the hydrodynamic shape coupled to hydration. Within the range of low pH studied here, it is found different hydrodynamic behaviors of this type of analytes. Also, several limitations associated with the simple modeling of amino acids electrophoretic mobilities are presented here for future researches.

This Thesis shows that CZE, apart from being an analytical tool widely used, has a high power for the estimation of physicochemical properties like, for instance, hydrodynamic radius, diffusion coefficient, effective electrical charge, zeta potential, shape and hydration of analytes, when the electropherogram is modeled through the balance equations of transport phenomena coupled to electrokinetic effects. More specifically, this Thesis presents: 1) A model of CZE (non ideal and lineal) involving small charged

molecules, which is validated with experimental data. 2) This model provides quantitative predictions of practical interest for electropherogram interpretations involving an analyte or a mixture of analytes. 3) It is possible to extend this basic model to more complex analytes like peptides and globular proteins, by including the charge regulation phenomenon, which leads one to relevant conclusions on the calculations of net charge, hydrodynamic radius, shape, hydration, pH near molecule and the estimation of  $pK$  variation of ionizing groups. 4) The use of conformational parameters like hydrodynamic radius, net charge and hydration may be useful to study the denaturizing process and conformational stability of globular proteins under the effect of different denaturant agents, from the measurement of simple electrophoretic mobilities as obtained from CZE. 5) The combined use of CZE experiments and CZE physicochemical models, like those described here, is able to provide further information of different type of analytes within a wide spectrum of BGE.

# PREFACIO

En esta Tesis se demuestra que el modelado de la electroforesis capilar por zona (CZE) es una herramienta teórica útil que puede servir para optimizar protocolos y para interpretar los resultados de las experiencias prácticas que se realizan en el laboratorio. Asimismo se propone extraer mayor información de los resultados que surgen de los gráficos característicos conocidos como electroferogramas. En efecto, el planteo central de la Tesis es presentar un modelo teórico de la CZE que se puede aplicar tanto a moléculas de bajo peso molecular como a macromoléculas, y que incluye las variaciones del medio electrolítico (BGE). En este sentido, la interpretación teórica de los fenómenos electrocinéticos se realiza en el marco de la fisicoquímica como área principal. Asimismo, la posibilidad de traducir el modelo en un programa computacional relativamente sencillo, incrementa su utilidad en aplicaciones específicas. La organización de los diferentes capítulos de la Tesis sigue la evolución y los logros que surgieron en el transcurso de la investigación. En consecuencia, dentro de este contexto, esta Tesis está organizada como se describe a continuación.

Primero, se presenta una Introducción General en la cual se realiza una reseña histórica breve de los comienzos y avances de la electroforesis capilar y se mencionan las distintas disciplinas y los múltiples campos de aplicación de esta metodología relativamente nueva. Se introducen diferentes puntos de vista del modelado de la CZE y se resalta la importancia que tiene el uso de modelos para relacionar la teoría con los experimentos. También se presentan los objetivos principales de este trabajo.

Luego, la Tesis se divide en dos partes: la Parte I, que comprende dos capítulos, considera la descripción de las fenomenologías básicas y el encuadre matemático necesario para la descripción de un modelo básico de la CZE y la Parte II, que se divide en cinco capítulos, se refiere a las aplicaciones del modelo básico y los modelos extendidos según corresponda a distintos tipos de analitos: drogas, proteínas, péptidos y aminoácidos. Se incluye una aplicación particular referida al estudio de la desnaturalización de proteínas.

El Capítulo 1 se refiere al modelado de la CZE. Se introducen consideraciones generales con relación a las capacidades predictivas de los modelos y se discuten diferentes estudios de la CZE presentados en la literatura. Se desarrolla un modelo básico (no-ideal y lineal) en el sentido que la difusión molecular está presente y la dispersión por

electromigración es despreciable, junto con las ecuaciones fundamentales que se utilizan para describir los fenómenos involucrados.

En el Capítulo 2 (dividido en seis secciones) se describen y se analizan cada una de las partes fundamentales que integran el modelo básico. Es decir, en la Sección 2.1 se estudia la inyección o introducción de la muestra en el capilar debido a que tiene un impacto relevante en la resolución del electroferograma. Se considera predominantemente la inyección hidrodinámica (por presión). En la Sección 2.2 se analiza el flujo electroosmótico (EOF), cuyo control es fundamental para optimizar la separación en la CZE. Se presta especial consideración a la dependencia del perfil de velocidad del EOF, con la aceleración de la gravedad, la temperatura, las conductividades térmica y eléctrica del BGE y el radio del capilar. La Sección 2.3 se refiere al potencial zeta del tubo capilar. En efecto, para el modelado de la CZE se requiere conocer el valor del potencial zeta de tubo, el cual se determina de manera experimental (usualmente en la práctica) mediante el uso de un marcador eléctricamente neutro o se puede estimar e interpretar a través de un modelo teórico consistente. En esta Tesis se encuentra una relación teórica entre el potencial zeta del capilar de sílice y la composición del BGE. Con este fin se usa la ecuación de Poisson-Boltzmann y se considera el equilibrio de disociación de los grupos silanoles pegados a la superficie del capilar como mecanismo de generación de carga. Se presta especial atención a la caracterización del BGE. Ambos procedimientos, predicciones teóricas y experimentación, se utilizan para evaluar el potencial zeta de tubo. Se comparan los valores teóricos y experimentales obtenidos para un rango variable de pH y fuerza iónica. Se debe remarcar que el modelo teórico es relevante para una comprensión fenomenológica de la generación del potencial zeta. En la Sección 2.4 se presenta el modelado de la migración de una partícula cargada en una solución electrolítica, la cual se realiza a través de las mismas ecuaciones básicas descritas para el EOF. En este sentido, es necesario previamente evaluar la carga efectiva de la partícula que migra, a través de expresiones adecuadas según se trate de analitos de peso molecular bajo (por ejemplo, drogas) o de mayor tamaño (péptidos y proteínas). Los aspectos concernientes a la detección axial de analitos y a los efectos dispersivos asociados se analizan en la Sección 2.5. La teoría que involucra la detección axial de los analitos es un problema relevante que define la calidad del modelo de la CZE. Para ello se debe resolver el sistema de ecuaciones que involucra el balance de especies asociado a cada analito cargado. Como se mencionó anteriormente, el modelo básico de la CZE propuesto, se encuadra como no-ideal y lineal

en el sentido que los efectos dispersivos son relevantes y la muestra se introduce en el capilar bajo condiciones muy diluidas. Por consiguiente, se incluyen en el estudio los fenómenos dispersivos más importantes presentes en la CZE a través de un parámetro global de dispersión. Para finalizar el Capítulo 2, en la Sección 2.6, se realiza una síntesis de las ecuaciones utilizadas en las secciones anteriores, las cuales definen el modelo básico de la CZE propuesto en esta Tesis. Se presenta un esquema que permite fácilmente identificar las variables y los datos de entrada, como así también los resultados que surgen de la resolución del modelo mediante un proceso algorítmico iterativo.

Por consiguiente, el modelo básico se desarrolla de manera general en la Parte I de la Tesis, mientras que en la Parte II, partiendo de este desarrollo generalizado, se consideran en las aplicaciones específicas distintos niveles de complejidad (se presentan los modelos extendidos). Es decir, se usa el modelo más adecuado según los diferentes tipos de analitos de interés y de acuerdo a la motivación del análisis.

En efecto, en el Capítulo 3 se aplica el modelo básico a analitos cargados de bajo peso molecular (drogas y aminoácidos) con el fin de ilustrar las capacidades de predicción y la utilidad del modelo para optimizar un protocolo experimental cuando se introduce una perturbación en la separación.

El Capítulo 4 se refiere en particular a las proteínas, dividiéndose en dos secciones. Primero, en la Sección 4.1 se modifica el modelo básico para incluir la consideración del fenómeno de regulación de cargas asociado con la extensión en la ionización de los residuos ácidos y básicos de los aminoácidos. Este fenómeno es una consecuencia de la diferencia entre el pH cercano a la molécula y aquel del seno de la solución. Asimismo, aquí se introduce una mejora sustancial en el modelo incluyendo la evaluación de las interacciones electrostáticas entre grupos cargados en la proteína. Surgen así los modelos extendidos (LLCEM y PLLCEM). Estos modelos se aplican al estudio de diferentes proteínas. En este sentido, partiendo de datos de movilidades electroforéticas experimentales, se estiman el radio hidrodinámico, la carga neta, el potencial de partícula y el pH cercano a la molécula como parámetros relevantes que describen el comportamiento hidrodinámico de las proteínas en la CZE. En adición se considera en el estudio el análisis de variables relevantes del BGE, como la fuerza iónica y la permitividad eléctrica. Segundo, en la Sección 4.2, el LLCEM se aplica a la estimación cuantitativa de las cargas eléctricas efectivas de la albúmina normal y la variante asociadas con la rara anomalía designada aloalbuminemia. El modelo permite, con ciertas aproximaciones, analizar

numéricamente los tipos de mutaciones probables asociados con el doble pico de albúmina presente en el electroferograma. También se extiende el modelo al análisis de otros casos de aloalbuminemia reportados en la literatura.

El Capítulo 5 se refiere al estudio y análisis de péptidos. Aquí el modelo básico se modifica y se adapta para considerar el comportamiento conformacional de estos analitos. Se establecen diferencias claras con relación al análisis previo realizado con proteínas. Se incluye la evaluación del parámetro de hidratación y se propone considerar en el modelo partículas con forma diferentes a la esférica (partículas esferoidales y cilíndricas). Estos aspectos son relevantes para aquellos péptidos que no pueden ser correctamente descriptos como una partícula esférica debido a que se obtienen valores de hidratación que no tienen significado físico.

En el Capítulo 6, las movilidades experimentales que se obtienen a partir de la CZE se usan para estudiar la desnaturalización y la estabilidad conformacional de proteínas a través del LLCCEM propuesto en esta Tesis. En efecto, se muestra que este modelo es capaz de proveer información adicional concerniente a los estados conformacionales del plegado y desplegado de una proteína y permite, en adición, el cálculo de parámetros termodinámicos como las variaciones de energía libre, entalpía y entropía.

En el Capítulo 7 se reconsidera el estudio de aminoácidos vía CZE. Se analizan e interpretan las movilidades electroforéticas efectivas de 20 aminoácidos que se reportan en la literatura con los modelos fisicoquímicos LLCCEM y PLLCEM propuestos en esta Tesis, los cuales proveen estimaciones de cantidades acopladas como el factor de forma hidrodinámica, el radio hidrodinámico equivalente (tamaño), la carga neta, los valores actuales de los  $pK$  y las cargas parciales de los grupos ionizantes, el número de hidratación y el pH cercano a la molécula (pH-microambiente). Asimismo, se presentan varias limitaciones concernientes al modelado simple de las movilidades electroforéticas de aminoácidos.

Por último, se enumeran en forma breve los principales resultados de esta Tesis, se presentan las conclusiones más destacadas y se establecen caminos posibles para futuras investigaciones.

# ÍNDICE

<b>Introducción general</b> .....	1
<b>Objetivos</b> .....	9

## **PARTE I. Desarrollo y descripción del modelo básico**

### **Capítulo 1. Modelado de la Electroforesis Capilar por Zona (CZE)**

1.1 Análisis de diferentes modelos y estudios de la CZE presentados en la literatura .....	10
1.2 Modelo básico de la CZE .....	18
1.3 Ecuaciones fundamentales .....	20
1.4 Importancia del uso de modelos teóricos en la CZE .....	22

### **Capítulo 2. Aspectos generales considerados en el modelo básico**

2.1 Inyección de la muestra .....	24
2.1.1 Introducción .....	24
2.1.2 Inyección hidrodinámica .....	25
2.1.3 Inyección electrocinética .....	28
2.1.4 Efecto de la cantidad de muestra que se inyecta en el capilar sobre la separación .....	29
2.1.5 Ejemplos de cálculos realizados con un programa computacional simple .....	30
2.2 Flujo electroosmótico .....	34
2.2.1 Definición y características del flujo electroosmótico .....	34
2.2.2 Modelo para la interpretación del flujo electroosmótico .....	39
2.2.3 Velocidad electroosmótica en la CZE. Determinación experimental .....	46
2.3 Modelado del potencial zeta del capilar en la CZE .....	49
2.3.1 Introducción .....	49
2.3.2 Relación entre el flujo electroosmótico y el potencial zeta del capilar .....	52
2.3.3 Modelado del potencial zeta del capilar con relación a la composición del BGE .....	56
<i>Conceptos asociados con interfases cargadas</i> .....	56
<i>Química de la superficie y potencial de superficie</i> .....	58
<i>Modelo y procedimiento de cálculo</i> .....	59

2.3.4 Composición de las soluciones electrolíticas .....	60
2.3.5 Validación del modelo del potencial zeta con datos experimentales .....	62
<i>Datos que involucran soluciones de sales</i> .....	62
<i>Datos que involucran soluciones buffer</i> .....	64
2.3.6 Respuestas asintóticas del modelo y predicciones adicionales .....	67
2.3.7 Extensión del modelo a capilares poliméricos menos convencionales .....	69
2.3.8 Conclusiones .....	70
2.4 Migración electroforética .....	71
2.4.1 Modelado de la migración electroforética de una partícula cargada .....	71
2.4.2 Determinación de la carga efectiva de un analito .....	74
2.4.3 Dependencia de la movilidad con la carga y la forma del analito .....	75
2.4.4 Acerca de las medidas experimentales de movilidad electroforética .....	76
2.5 Detección axial de analitos y fenómenos dispersivos .....	78
2.5.1 Consideraciones generales .....	78
2.5.2 Modelado de la detección axial de analitos .....	80
2.5.3 Relevancia del BGE en la eficiencia y selectividad de la CZE .....	84
2.6 Resumen del modelo básico propuesto para la CZE. Programa computacional ...	86
2.6.1 Ecuaciones y código numérico del modelo básico .....	86
2.6.2 Conclusiones .....	90

## **PARTE II. Aplicaciones**

### **Capítulo 3. Analitos de bajo peso molecular**

3.1. Drogas .....	91
3.1.1 Introducción .....	91
3.1.2 Aplicación del modelo básico a la separación y caracterización de drogas ...	93
3.1.3 Técnica experimental de la separación mediante la CZE .....	94
<i>Evaluación del potencial zeta de tubo</i> .....	94
3.1.4 Predicciones de los electroferogramas y discusión .....	95
3.1.5 Conclusiones .....	104
3.2 Aminoácidos .....	105
3.2.1 Introducción .....	105
3.2.2 Aplicación del modelo básico de la CZE a la separación de aminoácidos ...	106
<i>Protocolo experimental</i> .....	106

3.2.3 Simulación del electroferograma y predicciones con el modelo básico .....	107
3.2.4 Caso simple de estudio: cuantificación de fenilalanina y tirosina en suero mediante CZE .....	110
<i>Estudios realizados con el modelo</i> .....	111
3.2.5 Conclusiones .....	116
3.2.6 Apéndice 3-A .....	117

## Capítulo 4. Proteínas

4.1 Estimación de la carga neta y el radio hidrodinámico de proteínas .....	118
4.1.1 Introducción .....	118
4.1.2 Modelado de la carga neta y el radio hidrodinámico de proteínas vía CZE .....	127
<i>Modelo Perturbado de Linderstrøm-Lang de la Electroforesis     Capilar (PLLCEM)</i> .....	128
<i>Modelo de Linderstrøm-Lang de la Electroforesis     Capilar (LLCEM)</i> .....	132
<i>Procedimiento numérico</i> .....	133
4.1.3 Resultados y discusión .....	135
<i>Lisozima</i> .....	135
<i>Anhidrasa carbónica humana</i> .....	141
<i>Anhidrasa carbónica bovina</i> .....	145
<i>Nucleasa estafilocócica</i> .....	149
<i>Albúmina sérica humana</i> .....	159
4.1.4 Limitaciones de los modelos extendidos .....	163
4.1.5 Conclusiones .....	164
4.1.6 Apéndice 4-A .....	167
4.2 Aplicación del LLCCEM a la detección y caracterización de aloalbúminas .....	169
4.2.1 Introducción .....	169
4.2.2 Motivación del estudio .....	171
4.2.3 Consideraciones para la aplicación del LLCCEM a la detección de aloalbúminas .....	174
<i>Diseño de cálculos para la Simulación I</i> .....	176
<i>Diseño de cálculos para la Simulación II</i> .....	178
4.2.4 Protocolo experimental .....	179

4.2.5 Presentación de dos casos clínicos de aloalbuminemia .....	180
<i>Caso clínico 1</i> .....	180
<i>Caso clínico 2</i> .....	182
4.2.6 Evaluación de los resultados que surgen del LLCCEM .....	182
4.2.7 Extensión de las predicciones del modelo a otros casos de aloalbúminas ...	185
4.2.8 Conclusiones .....	188
4.2.9 Propuestas de futuras investigaciones en el tema específico .....	189

## **Capítulo 5. Péptidos**

5.1 Introducción .....	190
5.2 Estimaciones de la carga neta, el tamaño y la forma hidrodinámica de péptidos ..	196
5.3 La hidratación como parte del tamaño hidrodinámico de los péptidos .....	203
5.4 CZE de péptidos con formas hidrodinámicas no-esféricas .....	205
5.5 Resultados y discusión .....	208
5.6 Conclusiones .....	220
5.7 Apéndice 5-A .....	222

## **Capítulo 6. Aplicación de la CZE al estudio de los procesos de desnaturalización de proteínas**

6.1 Introducción .....	223
6.2 Antecedentes bibliográficos .....	227
6.3 Consideraciones teóricas .....	230
6.4 Resultados y discusión .....	238
<i>Citocromo c</i> .....	238
<i>Lisozima</i> .....	249
6.5 Conclusiones .....	257

## **Capítulo 7. Aminoácidos**

7.1. Introducción .....	258
7.2 Conceptos relevantes asociados con el pH-microambiente en el entorno de los analitos cargados .....	262
7.3 Estimación de la carga neta, el radio hidrodinámico y la forma de aminoácidos a través de las movilidades efectivas experimentales .....	267
7.4 Cálculos numéricos .....	274
7.5 Datos experimentales de las movilidades efectivas de aminoácidos y los protocolos usados que se obtienen a partir de la literatura .....	276

7.6 Resultados y discusión .....	278
7.7 Conclusiones .....	293
<b>Conclusiones generales</b>	
<i>Resultados principales de la Tesis</i> .....	295
<i>Conclusiones más destacadas de esta Tesis</i> .....	297
<i>Propuestas para futuras investigaciones</i> .....	297
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	299
Lista de abreviaturas .....	338
Lista de símbolos .....	340

# Introducción General

---

---

En la actualidad numerosas técnicas separativas se basan en principios electroforéticos, los cuales describen en general la migración de partículas cargadas en solución debido a la aplicación de un campo eléctrico. En este sentido, la descripción de los fundamentos de la electroforesis se remonta a la época en que Kohlrausch (1897) deriva sus ecuaciones básicas para la migración iónica en una solución electrolítica.

Sin realizar un exhaustivo análisis de la historia de la electroforesis capilar (CE) (ver, para más detalles Vesterberg, 1989), es interesante y corresponde también mencionar los primeros trabajos realizados por Tiselius (1930 y 1937), en los que se analizaron mezclas de proteínas aplicando un campo eléctrico en un tubo de cuarzo abierto en forma de U. Por estos estudios, este investigador recibió el Premio Nóbel en 1948. No obstante, la eficiencia de la separación en este tipo de electroforesis sin soporte (usualmente denominada “libre”) estaba limitada por la difusión térmica y las corrientes de convección. Con el propósito de superar estas dificultades se emplearon primeramente soportes tales como papel, alrededor de 1950 y luego geles de almidón, agar, agarosa, acetato de celulosa y más recientemente, poliacrilamida. Es relevante destacar que a partir de esta situación, las separaciones en medio líquido no se usaron por un período largo de tiempo de alrededor de 20 años.

Hjertén (1967) fue el primero que describe un aparato para la electroforesis por zona en solución utilizando tubos de cuarzo que tenían un diámetro de 1 a 3 mm, los cuales estaban recubiertos con metilcelulosa para prevenir la electroósmosis. El autor presentó un informe detallado en una revista científica sobre los principios y práctica de la electroforesis desarrollada en un tubo pequeño, abierto y lleno de líquido, llamada “electroforesis libre por zona”. No obstante, en los siguientes 10 a 15 años, el método que se usó principalmente en tubos abiertos fue la isotacoforesis (Everaerts *et al.*, 1976), pero en general, su aceptación fue baja.

Luego, Virtanen (1974) reportó datos que se obtuvieron con la electroforesis por zona empleando tubos de vidrio de 200-500  $\mu\text{m}$  de diámetro interno; en este caso los compuestos separados eran detectados mediante potenciometría. Algunos años más tarde, Mikkers, Everaerts y Verheggen (1979) desarrollaron la electroforesis por zona en tubos de teflón con un diámetro interno de 200  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, a causa de la baja sensibilidad de

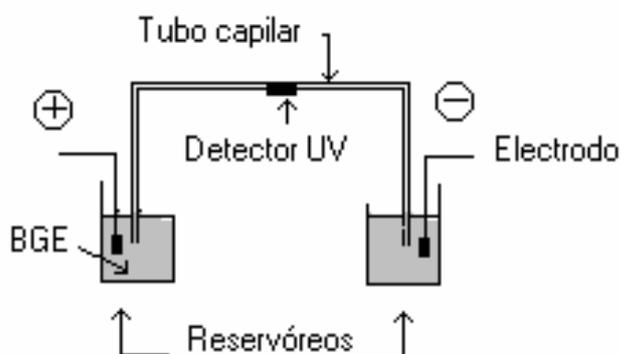
detección, fue necesario aplicar volúmenes grandes de inyección de muestra, resultando esto en el fenómeno denominado sobrecarga de muestra (*sample overloading*) muy conocido y analizado en la literatura actual (Poppe, 1992; Khun y Hoffstetter-Khun, 1993; Kenndler, 1998a).

Estos trabajos muestran que aunque el principio general de la electroforesis capilar por zona (CZE) se conocía desde muchos años atrás, dos problemas importantes aún no se habían resuelto en vísperas de la década de los ochenta, los cuales estaban asociados con la baja sensibilidad de los sistemas de detección para tubos de vidrio de diámetro pequeño y con la presencia de la electroósmosis. En este sentido, Jorgenson y colaboradores (Jorgenson y Lukacs, 1981a y b y 1983) ayudaron a lograr el rápido desarrollo de esta metodología. En efecto, en lugar de suprimir la electroósmosis usando capilares eléctricamente inertes, estos autores utilizaron la ventaja del perfil de velocidad casi plano originado por el flujo electroosmótico (EOF) en los capilares de sílice de diámetro interno muy pequeño, para mover los analitos a través del capilar con una dispersión menor que la que se observada en la cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En los años siguientes se realizaron muchos avances con respecto a los sistemas de detección y al desarrollo de métodos y protocolos de separación, con especial aplicación a compuestos biológicos y farmacéuticos (Khun y Hoffstetter-Khun, 1993). En efecto, esta ventaja diferencial del EOF se trata de explotar en la moderna electrocromatografía que está en intensivo desarrollo en la actualidad (ver, por ejemplo, Altria, 1999; Breadmore *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Xiang y Horvath, 2002; Ro *et al.*, 2003; Allen y El Rassi, 2003; Spegel *et al.*, 2003; Pesek *et al.*, 2004).

Desde fines de la década de 1980, cuando aparecieron comercialmente los equipos de electroforesis capilar, la información sobre esta técnica analítica relativamente nueva creció casi exponencialmente. Al comienzo de 1990, los principales descubrimientos en este campo se realizaron especialmente en los laboratorios de química analítica, pero actualmente, esta ciencia separativa además está logrando gran impacto en los laboratorios de química clínica (ver, por ejemplo, Kleparniak y Bocek, 1991; Xu, 1995; Lehmann *et al.*, 1996; Guzman *et al.*, 1997; Perret, 1999; Shihabi, 2000; Hempel, 2003).

De los diferentes modos posibles de la CE (es decir, electroforesis capilar por zona, CZE; isoelectroenfoque capilar, CIEF; electroforesis capilar en gel, CGE; isotacoforesis capilar, CITP; cromatografía capilar electrocinética micelar, MECC; cromatografía capilar quiral, CCC y electrocromatografía capilar, CEC), en particular la CZE es el modo más

sencillo y más ampliamente usado. Básicamente, se utiliza un capilar de sílice fundida con un diámetro interno comprendido entre 10-100  $\mu\text{m}$  y una longitud total variable entre 25-100 cm, lleno con una solución electrolítica de base (BGE), con los extremos inmersos en dos viales que contienen esta misma solución. La muestra se introduce en el capilar de diferentes maneras, por ejemplo: hidrodinámicamente (por presión o vacío), o electrocinéticamente (utilizando un voltaje bajo). Para lograr la separación se aplica un voltaje adecuado, sustancialmente alto (entre 5 y 30 kV) y los analitos migran con diferentes velocidades a través del sistema hasta alcanzar el detector UV, el cual registra la absorbancia (proporcional a la concentración del analito detectado) en función del tiempo de migración del analito. La movilidad efectiva de cada analito está determinada por: (a) la movilidad electroforética del analito, que como primera aproximación, se puede decir que es proporcional a la relación carga eléctrica / fricción hidrodinámica y (b) el EOF, el cual depende de las propiedades del BGE y la interacción de éste con la pared del capilar (Heiger, 1992; Blanc *et al.*, 1997; Berli *et al.*, 2003). En la Figura I-1 se muestra un esquema de un sistema de CE con los componentes básicos.



**Figura I-1.** Esquema de un sistema de CE con los componentes básicos.

En la actualidad la CE se está desarrollando rápidamente y muestra ventajas significativas sobre las técnicas separativas tradicionales como HPLC, electroforesis en gel, etc. Las características inherentes como la selectividad en la separación, el volumen de muestra pequeño, la velocidad alta de análisis, la eficiencia alta, el consumo bajo de reactivos y la recuperación alta, hacen a la CE atractiva para resolver diferentes problemas analíticos. Una de las ventajas relevantes es la aplicación en diversas disciplinas, tales

como: química clínica, química forense, química de alimentos, bioquímica, ciencia farmacéutica, neurociencia, biología molecular y ciencia ambiental. En este sentido los trabajos publicados en la última década son numerosos (ver, por ejemplo, Chen *et al.*, 1991; Grossman y Colburn, 1992; Guzman, 1993; Jandik y Bonn, 1993; Khun y Hoffstetter-Khun, 1993; Monnig y Kennedy, 1994; Jellum, 1994; Xu, 1995; Rogan y Altria, 1995; Lehmann *et al.*, 1996; Novotny, 1996; Vogt *et al.*, 1997; Heegaard *et al.*, 1998; Perrett, 1999; Castagnino, 1999; Altria, 1999; Shihabi, 2000; Boone *et al.*, 2001; Guzman y Stubbs, 2001; Morales, 2002; Tavares *et al.*, 2003; Hempel, 2003; Jia, 2005; Kraly *et al.*, 2006).

En efecto, la CE demostró ser útil en separaciones de aminoácidos, drogas quirales, vitaminas, pesticidas, iones inorgánicos, ácidos orgánicos, colorantes, tensoactivos, péptidos, proteínas, carbohidratos, partículas virales y oligonucleótidos (ver, por ejemplo, Deyl y Rohlicek, 1989; Guttman *et al.*, 1990; Guzman *et al.*, 1991; Thormann *et al.*, 1991 y 1992; Issaq *et al.*, 1992; Lee y Yeung, 1992; Schmutz y Thormann, 1993; Purcell *et al.*, 1993; Strege y Lagu, 1993a y b; Hernandez *et al.*, 1993a, b y c; Schwartz *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994; Schwartz y Pritchett, 1994; Sahin *et al.*, 1995; Schwartz y Guttman, 1995; Oefner, 1995; Shi *et al.*, 1995; Catagnola *et al.*, 1995; Dolník y Dolníková, 1995; Nuñez *et al.*, 1995; Xu, 1995; El Rassi, 1996; Choi y Jo, 1997; Doelman *et al.*, 1997; Lucangioli *et al.*, 1997; Pesek y Matyska, 1997; Walker *et al.*, 1997; Kunkel *et al.*, 1997; Kobol *et al.*, 1997; Guzman *et al.*, 1997; Hage *et al.*, 1998; Bossuyt *et al.*, 1998; Barbas *et al.*, 1998; Chapman y Hobbs, 1999; Petrini *et al.*, 1999; Shimizu y Kenndler, 1999; Adam *et al.*, 1999; Cotton *et al.*, 1999; Dolník, 1999; Manabe, 1999; Mario *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2000; Engelhardt y Grosche, 2000; Jonsson *et al.*, 2001; Hu, 2001 y 2002; Hu y Dovichi, 2002; Righetti *et al.*, 2002; Stellwagen y Stellwagen, 2002; Picó *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2003; Tavares *et al.*, 2003; Timerbaev, 2004; Soga *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Quigley y Dovichi, 2004; Vizioli, *et al.*, 2004 y 2005; Yeh y Hummer, 2004; Cerutti *et al.*, 2005; Luconi *et al.*, 2006; Babay *et al.*, 2006). Más recientemente, la CE se utilizó para el diagnóstico de enfermedades genéticas e intensivamente en el Proyecto del Genoma Humano (Gelfi *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1996; Meagher *et al.*, 2005). Es importante señalar que las referencias bibliográficas se presentan aquí como una guía básica para el lector, sin indicar por ello que la citación es exhaustiva.

Es relevante mencionar que la introducción de la instrumentación moderna y el más reciente uso de las microcomputadoras hicieron posible la comparación entre los resultados

experimentales y las teorías de una manera más eficiente y rápida. En este sentido, se generaron programas computacionales para simular y verificar muchos aspectos de la teoría (ver, por ejemplo, Bier *et al.*, 1983; Saville y Palusinski, 1986; Palusinski *et al.*, 1986; Mosher *et al.*, 1989, Mosher *et al.*, 1992; Mosher, Saville y Thormann, 1992; Dose y Guiochon, 1991; Poppe, 1990; Reijenga y Kenndler, 1994a y b; McGuffin y Tavares, 1997) logrando de esta manera el perfeccionamiento de las bases teóricas y la profundización del conocimiento acerca de los fenómenos de la CE. Es interesante observar que en general se desea predecir y estudiar los efectos que se producen en la separación de analitos con cierto detalle, tratando de disminuir el número de experimentos, los cuales se programan luego apropiadamente sobre la base de estos resultados. No obstante, la mayoría de estos modelos y programas son significativamente complejos y en muchos de ellos se introducen parámetros empíricos que no tienen aplicación y/o validez general.

En este sentido, se observa que un modelo amplio de la CZE debe incluir los procesos físicos y químicos relevantes que contribuyen a la migración y dispersión de un soluto en el sistema. En la práctica, sin embargo, las ecuaciones diferenciales asociadas no se pueden resolver analíticamente sin aproximaciones apropiadas en una forma consistente o “cerrada”. En efecto, generalmente estas ecuaciones se resuelven por métodos numéricos realizando simplificaciones adecuadas. Por ejemplo, algunos modelos consideran la migración electroforética solamente (Mikkers *et al.*, 1979a y b), mientras que otros, incluyen procesos adicionales como difusión molecular y electrodifusión, convección (Dose y Giochon, 1991), equilibrio químico y varias combinaciones de estos (Reijenga y Kenndler, 1994a; Andreev y Lisin, 1993).

Como consecuencia de estas hipótesis simplificatorias, se comprueba que los modelos clásicos no siempre proveen una descripción completa de los fenómenos de transporte en los sistemas electroforéticos. Paralelamente, como las ecuaciones diferenciales se derivan a partir de principios y propiedades macroscópicas, se generan modelos inadecuados para describir el transporte en sistemas complejos que son heterogéneos a niveles microscópico y molecular (Hopkins y McGuffin, 1998).

En general, un modelo de la CZE sirve para diferentes propósitos, y dependiendo de ellos, se pueden considerar una variedad amplia de fenómenos. Con relación a este último aspecto, Poppe (1998) discutió los conceptos de modelo no-ideal y lineal en la CZE, los cuales podrían generar un marco de referencia donde el tratamiento matemático se

vuelve accesible de análisis sin entrar en cálculos matemáticos complejos. Teniendo en cuenta estos aspectos, un modelo puede servir también para realizar los cálculos adicionales necesarios con el fin de llegar a conclusiones cuantitativas de interés en la práctica profesional. En este sentido, Saville y Palusinski (1986) presentaron un estudio computacional relevante involucrando polianfolitos en general que sirvió como base para numerosos trabajos.

Consecuentemente, considerando la discusión previa, el propósito de esta Tesis es presentar, en principio, un modelo básico de la CZE no-ideal y lineal (estos conceptos se retoman y analizan más adelante en los Capítulo 1 y 2), que contribuya al desarrollo de métodos y protocolos electroforéticos apropiados en las separaciones prácticas (ver, por ejemplo, Jandik y Bonn, 1993; Khun y Hoffstetter-Khun, 1993; Grossman y Colburn, 1992). En adición, se espera que la ampliación del modelo básico (modelos extendidos) sirva para realizar estudios teóricos y análisis de fenómenos fisicoquímicos relevantes involucrados en la CZE. Es importante mencionar que a través de los modelos propuestos se espera estimar propiedades como la carga eléctrica efectiva, el radio hidrodinámico, la hidratación, la forma, el potencial de partícula, etc., de analitos con diferentes grados de complejidad, en particular proteínas, péptidos y aminoácidos, los cuales son de interés y centro de intensa investigación en la actualidad.

A pesar de que los modelos propuestos en esta Tesis se basan en principios fundamentales y ecuaciones dinámicas rigurosas, los mismos resultan relativamente simples de computarizar y usar en el laboratorio (ver, por ejemplo, Piaggio y Deiber, 2003; Piaggio *et al.*, 2005a, 2006a, 2007a y b). En el modelo básico, las variables que se consideran son: el tiempo de inyección de la muestra y la distancia de detección del analito, el campo eléctrico aplicado, el tiempo de migración del analito, los  $pK_s$  de los analitos, el pH y la fuerza iónica de la solución electrolítica, el diámetro y la longitud total del capilar, el potencial zeta del capilar, la temperatura y la fracción másica relativa de los analitos, incluyendo en adición otros aspectos específicos de cada caso particular en estudio, principalmente con relación al tipo de analito.

Consecuentemente, el código numérico que se elabora con el modelo es capaz de predecir el efecto que tiene sobre la resolución del electroferograma, la variación de cualquiera de los parámetros citados anteriormente (Piaggio y Deiber, 2001). Esto sirve como parte integral de una estrategia de optimización para buscar e identificar las condiciones más favorables en una separación. Por consiguiente, en el Capítulo 3 de la

Parte II, se muestra la capacidad de predicción del modelo básico propuesto en esta Tesis mediante la realización de un estudio con analitos cargados de bajo peso molecular (en particular, drogas y aminoácidos). Los datos experimentales que se obtienen a partir de un equipo comercial de CE se usan para validar las predicciones teóricas. En términos prácticos, es relevante mencionar que el uso de modelos para la separación de analitos mediante la CZE permite disminuir sustancialmente el tiempo de experimentación y evita las aproximaciones de prueba y error, a las que usualmente están sometidos los usuarios de la CE.

Es importante indicar, como se mencionó más arriba, que el modelo básico propuesto, puede ser expandido en sus capacidades permitiendo así la estimación de parámetros fisicoquímicos como: el radio hidrodinámico, el coeficiente de difusión, la carga efectiva, la hidratación, la forma y el potencial zeta del analito. Para tal fin, se necesita conocer la movilidad electroforética o el tiempo de migración del analito; estos datos se obtienen fácilmente a partir del electroferograma experimental. Es significativo señalar que estos aspectos no han sido explotados y/o considerados enteramente en trabajos previos del modelado de la CZE. Corresponde también mencionar, que el programa computacional del modelo básico propuesto, además se puede usar ventajosamente como herramienta pedagógica y profesional para examinar el efecto de la variación de los distintos parámetros sobre la separación de analitos, debido a que mediante el ingreso de tres bloques de datos (ver la Sección 2.6 en el Capítulo 2) se obtiene en principio la simulación del electroferograma. Luego es posible realizar perturbaciones en el modelo, por ejemplo variaciones pequeñas en el pH y la  $I$ , (ver Capítulo 3 en la Parte II) y observar, en consecuencia, los cambios más convenientes que se deben introducir en dichos parámetros para lograr la resolución deseada en la separación.

Con relación al desarrollo de los modelos propuestos en esta Tesis y para visualizar más claramente la estrategia metodológica, se consideran en primer lugar, las ecuaciones de balance de las propiedades fisicoquímicas más relevantes que son el marco de referencia para obtener las ecuaciones específicas que se usan tanto en el modelo básico como en los modelos extendidos y en las aplicaciones. Estas ecuaciones se presentan en forma general, para luego aplicarlas específicamente en la descripción del EOF y de la migración electroforética de los analitos. Se presentan así las ecuaciones de balances de masa y de cantidad de movimiento de soluciones electrolíticas acopladas a efectos térmicos y eléctricos. Asimismo, se consideran los balances de energía, carga eléctrica y especies

iónicas, partiendo de la bibliografía fundamental del tema (ver, por ejemplo, Probst, 1989; Russel *et al.*, 1989). A través de las ecuaciones propuestas se describen y cuantifican los fenómenos electrocinéticos básicos que permiten evaluar con cierta aproximación el electroferograma de un analito o de una mezcla de analitos que deben ser separados mediante la CZE. En este sentido, los distintos aspectos que considera el modelo y el programa computacional se analizan desde el punto de vista teórico y se validan experimentalmente. En efecto, los aspectos fenomenológicos de la CZE que se consideran en el Capítulo 2 son: la inyección de la muestra, el flujo electroosmótico, el potencial zeta del tubo capilar, la migración electroforética, la carga eléctrica efectiva, la detección axial de analitos, los fenómenos dispersivos y su incidencia en la resolución de detección. Por consiguiente, el denominado modelo básico se presenta de manera general en la Parte I de esta Tesis. Luego, en la Parte II, partiendo de este desarrollo generalizado, se consideran distintos niveles de complejidad, mediante la introducción de nuevos conceptos y modificaciones que expanden y mejoran las capacidades del modelo básico generándose así modelos extendidos, útiles para las aplicaciones específicas. Es decir, se usa el modelo extendido más adecuado según los diferentes tipos de analitos de interés y las motivaciones particulares del análisis. Los analitos propuestos para el estudio a través de los modelos abarcan: drogas, proteínas, péptidos y aminoácidos. Se destaca como relevante en la investigación propuesta que la CE es una metodología relativamente nueva, con un crecimiento vertiginoso y con aplicaciones en diferentes áreas de interés práctico. En adición a la contribución que esta investigación puede brindar para la puesta a punto de diferentes protocolos experimentales, se destaca fundamentalmente su aplicación en el estudio y en el análisis de parámetros fisicoquímicos como: radio hidrodinámico, carga efectiva, coeficiente de difusión, coeficiente de fricción, hidratación,  $pK$  efectivos, etc., de diferentes tipos de analitos de interés bioquímico y biotecnológico.

# Objetivos

---

---

Considerando la introducción general breve acerca de la CZE y el contexto amplio de las aplicaciones señalado en la sección anterior, se mencionan a continuación los siguientes objetivos principales de la Tesis:

- 1.** Análisis y revisión de los conceptos teóricos fundamentales involucrados en la CZE. Encuadre del modelo dentro de las ecuaciones fisicoquímicas de balances de masa, carga eléctrica, densidad numérica de iones, energía y cantidad de movimiento. Descripción cuantitativa de las fenomenologías básicas.
- 2.** Elaboración de un modelo básico de la CZE factible de ser usado en el laboratorio con el fin de producir protocolos de separación eficientes con buena resolución. Generación del código numérico computacional necesario para este fin.
- 3.** Relación de los aspectos formulativos y de las predicciones teóricas con los resultados de la experimentación.
- 4.** Ampliación del modelo básico incorporando fenómenos complejos adicionales y generando así modelos extendidos para aplicaciones específicas. Presentación de alternativas de análisis teóricos y estrategias computacionales.
- 5.** Extracción y análisis de la información que brinda el electroferograma de una separación mediante la CZE, con el propósito de estimar a través de los modelos formulados los parámetros fisicoquímicos que permiten caracterizar diferentes analitos.
- 6.** Uso de los modelos propuestos en aplicaciones de interés bioquímico y biotecnológico, con especial énfasis en la caracterización de proteínas, péptidos y aminoácidos. Análisis de los procesos de desnaturalización y estabilidad de proteínas.

# **PARTE I**

## **Desarrollo y descripción del modelo básico**

# Capítulo 1

## Modelado de la Electroforesis Capilar por Zona

---

---

### 1.1 Análisis de diferentes modelos y estudios de la CZE presentados en la literatura

La revisión de la literatura sobre el tema indica que existen diferentes clasificaciones de los modelos que se aplican a la CZE. En general, se observa que es necesario distinguir entre los modelos teóricos basados en fundamentos fisicoquímicos y los programas computacionales que hacen uso de modelos teóricos simplificados junto con correlaciones semiempíricas.

McGuffin y Tavares (1997) señalaron que aunque las separaciones electroforéticas se realizan experimentalmente, el desarrollo teórico de métodos de optimización sistemáticos de protocolos se transformó en una importante y creciente área de interés. Estos autores adaptaron para la CZE el esquema de clasificación descrito previamente para la cromatografía. En este esquema de clasificación de los métodos de optimización se distinguen cuatro categorías generales: métodos simultáneos, secuenciales, de regresión y teóricos. En efecto, cada uno de estos métodos presenta ventajas y limitaciones para la optimización de los parámetros relevantes en las separaciones electroforéticas.

Por ejemplo, en los métodos simultáneos se seleccionan los parámetros del protocolo que se van a modificar y sus niveles de variación. El número de experimentos que se realizan depende del número de parámetros y los niveles previamente definidos. Es claro entonces que en un diseño factorial completo (*full factorial*) para  $n$  parámetros y  $q$  niveles se requerirán  $q^n$  experimentos. Por el contrario, en los métodos secuenciales se desarrollan unos pocos experimentos iniciales a niveles seleccionados de los parámetros. Luego, sobre la base de los resultados de estos experimentos se usa una rutina de búsqueda iterativa para dirigir y guiar los experimentos subsecuentes hacia las condiciones óptimas. Es decir, los métodos simultáneos y secuenciales que se mencionaron antes, debido a que derivan directamente de datos experimentales, no dependen de un método teórico o fisicoquímico para localizar el óptimo. Esto resulta una ventaja en la CE donde los efectos de los parámetros individuales no siempre se comprenden bien, o eventualmente, puede ser

complicado el análisis debido a la interacción con otros parámetros. La limitación más importante de los métodos simultáneos es que el número de experimentos crece rápidamente con el número de parámetros y niveles. No obstante, este problema se evita si se usa un diseño factorial fraccionado, aunque es posible que se pierda información importante sobre la interacción entre parámetros. A pesar de que los métodos secuenciales requieren un número menor de experimentos para llegar al óptimo, el número exacto es indeterminado. Además, para las superficies de respuesta que consisten de varios máximos o mínimos locales, un óptimo local se puede identificar erróneamente como un óptimo global. Finalmente, si se considera que la separación sólo se evalúa en puntos seleccionados, los métodos secuenciales proveen una visión limitada de la superficie de respuesta.

En los métodos de regresión, se desarrollan unos pocos experimentos a niveles seleccionados de los parámetros y los datos se ajustan a una ecuación matemática predefinida. Una vez que se determinan los coeficientes de regresión, esta ecuación se usa para estimar la calidad de la separación de todos los valores intermedios de los parámetros. Se aplican luego, algoritmos numéricos o procedimientos gráficos tales como un diagrama de ventana o un mapa de resolución solapado para determinar el “valor óptimo” de los parámetros. Ejemplos de este tipo de aplicación se encuentran en diversos trabajos (ver, por ejemplo, Smith y Khaledi, 1993; Friedl y Kenndler, 1993). En estos estudios la movilidad electroforética efectiva se predice por medio de ecuaciones de regresión. No obstante, debido a la falta de modelos para la migración electroosmótica y la descripción incompleta de los procesos dispersivos, la resolución u otros criterios de calidad no se pueden evaluar con exactitud. Estas limitaciones se han superado en otras simulaciones desarrolladas por Reijenga y Kenndler (1994a) las cuales incluyen modelos para los procesos relevantes de migración y de dispersión. Sin embargo, a pesar de que estas simulaciones se validaron experimentalmente (Reijenga y Kenndler, 1994b) estos resultados aún no son suficientes para el uso en optimizaciones sistemáticas de las separaciones electroforéticas. Más recientemente, Jalali-Heravi *et al.* (2005a y b) usaron redes neuronales como una extensión más sofisticada de los métodos de regresión, donde ciertas correlaciones semiempíricas de variables fisicoquímicas son necesarias.

Los métodos teóricos usan ecuaciones matemáticas derivadas a partir de la fisicoquímica y los fenómenos de transferencia para describir el efecto que tienen los parámetros del protocolo en la separación óptima de analitos. Estas ecuaciones tienen

generalmente un sustento riguroso y se derivan de leyes generales y ecuaciones de balance de propiedades bien definidas. En efecto, la diferencia importante con los métodos antes mencionados es que las ecuaciones se obtienen, en principio, sin el uso de correlaciones semiempíricas. Los métodos teóricos y de regresión tienen varias ventajas y limitaciones distintivas. Estos métodos se basan en modelos matemáticos, por lo tanto la confiabilidad de la predicción de las condiciones óptimas depende de la exactitud del modelo que los sustenta. El desarrollo y validación de estos modelos permite visualizar los procesos relevantes de migración y dispersión, y se pueden hacer extensivos a sistemas de la CZE que varían en protocolos y geometrías.

En este sentido, McGuffin y Tavares (1997) desarrollaron un programa computarizado para la optimización sistemática de separaciones electroforéticas. El programa incorpora una combinación de los modelos de regresión y teóricos mencionados anteriormente para la migración electroforética y electroosmótica como así también una racionalización simple para la dispersión zonal. Estos autores demostraron la validación experimental del programa aplicándolo a una mezcla de nucleótidos en soluciones *buffer* de fosfatos (ver también, Hopkins y McGuffin, 1998). En general, la hibridación entre modelos de regresión y teóricos proporciona resultados variados. A medida que predomina el primer tipo de modelo la capacidad predictiva se pierde y el modelo resultante deja de tener una validez generalizada y flexibilidad conceptual.

Desde otra perspectiva, se puede mencionar la clasificación que presentaron Reijenga y Kenndler (1994a) sobre los programas computarizados que simulan las técnicas separativas. En esta propuesta se distinguen tres categorías, cada una con sus propios propósitos y requerimientos específicos. Estas categorías son:

(I) Fundamental. El modelo que se incorpora al programa computacional debe ser exacto en todos los detalles fisicoquímicos, describiendo la dinámica de los procesos electroforéticos tanto en estado transitorio como en estado estacionario. La propuesta de esta Tesis se enfoca fuertemente en esta dirección.

(II) Optimización. El programa debe ser rápido y proveer una predicción bastante exacta de la separación basada en valores de la literatura y en experimentos previos. Aquí se ubican, por ejemplo, las propuestas de Gaš *et al.* (2001) y Jaroš *et al.* (2002). En general, se aplican a determinaciones prácticas que no exigen una exactitud demasiado elevada; solo se esperan predicciones que se aproximan a los valores reales y que ayudan a la selección más adecuada de los parámetros operacionales.

(III) Instrucción. El programa deber ser rápido, flexible, “amigable” para los usuarios y tener gráficas de salida y valores predictivos razonables. Usualmente son del tipo “caja negra” (*blackbox*) y están muy orientados a la enseñanza. En efecto, estos programas permiten una rápida evaluación de los cambios que se realizan sobre los parámetros operacionales y simultáneamente un análisis del efecto de los mismos sin gasto de tiempo o dinero.

En este sentido, Reijenga y Kenndler (1994a) desarrollaron un programa simulador (situado en las categorías II y III) que permite una ilustración gráfica y rápida del efecto de un gran número de variables sobre la forma del electroferograma (ver, para más detalles de las bases teóricas en las que se sustenta este modelo, Reijenga y Kenndler, 1994a, y las referencias allí incluidas). Con este propósito se simularon, los dos procesos que determinan el resultado electroforético (electroferograma): la migración y la dispersión. El tiempo de migración se derivó directamente de la movilidad aparente, que comprende la movilidad efectiva de los analitos y la movilidad electroosmótica del BGE, a valores de pH y fuerza iónica  $I$  específicos. Para describir el efecto de distorsión de la forma del pico de detección, los autores usaron el modelo de la altura de plato teórico. En este sentido, consideraron los factores más importantes que afectan el resultado final. En efecto, se incluyeron variables instrumentales tales como las dimensiones y el material del capilar, el voltaje, la intensidad de corriente y la temperatura. Las propiedades fisicoquímicas del BGE y de la muestra forman la base principal de los cálculos. También empíricamente se incluyeron los efectos extra-columna que surgen de la inyección (como sobrecarga de muestra y enfocado) y de la detección, además de los efectos dispersivos que resultan de fenómenos tales como la difusión, la electroósmosis, la electromigración y la producción de calor por efecto Joule.

Es posible señalar que el valor predictivo de este modelo es aceptable, aunque está limitado por la incertidumbre de los datos de ingreso, como lo mencionan los mismos autores, (en especial, las circunstancias en que fueron medidos los  $pK$  y las movilidades) y además, debido a que la fuerza iónica solo se tiene en cuenta de una manera aproximada.

En este contexto también se puede mencionar el trabajo de Ermakov y Righetti (1994) que utilizaron una simulación computarizada aplicada a la cuantificación y descripción de la forma de picos en la CZE. Esta es la primera vez que una propuesta de “química seca”, previa a las corridas reales “húmedas”, se desarrolla bajo condiciones experimentales verdaderas de la CZE, como se hace típicamente en HPLC.

Recientemente, Gaš *et al.* (2001) presentaron un modelo matemático y computacional para la optimización del BGE en separaciones de aniones mediante la CZE. El modelo considera iones mono-, di- o trivalentes y permite el modelado de electrolitos altamente ácidos y alcalinos. Las relaciones matemáticas del modelo están formuladas para permitir una fácil algoritmización y programación en lenguaje computacional. Estos autores señalaron que los procesos separativos en la CE son inherentemente de naturaleza no-lineal. Esta característica de la CE hace difícil diseñar adecuadamente los sistemas de separación y comprender los posibles fenómenos dispersivos. En este sentido, la dispersión por electromigración en la CZE es uno de los fenómenos dispersivos no-lineales. Este fenómeno provoca dispersión y deformaciones de las formas de los picos decreciendo así significativamente la eficiencia de la separación. En el caso en que la resolución de la separación es suficiente, se observa que la dispersión por electromigración no deteriora el análisis sino que simplemente ensancha los picos (disminuye la eficiencia pero no necesariamente la selectividad). Sin embargo, en muchos análisis de importancia práctica un analito en concentración relativamente baja puede no ser detectado al estar presente en un medio de concentración relativamente alta. En efecto, en esta situación la excesiva dispersión de los picos en el medio puede cancelar el pico del analito y no permitir su detección. En general, los diferentes sistemas electrolíticos tienen una tendencia variable para causar dispersión por electromigración. Por consiguiente, encontrar un sistema electrolítico adecuado es un problema de “conciliación”, de tal manera de elegir aquel donde la sensibilidad de detección es máxima y a su vez la dispersión por electromigración es mínima. Tanto la teoría como la práctica demuestran que tales electrolitos se pueden encontrar y formular. En este sentido, el modelo propuesto por Gaš *et al.* (2001) permite la evaluación de la tendencia de un analito de sufrir dispersión por electromigración y permite la optimización de la composición del BGE para alcanzar una buena sensibilidad de detección manteniendo las propiedades dispersivas en un rango aceptable.

Posteriormente, Jaroš *et al.* (2002), presentaron un modelo matemático y computacional que fue adaptado, algoritmizado y preparado para el uso como un programa computacional al que denominaron *PeakMaster*. El modelo permite la optimización de sistemas de BGE para la CE. A diferencia del modelo presentado por Gaš *et al.* (2001), este modelo tiene en cuenta la dependencia de la movilidad iónica y la disociación de los electrolitos débiles con la fuerza iónica. El modelo calcula la movilidad efectiva de los analitos y predice parámetros del sistema que son experimentalmente accesibles. Además

el modelo permite la evaluación de la tendencia de un analito a sufrir dispersión por electromigración que genera ensanchamiento del pico. La adaptabilidad del modelo se verifica por comparación de los resultados computacionales con los experimentos. Asimismo, el modelo descrito por Jaroš *et al.* (2002) permite reconocer y evaluar el fenómeno que se manifiesta con la aparición de nuevos picos llamados *eigenpeaks*, señalados también anteriormente por Poppe (1992).

Nuevamente, es importante recordar que el proceso separativo en la electroforesis para concentraciones de analito relativamente altas es de naturaleza no-lineal desde el punto de vista matemático. Este hecho hace difícil diseñar adecuadamente los sistemas de separación electroforética y predecir su comportamiento. En consecuencia, se encuentran en la literatura distintos modelos que consideran este aspecto principalmente asociado con el fenómeno de electromigración (Gebauer y Boček, 1997; Beckers y Boček, 2000; Beckers *et al.*, 2001).

En este sentido es relevante señalar que los resultados que surgen de la aplicación de un modelo se pueden usar para un análisis complejo de electroferogramas, permitiendo entender caracteres distintivos. Asimismo modificando los datos que se ingresan al programa, es posible optimizar las condiciones experimentales para finalmente conseguir la separación deseada de los analitos.

En síntesis se considera que la simulación computarizada del comportamiento de los sistemas electroforéticos es una herramienta poderosa. En consecuencia, si se modifican los parámetros que se ingresan al programa, principalmente la composición del BGE, se obtiene una idea acerca de los resultados que se lograrán en el laboratorio. Es decir, después de encontrar las opciones más adecuadas, el comportamiento real de los sistemas se puede verificar en la práctica. De esta manera el usual ensayo de prueba y error se reemplaza por una simulación computarizada más rápida y eficiente. Por otro lado, la simulación numérica/computarizada también explica algunos fenómenos no esperados que aparecen en la práctica, como los sistemas de picos extraños, la inusual deformación de algunos picos, polaridades no esperadas de la señal del detector, etc.

Todas las características enumeradas en el párrafo anterior se alcanzan efectivamente solo si las simulaciones computarizadas trabajan en forma correcta y precisa. Lo que aún es un problema que persiste, a veces, es la incertidumbre de los datos físicoquímicos básicos para los compuestos químicos. Mientras los  $pK$  en la mayoría de los casos son confiables (pueden diferir ligeramente según la fuente, en particular para

aminoácidos y proteínas), los datos de movilidades frecuentemente no se encuentran disponibles en la literatura o difieren de las condiciones exactas requeridas para la simulación.

Chatterjee y Keating (2003) mencionaron que las aplicaciones actuales de la CE están típicamente caracterizadas por la presencia de un número alto de fenómenos físicos. En adición, el permanente incremento de las complejidades que aparecen en las aplicaciones, hace que el modelado práctico o real de los electroferogramas sea una tarea desafiante. Estos autores propusieron un modelo matemático y computacional amplio aplicable a diferentes técnicas de la CE. La estrategia que utilizaron está organizada en el sentido de generalizar sin tener que hacer uso de hipótesis restrictivas tales como simplicidad en la geometría, presencia única de analitos fuertes o analitos débiles, etc. Estos autores tratan de proveer una herramienta de simulación para aplicaciones reales y de uso práctico en la CE. Aunque reportaron simulaciones del modelo, los resultados no se compararon con datos experimentales; no obstante señalaron que coinciden con los presentados por Palusinski *et al.* (1986), (ver también, Chatterjee y Jafri, 2003). Es pertinente señalar que el uso práctico de esta propuesta no es simple ciertamente y se deberían validar aplicaciones que consideren casos específicos.

En este contexto, es posible mencionar que muchos de los trabajos que aparecen en la literatura se focalizan o limitan a aspectos individuales del fenómeno físico, con numerosas hipótesis simplificadoras (ver, Chatterjee y Keating, 2003). Por ejemplo, un número alto de publicaciones se centra exclusivamente en el modelado del flujo electroósmótico (ver por ejemplo, Patankar y Hu, 1998; Potocek *et al.*, 1995). Estos trabajos, aunque son interesantes, son estudios “puramente” fluido-dinámicos en el sentido de que no tienen en cuenta la presencia de los analitos en el sistema. Otros, prestan su atención al transporte y comportamiento de determinados analitos en un sistema electrolítico, pero están por ejemplo, restringidos al caso de analitos fuertes, es decir formas iónicas puras con una carga fija (ver, Saville y Palusinski, 1986 y Palusinski *et al.*, 1986). Por otro lado, Mosher *et al.* (1989) presentaron un modelo matemático del comportamiento electroforético de proteínas en geometrías simples con similares restricciones. Más recientemente, como se describió arriba, Gäs *et al.* (2001) presentaron un modelo computacional para la optimización del BGE en la CZE, sin embargo, este modelo desprecia el efecto de difusión y es limitado en relación con el número y tipo de analitos y el proceso que se modela.

En adición, se puede citar como ejemplo específico de modelado y predicción de las movilidades electroforéticas, el modelo que presentan McKillop *et al.* (1999), que se aplicó a la separación mediante CE de una serie de alquilpiridinas estrechamente relacionadas. En este caso se usó un modelo semiempírico que introduce el concepto de orientación preferencial bajo la influencia del campo eléctrico aplicado. Esto significa que los analitos con los mismos volúmenes de van der Waals presentan radios hidrodinámicos efectivos diferentes para moverse a través de la solución *buffer*. Asimismo, Quang y Khaleedi (1994) utilizaron un modelo empírico-semiempírico para predecir movilidades y tiempos de migración. Este tipo de propuesta se usa para una rápida optimización de la separación basada en un número limitado de condiciones experimentales. También, es pertinente mencionar a Wren y Rowe (1992), quienes desarrollaron un modelo teórico, el cual usa parámetros fisicoquímicos para describir y optimizar el caso particular de separaciones quirales. Modelos similares desarrollaron Penn *et al.* (1994) y Cooper *et al.* (1994) y los aplicaron a drogas enantioméricas y aminoácidos, respectivamente. Igualmente, Britz-McKibbin y Chen (1997) predijeron el comportamiento migratorio de analitos (un grupo de deoxiribonucleótidos) en la CE con el agregado de aditivos tales como  $\beta$ -ciclodextrinas, considerando tres parámetros fundamentales: la movilidad electroforética del analito, la movilidad electroforética del complejo analito-aditivo y la constante de equilibrio. Estos autores determinaron así las condiciones óptimas de separación con estos tres parámetros fundamentales.

Más recientemente, Liu *et al.* (2002) presentaron una alternativa interesante para predecir y evaluar la calidad de separaciones en la CE. La propuesta consiste en simular los procesos a través del uso de redes neuronales artificiales (ANNs). Estas ANNs son un tipo de herramienta de modelado computacional, que se definen como estructuras reducidas de neuronas artificiales adaptativas interconectadas que son capaces de desarrollar computaciones masivas en forma paralela para el procesamiento de información y representación de datos. Debido a su naturaleza de no-linealidad y alto paralelismo y robustez, en la actualidad, las ANNs son ampliamente aceptadas en muchas disciplinas para simular problemas verdaderos y complejos.

En el campo de la CE, las ANNs se usaron principalmente en la CZE (ver, Farkova *et al.*, 1999) y en el modo MECC, es decir, en la electroforesis capilar electrocinética micelar (ver, Zhang *et al.*, 2005). Farkova *et al.* (1999) en su trabajo, demostraron que las ANNs se pueden usar para estimar parámetros de picos y que en combinación con diseños

experimentales se aplican para una eficiente predicción de las condiciones óptimas de separación. Aquí, es posible señalar como ventaja diferencial que no se usa un modelo explícito del proceso de separación y no se necesita el conocimiento de las constantes fisicoquímicas, hecho que suele ser limitante en otros modelos como ya se mencionó. No obstante, en el campo de la CZE, su aplicación práctica todavía es limitada.

También, se debe señalar el trabajo reciente de Găs *et al.* (2005) en el cual los autores describieron en detalle el *software*-simulador para la CZE (*PeakMaster*) antes mencionado. Como se expresó, este *software* simula separaciones de la CZE luego que el usuario ingresa los parámetros operacionales y aquellos que caracterizan a la muestra. Los autores aplicaron el modelo a ejemplos seleccionados y los resultados se compararon favorablemente con los experimentos. Sin embargo, este tipo de *software* que presenta fundamentalmente ventajas de utilidad práctica, no permite el cálculo de parámetros fisicoquímicos inherentes al analito, como es posible lograr con el modelo y el programa computacional que constituye la propuesta central de esta Tesis.

Como se aprecia en la descripción general de los modelos reportados en la literatura, existen diferentes alternativas de uso con relación a la complejidad y alcance de los sistemas bajo estudio. Aunque se desarrollaron modelos unificados para describir los diferentes modos de separaciones electroforéticas (Bier *et al.*, 1983; Saville y Palusinski, 1986; Palusinski *et al.*, 1986) en general, estos modelos se aplican a casos particulares y muy específicos de separación o enfatizan el modelado en unos pocos aspectos de la separación mediante la CE. No se encuentra en la bibliografía (a nuestro mejor saber) un modelo relativamente amplio y general de la CZE. Es decir, un modelo que abarque desde iones a macromoléculas teniendo en cuenta variaciones en el BGE y que además considere globalmente el modelado de casi todos los fenómenos implicados en la CZE, sin perder de vista la necesidad de procedimientos relativamente simples involucrando expresiones matemáticas rigurosas y fácilmente adaptables al lenguaje de programación computacional.

## **1.2 Modelo básico de la CZE**

Antes de introducir las ecuaciones fundamentales que definen el marco conceptual para el modelo básico de la CZE propuesto en esta Tesis, es conveniente establecer el nivel de modelado que se presenta aquí. En este sentido, en la Tabla 1.2.1 se observa que es posible considerar tres niveles: Nivel 1, Nivel 2 y Nivel 3. El Nivel 1 se aplica a sistemas concentrados donde los fenómenos dispersivos por electromigración son relevantes.

Corresponde mencionar que en la CZE los sistemas concentrados son menos frecuentes, y en la mayoría de los casos se trabaja en condiciones diluidas. Es claro entonces que en el Nivel 1 se prioriza la descripción de los efectos de deformación de picos causados por la electrodispersión predominante a altas concentraciones de analitos (*fronting - tailing*) y se desprecia la difusión molecular. Por el contrario, el Nivel 2 se aplica a sistemas diluidos, lo cual permite despreciar los efectos dispersivos por electromigración y pone mayor énfasis en la descripción de los efectos de dispersión por difusión molecular. De acuerdo con esta clasificación el modelo propuesto en esta Tesis se sitúa en el Nivel 2 debido a que se consideran los fenómenos difusivos (difusividad del analito  $D_i$ , distinta de cero) y se elimina la electrodispersión (densidad de carga del BGE,  $\rho_e \cong 0$ ) debido a que la condición de dilución es aplicable a los protocolos prácticos de la CZE. Corresponde mencionar que en el Nivel 3 se encuadran los modelos que consideran simultáneamente los fenómenos que se desprecian en los Niveles 1 y 2. Estos modelos son fuertemente no lineales con una alta complejidad computacional. En general no se justifica el esfuerzo puesto en la formulación y computación de estos modelos para considerar estudios de la CZE, teniendo en cuenta que el Nivel 2 tiene hipótesis simples muy adecuadas para sistemas diluidos. Asimismo, los modelos del Nivel 3 no permiten una visualización simple del rol que tienen los diferentes parámetros fisicoquímicos del protocolo en la optimización del electroferograma, debido a que la interpretación de los resultados obtenidos requiere el procesamiento de datos numéricos a través de gráficos paramétricos de casos típicos.

**Tabla 1.2.1.** Niveles típicos del modelado de la CZE.

Modelos	Difusión	Electrodispersión	Fenómenos descriptos
Nivel 1	Ideal $D_i = 0$	No-lineal $\rho_e \neq 0$	Formación de frente y cola del electroferograma (analítico)
Nivel 2	No-ideal $D_i \neq 0$	Lineal $\rho_e \cong 0$	Varios de ellos, principalmente dispersión (analítico y computacional)
Nivel 3	No-ideal $D_i \neq 0$	No-lineal $\rho_e \neq 0$	La mayoría de ellos (computacional)

### 1.3 Ecuaciones fundamentales

Para el desarrollo del modelo básico propuesto en esta Tesis, se consideran en primer lugar, las ecuaciones de balance de las propiedades fisicoquímicas relevantes que son necesarias para modelar el electroferograma en la CZE. Estas ecuaciones se presentan en forma general, para luego aplicarlas rigurosamente en la descripción del EOF y de la migración electroforética de analitos en el Capítulo 2, Secciones 2 y 4, respectivamente. Se estudian así las ecuaciones de los balances de masa y de cantidad de movimiento de soluciones electrolíticas acopladas a efectos térmicos y eléctricos. Asimismo, los balances de energía, carga eléctrica y especies iónicas se consideran partiendo de la bibliografía fundamental del tema (ver, por ejemplo, Probst, 1989; Russel *et al.*, 1989). Para visualizar la estrategia metodológica más claramente, se expresan a continuación las ecuaciones de balances más relevantes que son el marco de referencia a lo largo de toda la Tesis para obtener las ecuaciones específicas usadas en el modelo propuesto.

*Conservación de materia (Ecuación de continuidad)*

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \underline{v}) = 0 \quad (1.3.1)$$

donde  $\rho = \sum_{i=1}^N \rho_i$  es la densidad de mezcla que involucra la densidad  $\rho_i$  de  $N$  especies,  $\underline{v}$  es la velocidad de mezcla y  $t$  indica el tiempo. La densidad de mezcla se considera aproximadamente constante para pequeños cambios de concentración y temperatura que ocurren en el capilar, permitiendo expresar  $\nabla \cdot \underline{v} = 0$ .

*Balance de cantidad de movimiento (Ecuación de Navier-Stokes)*

$$\rho \left( \frac{\partial \underline{v}}{\partial t} + \underline{v} \cdot \nabla \underline{v} \right) = -\nabla p + \eta \nabla^2 \underline{v} + \rho \underline{g} + \rho_e \underline{E} \quad (1.3.2)$$

En la Ec. (1.3.2),  $p$  es la presión,  $\eta$  es la viscosidad de la solución electrolítica,  $\underline{g}$  es el vector gravedad y  $\underline{E}$  es el campo eléctrico. En este trabajo  $e$  indica la carga elemental. Así, la distribución de carga eléctrica por unidad de volumen  $\rho_e = \sum_{i=1}^N e z_i n_i$  en el BGE, que depende de la valencia  $z_i$  del ión y de la concentración numérica  $n_i$  del ión

(lejos de la pared del tubo la concentración del ión es  $n_i^\infty$ ), debe satisfacer el balance de carga como se expresa seguidamente.

*Balance de carga eléctrica (Ecuación de Poisson-Boltzmann)*

$$\varepsilon \nabla^2 \psi = -\rho_e \quad (1.3.3)$$

Se define el campo eléctrico  $\underline{E} = -\nabla \psi$ , donde  $\psi$  es el potencial eléctrico en la solución electrolítica y  $\varepsilon$  es la permitividad eléctrica. Debido a que las leyes de la electrostática son válidas dentro del marco de la CZE, el campo eléctrico se considera irrotacional.

*Balance de energía*

También se necesita el balance de la energía interna del BGE,  $u(T, \rho)$  como una función de la temperatura  $T$  y la densidad  $\rho$ . Debido a que la densidad del BGE es aproximadamente constante (excepto en el término gravedad) se obtiene,

$$\rho C_v \left( \frac{\partial T}{\partial t} + \underline{v} \cdot \nabla T \right) = k \nabla^2 T + \frac{\eta}{2} \underline{\dot{\gamma}} : \underline{\dot{\gamma}} + \frac{1}{\sigma} \underline{J} \cdot \underline{J} \quad (1.3.4)$$

donde  $C_v$  es la capacidad calorífica y  $k$  es la conductividad térmica del BGE y se suponen aproximadamente constantes. En la Ec. (1.3.4) la temperatura  $T$  varía en la solución debido a: (a) el efecto Joule asociado con el término  $\underline{J} \cdot \underline{J} / \sigma$ , donde  $\underline{J}$  es la corriente eléctrica,  $\sigma = \sum_{i=1}^N e z_i n_i \mu_i^T$  es la conductividad eléctrica del BGE y  $\mu_i^T$  es la movilidad total del ion  $i$ , (b) disipación viscosa  $\eta \underline{\dot{\gamma}} : \underline{\dot{\gamma}} / 2$ , la cual es del orden de la viscosidad del agua y se desprecia. Aquí,  $\underline{\dot{\gamma}} = \nabla \underline{v}^T + \nabla \underline{v}$  es el tensor velocidad de deformación, donde la operación de transposición se indica mediante el superíndice  $T$ .

*Balance iónico*

$$\left( \frac{\partial n_i}{\partial t} + \underline{v} \cdot \nabla n_i \right) = -\nabla \cdot \underline{J}_i^\# \quad (1.3.5)$$

En la Ec. (1.3.5), el flujo difusivo  $J_i^\# = n_i u_i^\#$  de iones  $i$  involucra dos fuerzas, una es la asociada con el movimiento browniano y la otra es consecuencia del potencial eléctrico. Así, se puede expresar,

$$\underline{J}_i^\# = n_i(\underline{v}_i - \underline{v}) = -k_B T \omega_i \nabla n_i - \omega_i e z_i n_i \nabla \psi \quad (1.3.6)$$

donde la velocidad del ión  $\underline{v}_i$  incluye la velocidad de mezcla  $\underline{v}$ , la velocidad electroforética  $\underline{v}_i^e$  y la velocidad de difusión  $\underline{u}_i$ . En la Ec. (1.3.6)  $\omega_i = 1/6\pi\eta a_i$  es la movilidad hidrodinámica del ión que se expresa como la inversa del coeficiente de fricción de Stokes definido para una partícula de radio  $a_i$  suspendida en un medio fluido, y  $k_B$  es la constante de Boltzmann.

A través de las ecuaciones Ecs. (1.3.1) a (1.3.6) se describen y cuantifican los fenómenos electrocinéticos básicos que permiten evaluar el electroferograma de un analito o de una mezcla de analitos que deben ser separados mediante la CZE.

El modelo básico propuesto en esta Tesis considera diferentes aspectos que describen los fenómenos principales presentes en la CE y que se analizan en particular en el Capítulo 2. Se adelanta aquí, que este modelo (Ecuaciones (1.3.1) a (1.3.6)) se presenta en la Parte II con distintos niveles de complejidad dependiendo del propósito de su aplicación y/o del tipo de analitos involucrados en el estudio (ver, Capítulos 3, 4, 5, 6 y 7).

## 1.4 Importancia del uso de modelos teóricos en la CZE

Antes de continuar con el desarrollo de la Tesis, es natural considerar la siguiente pregunta ¿por qué usar modelos teóricos en la CZE? Es evidente que para encontrar las condiciones apropiadas de separación de analitos en la CZE desde el punto de vista experimental, se requiere mucho tiempo y además es un procedimiento muy tedioso, generalmente por prueba y error. En este sentido, los múltiples factores que influyen la separación electroforética se deben seleccionar adecuadamente, tales como, el pH, la fuerza iónica, el voltaje aplicado, la temperatura, el tipo de *buffer* y la concentración, las dimensiones del capilar, la inyección de la muestra (modo y tiempo de inyección), los aditivos agregados al *buffer* (metanol, acetonitrilo, etc) y otros. Esto implica que los métodos necesitan ser desarrollados y optimizados por el operador de la CE para cada aplicación particular. Por lo tanto, el disponer de modelos que permitan una simulación del electroferograma antes de la experimentación, acorta de manera significativa el tiempo de

desarrollo y optimización experimental de un protocolo y evita las aproximaciones heurísticas (ver Capítulo 3 en la Parte II).

En adición a las ventajas prácticas enumeradas en el párrafo anterior es relevante mencionar que el uso de modelos adecuados permite la evaluación de parámetros fisicoquímicos tales como la carga efectiva y el radio hidrodinámico de los analitos y la interacción entre ellos y el BGE, en el cual se efectúa la separación. En este sentido también es posible obtener informaciones adicionales, tales como la hidratación y las variaciones en las constantes de disociación,  $pK_i$  de los grupos cargados (ver Capítulo 4), los cuales son relevantes para describir el comportamiento hidrodinámico y las conformaciones probables de los analitos. Este último aspecto se aplica en particular a proteínas, péptidos y aminoácidos y se describe en detalle en la Parte II, en los Capítulos 4, 5 y 7, respectivamente.

Concluyendo, los modelos propuestos en esta Tesis (básico y extendidos) se pueden usar de tres formas diferentes:

- (I) A partir del electroferograma inicial, es posible perturbar la velocidad electroforética de cada analito (variando, por ejemplo, el pH o la  $I$ ), para adoptar el protocolo de trabajo más conveniente según las necesidades separativas que se desean obtener (resolución relevante). Es decir, es posible encontrar las condiciones apropiadas de resolución previa a la corrida experimental.
- (II) Cuando se dispone del tiempo de migración o la movilidad electroforética que se obtienen a partir del electroferograma experimental, es posible estimar parámetros fisicoquímicos de analitos tales como: radio hidrodinámico, difusividad molecular, carga efectiva, hidratación, forma y potencial zeta.
- (III) Si se conocen la carga efectiva o el radio hidrodinámico o se supone una forma partícula esférica, es posible predecir con cierta aproximación la movilidad electroforética del analito en estudio.

# Capítulo 2

## Aspectos generales considerados en el modelo básico

---

---

En este capítulo se consideran los aspectos fenomenológicos más relevantes de la CZE mediante las ecuaciones de balances, mencionadas en el Capítulo 1. En las Secciones 2.1 a 2.5 se analizan desde el punto de vista teórico y se ilustran o validan experimentalmente: la inyección de la muestra, el flujo electroosmótico, el potencial zeta de tubo, la migración electroforética, la detección axial de analitos y los fenómenos dispersivos. Estos aspectos generales que componen el modelo básico de la CZE se incluyen luego en un programa computacional (ver Sección 2.6).

### 2.1 Inyección de la muestra

#### 2.1.1 Introducción

La inyección de la muestra es un procedimiento crucial en la CE. Aún en el caso de que las variables fisicoquímicas del protocolo electroforético estén optimizadas, es frecuente encontrar que se puede producir una separación no satisfactoria si la inyección de la muestra se realiza sin contemplar rigurosos cuidados. Desde el punto de vista teórico, la muestra se debe introducir en el capilar con un volumen “infinitamente” pequeño para minimizar la dispersión inicial de la zona de muestra de los analitos (Khun y Hoffstetter-Khun, 1993). Sin embargo, es también claro que en la práctica esta condición es difícil de lograr. El tamaño de la muestra en la CE está determinado por el tiempo que se utiliza para la introducción de la muestra en el capilar que se expresa normalmente en segundos.

En este sentido, se debe señalar la importancia de comprender los factores que controlan los anchos de los picos que se observan experimentalmente en la detección. Vinther y Sørensen (1991) demostraron que la eficiencia de pico decrece de forma importante cuando aumenta el tiempo de inyección y por lo tanto con el aumento de la longitud de la zona de inyección de muestra. Sin este conocimiento, no es posible establecer el diseño de los parámetros óptimos para una separación mediante CZE (Huang *et al.*, 1989). Por consiguiente, se infiere que la inyección o introducción de la muestra en el capilar tiene un importante impacto en la resolución del electroferograma. Es decir, los efectos de la inyección inciden en la eficiencia de la CE, que se expresa a través del

número de platos teóricos. El mayor deterioro en el electroferograma se encuentra para una longitud grande de la zona de muestra en un capilar relativamente corto (Delinger y Davis, 1992). Este aspecto se puede visualizar mejor cuando se analizan con más detalles los fenómenos dispersivos asociados a la detección de analitos, en la Sección 2.5.

Como se describe e ilustra apropiadamente en la bibliografía la introducción de la muestra en el capilar se puede realizar de diferentes maneras (ver, por ejemplo, Heiger, 1992; Khun-Hoffstetter-Khun, 1993). Las dos metodologías que se utilizan para la inyección de la muestra son: (1) la forma hidrodinámica (con sus tres variantes: por presión, por vacío y por efecto-sifón) o (2) la forma electrocinética (también llamada por electromigración). A continuación se analiza la forma hidrodinámica de inyección de la muestra que es la que se usa en la parte experimental y en general en los protocolos que se toman de la bibliografía con el propósito de analizar los modelos propuestos en esta Tesis.

### **2.1.2 Inyección hidrodinámica**

La introducción de la muestra en el capilar en forma hidrodinámica es el modo que se usa con mayor frecuencia, y como se analizará más abajo, presenta ciertas ventajas. Ésta se puede lograr por aplicación de presión en el reservorio que contiene la muestra (vial de entrada o *inlet*); por vacío en el extremo final del capilar (vial de salida o *outlet*); o por una acción de efecto-sifón, el cual se obtiene si se eleva el vial de inyección con relación al vial de salida de manera de establecer una variación de altura entre ambos viales. Es relevante mencionar que la cantidad de muestra que se introduce en el capilar con la inyección hidrodinámica es casi independiente de la composición de la muestra.

Consecuentemente, en la práctica, el vial que contiene el BGE se reemplaza por el vial que contiene la muestra de tal manera que el capilar queda inmerso en la solución de muestra. Después que se completa la inyección de la muestra, el vial de muestra se reemplaza nuevamente por el vial que contiene el BGE y comienza el proceso de separación. En estas condiciones, el volumen de muestra que se introduce en el capilar es función de las dimensiones del capilar (diámetro interno y longitud total), la viscosidad del BGE, la presión aplicada y el tiempo de inyección. Es importante también señalar que se debe controlar con precisión la temperatura del capilar, debido a que la viscosidad del BGE varía con la temperatura y en consecuencia varía así la cantidad de muestra que se introduce en el capilar (ver, Khun y Hoffstetter-Khun, 1993). Estos aspectos que se

mencionan aquí brevemente, se analizan y se ejemplifican con cálculos, más adelante en esta sección.

Es importante mencionar que es de interés práctico conocer la diferencia de presión que se debe aplicar al sistema y la duración del tiempo de inyección para introducir la muestra adecuadamente en el capilar. Asimismo es útil calcular la cantidad de muestra (expresada como volumen de muestra) que se introduce en el capilar y establecer la forma que toma el pistón de muestra que se inyecta. En consecuencia, con este propósito se procede con el siguiente análisis.

Si se considera el inicio del flujo bajo la aplicación súbita de un gradiente de presión  $\Delta p/L_t$ , el volumen  $V_i$  de muestra que se introduce durante un tiempo  $t$  en el capilar de longitud total  $L_t$  satisface la siguiente expresión, la cual se obtiene a partir de los balances de conservación de materia y de cantidad de movimiento del fluido dentro del capilar (Ecs. 1.3.1 y 1.3.2),

$$V_i = \frac{\Delta p \pi d_i^4}{128 \eta L_t} t_{eff} \quad (2.1.1)$$

En la Ec. (2.1.1)  $d_i$  es el diámetro interno del capilar,  $\eta$  es la viscosidad del BGE y  $t_{eff}$  es el tiempo efectivo de inyección si se consideran los efectos transitorios asociados al hecho de que la muestra arranca desde el reposo antes de moverse dentro del tubo capilar. El tiempo efectivo se calcula a partir de,

$$t_{eff} = t + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{8 \rho d_i^2}{\alpha_n^6 \eta} \left[ \exp\left(-\frac{4 \alpha_n^2 \eta t}{\rho d_i^2}\right) - 1 \right] \quad (2.1.2)$$

donde  $\alpha_n$  son valores característicos (*eigenvalues*) del problema básico (raíces de la función de Bessel). En la mayoría de las circunstancias prácticas  $t_{eff} \approx t$  y la evaluación de la Ec. (2.1.1) para obtener  $V_i$  se realiza directamente con el tiempo de inyección  $t$ . En consecuencia, para las determinaciones prácticas, es posible calcular el volumen de muestra que se inyecta aplicando directamente la conocida ecuación de Hagen-Poiseuille, ignorando los efectos del flujo transitorio,

$$V_i = \frac{\Delta p \pi d_i^4}{128 \eta L_t} t \quad (2.1.3)$$

La Ec. (2.1.3) indica que el volumen de muestra que se introduce en el capilar en forma hidrodinámica se puede manipular si se varía el tiempo de inyección y/o la

diferencia de presión para dimensiones del capilar,  $d_i$  y  $L_t$ , fijas. Si la inyección de la muestra se lleva a cabo por gravedad la diferencia de presión está dada por la presión hidrostática, la cual se define como  $\Delta p = \rho g \Delta h$ , siendo  $\rho$  la densidad de la solución de muestra,  $g$  la aceleración de la gravedad y  $\Delta h$  la diferencia de altura entre los niveles de líquido contenidos en los viales de la muestra y del BGE.

En este sentido se mencionan a continuación las consideraciones que se tienen en cuenta para aplicar directamente la Ec. (2.1.3) (ver para más detalles, Byron Bird *et al.*, 1960):

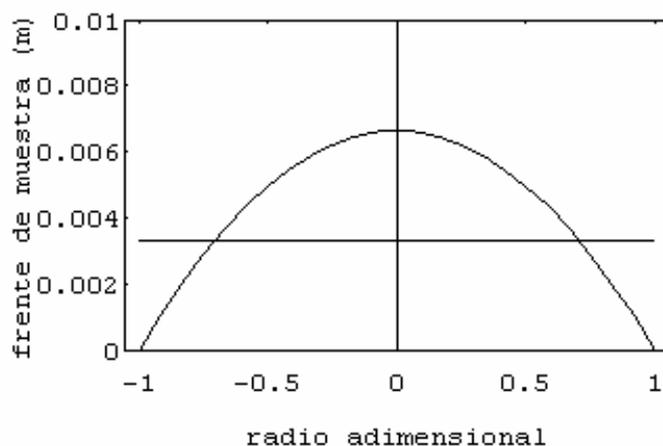
- (a) El flujo es laminar, con número de Reynolds,  $Re = d_i \langle v_z \rangle \rho / \eta$ , menor de 2100, donde  $d_i = 2R$ , aquí  $R$  es el radio del tubo capilar y  $\langle v \rangle$  es la velocidad promedio. Si se calcula el  $Re$  para el caso de la inyección de muestra con  $\Delta p = 0.5$  psi, se obtiene  $Re = 5.10^{-2}$  y para el lavado del capilar con  $\Delta p = 20$  psi resulta  $Re = 2$ . Se observa, en ambas circunstancias, que los valores que se obtienen son sustancialmente menores que 2100.
- (b) La densidad  $\rho$  es constante (flujo incompresible).
- (c) El flujo es independiente del tiempo (estado estacionario), aunque pasa por un período de transición corto, llega rápidamente al estado estacionario.
- (d) El fluido es newtoniano.
- (e) Se desprecian los efectos hidrodinámicos de entrada y salida.
- (f) El fluido se comporta como un continuo material.
- (g) No hay deslizamiento en la pared, lo cual es una excelente suposición para fluidos puros bajo las condiciones supuestas en (f).

Es evidente, de acuerdo a lo mencionado en el párrafo anterior, que después de la introducción de la muestra en el capilar, ésta no queda distribuida en la entrada del mismo como un tapón cilíndrico perfecto. En efecto, el perfil axial  $z_f(r)$  de la muestra varía con la coordenada radial  $r$  de acuerdo a la siguiente ecuación (Piaggio y Deiber, 2001 y 2003),

$$z_f(r) = \frac{\Delta p d_i^2}{16 \eta L_t} \left( 1 - \frac{r^2}{R^2} \right) t_{eff} \quad (2.1.4)$$

En la Figura (2.1.1) se ilustra el frente de muestra para una inyección hidrodinámica típica en la CZE. En esta figura el tapón ideal se indica con una línea horizontal donde se observa la aproximación asociada a la hipótesis de distribución uniforme de muestra en la entrada del capilar, después de la inyección de la misma.

No obstante, en el modelado de la CZE la cantidad de muestra que se introduce en la entrada del capilar se considera idealmente como un tapón cilíndrico con una longitud  $h$  definida a través del volumen de muestra expresado por la Ec. (2.1.3), la cual satisface  $h = V_i / (\pi R^2)$ . Como se mencionó antes, debido a que el tamaño del tapón de muestra afecta la resolución del electroferograma (Radko *et al.*, 1997), el tiempo de inyección que se emplea para la introducción de la muestra en el capilar se debe elegir cuidadosamente. En el Capítulo 3 se ilustra como tiempos diferentes de inyección afectan el tiempo de detección del analito, lo cual se observa nítidamente en el electroferograma experimental y se simula correctamente con el modelo básico y el programa computacional que se propone en la Tesis.



**Figura 2.1.1.** Perfil del frente de muestra para un tiempo de inyección de 3 segundos, en una corrida típica de CZE. La caída de presión es 0.5 psi. La línea horizontal indica el frente del tapón de muestra (ideal).

### 2.1.3 Inyección electrocinética

La inyección electrocinética, también designada por electromigración, se fundamenta en el hecho de que la aplicación de un voltaje entre los extremos del tubo capilar causa movimiento electroforético y electroosmótico. Usualmente el campo eléctrico que se aplica en esta forma de inyección de la muestra es 3 a 5 veces menor que el que se usa en la separación, el cual varía desde 1 a 30 kV. En consecuencia, en la inyección electrocinética los analitos entran en el capilar por migración y por acción del EOF. Una propiedad característica de la inyección electrocinética es que la cantidad de muestra que se introduce en el capilar depende de la movilidad electroforética de cada uno de los

solutos. Por consiguiente, ocurre entonces una discriminación indeseada entre las especies iónicas debido a que los iones más móviles serán inyectados en mayor cantidad que aquellos menos móviles. También puede ocurrir que la cantidad de muestra inyectada varíe en función de la conductividad del medio. Por lo tanto la composición de la muestra influye en esta modalidad de inyección (Grossman y Colburn, 1992). Todos estos fenómenos hacen que en general se considere la inyección electrocinética menos reproducible que la inyección hidrodinámica. No obstante, a pesar de las limitaciones cuantitativas, la inyección electrocinética es muy simple y no requiere instrumentación adicional. Además es ventajosa en determinados casos, por ejemplo, (a) si se desea discriminar entre un componente de interés y contaminantes, (b) cuando se usan medios viscosos o geles (poliacrilamida) en el capilar, donde no es posible la inyección hidrodinámica y (c) si se desea concentrar un componente a partir de una solución de la muestra diluida.

#### **2.1.4 Efecto de la cantidad de muestra que se inyecta en el capilar sobre la separación**

Como se describe con más detalles en la Sección 2.5, son varios los parámetros que se deben controlar para lograr una buena resolución y eficiencia en la CE (Roberts *et al.*, 1989). Uno de estos parámetros con alta incidencia en la resolución de la CZE es el volumen de muestra que se inyecta en el capilar o más específicamente la longitud del pistón de inyección de muestra que se debe mantener en un valor mínimo para lograr una eficiencia alta en la separación (Otsuka y Terabe, 1989). En este sentido, típicamente, un volumen de inyección de muestra menor de 2 % del volumen total del capilar (es decir, menor de 40 nL en una columna capilar de 2  $\mu$ L) conduce a una separación óptima en la CE (Blanc *et al.*, 1997). En general, se desean evitar los picos anchos y poco resueltos. Sin embargo, los analitos presentes en muestras diluidas o en un medio complejo como suero, plasma u orina, y a menudo en baja concentración, pueden no ser detectados en estas condiciones. Por consiguiente, la experiencia práctica indica que se necesita inyectar mayor cantidad de muestra para lograr un análisis satisfactorio. En consecuencia, se debe recurrir a alguno de los métodos de preconcentración de la muestra (ver también, Vizioli *et al.*, 2004; Schwer *et al.*, 1993), tales como: autoenfocado de la muestra (*sample self-stacking*), enfocado por voltaje (*field amplified stacking*), isotacoforesis transitoria o isoelectroenfoco (Blanc *et al.*, 1997). El autoenfoco de la muestra ocurre cuando la fuerza iónica y, por consiguiente la conductividad de la muestra es menor que la fuerza

iónica del BGE de separación. En este sentido, al ser menor la conductividad de la muestra, existe un campo eléctrico local mayor, y los solutos migran más rápidamente. Esta migración rápida continúa hasta que los solutos alcanzan el límite de la zona de alta conductividad del BGE. En este límite la movilidad de los solutos se reduce, causando que ellos se apilen o enfoquen en una zona concentrada. Los principios de enfoque por voltaje (electroenfoque) son similares a aquellos de autoenfoque de la muestra. Jandik y Bonn (1993) señalaron que en presencia del fenómeno de electroenfoque se puede apreciar una clara diferencia entre los electroferogramas de una muestra de igual concentración pero disuelta inicialmente en dos medios diferentes, por ejemplo, en agua y en el mismo BGE de separación. Con relación a este tema se describen más detalles en el trabajo de Chien y Burgi (1992) y se presenta un tratamiento matemático más completo en Chien (1991).

Es relevante señalar que la sobrecarga de muestra, que se menciona en la bibliografía como *sample overloading*, puede tener dos efectos de importancia, ambos perjudiciales para la resolución (ver, Poppe, 1992). Primero, las longitudes de inyección de muestra mayores que el ancho de zona controlado por la difusión, aumentarán proporcionalmente el ancho de pico. Segundo, pueden incrementar las inhomogeneidades del medio y distorsionar las formas de los picos causado por las desigualdades entre las conductividades del BGE y de la zona de muestra. Este último aspecto se estudia a través de la Función Reguladora de Kohlrausch (ver, por ejemplo, Jandik y Bonn, 1993; Heiger, 1992).

### **2.1.5 Ejemplos de cálculos realizados con un programa computacional simple**

Como se mencionó al comienzo de esta sección, en el modelo básico propuesto en la Tesis, se considera fundamentalmente la inyección hidrodinámica por presión, debido a que, en general, en las aplicaciones prácticas, es el modo que se usa comúnmente. Considerando los conceptos teóricos y las ecuaciones, que se mencionaron más arriba, y que se usan en la primera etapa del modelo básico para describir la inyección de la muestra en el capilar, es posible estimar, antes de comenzar la separación electroforética, el tiempo óptimo de inyección y el volumen de muestra que se debe introducir en el capilar. Asimismo, es posible determinar el valor límite para que el ancho del pistón de muestra no sobrepase las dimensiones aceptadas como óptimas, de tal manera que la dispersión no se magnifique y lograr una mayor eficiencia, en principio, desde el punto de vista de la inyección de la muestra. Con este propósito se utiliza un programa computacional simple

que involucra la Ec. (2.1.3). Los resultados obtenidos permiten visualizar el efecto que tienen las variaciones de las dimensiones del capilar ( $L_t$  y  $d_i$ ) en el volumen de muestra que se inyecta. Los resultados se presentan en la Tabla 2.1.1.

**Tabla 2.1.1.** Variaciones del volumen de muestra  $V_i$ , que se inyecta en capilares con diferentes dimensiones (longitud total,  $L_t$  y diámetro interno,  $d_i$ ) para un mismo tiempo de inyección  $t = 1$  s .

$L_t$ (cm)	$d_i$ ( $\mu\text{m}$ )	$V_i$ (nL)
20	50	2.4
50	50	1.2
20	50	2.4
20	75	12.4

Se observa en la Tabla 2.1.1, que si el tiempo de inyección por presión (0.5 psi) es 1 segundo, se introducen 2.4 nL de muestra en un capilar de  $d_i=50 \mu\text{m}$  y  $L_t=20$  cm y solamente 1.2 nL en un capilar de  $d_i=50 \mu\text{m}$  y  $L_t=50$  cm. En efecto, un capilar más largo presenta una resistencia mayor al flujo de líquido que un capilar más corto, por consiguiente, es claro que se introduce una cantidad de muestra menor. Como segundo ejemplo se puede señalar que con 1 segundo de inyección (a 0.5 psi) se introducen 2.4 nL de muestra en un capilar de  $d_i=50 \mu\text{m}$  y  $L_t=20$  cm y un volumen notablemente mayor, igual a 12.4 nL, en un capilar de  $d_i=75 \mu\text{m}$  y  $L_t=20$  cm. El capilar de  $d_i$  mayor resiste menos el flujo de líquido, por esta razón es posible introducir una cantidad de muestra mayor. Asimismo, en las Tablas 2.1.2 y 2.1.3 se presentan de manera ilustrativa, y principalmente por su valor práctico, las estimaciones de los volúmenes de muestra que se introducen en el capilar y que se calculan a partir de la Ec. (2.1.3), si se usan diferentes tiempos de inyección, que varían entre 1 y 10 segundos, para capilares de longitudes totales y diámetros internos variables según se especifica en cada tabla. En todos los casos evaluados, la temperatura se mantiene constante e igual a 25 °C. Es relevante mencionar que el cambio de temperatura afecta la viscosidad del BGE y en consecuencia se producen cambios en el volumen de muestra que se inyecta para un mismo tiempo de inyección. Este último aspecto se analiza y visualiza más abajo, en la Tabla 2.1.4. En adición, en la Figura 2.1.2 se representan los valores calculados para el volumen de muestra que se introduce en el capilar (ver, Tabla 2.1.3) en función de los distintos tiempos de inyección. Para una

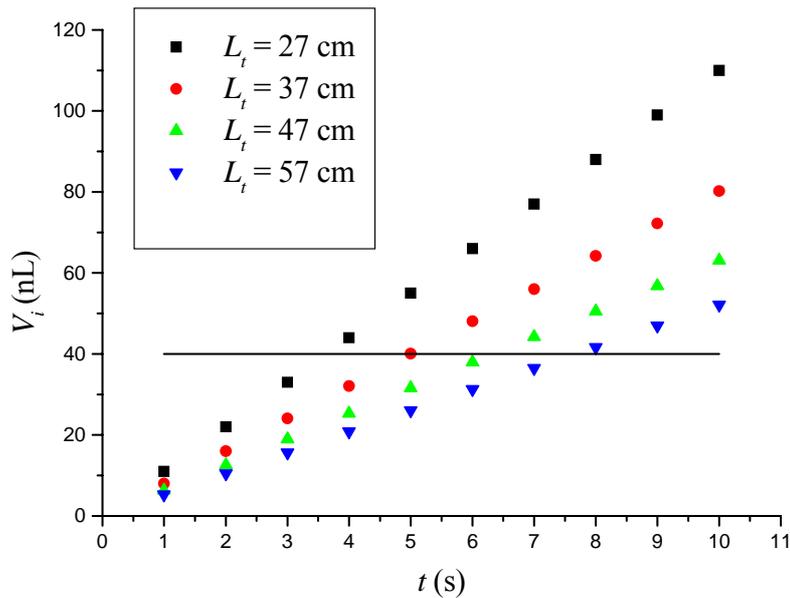
rápida visualización se señala con una línea horizontal el límite aceptable para que no se produzca deterioro en el proceso de separación a causa de los fenómenos dispersivos originados a partir de que el volumen de muestra que se introduce en el capilar resulta inadecuado. Es decir, por arriba de la línea horizontal, el valor de  $h$  correspondiente al tapón de muestra excede los límites aceptables y provocaría un deterioro en la resolución del electroferograma.

**Tabla 2.1.2.** Estimaciones del volumen de muestra  $V_i$ , que se introduce en un capilar de longitud total  $L_t$  variable y diámetro interno  $d_i = 50 \mu\text{m}$  con diferentes tiempos de inyección  $t$ , a  $25^\circ\text{C}$ , típicamente usados en experiencias de CZE.

Dimensiones del capilar: $d_i = 50 \mu\text{m}$				
$L_t = 27 \text{ cm}$ $L_t = 37 \text{ cm}$ $L_t = 47 \text{ cm}$ $L_t = 57 \text{ cm}$				
$t$ (s)	$V_i$ (nL)			
1	2.2	1.6	1.25	1.0
2	4.3	3.2	2.5	2.1
3	6.5	4.8	3.7	3.1
4	8.7	6.3	5.0	4.1
5	10.9	7.9	6.2	5.1
6	13.0	9.5	7.5	6.2
7	15.2	11.1	8.7	7.2
8	17.4	12.7	10.0	8.2
9	19.5	14.3	11.2	9.3
10	21.7	15.8	12.5	10.3

**Tabla 2.1.3.** Estimaciones del volumen de muestra  $V_i$  que se introduce en un capilar de longitud total  $L_t$  variable y diámetro interno  $d_i = 75 \mu\text{m}$  con diferentes tiempos de inyección  $t$ , a  $25^\circ\text{C}$ , típicamente usados en experiencias de CZE.

Dimensiones del capilar: $d_i = 75 \mu\text{m}$				
$L_t = 27 \text{ cm}$ $L_t = 37 \text{ cm}$ $L_t = 47 \text{ cm}$ $L_t = 57 \text{ cm}$				
$t$ (s)	$V_i$ (nL)			
1	11	8.0	6.3	5.2
2	22	16.0	12.6	10.4
3	33	24.1	18.9	15.6
4	44	32.1	25.3	20.8
5	55	40.1	31.6	26.0
6	66	48.1	37.9	31.2
7	77	56.0	44.2	36.4
8	88	64.2	50.5	41.6
9	99	72.2	56.8	46.9
10	110	80.2	63.1	52.1



**Figura 2.1.2.** Volumen de muestra  $V_i$  que se introduce en el capilar (calculado a partir de la Ec. (2.1.3)) para distintos tiempos de inyección  $t$  y capilares de diámetro interno  $d_i = 75 \mu\text{m}$  y longitud total  $L_t$  variable (27, 37, 47 y 57 cm, alternativamente). La línea horizontal indica un volumen de muestra de 40 nL por arriba del cual en la práctica se observa deterioro en el electroferograma.

Asimismo, como se mencionó más arriba, es importante considerar la variación de la viscosidad del BGE con la temperatura. En efecto, un cambio de temperatura modifica la viscosidad del BGE y en consecuencia varía el volumen de muestra que se introduce en el capilar (ver, Ec. (2.1.3)). Al aumentar la temperatura disminuye la viscosidad del BGE y por consiguiente aumenta el volumen de muestra que se inyecta (Khun- Hoffstetter-Khun, 1993). En la Tabla 2.1.4 se ilustra este aspecto de acuerdo a los cálculos realizados. Así, por ejemplo, para un capilar de  $L_t = 27 \text{ cm}$  y  $d_i = 50 \mu\text{m}$  y un tiempo de inyección de 2 segundos se muestra la variación en la cantidad de muestra que se introduce en el capilar para diferentes temperaturas. Si se considera un cambio de temperatura de 25 a 35 °C, se observa una variación del 28 % en la cantidad de muestra que se inyecta en el capilar. Si se considera un cambio de temperatura mayor, de 20 a 50 °C, prácticamente se duplica la cantidad de muestra que ingresa al capilar, teniendo en cuenta que el valor de la viscosidad prácticamente se reduce a la mitad. En este sentido, el modelo básico propuesto en esta Tesis, considera este efecto incluyendo la siguiente expresión que tiene en cuenta la variación de la viscosidad del BGE con la temperatura,

$$\eta = 0.001(0.25 + 1.53 \exp[-(T - 273)/29.32]) \quad (2.1.5)$$

Particular interés presenta este aspecto cuando se usa el modelo para el estudio de la desnaturalización térmica de proteínas (ver Capítulo 6). En este sentido, es necesario considerar el efecto de la variación de la viscosidad del BGE con la temperatura sobre la movilidad electroforética para evaluar correctamente los resultados.

**Tabla 2.1.4** Variación del volumen de muestra  $V_i$  que se inyecta en el capilar como consecuencia de la disminución de la viscosidad del BGE, al cambiar la temperatura en el rango de 20 a 50 °C. El tiempo de inyección de la muestra  $t$  se mantiene constante e igual a 2 segundos.

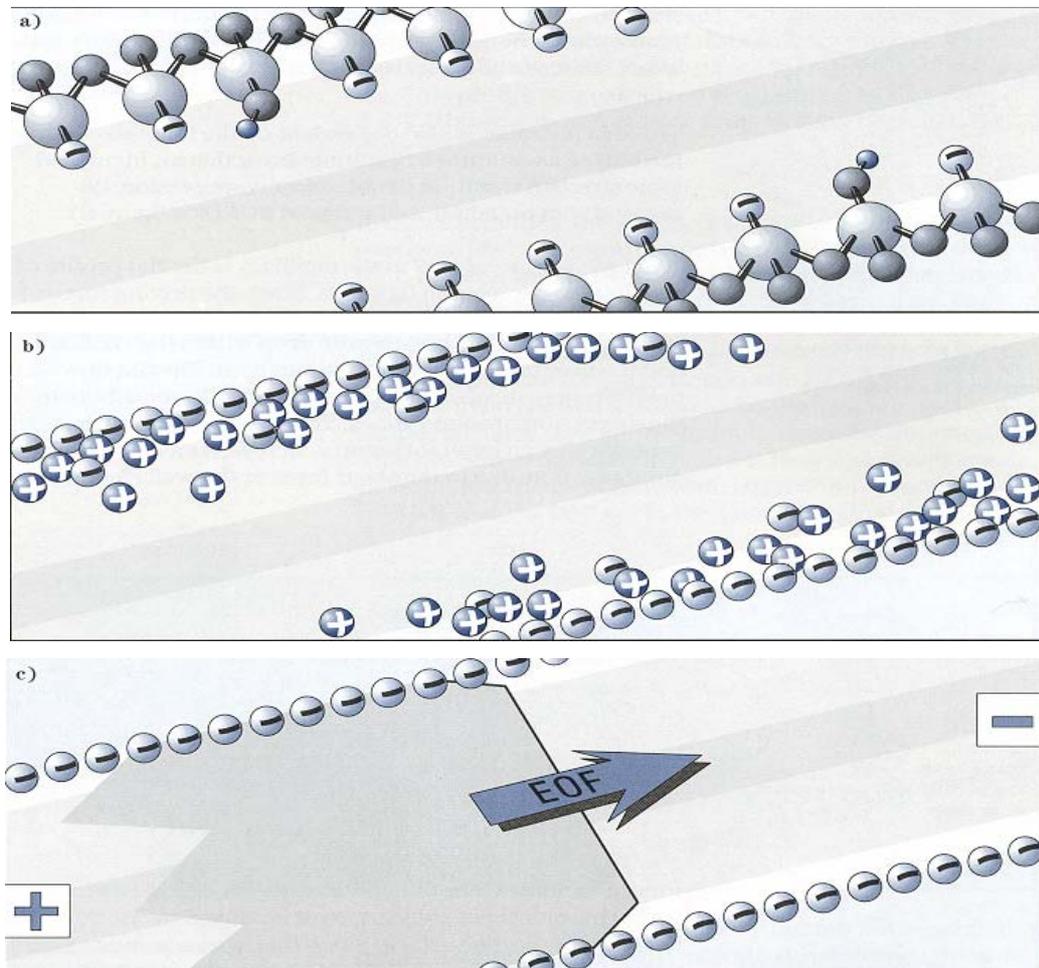
$T$ (°C)	$\eta$ $10^3$ (Pa s)	$V_i$ (nL)
20	1.02348	3.8
25	0.902207	4.3
30	0.799952	4.9
35	0.713728	5.5
40	0.641023	6.1
45	0.579717	6.8
50	0.528023	7.4

## 2.2 Flujo electroosmótico

### 2.2.1 Definición y características del flujo electroosmótico

La electroósmosis es un fenómeno básico en los procesos de separación electroforética. Se describe como el movimiento relativo de un líquido con relación a una superficie cargada causado por acción de un campo eléctrico. Este movimiento se conoce también como flujo electroosmótico (EOF) y se manifiesta siempre que se aplica un voltaje a un sistema líquido que está en contacto cercano con una superficie cargada, por ejemplo el capilar de sílice fundida en el caso de la CE. La magnitud y dirección del EOF dependen de la composición química del capilar y de la naturaleza de la solución contenida dentro del tubo, es decir del BGE. Empíricamente se encontró que la fase con la mayor constante dieléctrica se polariza positivamente en contraposición a la otra. El agua, debido a su constante dieléctrica extremadamente alta, está de manera usual polarizada positivamente en comparación con la superficie del capilar de sílice fundida. Por lo tanto, si se aplica un campo eléctrico entre los extremos del capilar, los iones móviles de la solución migran con su agua de hidratación hacia el polo negativo provocando el flujo de toda la solución. (Khun y Hoffstetter-Khun, 1993). En general, bajo condiciones acuosas la mayoría de las

superficies poseen un exceso de cargas negativas. Este hecho puede ser la consecuencia de un proceso de ionización de la superficie, es decir, el resultado del equilibrio ácido-base, y/o puede ocurrir a partir de la adsorción de especies iónicas sobre la superficie. Para el caso de la sílice fundida probablemente ocurren ambos procesos, sin embargo el EOF está controlado fundamentalmente por los numerosos grupos silanoles ( $\text{SiOH}$ ) que pueden existir en la forma aniónica ( $\text{SiO}^-$ ). La Figura 2.2.1 (a) ilustra este aspecto. A pesar de que el punto isoeléctrico exacto de la sílice fundida es difícil de determinar, el EOF adquiere importancia por encima de pH 4. Asimismo, los materiales no iónicos tales como el teflón también pueden exhibir EOF, presumiblemente como resultado de la adsorción de aniones (Heiger, 1992).



**Figura 2.2.1.** Desarrollo del flujo electroosmótico: (a) Superficie del capilar de sílice fundida cargada negativamente ( $\text{SiO}^-$ ). (b) Cationes hidratados acumulados cerca de la superficie. (c) Flujo de líquido en dirección al polo negativo al aplicar un campo eléctrico (Heiger, 1992).

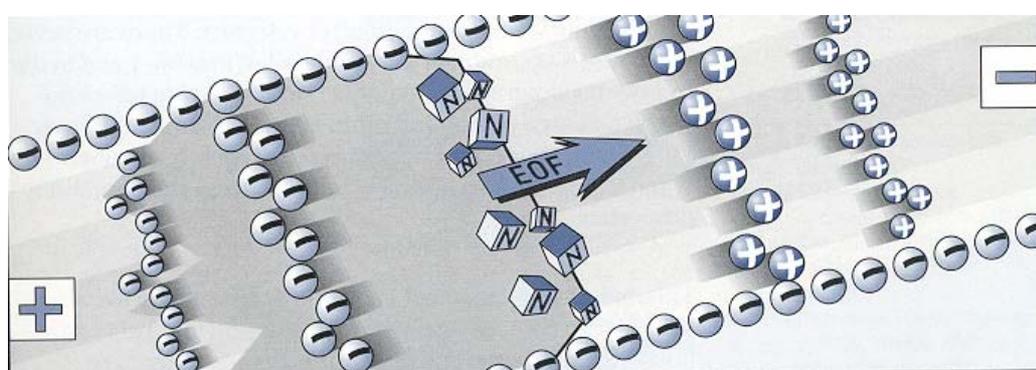
Con respecto al análisis de la generación del EOF es importante mencionar que los contraiones (cationes en la mayoría de los casos) que se encuentran cerca de la superficie para mantener el balance de cargas, forman la doble capa eléctrica (EDL) (Figura 2.2.1 (b)) y crean una diferencia de potencial muy cerca de la pared. Este potencial se conoce como potencial zeta de tubo (ver Sección 2.3). Como se mencionó antes, cuando se aplica un voltaje entre los extremos del capilar los cationes que forman la capa difusa de la EDL son atraídos hacia el polo negativo. Debido a que estos iones están solvatados, al moverse arrastran la solución del BGE contenida en el capilar en ese sentido. Este proceso se muestra esquemáticamente en la Figura 2.2.1 (c).

Por consiguiente, el potencial zeta del tubo capilar está determinado esencialmente por la carga superficial de la pared interna del capilar. Debido a que la carga depende fuertemente del pH, la magnitud del EOF varía con el pH. A pH alto, donde los grupos silanoles están predominantemente deprotonados, el EOF es significativamente mayor que a pH muy bajo con abundancia de protones. El potencial zeta del tubo también depende de la fuerza iónica del BGE, como se puede explicar mediante la teoría de la doble capa eléctrica. En este sentido, un aumento de la fuerza iónica implica una compresión de la EDL, una disminución del potencial zeta y consecuentemente la reducción del EOF.

Una característica única del EOF que se presenta en la CE es el perfil plano del flujo. En los sistemas impulsados eléctricamente la fuerza que gobierna el flujo está uniformemente distribuida a lo largo del capilar, no hay una caída de presión significativa dentro del capilar y el perfil de velocidad axial generado es casi uniforme. Solamente en la región de la EDL, muy cerca de la superficie del capilar, el perfil de velocidad se aproxima a cero satisfaciendo la condición de adherencia a la pared del tubo. El perfil plano del flujo es beneficioso para la CE puesto que no contribuye directamente a la dispersión de la muestra. Esto está en contraposición al flujo generado por una bomba externa (tal es el caso de HPLC), donde las fuerzas de fricción en la interfaz líquido-sólido causan una caída de presión importante a través del capilar, lo cual conduce a un perfil de velocidad parabólico. Como consecuencia, en este último caso, ocurre un gradiente de velocidad transversal a la dirección del flujo que genera una dispersión significativa de la muestra antes de la detección.

Otra ventaja del EOF es que imparte un movimiento a todas las especies (cargadas o neutras) en la misma dirección. Bajo condiciones normales (es decir, cuando la superficie del capilar está cargada negativamente), el flujo se produce desde el polo positivo hacia el

polo negativo. En efecto, los aniones son arrastrados hacia el polo negativo debido a que la magnitud del EOF, en general es mayor que sus movilidades electroforéticas. De esta manera cationes, sustancias neutras y aniones se pueden analizar en una misma corrida electroforética debido a que todos migran en la misma dirección del EOF. Este proceso se representa esquemáticamente en la Figura 2.2.2, donde los cationes migran más rápido debido a que son atraídos electroforéticamente hacia el polo negativo, los analitos neutros son arrastrados con la velocidad del EOF y no pueden ser separados entre ellos, mientras que los aniones migran más lentamente porque son atraídos hacia el polo positivo pero a su vez son llevados por el EOF hacia el polo negativo.



**Figura 2.2.2.** Migración diferencial de los solutos superpuesta al flujo electroosmótico en la electroforesis capilar por zona. (Heiger, 1992).

Aunque el EOF es beneficioso usualmente en la CE, en determinadas circunstancias se debe controlar y en ciertos casos eliminar. Por ejemplo, a pH altos, el EOF puede ser tan rápido que se produzca una elusión del soluto antes de que ocurra la separación. Recíprocamente, a pH bajo o moderado, la pared cargada negativamente puede causar la adsorción de los solutos cargados positivamente a través de interacciones de tipo electrostáticas. Este último fenómeno es problemático principalmente para la separación de proteínas con carga neta positiva. En adición, otros modos de la CE tales como isoelectroenfoque, isotacoforesis y electroforesis en gel, a menudo requieren la reducción o eliminación del EOF.

El control del EOF requiere principalmente alteración de la carga de la superficie del capilar o de la viscosidad del BGE. Existen diferentes métodos para lograr esto. Los surfactantes catiónicos como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y compuestos homólogos son reactivos capaces de cambiar el signo de la superficie cargada por adsorción. Por ejemplo, dependiendo de la concentración de CTAB, el EOF se enlentece y

aún revierte a la dirección opuesta para concentraciones altas de CTAB. La adición de modificadores orgánicos tales como alcoholes o polímeros lineales hidrofílicos también conducen a la reducción del EOF. Para eliminar completamente el EOF, se puede usar un recubrimiento dinámico. En este sentido, por ejemplo, se unen covalentemente a la sílice polímeros como la poli(acrilamida), con el beneficio adicional de minimizar la adsorción de proteínas a la pared del capilar.

Por otro lado, la velocidad del EOF disminuye fácilmente si se aplica un campo eléctrico menor. Sin embargo, esta acción tiene numerosas desventajas con relación al tiempo de análisis, la eficiencia y la resolución. Desde el punto de vista práctico, los cambios más dramáticos en el EOF se logran alterando simplemente el pH del BGE.

El EOF también se modifica si se varía la concentración del BGE y en consecuencia, la fuerza iónica. Las concentraciones típicas del BGE que se usan en la CZE están en el rango de 10 a 50 mM, aunque también se pueden llegar a utilizar concentraciones en el rango de 100 a 500 mM. Al finalizar esta Sección se muestran algunos ejemplos experimentales que ilustran las variaciones del EOF con el pH y la fuerza iónica.

En este contexto de análisis, la comprensión y cuantificación del EOF en la CZE es relevante para formular un protocolo experimental que provea un electroferograma con buena resolución. Por consiguiente, en esta Sección se analiza el EOF no-isotérmico en un tubo capilar a través de las ecuaciones básicas que describen el fenómeno electrocinético de partículas cargadas suspendidas en un fluido. Así, el BGE es una mezcla que considera especies cargadas en concentraciones diluidas con un perfil de temperatura variable.

Este tipo de estudio tiene distintas motivaciones prácticas, y en consecuencia se encuentran y enfatizan diferentes fenómenos, en los cuales los aspectos físicos dependen principalmente de las características del sistema donde ocurre el EOF. En estos términos, Xuan *et al.* (2004) investigaron numéricamente los efectos térmicos sobre el EOF en un capilar horizontal teniendo en cuenta el acople entre el calentamiento por efecto Joule y las propiedades del líquido que dependen de la temperatura (viscosidad, permitividad eléctrica y conductividades eléctrica y térmica) con la velocidad, la temperatura y el potencial de campo eléctrico. En la mayoría de los trabajos previos relacionados con el EOF no-isotérmico en microcapilares (ver, por ejemplo, Tang *et al.*, 2004; MacInnes, 2002; Otevrel y Kleparnik, 2002; Andreev y Lisin, 1992; Grushka *et al.*, 1989), no se consideró el efecto de la densidad de mezcla variable en el balance de la cantidad de movimiento teniendo en

cuenta que, en principio, el vector gravedad se supone perpendicular a la dirección del flujo. En esta Sección, se muestra que los efectos térmicos de boyancia (convección natural) que resultan del acople entre la gravedad y la densidad variable con la temperatura, pueden ser relevantes en la CZE, donde el capilar de sílice fundida está usualmente enrollado en un cartucho con las secciones de entrada y salida colocadas en posición vertical. Por lo tanto, esta disposición del capilar en el aparato de la CZE hace necesario estudiar y considerar como la convección natural puede afectar el EOF y en consecuencia la resolución del electroferograma.

Sobre la base de las consideraciones físicas mencionadas arriba, en esta sección se pone énfasis en la descripción, a través de un modelo, de las distorsiones del EOF (idealmente un flujo plano) debido a la convección natural en microcapilares, donde se introduce la aproximación de Boussinesq con relación a la densidad variable con la temperatura. Por consiguiente, para visualizar fácilmente la relevancia de este fenómeno en la CZE, se excluye aquí la necesidad de usar códigos numéricos complejos, introduciendo aproximaciones adicionales bien establecidas y validadas en trabajos previos como se describe más abajo. En consecuencia, primero se presenta una breve descripción del modelo y las suposiciones asociadas con el problema matemático analítico bien planteado. Luego, se indican las expresiones que definen la velocidad, la temperatura y el potencial eléctrico, donde se visualiza el acople de términos no lineales. Así, estas expresiones permiten analizar cómo la convección natural puede afectar el perfil del EOF. También se obtiene el orden de magnitud de los valores críticos para el número adimensional de Grashof, para el cual se espera un deterioro de la resolución en el electroferograma de la CZE, cuando el radio del capilar y las propiedades del protocolo están especificadas. Finalmente, se presentan cálculos adicionales de la velocidad electroosmótica y su relación con el potencial zeta de tubo, fundamentalmente por su interés práctico.

### **2.2.2 Modelo para la interpretación del flujo electroosmótico**

Como se mencionó más arriba, uno de los primeros requerimientos para generar un modelo de la CZE es cuantificar el EOF en un BGE particular. En efecto, el EOF se analiza a través de las ecuaciones básicas que describen el fenómeno electrocinético de partículas cargadas suspendidas en un fluido (ver, por ejemplo, Probstein, 1989; Russell *et al.*, 1989). Estas ecuaciones se aplican a la descripción del EOF y en la Sección 2.4 a la

migración electroforética en un tubo capilar caracterizado por una longitud total  $L_t$  y un radio  $R$ . Aquí la longitud de detección se designa  $L_d$  y por supuesto  $L_d < L_t$ .

Por consiguiente, se utilizan las ecuaciones de conservación de masa y los balances de cantidad de movimiento, energía e iones (ver Capítulo 1, Sección 1.3 y las ecuaciones (1.3.1) a (1.3.6) allí desarrolladas) para describir en general el EOF no-isotérmico del BGE en la CZE, cuando las propiedades físicas dependientes de la temperatura se suponen constantes (excepto la densidad del BGE). En adición, estas ecuaciones permiten introducir la aproximación de Boussinesq como se describe más abajo.

La ecuación de balance para el EOF no-isotérmico se puede simplificar para el flujo del BGE en una dirección en estado estacionario, en un tubo capilar de radio  $R$ . Sin embargo, para introducir la convección natural en este sistema fluido, se debe aplicar la aproximación de Boussinesq que concierne a las fuerzas volumétricas con relación al campo de temperatura. Con este propósito, la densidad de mezcla se describe a través de  $\rho = \rho_w [1 - \beta(T - T_w)]$ , donde  $\beta$  es el coeficiente de expansión térmica del BGE y el subíndice  $w$  indica la evaluación de las propiedades y variables a la temperatura de la pared del tubo capilar. En consecuencia, se encuentra que el campo de presión satisface  $\nabla p = \rho_w \underline{g}$ , mientras que  $\rho_w \beta (T - T_w) \underline{g}$  se balancea con las fuerzas eléctrica y viscosa. En adición, si se desprecian los efectos de entrada del flujo en el capilar (el campo de velocidad está completamente desarrollado y no existe un campo de presión aplicado a lo largo del capilar), las siguientes ecuaciones son válidas después de escribir las Ecs. (1.3.1) a (1.3.6) en el sistema de coordenadas cilíndricas:

$$\eta \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial v}{\partial r} \right) \pm \rho_w g \beta (T - T_w) + \rho_e E = 0 \quad (2.2.1)$$

$$k \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial T}{\partial r} \right) + \sigma E^2 = 0 \quad (2.2.2)$$

$$\varepsilon \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial \psi}{\partial r} \right) + \rho_e = 0 \quad (2.2.3)$$

En las Ecs. (2.2.1) a (2.2.3), el campo eléctrico vectorial se expresa  $\underline{E} = -\left(\frac{\partial \psi}{\partial r}\right) \underline{e}_r + E \underline{e}_z$ , donde  $E$  es el campo eléctrico externo que se aplica en la dirección axial del vector unitario  $\underline{e}_z$ , a lo largo del cual se establece la corriente eléctrica  $\underline{J}$ . El

componente radial  $-\left(\frac{\partial\psi}{\partial r}\right)_{e-r}$  está dado como una primera aproximación por el modelo de la doble capa eléctrica en el equilibrio. Sin embargo, aquí se requiere un análisis breve de este último aspecto físico para introducir una hipótesis adicional con relación a la condición no-isotérmica. En efecto, una integración directa de la Ecs. (1.3.5) y (1.3.6) (ver Sección 1.3 en el Capítulo 1) indica que la distribución de iones en la doble capa eléctrica bajo la condición de equilibrio se debe corregir por efectos térmicos proporcionando,  $n_i = n_i^\infty \exp\left\{-\frac{ez_i}{k_B} \int_0^r \frac{1}{T} \frac{\partial\psi}{\partial r} dr\right\} = n_i^\infty \exp\left\{-\frac{ez_i\psi}{k_B} \left\langle \frac{1}{T} \right\rangle\right\}$ ; por consiguiente para recobrar la distribución de iones clásica (Russel *et al.*, 1989), se debe definir una temperatura promedio. En este sentido, una primera aproximación es  $\left\langle \frac{1}{T} \right\rangle = \frac{1}{T_w}$  para una doble capa eléctrica delgada como usualmente ocurre en la CZE, y así se recupera la distribución de Boltzmann clásica en función de la temperatura de la pared del capilar  $T_w$ . Esta relación se adopta para los cálculos que se realizan más adelante con respecto al EOF.

Las condiciones de contorno para el problema matemático descrito por las Ecs. (2.2.1) a (2.2.3) consideran en la pared del tubo la velocidad de no-deslizamiento, el potencial zeta de superficie del tubo  $\zeta_t$  negativo (ver, Sección 2.3) y la temperatura en la pared  $T_w$ . También se imponen condiciones de simetría en el centro de línea del tubo capilar. Consecuentemente, se obtiene para un electrolito  $z-z$  (Piaggio y Deiber, 2003),

$$T - T_w = \frac{\sigma E^2 R^2}{4k} \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right) \quad (2.2.4)$$

$$v = -\frac{E\varepsilon\zeta_t}{\eta} \left[1 - \frac{\psi}{\zeta_t} \pm N_{Gr} \left(1 - \frac{3}{2}\xi^2 + \frac{1}{2}\xi^4\right)\right] \quad (2.2.5)$$

$$\psi = 2 \frac{k_B T_w}{e|z_i|} \ln \left\{ \frac{1 + \exp[-\kappa(R-r)] \tanh\left(\frac{e|z_i|\zeta_t}{4k_B T_w}\right)}{1 - \exp[-\kappa(R-r)] \tanh\left(\frac{e|z_i|\zeta_t}{4k_B T_w}\right)} \right\} \quad (2.2.6)$$

donde  $\xi = \frac{r}{R}$  y  $k_B$  es la constante de Boltzmann. Se define

$\kappa = \sqrt{2e^2 I N_A 10^3 / (\varepsilon k_B T)} = 1/l_D$ , expresión que proporciona una estimación del espesor de la doble capa eléctrica  $l_D$  cerca de la pared del tubo también llamada longitud de

Debye. Aquí,  $N_A$  es la constante de Avogadro y la fuerza iónica  $I = \sum_{i=1}^N z_i^2 C_i^\infty / 2$  se

expresa en unidades de Molaridad ( $M = \text{mol/L}$ ). Debido a que en el aparato de la CE, la entrada y salida del capilar en los viales de BGE y de muestra se encuentran en posición vertical, el signo (+) aparece en la Ec. (2.2.5) para el caso en el que el fluido se mueve hacia arriba en el capilar y el signo (-) para la situación inversa. En la Ec. (2.2.5),  $N_{Gr}$  es el número de Grashof que mide la distorsión del flujo electroosmótico debido a efectos térmicos. Este número adimensional se expresa,

$$N_{Gr} = \frac{\rho_w g \beta \sigma E R^4}{24 \varepsilon k |\zeta_t|} = \frac{\rho_w g \beta I_e R^2}{24 \pi \varepsilon k |\zeta_t|} \quad (2.2.7)$$

donde  $I_e = \pi R^2 |J|$  es la corriente eléctrica. Esta ecuación muestra que los efectos térmicos sobre el EOF son proporcionales al radio del capilar de sílice, el cual está elevado a la cuarta potencia, por consiguiente éste se debe elegir con el criterio de minimizar el valor del  $N_{Gr}$  (Piaggio y Deiber, 2001; Piaggio y Deiber, 2006). Lo mismo es válido para  $I_e$ . Asimismo, se desea una conductividad térmica alta y una permitividad eléctrica alta del BGE, una intensidad de campo eléctrico baja y una fuerza iónica baja, expresada a través de la conductividad eléctrica del BGE para lograr un electroferograma apropiado.

Las Figuras 2.2.3 (a) y (d) describen la distorsión que se espera en el EOF para un protocolo relativamente drástico de la CZE, como lo predice la Ec. (2.2.5) y cuando el diámetro del tubo es grande, alrededor de 300  $\mu\text{m}$ , así elegido para poner énfasis en la manifestación de este fenómeno.

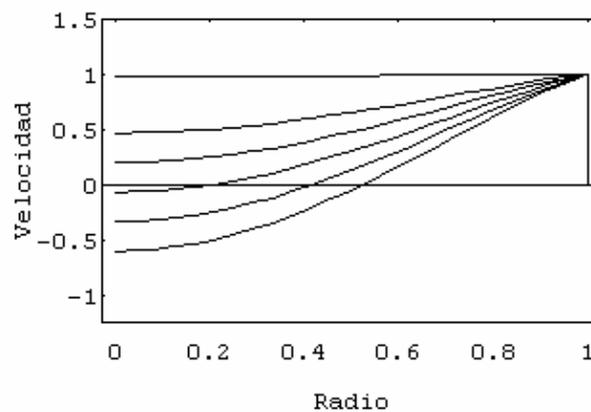
Asimismo, la Figura 2.2.3 muestra la predicción de la Ec. (2.2.5) cuando se usa el potencial eléctrico asintótico  $\psi = \zeta_t \exp[-\kappa(r-R)]$  con  $\zeta_t = -20 \text{ mV}$ . En efecto, para este caso particular, la Ec. (2.2.5) se simplifica significativamente a través de la aproximación de Debye-Hückel (es decir,  $ez_i \psi / (k_B T_w) \ll 1$ ), la cual es válida para  $\zeta_t$  relativamente bajo.

A partir de la Ec. (2.2.4) también se encuentra que la diferencia de temperatura  $T_o - T_w = (\sigma E^2 R^2)/(4k)$ , donde  $T_o = T(0)$  es la temperatura en el centro de línea, es sensible al radio del capilar, al campo eléctrico aplicado y a la conductividad eléctrica del BGE. Aunque  $R$  está comprendido usualmente entre 25 y 50  $\mu\text{m}$  para los capilares de sílice estándares que se disponen comercialmente,  $\sigma$  y  $E$  varían en un rango amplio de valores, debido a que se usan diferentes fuerzas iónicas del BGE (la fuerza iónica del BGE también define la magnitud de  $\sigma$ ), potenciales de campo eléctrico aplicado y longitudes de los capilares. Por consiguiente, para una corrida típica de la CZE se espera que  $\pi R^2 |J|$  sea menor que 65  $\mu\text{A}$ , teniendo en cuenta que  $|J| = \sigma E$ . Se demuestra más abajo que en la medida en que se cumpla esta condición, el perfil del EOF ideal se satisface plenamente cuando las hipótesis que se discutieron arriba son válidas.

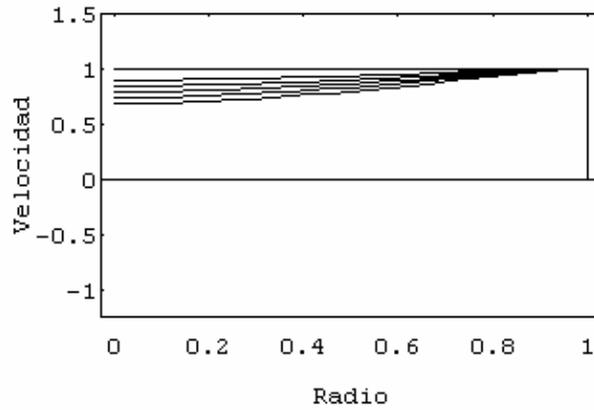
Las Figuras 2.2.3 (a) y (d) muestran los perfiles del EOF descendente y ascendente, respectivamente, que se obtienen con las Ec. (2.2.5) y (2.2.6) para un potencial zeta asintótico bajo y a un protocolo drástico de la CZE; así elegido para visualizar mejor las distorsiones generadas por los efectos térmicos sobre el EOF ideal. En efecto, la Figura 2.2.3 (a) muestra que para potenciales de campo eléctrico aplicado entre 20 y 30 kV y el protocolo mencionado en la leyenda correspondiente, se pierde la estabilidad del EOF porque el perfil de velocidad se vuelve nulo dos veces, para  $0 \leq \xi \leq 1$ . En consecuencia, en este caso se espera un reflujo que origine una mezcla de los analitos, en lugar de la separación deseada (flujos ascendente y descendente). Sin embargo, esta mezcla se puede evitar manteniendo una corriente eléctrica baja (es decir, se sugiere un valor menor a 65  $\mu\text{A}$ ). Debido a que el comienzo de la mezcla se produce en el centro de línea cuando  $N_{Gr} = 1$ , como se deduce de la Ec. (2.2.5), los cálculos que se realizaron muestran que los diámetros de los capilares que se usan típicamente en las corridas de CZE satisfacen la condición para lograr corrientes eléctricas  $I_e$  relativamente bajas, teniendo en cuenta que el BGE tiene una fuerza iónica menor a 150 mM. En las Figuras 2.2.3 (b) y (c) se observa lo que ocurre cuando los radios de los capilares son 100 y 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente. La Figura 2.2.3 (d) muestra que cuando el potencial de campo eléctrico que se aplica varía entre 0.5 y 30 kV, el perfil plano de la velocidad electroosmótica ascendente se vuelve más parabólico en el entorno del centro de línea, afectando así la separación óptima de la CZE. En efecto, a pesar de que en esta sección del tubo capilar no se encuentra reflujo debido a

efectos térmicos (la convección natural tiene la misma dirección que la del EOF), se puede esperar una pérdida de resolución, como consecuencia de los efectos dispersivos que se obtendrán por el aumento de  $E$  (Piaggio y Deiber, 2003). Sin embargo, es importante señalar (ver Figura 2.3.3 (e)), que para los radios de los capilares que se usan típicamente en la CZE, la distorsión del perfil plano deseado es mínima y llega a ser perfectamente plano (ver Figura 2.2.3 (f)), aún cuando el voltaje aplicado sea tan alto como 30 kV y la fuerza iónica del BGE alcance un valor alrededor de 200 mM.

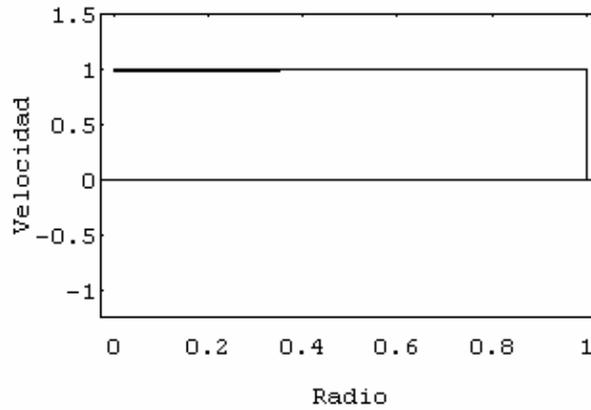
Es relevante señalar aquí que el modelo del EOF que se expresa a través de las Ecs. (1.3.1) a (1.3.6) y (2.2.1) a (2.2.7), involucrando la convección natural en la CZE, provee estimaciones del perfil de la velocidad electroosmótica en el tubo capilar. En efecto, los cálculos muestran que el valor del radio del capilar controla significativamente el número de Grashof, el cual es proporcional al radio elevado a la cuarta potencia. Este efecto también se analiza a través del valor de la corriente eléctrica, como se indica en la Ec. (2.2.7). En consecuencia, queda claro que las condiciones de protocolo que se usan normalmente en las experiencias de CZE hacen posible un perfil plano del EOF con las ventajas mencionadas en la Sección 2.2.1.



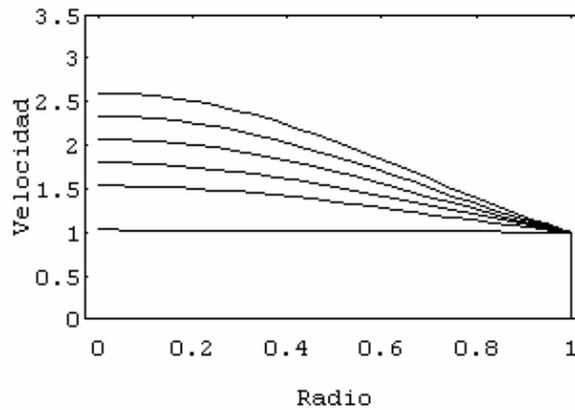
**Figura 2.2.3 (a).** Velocidad axial adimensional del EOF  $v\eta/(E\varepsilon|\zeta_t|)$  para el signo negativo en la Ec. (2.2.5), que corresponde al flujo descendente en función del radio adimensional  $\xi$  para diferentes potenciales eléctricos (30, 25, 20, 15, 10 y 0.5 kV, desde la máxima distorsión hasta el flujo plano, respectivamente). Los otros valores de los parámetros son:  $\varepsilon = 6.9 \text{ Cm}^2/\text{V}$ ,  $\eta = 0.001 \text{ Pa s}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ ,  $\zeta_t = -20 \text{ mV}$ ,  $L_t = 0.27 \text{ m}$ ,  $I = 0.2 \text{ M}$  y  $R = 150 \text{ }\mu\text{m}$ .



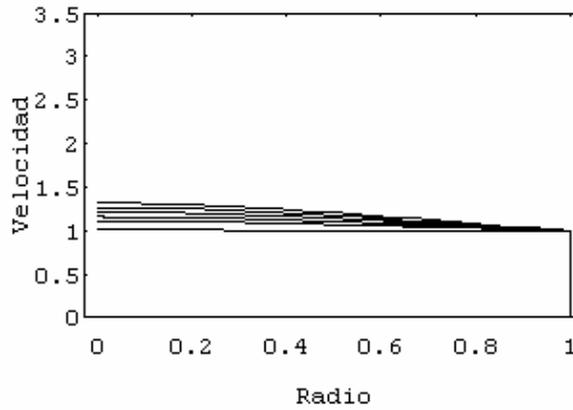
**Figura 2.2.3 (b).** Velocidad axial adimensional del EOF para el signo negativo en la Ec. (2.2.5), que corresponde al flujo descendente y para diferentes potenciales eléctricos (30, 25, 20, 15, 10 y 0.5 kV). Los otros valores de los parámetros son iguales a los de la Figura 2.2.3 (a), excepto  $R = 100 \mu\text{m}$ .



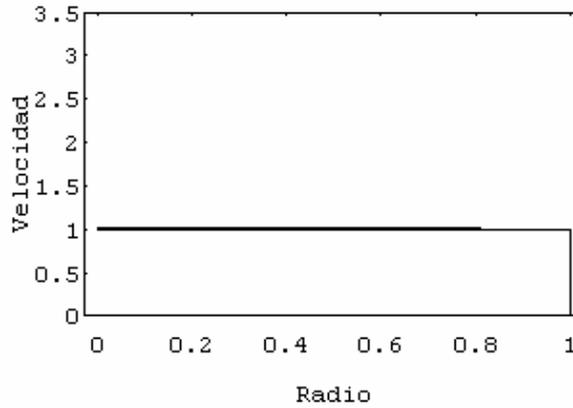
**Figura 2.2.3 (c).** Velocidad axial adimensional del EOF para el signo negativo en la Ec. (2.2.5), que corresponde al flujo descendente y para diferentes potenciales eléctricos (30, 25, 20, 15, 10 y 0.5 kV). Los otros valores de los parámetros son iguales a los de la Figura 2.2.3 (a), excepto  $R = 50 \mu\text{m}$ .



**Figura 2.2.3 (d).** Velocidad axial adimensional del EOF para el signo positivo en la Ec. (2.2.5), que corresponde al flujo ascendente y para diferentes potenciales eléctricos (30, 25, 20, 15, 10 y 0.5 kV). Los otros valores de los parámetros son iguales a los de la Figura 2.2.3 (a).



**Figura 2.2.3 (e).** Velocidad axial adimensional del EOF para el signo positivo en la Ec. (2.2.5), que corresponde al flujo ascendente y para diferentes potenciales eléctricos (30, 25, 20, 15, 10 y 0.5 kV). Los otros valores de los parámetros son iguales a los de la Figura 2.2.3 (a), excepto el  $R = 100 \mu\text{m}$ .



**Figura 2.2.3 (f).** Velocidad axial adimensional del EOF para el signo positivo en la Ec. (2.2.5), que corresponde al flujo ascendente y para diferentes potenciales eléctricos (30, 25, 20, 15, 10 y 0.5 kV). Los otros valores de los parámetros son iguales a los de la Figura 2.2.3(a) excepto el  $R = 50 \mu\text{m}$ .

### 2.2.3 Velocidad electrosmótica en la CZE. Determinación experimental

La teoría que se presenta en esta sección se usa en el sentido de garantizar que la velocidad electrosmótica  $v_{eo}$  es consistente con la siguiente expresión cuando el  $N_{Gr}$  es pequeño (ver para más detalles Ec. (2.2.5) y Russel *et al.*, 1989),

$$v_{eo} = -\frac{E \varepsilon \zeta_t}{\eta} \mp O(N_{Gr}) \quad (2.2.8)$$

donde la variación del potencial eléctrico también se desprecia dentro de la pequeña región  $R - l_D \leq r \leq R$  porque  $l_D$  es muy pequeño en la práctica. La Ec. (2.2.8) se usa en esta Tesis teniendo en cuenta que las variables de la CZE se eligen de tal manera que el número

de Grashof se minimiza adecuadamente de acuerdo a las sugerencias proporcionadas y analizadas en detalle en la Sección 2.2.2.

Por consiguiente, en la práctica, para estimar  $v_{eo}$ , es posible usar directamente la siguiente ecuación simplificada,

$$v_{eo} = -\frac{E \varepsilon \zeta_t}{\eta} \quad (2.2.9)$$

Consecuentemente, se deduce de esta expresión que  $v_{eo}$  se puede calcular de dos maneras: (a) a partir del conocimiento del potencial zeta de tubo se aplica directamente la Ec. (2.2.9) y (b) en forma experimental usando un marcador neutro, se calcula

$$v_{eo} = \frac{L_d}{t_{mo}} \quad (2.2.10)$$

donde  $t_{mo}$  es el tiempo de migración del analito que se usa como marcador del EOF.

Con relación al punto (b), la forma de obtener los datos experimentales necesarios para estimar  $v_{eo}$  consiste en inyectar en el capilar una marcador neutro que migra con la velocidad del EOF. Por consiguiente, si se conoce la distancia hasta el detector  $L_d$  y se mide el tiempo  $t_{mo}$  que este marcador necesita para alcanzar el detector, es posible calcular  $v_{eo}$ , directamente con la Ec. (2.2.10). En la Tabla 2.2.1 se presentan algunos ejemplos de variaciones del tiempo de migración del analito usado como marcador del EOF a diferentes pH y fuerzas iónicas. Es interesante mencionar que la sustancia que se usa como marcador neutro debe satisfacer ciertos requerimientos. Este compuesto debe ser soluble en agua, neutro en un amplio rango de pH, y no debe adsorberse sobre las paredes del capilar. Además, debe presentar una alta absorbancia en UV para permitir una detección fácil de forma tal que sea posible inyectar una cantidad pequeña. Para este propósito se sugieren como marcadores del EOF, por ejemplo, alcohol benzílico, riboflavina, acetona, benceno, dimetilsulfóxido (DMSO) y mesitolóxido (Kenndler-Blachkolm *et al.*, 1996).

Los tiempos de migración  $t_{mo}$  del marcador de EOF, que figuran en la Tabla 2.2.1, son el resultado de al menos tres experiencias consecutivas. Para cada experiencia se estimó la desviación estándar relativa, RSD en forma porcentual. En general, en los casos analizados la RSD no supera el 0.5 %.

**Tabla 2.2.1.** Variaciones del tiempo de migración experimental  $t_{mo}$  del marcador de EOF (DMSO), en función de distintos valores de pH y fuerza iónica  $I$ , para concentraciones iniciales variables de ácido bórico. Cálculos de la velocidad electroosmótica  $v_{eo}$  y el potencial de tubo  $\zeta_t$ , a partir de las Ecs. (2.2.10) y (2.2.9), respectivamente.

Ácido Bórico 25 mM					
pH	8.0	8.5	9	9.5	10.0
$I$ (mM)	1.69	4.66	10.5	17.4	21.97
$t_{mo}$ (min)	1.89	1.92	2.07	2.31	2.53
$v_{eo}$ $10^3$ (m/s)	1.764	1.736	1.610	1.443	1.318
$\zeta_t$ (V)	0.108	0.105	0.098	0.087	0.080
Ácido Bórico 50 mM					
pH	8.0	8.5	9	9.5	10.0
$I$ (mM)	3.38	9.32	21.01	34.81	43.94
$t_{mo}$ (min)	1.94	2.16	2.33	2.48	2.63
$v_{eo}$ (m/s)	1.718	1.543	1.431	1.344	1.267
$\zeta_t$ (V)	0.105	0.093	0.087	0.082	0.077
Ácido Bórico 75 mM					
pH	8.0	8.5	9	9.5	10.0
$I$ (mM)	5.07	13.98	31.51	52.21	65.90
$t_{mo}$ (min)	2.09	2.24	2.51	2.68	2.81
$v_{eo}$ (m/s)	1.595	1.488	1.328	1.244	1.186
$\zeta_t$ (V)	0.097	0.090	0.081	0.075	0.072
Ácido Bórico 100 mM					
pH	8.0	8.5	9	9.5	10.0
$I$ (mM)	6.76	18.64	42.01	69.61	87.87
$t_{mo}$ (min)	2.22	2.29	2.54	2.68	2.86
$v_{eo}$ (m/s)	1.502	1.456	1.323	1.244	1.166
$\zeta_t$ (V)	0.091	0.088	0.080	0.075	0.071

Como se muestra en la Tabla 2.2.1 la magnitud del EOF varía con el pH, y consecuentemente a pH alto, donde los grupos silanoles están predominantemente deprotonados, se espera que el EOF sea significativamente mayor que a pH bajo con abundancia de protones, pero debido a que el potencial zeta del tubo también depende de la fuerza iónica del BGE, en este caso se observa que el efecto que predomina es el de la fuerza iónica. En este sentido, un aumento de la fuerza iónica implica una compresión de la EDL, una disminución del potencial zeta y consecuentemente un aumento del tiempo de migración del EOF y por lo tanto la reducción de la velocidad del EOF.

Con respecto al punto (a) y la Ec. (2.2.9), a continuación en la Sección 2.3, se discute en particular el modelado del potencial zeta de tubos capilares de sílice en relación con la composición del BGE.

## **2.3 Modelado del potencial zeta del capilar en la CZE**

En esta Sección se presenta una relación teórica entre el potencial zeta de capilares de sílice fundida y la composición del BGE. La misma se deriva sobre la base de la ecuación de Poisson-Boltzmann y considera el equilibrio de disociación de los grupos silanoles de la pared del capilar como mecanismo de generación de cargas. En consecuencia, el modelo resultante involucra los parámetros fisicoquímicos relevantes de la interfaz BGE-pared del capilar. Se presta especial atención a la caracterización del BGE, los cuales pueden ser sales y/o soluciones amortiguadoras (*buffer*). El modelo se aplica satisfactoriamente a datos experimentales del EOF de diferentes soluciones acuosas, que cubren un amplio rango de pH y fuerza iónica  $I$ . En adición, se presentan predicciones numéricas que muestran la capacidad del modelo para cuantificar el EOF, cuyo control es relevante para mejorar la separación de analitos en CZE. Por último se extienden las predicciones teóricas a tubos capilares construidos con otros materiales poliméricos menos convencionales (ver también Berli *et al.*, 2003 y 2004).

### **2.3.1 Introducción**

Como se mencionó en la Introducción General de la Tesis, la CZE es uno de los modos de separación más comúnmente usados en la CE, principalmente porque la magnitud del EOF se puede manipular para optimizar el proceso de separación mediante

cambios adecuados del campo eléctrico aplicado  $E$ , el potencial zeta del capilar  $\zeta_t$ , y el cociente entre la permitividad eléctrica y la viscosidad  $\varepsilon/\eta$  del BGE. Otras ventajas se describen bien en Grossman y Colburn (1992), Jandick y Bonn (1993), Khun y Hoffstetter-Khun (1993), Poppe (1998), Kenndler (1998a). En este sentido, dos factores fundamentales que afectan el potencial zeta, y en consecuencia el EOF, necesitan ser controlados cuidadosamente: la densidad de carga de la pared del capilar y la composición química del BGE. Con este propósito se requiere una formulación racional de las soluciones en lo concerniente al pH, la fuerza iónica, la viscosidad y la permitividad eléctrica (ver, por ejemplo, Kenndler, 1998a; Kenndler y Gassner, 1990; Schwer y Kenndler, 1991; Kenndler y Friedl, 1992 y Kenndler, 1998b). Frecuentemente el medio más efectivo para controlar el potencial de superficie del capilar consiste en modificar el pH y la fuerza iónica del BGE (ver también, Tavares y McGuffin, 1995 y las referencias que se presentan allí para una discusión sobre este aspecto). Además, en la práctica se sabe, que la adecuada preparación del capilar (protocolos de activación y lavado) antes de una corrida electroforética es un paso crucial en el proceso de separación (Schwer y Kenndler, 1991; Lambert y Middleton, 1990).

Como se verá con más detalles en la Sección 2.4 de esta Tesis, el principio de separación en la CZE se basa en la movilidad electroforética, que depende del cociente entre la fuerza eléctrica (carga) y la fuerza de fricción (tamaño y forma) que actúan sobre cada analito. Debido a que en la mayoría de los casos los analitos se mueven en el tubo capilar hacia el detector con una velocidad efectiva, que es la resultante de la migración del EOF y la migración electroforética, es necesario cuantificar el potencial zeta del tubo capilar para determinar la movilidad absoluta de la partícula y otras propiedades asociadas para un BGE específico. A parte de esta situación experimental, los modelos de simulación de la CZE se usan corrientemente en los laboratorios (Piaggio y Deiber, 2003) principalmente para diseñar y optimizar protocolos de separación (ver, Capítulo 1 de la Tesis y Reijenga y Kenndler, 1994a para una discusión sobre los diferentes niveles de modelado y también, Mosher *et al.*, 1989; Saville y Palusinski, 1986 y Palusinski *et al.*, 1986 para el análisis de códigos computacionales que predicen la separación de anfolitos). Estas simulaciones predicen “electroferogramas virtuales” basados en ecuaciones de balance de propiedades fisicoquímicas relevantes del capilar, el BGE y los analitos. Entre estas propiedades, el potencial zeta del capilar es, por supuesto, de particular interés.

Para describir y cuantificar el EOF a través del potencial zeta de tubo, varias propuestas consisten en modelar la doble capa eléctrica con la introducción de parámetros tales como las constantes de equilibrio de adsorción de cationes, además del número de grupos ionizables por unidad de área  $n_s$  de la pared del capilar de sílice y el espesor de la capa compacta  $d$  (Salomón *et al.*, 1991; Wiese *et al.*, 1971). Un análisis detallado de los modelos de grupos superficiales ionizables de interfases acuosas fue realizado por Healy y White (1978), donde es evidente que varios parámetros, difíciles de determinar experimentalmente, surgen cuando se consideran otros fenómenos posibles como adsorción de cationes en la interfase. Tavares y McGuffin (1995) presentaron una ecuación para evaluar el potencial zeta de los capilares de sílice, y en consecuencia el EOF, donde se consideró una analogía entre membranas ión-selectivo y la estructura de la doble capa de la superficie de sílice. En general, se puede concluir que aún se requieren estudios teóricos básicos para encontrar una relación entre el potencial zeta del capilar y las características del BGE.

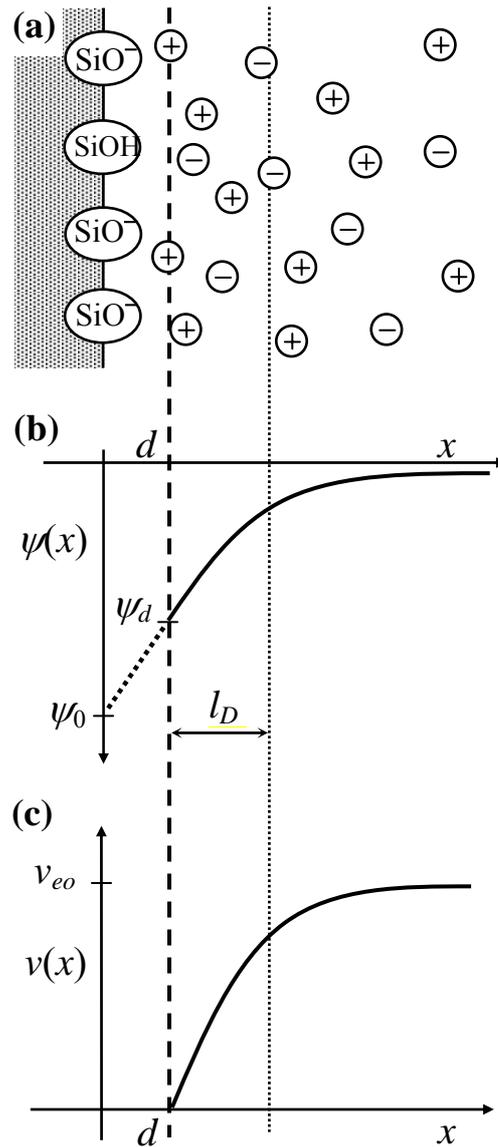
Precisamente, la finalidad de esta Sección es derivar una relación teórica entre el potencial zeta de los tubos capilares de sílice y la composición del BGE incluyendo las propiedades fisicoquímicas relevantes de este sistema. Por consiguiente, el modelo se desarrolla con base en la ecuación de Poisson-Boltzmann y consideraciones sobre la capa compacta adyacente a la superficie, la cual se expresa en términos de una capacitancia eléctrica por unidad de área. El intercambio de iones entre la superficie y el BGE, el cual es el fenómeno determinante del EOF, se considera a través de la densidad numérica  $n_s$  y la constante de disociación  $K_s$  de los grupos silanoles de la pared del capilar. En consecuencia, esta Sección está organizada de la siguiente manera: en la Sección 2.3.2 se consideran aspectos generales concernientes al fenómeno electrocinético, en particular se discute conceptualmente la ecuación básica que describe el EOF. En la Sección 2.3.3, se presenta el modelado del potencial zeta de los capilares de sílice. La estructura seguida en esta parte es cercana a la de Healy y White (1978). Las composiciones de los BGE que se usan frecuentemente en la CZE se discuten brevemente en la Sección 2.3.4. Luego, en la Sección 2.3.5, se aplica el modelo a datos experimentales extraídos de la literatura, como así también a los experimentos de EOF propios generados en este trabajo. En este sentido, se observa que los datos experimentales que involucran el EOF en capilares no están fácilmente disponibles en la literatura ni tampoco es sencillo procesarlos debido a la gran

diversidad de condiciones experimentales desarrolladas en los laboratorios. Por esta razón, se usan dos grupos de datos. Uno de ellos (Wiese *et al.*, 1971) considera  $\zeta_t$  para un amplio rango de pH, incluyendo soluciones de sales como BGE y un diámetro de capilar relativamente grande. Estos datos sirven como ilustración relevante del potencial zeta en los libros clásicos de CE (Khun y Hoffstetter-Khun, 1993). Los otros datos (datos experimentales que se obtienen en esta Tesis) concentran el estudio en una solución *buffer* típica que se usa como BGE, cubriendo una zona de pH que frecuentemente se emplea en la práctica. En la Sección 2.3.6, se discuten las respuestas asintóticas del modelo y se presentan predicciones numéricas para ilustrar el potencial zeta bajo diferentes valores de pH y fuerza iónica. Finalmente, en la Sección 2.3.7 se extiende el modelo a capilares contruidos con materiales menos convencionales.

### 2.3.2 Relación entre el EOF y potencial zeta del capilar

En primer lugar, se presentan definiciones y ecuaciones fundamentales que se utilizan en la descripción del modelo propuesto en esta Tesis y que relacionan el potencial zeta de los capilares de sílice y la composición del BGE.

La Figura 2.3.1 muestra esquemáticamente la representación de una superficie de sílice de un capilar de longitud  $L_t$  y radio  $R$  en equilibrio con una solución acuosa de un electrolito. En este trabajo, por razones prácticas que se visualizarán más adelante, la coordenada cilíndrica  $r$  se expresa a través de la coordenada  $x = R - r$  que mide la distancia desde la pared del capilar. Los grupos silanoles constituyentes de la pared del capilar se comportan como un ácido débil. La disociación de protones genera una interfase cargada negativamente, con una densidad de carga por unidad de área  $\sigma_0$ , y consecuentemente, un potencial de superficie  $\psi_0$ . En equilibrio térmico, la distribución de contraiones y co-iones cerca de la interfase está determinada por el balance entre las fuerzas entrópicas y electrostáticas. En particular, la región entre  $0 \leq x \leq d$ , que también se llama capa rígida, generalmente se supone libre de cargas (eléctricamente neutra) debido al tamaño finito de los iones hidratados. En realidad, la magnitud de  $d$  es del orden de varios Ångstrom (Å) (Hunter, 1992). La superficie en  $x = d$ , que también se designa la capa externa de Helmholtz, comprende el potencial  $\psi_d$ .



**Figura 2.3.1.** (a) Representación esquemática de la pared del capilar con grupos silanoles disociados que presentan cargas eléctricas negativas. La superficie cargada induce la formación de una capa difusa de iones en la solución electrolítica. (b) Potencial electrostático  $\psi(x)$  en función de la distancia  $x$  medida a partir de la superficie cargada. La longitud de Debye,  $l_D$ , mide el espesor de la capa difusa bajo condiciones típicas de CZE. (c) Perfil de la velocidad del fluido  $v(x)$  debido a la acción de un campo eléctrico aplicado a lo largo del capilar.  $d$ , espesor de la capa compacta;  $\psi_0$  potencial de superficie;  $\psi_d$  potencial en la capa externa de Helmholtz (se supone que  $\zeta_t \approx \psi_d$ );  $v_{eo}$ , velocidad electroosmótica límite. Todo el diagrama enfatiza la interfase sólido-líquido.

Se supone en todo este trabajo que  $\zeta_t \approx \psi_d$  (ver también, Hunter, 1992 y Attard *et al.*, 2000). Para  $x \geq d$ , en la capa difusa, la relación entre el potencial electrostático  $\psi(x)$  y las densidades iónicas están gobernadas por la ecuación de Poisson-Boltzmann,

$$\frac{1}{(x+R)^n} \frac{d}{dx} \left( (x+R)^n \frac{d\psi}{dx} \right) = -\frac{e}{\varepsilon} \sum_k z_k n_k^n \exp\left(-\frac{ez_k\psi}{k_B T}\right) \quad (2.3.1)$$

con condiciones de contorno  $\psi|_{x=d} = \zeta_t$  y  $\frac{d\psi}{dx}|_{x=R} = 0$ .

En la Ec. (2.3.1), el parámetro  $n$  se usa para describir las geometrías planar ( $n = 0$ ) y axisimétrica ( $n = 1$ ) (Griffiths y Nilson, 2000). Asimismo,  $e$  es la carga elemental,  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $z_k$  son las valencias de los iones,  $T$  es la temperatura absoluta, y  $n_k^b$  son las densidades iónicas en el seno de la solución. Como se muestra en la Figura 2.3.1(b),  $\psi(x)$  decrece a medida que se aleja de  $x = d$  y tiende a un valor diferente de cero en el centro de línea del capilar (Griffiths y Nilson, 2000), dependiendo esta respuesta del valor relativo del potencial zeta y de la fuerza iónica del BGE. Es apropiado recordar aquí que el parámetro  $\kappa = \left(2e^2 I N_A 10^3 / \varepsilon k_B\right)^{1/2}$ , es igual a la inversa de la longitud de Debye  $l_D$ ; y en esta ecuación,  $I = \frac{1}{2} \sum_k z_k^2 c_k$  es la fuerza iónica, donde  $c_k = n_k^b / 10^3 N_A$  son concentraciones molares; asimismo  $N_A$  es la constante Avogadro. Cuando se aplica un campo eléctrico a lo largo del capilar (normalmente en la dirección  $x$  en la Figura 2.3.1), la fuerza eléctrica mueve los iones en la dirección del campo, arrastrando el BGE a través del capilar. El perfil de la velocidad electroosmótica  $v(x)$  se desarrolla como se representa en la Figura 2.3.1(c).

Recientemente, Griffiths y Nilson (2000) (ver también, Gross y Osterle, 1968) llevaron a cabo soluciones numéricas de la Ec. (2.3.1) acopladas al balance de especies y a la ecuación de Navier-Stokes que involucra la fuerza eléctrica, para obtener el potencial eléctrico, la velocidad del fluido y la distribución final de solutos en presencia de EOF para tubos de sección transversal, circular y rectangular con valores de potenciales zeta no necesariamente bajos. A partir de este estudio es evidente que el efecto causado sobre los perfiles de velocidad electroosmótica y potencial eléctrico por el aumento del número adimensional  $ez_k \zeta_t / k_B T$  es análogo a aquel que se obtiene disminuyendo el cociente  $l_D / R$ , donde  $l_D = 1/\kappa$ . De este manera para valores intermedios del potencial zeta que típicamente se encuentran en la CZE y cuando  $l_D / R \ll 1$ , se logra un EOF casi pistón, o sea la relación de Helmholtz-Smoluchowski es válida. En efecto, Gaš *et al.* (1995) claramente demostraron esta conclusión concerniente al EOF en la CZE sobre la base de

que el potencial eléctrico en torno del centro del capilar es casi cero en capilares con diámetros mayores de 10  $\mu\text{m}$ . Esta situación del flujo se logra porque la variación de  $\psi(x)$  está confinada dentro de la pequeña región,  $d \leq x \leq l_D$ , teniendo en cuenta que el efecto Joule asociado con la corriente eléctrica se minimizó adecuadamente (ver Sección 2.2). Por ejemplo, valores de  $\text{pH} = 9$ ,  $I \approx 10 \text{ mM}$  y  $2R \approx 75 \mu\text{m}$  conducen a  $l_D/R \approx 10^{-4}$ , el cual es un valor suficientemente pequeño para considerar  $\psi|_{x=R} \approx 0$ . Debido a que en las corridas típicas de la CZE esta condición se satisface plenamente, se puede desprestigiar la curvatura del tubo en la Ec. (2.3.1) para calcular  $\zeta_t$  colocando  $n = 0$ . No obstante las consideraciones enunciadas más arriba sobre el EOF en la CZE, se observa que después de desprestigiar la curvatura del capilar y consecuentemente tomando el potencial eléctrico asintóticamente nulo en el centro de línea, la respuesta no lineal de la ecuación de Poisson-Boltzmann se preserva todavía en este análisis. Así, la Ec. (2.3.1) con  $n = 0$  proporciona resultados válidos para valores de  $\zeta_t$  altos, es decir, no se aplica la aproximación de Debye-Hückel.

Desde el punto de vista cinemático, la relación entre el EOF y el potencial zeta en capilares recibió especial atención en la literatura durante los últimos años, principalmente para visualizar bajo que condiciones fisicoquímicas las hipótesis clásicas son válidas para dar, por ejemplo, la relación de Helmholtz-Smoluchowski que involucra una velocidad electroosmótica casi pistón (ver, por ejemplo, Griffiths y Nilson, 2000; Gaš *et al.*, 1995; Andreev y Lisin, 1992). La motivación de estos estudios responde en parte a los resultados previos reportados por Rice y Whitehead (1965) que indican que los perfiles de velocidad estacionaria del EOF en capilares cilíndricos calculados a través de una aproximación lineal de los términos exponenciales en la ecuación de Poisson-Boltzmann fallan cuando el valor absoluto del potencial zeta es mayor de 50 mV (ver también, Martín y Guiochon, 1984; Martín *et al.*, 1985 donde este tema se considera en relación a la cromatografía líquida). Estos resultados indican claramente que se necesitan soluciones numéricas para evaluar con precisión situaciones físicas diferentes bajo las cuales se desarrolló el EOF y, además, para comprender cómo estas situaciones se relacionan con la práctica de la CZE. Con relación a este aspecto, Gaš *et al.* (1995) y Andreev y Lisin (1992), reportaron estudios importantes donde los perfiles del potencial eléctrico en la capa difusa se calculan a partir de la ecuación de Poisson-Boltzmann que se expresa en el sistema de coordenadas cilíndricas sin introducir aproximaciones. En estos trabajos, es posible también encontrar

una expresión analítica para el perfil de velocidad electroosmótica en términos del potencial eléctrico de la capa difusa bajo condiciones isotérmicas del BGE, como sigue (ver también Sección 2.2.2 acerca del cálculo de la velocidad electroosmótica):

$$v(x) = -\frac{\varepsilon E \zeta_t}{\eta} \left( 1 - \frac{\psi(x)}{\zeta_t} \right) \quad (2.3.2)$$

Dentro del mismo contexto de análisis de la Ec. (2.3.2) y si se incluye el balance de energía del BGE (Probstein, 1989; Russell *et al.*, 1989) se reporta (Piaggio y Deiber, 2001, 2003 y 2006b) que bajo condiciones no isotérmicas la velocidad axial electroosmótica  $v(x)$  se puede expresar a través de la Ec. (2.3.2) sumando un término del orden del número

de Grashof  $N_{Gr} = \frac{\rho g \beta \sigma E R^4}{24 \varepsilon k \zeta_t}$ , el cual es despreciable para capilares de radio pequeño

(ver Sección 2.2.2). En efecto, como se mencionó anteriormente en esta Tesis, el valor del  $N_{Gr}$  mide la distorsión del EOF proporcionada por la Ec. (2.3.2), cuando los efectos térmicos son importantes. Para  $N_{Gr} \rightarrow 0$ , el resultado que se encuentra (Piaggio y Deiber, 2001) es consistente con la Ec. (2.3.1). También se observa en la Ec. (2.3.2) que la velocidad del fluido disminuye para  $x = d$  satisfaciendo la clásica condición de contorno de no-deslizamiento. En adición, como  $l_D/R$  es pequeño en la CZE, el potencial se desvanece para  $x \gg l_D$  y la velocidad del fluido alcanza el valor límite  $v_{eo}$ , casi pistón.

Cuando todas las condiciones enunciadas arriba se satisfacen, se obtiene (Gaš *et al.*, 1995), la Ec. (2.2.9),  $v_{eo} \approx -\frac{\varepsilon E \zeta_t}{\eta}$ , presentada en la Sección 2.2.3, la cual es la ecuación de

Helmholtz-Smoluchowski que relaciona  $\zeta_t$  con la velocidad del EOF,  $v_{eo}$ .

### 2.3.3 Modelado del potencial zeta del capilar con relación a la composición del BGE

#### *Conceptos asociados con interfases cargadas*

Aquí, se presentan varios conceptos que son necesarios para estudiar las interfases cargadas en equilibrio con una solución electrolítica acuosa. La densidad de carga superficial  $\sigma_0$ , generada por la disociación de los grupos silanoles de la pared del capilar, se balancea con la carga total en la capa difusa de iones,  $\sigma_d$ . Por lo tanto, la electroneutralidad del sistema se establece a través de,

$$\sigma_d + \sigma_0 = 0 \quad (2.3.3)$$

donde,

$$\sigma_d = \int_R^d e \sum_k z_k n_k^b \exp\left(-\frac{ez_k \psi}{k_B T}\right) dx \quad (2.3.4)$$

combinando la Ec. (2.3.1) con  $n = 0$  y la Ec. (2.3.4), y si se consideran las condiciones de contorno, se obtiene,

$$\sigma_d = \left\{ 2\epsilon k_B T \sum_k n_k^b \left[ \exp\left(-\frac{ez_k \zeta_t}{k_B T}\right) - 1 \right] \right\}^{1/2} \quad (2.3.5)$$

Esta ecuación, que también se llama la ecuación de Grahame, establece una relación entre la carga superficial y la concentración de iones en solución. Para el caso particular de un electrolito simétrico ( $z_+ = -z_- = z$ ) en equilibrio con un reservorio infinitamente grande ( $n_+^b = n_-^b = n^b$ ), la Ec. (2.3.5) da el resultado del modelo de Gouy-Chapman que se expresa (Russel *et al.*, 1989),

$$\sigma_d = -(8\epsilon k_B T n^b)^{1/2} \sinh(ze\zeta_t / 2k_B T) \quad (2.3.6)$$

Las suposiciones precedentes también implican que la concentración de contraiones que neutralizan la carga superficial de la pared del capilar se desprecia en comparación con la concentración de iones en el seno de la solución.

Por otro lado, el potencial en la capa compacta requiere diferentes consideraciones físicas. Para simplificar los cálculos, una práctica común en la literatura es interpretar las superficies planas equipotenciales en  $x=0$  y  $x=d$  como un par de placas cargadas formando un capacitor. Por consiguiente, debido a que los iones se excluyen de esta región, el potencial que cae de una parte a otra de la capa  $0 \leq x \leq d$  se supone que es lineal, es decir,

$$\psi_0 - \zeta_t = \sigma_0 / C_{in} \quad (2.3.7)$$

donde  $C_{in}$  es la capacitancia por unidad de área de la región interior entre estas placas (Hunter, 1992). En este sentido se requiere la introducción de  $C_{in}$  en la capa compacta para describir adecuadamente la relación entre  $\psi_0$ , el cual se evalúa por medio de la titulación de cargas, y  $\zeta_t$  que se obtiene a partir de mediciones de la velocidad electroosmótica, proporcionada por la Ec. (2.2.9).

### ***Química de la superficie y potencial de superficie***

El potencial de superficie  $\psi_0$  se desarrolla debido a la disociación de los grupos silanoles de la pared del capilar de sílice, como se mencionó en la leyenda de la Figura 2.3.1(a). Esta disociación está representada por el equilibrio químico,



similar a la disociación de un ácido débil en solución acuosa. En los tubos de sílice, el número de sitios ionizables por unidad de área superficial es aproximadamente  $n_S \approx 10^{17} \text{ m}^{-2}$  (ver por ejemplo, Jandik y Bonn, 1993 y Russel *et al.*, 1989). Por consiguiente, los cálculos indican que la máxima concentración de protones liberados al medio se desprecia en comparación con las concentraciones de sales que se usan típicamente en la CZE. Este hecho afortunadamente simplifica los cálculos debido a que la cantidad de  $\text{H}^+$  en la solución se controla exclusivamente por la cantidad de ácido o base que se agrega al BGE. De esta manera, la relación entre la concentración de protones en la solución y la densidad de carga superficial se establece fácilmente. Para este propósito, se considera un sistema compuesto de una superficie sólida que contiene ambas especies  $\text{SiOH}$  y  $\text{SiO}^-$  en equilibrio con un reservorio de electrolitos grande. Este reservorio es la solución electrolítica, en el cual el potencial electrostático en el seno es  $\psi \approx 0$  de acuerdo a las consideraciones previas para  $l_D/R$  pequeño. Por consiguiente, para expresar la ecuación de equilibrio que involucra el proceso de disociación de los grupos silanoles, los potenciales químicos de las especies deben incluir adecuadamente la contribución electrostática a la energía libre además de aquella que corresponde a la entropía de mezcla (Evans y Wennerström, 1999). Basado en la termodinámica estadística, y si se supone que la mezcla es ideal (los coeficientes de actividad son unitarios; ver también Kenndler, 1998a para una discusión sobre este último aspecto), se obtiene la constante de equilibrio  $K_S$  como sigue (Healy y White, 1978),

$$\frac{[\text{SiO}^-][\text{H}^+]}{[\text{SiOH}]} = K_S \exp(e\psi_0/k_B T) \quad (2.3.8)$$

donde  $[\text{SiO}^-]$  y  $[\text{SiOH}]$  representan las concentraciones superficiales que se expresan en moles/m<sup>2</sup>, mientras  $[\text{H}^+]$  se refiere a la concentración de protones en el seno de la solución en moles/m<sup>3</sup>. El factor  $\exp(e\psi_0/k_B T)$  se interpreta como la contribución

electrostática al potencial de superficie  $\psi_0$ . Otros autores simplemente consideran que  $[H^+] \exp(-e\psi_0/k_B T)$  representa la concentración actual de protones en la superficie del sólido donde tiene lugar la reacción de disociación (Gisler *et al.*, 1994; ver también, el Capítulo 4 de esta Tesis donde se introduce el concepto de “regulación de cargas”). A partir de la Ec. (2.3.8), se encuentra fácilmente la carga superficial como,

$$\sigma_0 = \frac{-en_S}{1 + ([H^+]/K_S) \exp(-e\psi_0/k_B T)} \quad (2.3.9)$$

donde  $en_S$  es el número total de cargas superficiales disponibles.

### **Modelo y procedimiento de cálculo**

Como se mencionó en la Sección 2.3.1, es de interés predecir el potencial zeta a partir del conocimiento de las características del BGE. Con este propósito se relacionan las Ecs. (2.3.3), (2.3.7) y (2.3.9) para determinar  $\zeta_t$  a partir de la siguiente expresión:

$$\sigma_d(n_k^b, \zeta_t) - \frac{en_S}{1 + \left( \frac{[H^+]}{K_S} \right) \exp \left\{ \frac{-e}{k_B T} \left[ \zeta_t - \frac{\sigma_d(n_k^b, \zeta_t)}{C_{in}} \right] \right\}} = 0 \quad (2.3.10)$$

donde  $\sigma_d(n_k^b, \zeta_t)$  está dado por la Ec. (2.3.5). En particular, para electrolitos simétricos se usa la Ec. (2.3.6). El alcance de la Ec. (2.3.10) es bastante general en la medida que las densidades iónicas se cuantifiquen adecuadamente para cada BGE (ver Sección 2.3.4). Es interesante señalar aquí que una expresión más simple para el potencial zeta se estableció en la literatura (Healy y White, 1978) suponiendo que  $C_{in} \rightarrow \infty$ , y en consecuencia  $\psi_0 \approx \zeta_t$ . En adición, se consideró electrolitos  $z:z$  solamente, es decir  $\sigma_d(n_k^b, \zeta_t)$  se obtiene a partir de la Ec. (2.3.6).

En la Ec. (2.3.10) se reconocen parámetros que caracterizan el capilar  $(n_S, K_S, C_{in})$ , el BGE  $(n_k^b, [H^+])$  y el potencial zeta del capilar  $\zeta_t$ . Si se tiene en cuenta que la composición de la solución electrolítica se conoce a partir del proceso de formulación (ver Sección 2.3.4), el primer paso en los cálculos es evaluar los parámetros del capilar. Para este propósito se requieren una serie de  $N$  datos experimentales  $\{\text{pH}, I, \zeta_t\}$ . Luego,  $n_S, K_S$  y  $C_{in}$  se determinan como los valores que minimizan, para el conjunto de datos completos, el lado izquierdo de la Ec. (2.3.10), designado  $\Delta$ . En este

sentido, se encuentra el mínimo de la suma de los cuadrados,  $\sum_{i=1}^N (\Delta_i)^2$ , donde el subíndice  $i$  se refiere a cada terna  $\{\text{pH}, I, \zeta_t\}$  de datos experimentales utilizados en la Ec. (2.3.10). Los cálculos numéricos se realizan por medio de la rutina de minimización típica basada en el método de Newton. La desviación estándar relativa del ajuste en todas las muestras analizadas es menor del 5 %. Una vez que se conocen los parámetros del capilar, se puede predecir el potencial zeta para una composición diferente del electrolito con el mismo esquema numérico, donde los datos impuestos son  $\{\text{pH}, I\}$  y el único parámetro que se desconoce es  $\zeta_t$ .

### 2.3.4 Composición de las soluciones electrolíticas

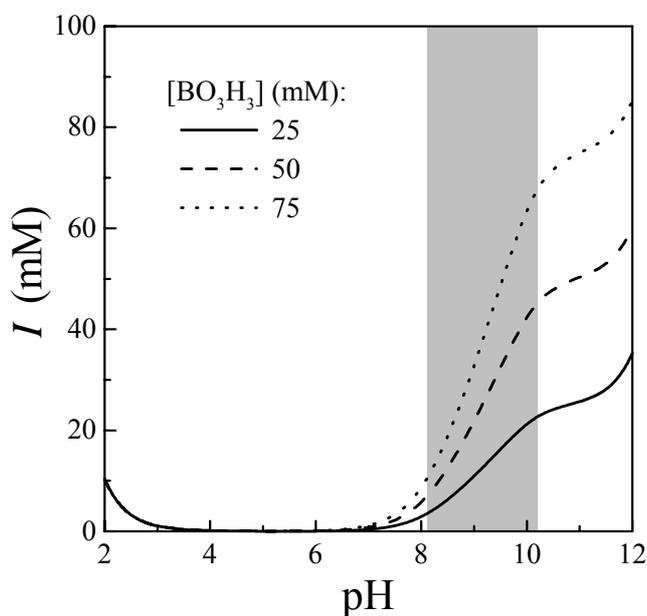
Para obtener datos experimentales relevantes del EOF en capilares de sílice fundida, los cálculos de la fuerza iónica de las diferentes soluciones que se usan en el programa experimental se deben realizar cuidadosamente, evitando aproximaciones importantes que usualmente introducen errores en los valores extremos de pH y concentraciones de sales. Por esta razón, se mencionan aquí, cuestiones numéricas relevantes en los cálculos de la fuerza iónica  $I$  para dos tipos de BGE que se usan en esta parte de la Tesis.

Para soluciones de sales 1:1, por ejemplo,  $\text{KNO}_3$ , la fuerza iónica es simplemente  $I \approx [\text{KNO}_3]$ , donde la contribución por la disociación del agua se desprecia. En los experimentos del EOF, el pH de las soluciones se varía agregando KOH o  $\text{HNO}_3$ . En este proceso, la fuerza iónica se considera constante si la concentración inicial de sal,  $[\text{KNO}_3]$ , excede ampliamente la concentración de ácido o base agregada para ajustar el pH. Sin embargo, cuando la concentración de sal es bastante baja, los equivalentes de ácido o base agregados se deben también considerar. Asimismo, para esta solución electrolítica, la densidad de carga  $\sigma_d(n_k^b, \zeta_t)$  que se introduce en la Ec. (2.3.10) se debe evaluar a través de la Ec. (2.3.6), en la cual  $n_b \equiv 10^3 N_A I$ .

En el caso de soluciones de  $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ , por ejemplo, la contribución de los iones divalentes a la fuerza iónica es particularmente importante. En adición, el pH de la solución se aumenta con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  o se disminuye con  $\text{HNO}_3$ . Teniendo en cuenta estas contribuciones, la fuerza iónica para este caso puede cambiar significativamente para

valores de pH diferentes de alrededor de 7. En consecuencia, en el caso de un electrolito 2:1, la densidad de carga  $\sigma_d(n_k^b, \zeta_t)$  se debe evaluar necesariamente a través de la Ec. (2.3.5), porque no se puede expresar explícitamente en términos de  $I$ .

En las determinaciones de la CZE y también en la evaluación experimental del EOF correspondiente, el pH de la solución se controla comúnmente con un *buffer* adecuado. Siguiendo esta práctica, en los experimentos realizados en este trabajo (Sección 2.3.5), se usa un *buffer* borato (par conjugado  $\text{BO}_3\text{H}_3/\text{BO}_3\text{H}_2^-$ ), cuyo valor de  $\text{p}K_a$  es 9.2 a 25°C. Asimismo, se agrega a la solución una base fuerte (NaOH) para aumentar el pH. De esta manera, la fuerza iónica se determina principalmente por los equivalentes de  $\text{BO}_3\text{H}_2^-$  presentes en el medio. Sin embargo, para valores de pH altos y bajos, la expresión aproximada  $I \approx c_0 / (1 + 10^{-(\text{pH} - \text{p}K_a)})$  donde  $c_0$  es la concentración molar de ácido bórico que se usa en la preparación de la solución, se debe corregir debido a la contribución de  $[\text{H}^+]$ . Para discusiones adicionales que se presentan más adelante, se muestra en la Figura 2.3.2, la variación de la fuerza iónica en función del pH para diferentes valores de  $c_0$  en la cual se indica el rango de pH (zona sombreada) donde la capacidad *buffer* es máxima.



**Figura 2.3.2.** Fuerza iónica en función del pH del *buffer*  $\text{BO}_3\text{H}_3/\text{BO}_3\text{H}_2^-$  a 25 °C. La zona sombreada muestra el rango de pH donde la capacidad *buffer* es máxima y en el cual se reportan los resultados experimentales.

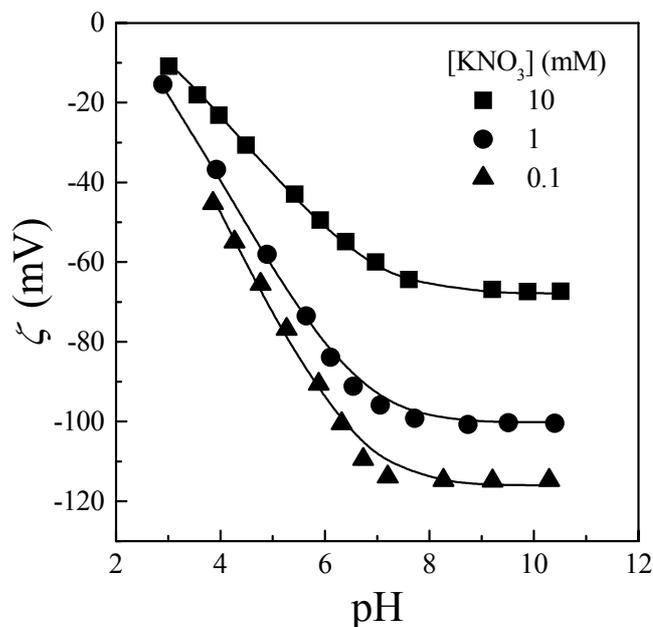
### 2.3.5 Validación del modelo del potencial zeta con datos experimentales

#### *Datos que involucran soluciones de sales*

En esta parte, el modelo se aplica a datos experimentales del potencial zeta como una función del pH cuando el BGE es una solución compuesta de sales. Si bien, los resultados y detalles de la técnica experimental están bien descritos en Wiese *et al.* (1971), es relevante señalar aquí que las medidas se realizaron en un capilar de sílice vítrea de 760  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0.30 m de longitud. La temperatura fue de 25  $^{\circ}\text{C}$  y por lo tanto  $\varepsilon = 6.95 \times 10^{-10} \text{C}^2/\text{Nm}^2$  para la solución acuosa. Los valores de los parámetros del modelo que se obtienen con los datos de esta Tesis para diferentes composiciones de electrolitos se presentan en la Tabla 2.3.1. La Figura 2.3.3 presenta  $\zeta_t$  en función del pH para diferentes concentraciones de un electrolito 1:1. Los símbolos indican los resultados experimentales (Wiese, *et al.*, 1971) y las líneas se refieren a las predicciones del modelo cuando se usan los valores de los parámetros reportados en la Tabla 2.3.1. Se observa una concordancia muy buena entre la teoría y los experimentos para todo el rango de pH y concentraciones de sales. Es relevante observar que se obtienen casi los mismos valores numéricos de  $K_S$  para las concentraciones de sales estudiadas aquí. En relación a los datos de la Tabla 2.3.1 también se observa que los valores típicos de  $C_{in}$  están en el rango de 0.1-1  $\text{Fm}^{-2}$  para el caso de grupos ácidos unidos a superficies sólidas (Hunter, 1992). En adición, el número de grupos silanoles ionizables que se encuentra es del mismo orden de magnitud que el que se reporta típicamente en la literatura (ver, por ejemplo, Jandik y Bonn, 1993 y Russel *et al.*, 1989), a pesar que se registra un pequeño cambio con  $I$ . Esta ligera variación del parámetro  $n_S$  probablemente indica que el número efectivo de cargas superficiales puede cambiar con una concentración de sal 1:1.

**Tabla 2.3.1.** Valores de los parámetros del modelo que se obtienen en la predicción de los datos del EOF para un capilar de sílice vítrea.

Electrolito	Concentración (mM)	$\text{p}K_S$	$C_{in}$ ( $\text{Fm}^{-2}$ )	$n_S$ ( $10^{17} \text{m}^{-2}$ )
$\text{KNO}_3$	0.1	3.51	0.18	1.27
	1		0.17	0.80
	10		0.10	0.35
$\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$	0.033	3.68	0.52	0.42
	0.1			0.45
	0.333			0.43

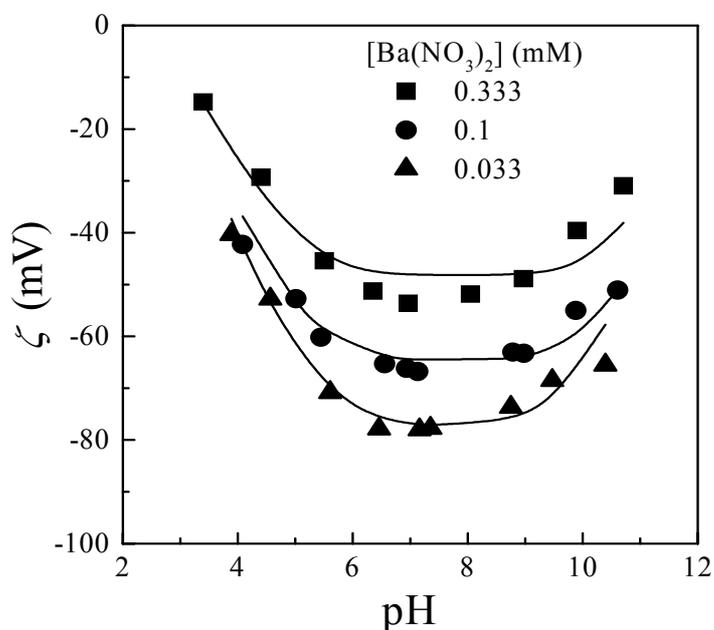


**Figura 2.3.3.** Potencial zeta de un capilar de sílice vítreo en función del pH, para diferentes concentraciones de  $\text{KNO}_3$ . Los símbolos representan los datos experimentales reportados en Wiese *et al.* (1971). Las líneas son las predicciones que se obtienen con el modelo usando los valores de los parámetros presentados en la Tabla 2.3.1.

La Figura 2.3.4 representa  $\zeta_t$  en función del pH para diferentes concentraciones de un electrolito 2:1. Nuevamente, los símbolos indican los resultados experimentales (Wiese *et al.*, 1971) y las líneas se refieren a las predicciones del modelo con los valores de los parámetros reportados en la Tabla 2.3.1. Es relevante señalar que el modelo predice adecuadamente el valor mínimo de  $\zeta_t$  en función del pH. En la literatura se presentan diferentes explicaciones para interpretar este comportamiento en los experimentos de EOF (Wiese *et al.*, 1971). Aquí, se encuentra que las curvas  $\zeta_t(\text{pH})$  se describen satisfactoriamente cuando la composición del BGE se evalúa rigurosamente. En efecto, el mínimo se predice con el modelo solamente en el caso que los equivalentes de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  agregados para aumentar el pH se consideren en la evaluación de  $\sigma_d(n_k^b, \zeta_t)$ . Consistentemente, la sumatoria de todas las especies iónicas en la Ec. (2.3.5) se lleva a cabo como sigue,

$$\frac{\sum_k n_k^b (e^{-z_k \phi} - 1)}{10^3 N_A} \approx \begin{cases} [\text{Ba}(\text{NO}_3)_2] (2e^\phi + e^{-2\phi} - 3) + 10^{(\text{pH}-14)} (e^\phi + e^{-2\phi} / 2 - 3/2), & \text{pH} > 7; \\ [\text{Ba}(\text{NO}_3)_2] (2e^\phi + e^{-2\phi} - 3) + 10^{(-\text{pH})} (e^\phi + e^{-\phi} - 2), & \text{pH} < 7 \end{cases}$$

donde  $e \approx \exp(1)$  y  $\phi \approx e\zeta_t/K_B T$ . Por consiguiente, para valores de pH más alto que  $\approx 7$ , el valor absoluto de  $\zeta_t$  disminuye debido al aumento de la fuerza iónica con el pH.



**Figura 2.3.4.** Potencial zeta de un capilar de sílice vítrea en función del pH, para diferentes concentraciones de  $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ . Los símbolos son los datos experimentales reportados por Wiese *et al.* (1971). Las líneas son las predicciones que se obtienen con el modelo usando los valores de los parámetros presentados en la Tabla 2.3.1.

### ***Datos que involucran soluciones buffer***

#### ***Experimentos***

Las mediciones del EOF se realizan con un equipo comercial P/ACE 5010 Beckman Instrument (Fullerton, CA, USA). En este caso se usan en las experiencias un capilar de sílice fundida de 47 cm de longitud total y 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno. El detector UV está ubicado a 40 cm del comienzo del capilar. El voltaje que se aplica es de 20 kV y la temperatura se fija en 25  $^\circ\text{C}$ , la cual se controla por el sistema de líquido refrigerante que dispone el equipo. Uno de los marcadores de EOF que se usa es cafeína (FADA) con una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  preparada en agua destilada. Se utiliza la inyección hidrodinámica para introducir el marcador de EOF en el capilar a una presión de 0,5 psi con un tiempo de inyección igual a 2 s. El tiempo de corrida es igual a 4 minutos y la longitud de onda de detección que se selecciona es 214 nm. Los BGEs que se usan son

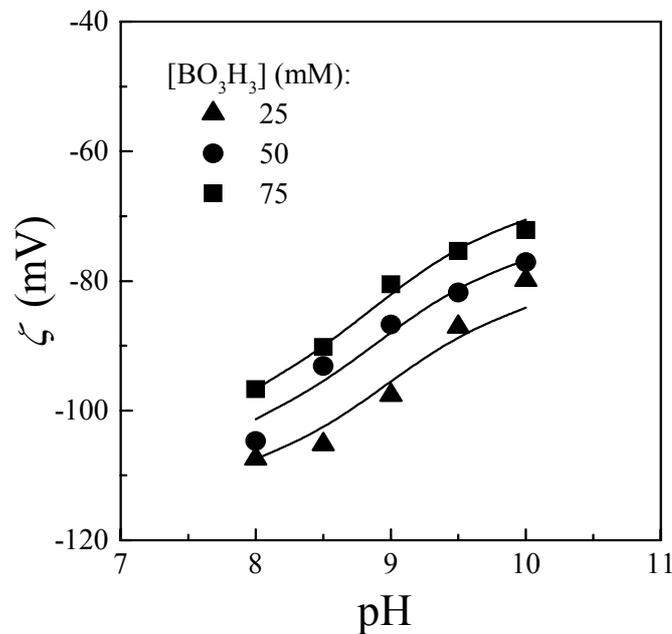
soluciones acuosas de ácido bórico (Sigma, St. Louis, MO, USA). Las concentraciones de los mismos se formula para mantener la fuerza iónica en el rango de 2-100 mM. El pH se ajusta en el rango de  $8 \leq \text{pH} \leq 10$  con el agregado de NaOH 10 M. Los valores de los pH se controlan con un pH-metro (Orion 410A; Beverly, MA, USA). El tubo capilar, cuando se usa por primera vez, se activa lavándolo durante 15 minutos con HCl 0,1 N, 15 minutos con H<sub>2</sub>O, 30 minutos con NaOH 0,1 N, 30 minutos con H<sub>2</sub>O y finalmente 30 minutos con el *buffer* borato deseado. Cada cambio de pH y fuerza iónica del *buffer* involucra un lavado del capilar durante 3 minutos con NaOH 0,1 N, 3 minutos con H<sub>2</sub>O y 5 minutos con la nueva solución *buffer*. Se realizan, al menos tres corridas para cada una de las determinaciones y la desviación estándar relativa (RSD) que se calcula para el tiempo de migración es menor del 0,5 %. Los datos experimentales que se obtienen se corroboran luego usando otro marcador de EOF: DMSO (Sigma) preparado en solución acuosa al 0,5 %, con un tiempo de inyección en este caso igual a 1 segundo. Finalmente, se calculan los valores de  $\zeta_t$  usando la Ec. (2.2.9).

### **Resultados**

La Figura 2.3.5 presenta los datos experimentales que se obtienen para diferentes concentraciones de *buffer*. En esta figura, las líneas se refieren a las predicciones del modelo con los siguientes valores de los parámetros:  $pK_S = 6$ ,  $C_{in} = 1 \text{ Fm}^{-2}$  y  $n_S = a + bc_0$ , donde  $a = 2.44 \cdot 10^{17} \text{ m}^{-2}$  y  $b = 14.6 \cdot 10^{17} \text{ m}^{-2}\text{M}^{-1}$  para  $0.025 \text{ M} \leq c_0 \leq 0.1 \text{ M}$ . Los resultados muestran que el valor de  $pK_S$  que se obtiene coincide con el valor reportado en la literatura (Hewlett-Packard, 2000). Teniendo en cuenta que todos estos parámetros son físicamente relevantes, se concluye que el modelo es capaz de predecir los datos experimentales de  $\zeta_t$  para diferentes trayectorias de  $I$  y pH. Estas trayectorias se generan usando las relaciones adecuadas entre pH y fuerza iónica (ver, también Sección 2.3.4) a una concentración de *buffer*  $c_0$  específica.

Es evidente de acuerdo a los resultados señalados más arriba que los valores encontrados para los parámetros  $(n_S, K_S, C_{in})$  que caracterizan a un capilar de sílice fundida son diferentes de aquellos correspondientes a un capilar de sílice vítrea. En principio se observa que diferentes procesos de fabricación de los capilares de sílice conducen a diferentes valores de potenciales zeta para un BGE particular. En este sentido,

los capilares de sílice fundida están hechos por melteado a temperatura muy alta (Jandik y Bonn, 1993). En este proceso, los capilares se extrudan partiendo del material fundido y luego son enfriados y expuestos a la atmósfera. Posteriormente, un proceso lento de relajación que involucra el estiramiento de los grupos siloxanos permite la aceptación de grupos hidróxido que provienen del agua, lo cual genera una cubierta de grupos silanoles. Consecuentemente, el valor de  $n_S$  para un capilar de sílice fundida ( $2.8-3.5 \times 10^{17}$  sitios/m<sup>2</sup>) se espera que sea más alto que aquel del clásico capilar vítreo ( $0.43-1.27 \times 10^{17}$  sitios/m<sup>2</sup>), el cual es un resultado que se observa en los cálculos realizados. En adición al resultado mencionado anteriormente, se debe señalar que no es posible en general especificar un valor definitivo de  $pK_S$  teniendo en cuenta que para el caso de los capilares



**Figura 2.3.5.** Potencial zeta de un capilar de sílice fundida en función del pH, para diferentes concentraciones de  $\text{BO}_3\text{H}_3$  (*buffer*). Los símbolos son los datos experimentales obtenidos en este trabajo. Las líneas son las predicciones del modelo con los siguientes valores de los parámetros:  $pK_S = 6$ ,  $C_{in} = 1\text{Fm}^{-2}$  y  $n_S = a + bc_0$ , con  $a = 2.44 \times 10^{17} \text{ m}^{-2}$  y  $b = 14.6 \times 10^{17} \text{ m}^{-2} \text{ M}^{-1}$ .

de sílice fundida, al menos se pueden encontrar cinco tipos de grupos silanoles superficiales con diferentes ambientes químicos, dependiendo del proceso de fabricación (ver Jandik y Bonn, 1993 y referencias allí incluidas). Por lo tanto, como lo sugieren Jandik y Bonn (1993), probablemente es correcto pensar que los valores de  $pK_S$  de los

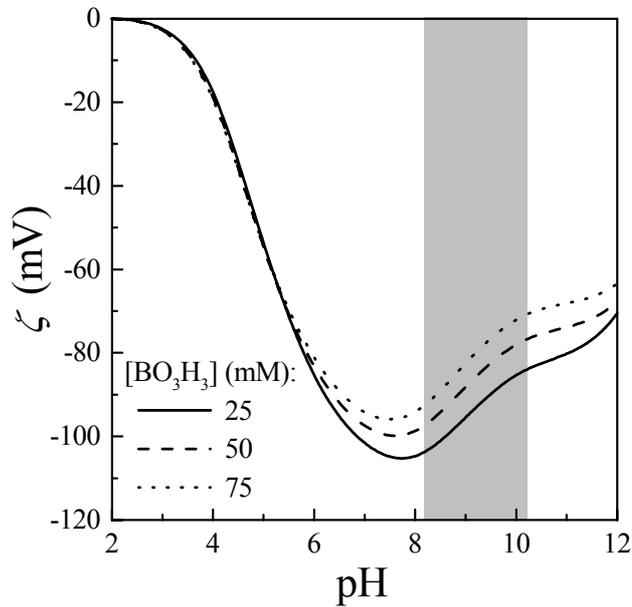
capilares de sílice están en un cierto rango más que definir un único y definitivo valor. Además en este contexto de análisis, se podría considerar que los grupos siloxanos son predominantes en el caso del capilar de sílice vítrea conduciendo a un valor más bajo de su  $pK_S$  en comparación con aquel del capilar de sílice fundida.

### 2.3.6 Respuesta asintótica del modelo y predicciones adicionales

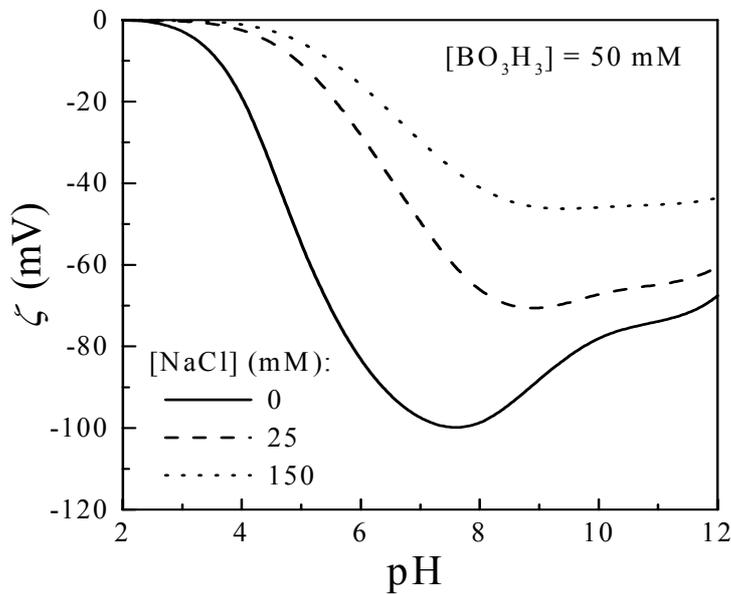
Una vez que se conocen los parámetros del modelo para un capilar determinado, el modelo permite predecir el potencial zeta para una composición de electrolitos diferente. Más precisamente, se puede estimar  $\zeta_t$  para diferentes valores de  $I$  y pH. Como ejemplo, se presentan en la Figura 2.3.6 cálculos adicionales de  $\zeta_t$  que involucran un capilar de sílice fundida, los cuales fueron discutidos previamente en la Figura 2.3.5. En la Figura 2.3.6, la zona sombreada indica el rango de pH donde el modelo se compara con datos experimentales de esta Tesis (ver también Figuras 2.3.2 y 2.3.5). Esta zona es precisamente donde efectivamente el ácido bórico tiene su acción *buffer* efectiva. Fuera de esta zona, la predicción del modelo es consistente con la respuesta esperada de  $\zeta_t$  en función del pH y la fuerza iónica. En particular, se visualiza en esta figura que se predice el punto donde la carga es cero, aproximadamente a 2.5, en concordancia con resultados reportados en trabajos experimentales previos (Wiese, *et al.*, 1971 y Hunter, 1992). Se concluye a partir de estas extrapolaciones que el modelo es útil para formular adecuadamente el BGE con el fin de obtener un potencial zeta del tubo capilar bien definido en los experimentos de la CZE.

La Figura 2.3.7 muestra otro ejemplo relevante de la predicción del modelo. Se presentan cálculos numéricos de  $\zeta_t(\text{pH})$  cuando se agregan diferentes concentraciones de sal 1:1 a la solución buffer. Se observa que la curva del potencial zeta cambia sustancialmente en la forma cuando la concentración de sal se incrementa a un valor de 150 mM y, como se espera, la curva se desvía a potenciales más bajos. En particular, esta curva alcanza un *plateau* para  $9 \leq \text{pH} \leq 12$ . Este ejemplo claramente ilustra que la intensidad del EOF tiene en general una respuesta bastante compleja en términos de  $I$  y pH. Finalmente, vale la pena mencionar que la predicción asintótica del modelo para el caso de  $C_{in} \rightarrow \infty$  también se estudió aquí usando los datos experimentales propios. En

este sentido, aún cuando la tendencia cualitativa es todavía aceptable, los resultados cuantitativos (no mostrados aquí) fallan principalmente para soluciones de electrolitos 2:1.



**Figura 2.3.6.** Potencial zeta estimado con el modelo en un amplio rango de pH. El BGE es una solución *buffer* de ácido bórico a diferentes concentraciones. Los valores de los parámetros utilizados en los cálculos son los reportados en la Figura 2.3.5.



**Figura 2.3.7.** Potencial zeta estimado por el modelo en un amplio rango de pH. El BGE está compuesto por 50 mM  $\text{BO}_3\text{H}_3$  (*buffer*) y diferentes concentraciones de una sal z:z (NaCl). Los parámetros del modelo usados son aquellos de la Figura 2.3.5.

### 2.3.7 Extensión del modelo a capilares poliméricos menos convencionales

En adición, se extiende el modelo a tubos capilares construidos a partir de materiales menos convencionales que el clásico de sílice que comúnmente se usa en la CE (Berli *et al.*, 2004). En efecto, se compara el modelo del potencial zeta descrito en la Sección 2.3.3 con datos obtenidos de la literatura (Schützner y Kenndler, 1992) a partir de experimentos del EOF realizados en capilares sintéticos de polímeros orgánicos: polifluorocarbono (PFC), polietileno (PE) y polivinilcloruro (PVC). Los detalles experimentales que se usaron están bien descritos en Schützner y Kenndler (1992). Aquí, es relevante mencionar que el BGE, que es una mezcla de *buffer* y solución salina acuosa, se formuló en el sentido de mantener la fuerza iónica relativamente constante e igual a 10 mM para todo el rango de pH. Los valores experimentales para los capilares de PFC y PVC se presentan en la Figura 2.3.8. Los datos para el capilar de PE no se muestran por razones de claridad, ya que ellos se superponen a los datos de PFC. Asimismo, en la Figura 2.3.8 la línea se refiere a las predicciones del modelo con los valores de los parámetros que se reportan en la Tabla 2.3.2. Se observa una concordancia muy buena entre la teoría y los experimentos.

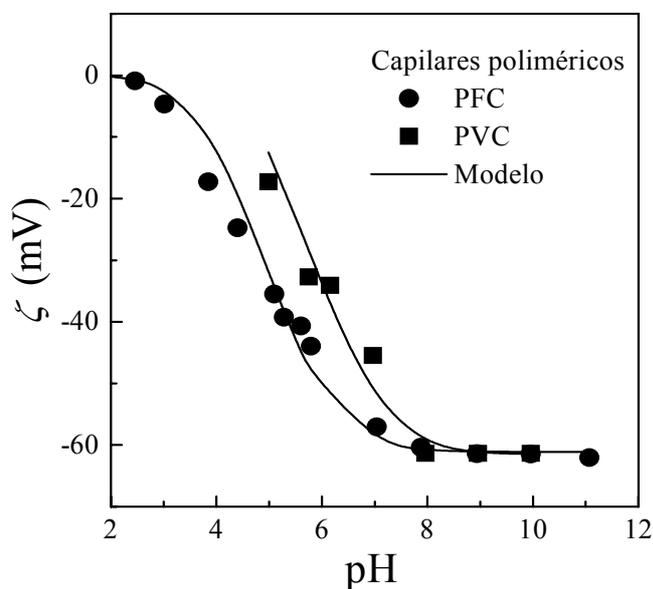
**Tabla 2.3.2.** Valores de los parámetros del modelo que se aplican a capilares sintéticos de polímeros orgánicos, obtenidos a partir de datos experimentales del EOF que se reportan en Schützner y Kenndler (1992).

Capilar	$pK_S$	$n_S$ ( $10^{17} \text{ m}^{-2}$ )
Polifluorocarbono	4.55	1.09
Polietileno	4.95	1.14
Polivinilcloruro	5.50	1.10

Los valores de los  $pK_S$  que se encuentran coinciden con los que se reportan para los grupos carboxilatos (Hunter, 1992; Healy y White, 1978), siendo ligeramente mayores en el caso de los capilares de PVC (ver también, Schützner y Kenndler, 1992 y las referencias allí incluidas). En particular, el modelo predice  $C_{in} \rightarrow \infty$  para todos estos capilares, lo cual significa que  $\zeta \approx \psi_0$ . En efecto, éste es también un resultado que se espera para los grupos carboxilatos, los cuales permiten que los contraiones se aproximen muy cerca de la superficie y en consecuencia el espesor de la capa compacta  $d$  es muy delgado (Hunter, 1992). Por ejemplo, se necesitan valores de  $C_{in}$  más altos que  $10^{-4} \text{ F m}^{-2}$

en Healy y White (1978) para ajustar los datos experimentales que involucran los grupos carboxilatos pegados a las partículas de látex (ver también, Gisler *et al.*, 1994 para resultados que involucran interfases que contienen grupos carboxilatos y sulfatos). En consecuencia, como resultado del modelo, es claro que el valor del potencial zeta desarrollado en capilares poliméricos (PFC, PVC y PE) es prácticamente el mismo que el potencial de superficie, el cual es accesible a partir de experimentos de titulación.

Con base en los resultados que se discuten aquí, el modelo aparece como suficientemente robusto, en el sentido que es capaz de describir  $\zeta_t$  satisfactoriamente para capilares de distintos materiales y BGEs comprendidos en un amplio rango de pH y fuerza iónica.



**Figura 2.3.8** Potencial zeta de capilares sintéticos de polímeros orgánicos (polifluorocarbono (PFC) y polivinilcloruro (PVC)) en función del pH a 24 °C. Los símbolos representan los datos experimentales obtenidos en Schützner y Kenndler (1992). Las líneas son las predicciones con la Ec. (2.3.10) usando los valores de los parámetros reportados en la Tabla 2.3.2.

### 2.3.8 Conclusiones

El modelo que se desarrolla en esta Tesis para cuantificar el potencial zeta del capilar y consecuentemente el EOF en la CZE está compuesto de dos ecuaciones fundamentales. Una provee la carga de la capa difusa que se obtiene a partir de la ecuación de Poisson- Boltzmann (la ecuación de Grahame en general, o el modelo de Gouy-Chapman para electrolitos  $z:z$ , en particular). La otra modela la carga superficial con tres

parámetros básicos: la densidad numérica  $n_S$  de los grupos silanoles de la pared del capilar, la constante de disociación  $K_S$  de estos grupos y la capacitancia eléctrica de la capa compacta  $C_{in}$ . El potencial zeta del capilar se obtiene a partir de una función implícita que involucra al pH y la fuerza iónica  $I$ , la cual resulta de igualar estas dos ecuaciones básicas. El modelo predice bien los datos experimentales para diferentes BGEs, principalmente para trayectorias complejas que involucran cambios de  $I$  y pH. En particular, el modelo indica que el valor absoluto de  $\zeta_t$  decrece con el pH debido a un incremento en la fuerza iónica con los equivalentes de base agregado. Este efecto es evidente para valores de pH mayores de 7. En principio, no sería necesario buscar un fenómeno adicional más complejo para entender este comportamiento de  $\zeta_t$  en términos de  $I$  y pH, el cual se puede describir efectivamente a través de un modelo físico como el propuesto aquí. Asimismo, es posible extender el modelo satisfactoriamente a capilares poliméricos menos convencionales. En este sentido, los algoritmos computacionales que se usan para diseñar y optimizar el desarrollo de un método de separación de analitos en la CZE se pueden beneficiar con estos resultados.

## **2.4 Migración electroforética**

### **2.4.1 Modelado de la migración electroforética de una partícula cargada**

El modelado de la migración de una partícula cargada en una solución electrolítica se realiza con las ecuaciones básicas (ver Ecs. (1.3.1) a (1.3.6) en el Capítulo 1) que también se usaron para describir el flujo electroosmótico en la Sección 2.2 del Capítulo 2, en un contexto físico-matemático no-lineal (ver, por ejemplo, O'Brien y White, 1978; Russel *et al.*, 1989; Radko *et al.*, 2000). En el modelo básico que se propone aquí, es necesario primero evaluar la carga efectiva del analito a través de expresiones simples y adecuadas. Es decir, en esta etapa no se considera aún el fenómeno de regulación de cargas que se describe y analiza en el Capítulo 4 de esta Tesis (ver también Capítulos 5 y 7). Asimismo, se debe considerar la forma y la masa molecular de los analitos, y analizar la influencia de las variables características del medio (pH,  $I$ ,  $\varepsilon$  y  $\eta$  del BGE) sobre la movilidad electroforética de los analitos.

Fenomenológicamente la solución electrolítica desarrolla un perfil de velocidad alrededor de la partícula que migra electroforéticamente. Desde el punto de vista matemático este perfil satisface condiciones de contorno específicas en la interfase partícula-fluido. Por consiguiente, la velocidad del fluido  $\underline{v}$ , el potencial eléctrico  $\psi$  y el flujo difusivo  $\underline{J}_i^\#$  cumplen con las siguientes expresiones  $\underline{v} = \underline{v}_i^e$ ,  $(\underline{J}_i^\# - n_i \underline{v}_i^e) \cdot \underline{n} = 0$  y  $(\epsilon \nabla \psi) \cdot \underline{n} = q_i$  sobre la superficie de la partícula  $i$ , con una carga específica  $q_i$  (carga por unidad de superficie). Aquí,  $\underline{n}$  es el vector unitario perpendicular a la superficie de la partícula. También, se verifica que lejos de la partícula  $\underline{v} \rightarrow 0$ ,  $n_i \rightarrow n_i^\infty$  y  $-\nabla \psi \rightarrow \underline{E}$ . El problema así generado es bastante complejo de resolver. Sin embargo, varias condiciones intrínsecas a la CZE facilitan el análisis debido a que la migración electroforética de la partícula se superpone al EOF en el tubo capilar. Afortunadamente el número de Reynolds es del orden de  $10^{-4}$  y los efectos inerciales se desprecian en el seno del fluido. Por otro lado, la convección de carga, en general, no se puede descartar porque el número de Peclet es del orden de  $\frac{1}{2}$  (Russell *et al.*, 1989). Basados en los resultados de la bibliografía, a continuación se presentan las expresiones más relevantes que permiten estimar la velocidad electroforética del analito de radio genérico  $a_i$ . Por consiguiente, para una doble capa eléctrica grande ( $a_i \kappa \rightarrow 0$ ), la migración electroforética se expresa,

$$v_i^e = \frac{Q_i E}{6 \pi \eta a_i} \quad (2.4.1)$$

donde  $Q_i = 4 \pi a_i^2 q_i$  es la carga efectiva de la partícula considerada esférica. Por otro lado, cuando la doble capa eléctrica es delgada ( $a_i \kappa \rightarrow \infty$ ), la velocidad  $v_i^e$  se obtiene a partir de,

$$v_i^e = \frac{\epsilon \zeta_i E}{\eta} \quad (2.4.2)$$

donde  $\zeta_i$  es el potencial de superficie de la partícula (también designado potencial zeta de la partícula), el cual se expresa,

$$\zeta_i = \frac{Q_i}{4 \pi \eta a_i \epsilon (1 + \kappa a_i)} \quad (2.4.3)$$

La Ec. (2.4.3) es válida en general para  $0 < a_i \kappa < \infty$  y para potenciales de superficie relativamente pequeños de tal manera que se aplica la hipótesis de Debye-

Hückel. Sin embargo, los cálculos numéricos mostraron que en la medida que  $\kappa a_i < 1$ , la Ec. (2.4.3) es aún válida para valores de potenciales eléctricos de partículas de hasta alrededor de 100 mV (ver O'Brien y White, 1978 y el Capítulo 4 de esta Tesis). Es claro que para  $\kappa a_i \rightarrow 0$ , la Ec. (2.4.1) combinada con la Ec. (2.4.3) conduce a,

$$v_i^e = \frac{2}{3} \frac{\varepsilon \zeta_i E}{\eta} \quad (2.4.4)$$

Así, las Ecs. (2.4.2) y (2.4.4) son precisamente las asíntotas de la solución de Henry, la cual se expresa,

$$v_i^e = \frac{2}{3} \frac{\varepsilon \zeta_i E}{\eta} f(\kappa a_i) = \frac{Q_i E}{6\pi\eta a_i (1 + \kappa a_i)} f(\kappa a_i) \quad (2.4.5)$$

donde, para el caso de anfólitos simples (drogas y aminoácidos) la carga efectiva  $Q_i = \sum_i e\alpha_i^\pm$  es proporcional a la fracción de carga  $\alpha_i^\pm$  que se calcula a partir de las constantes de disociación de los grupos ácidos y básicos como se indica más abajo. Por razones prácticas, en los cálculos la función de Henry  $f(\kappa a_i)$  se representa con la siguiente expresión (Piaggio y Deiber, 2003),

$$f(\kappa a_i) = 0,988 + 0,509 / [1 + (8,416 / \kappa a_i)^{0,985}] \quad (2.4.6)$$

la cual ajusta bien los datos numéricos correspondientes.

A pesar de que se conocen las expresiones más relevantes que permiten estimar las velocidades electroforéticas asíntóticas, en un contexto más general, la consideración de las soluciones numéricas que se reportan en la literatura (O'Brien y White, 1978) sugieren que la relación entre la velocidad electroforética  $v_i^e$  y el potencial zeta  $\zeta_i$  de la partícula presenta respuestas complejas para valores de  $\zeta_i$  altos que se describen a través de la siguiente expresión,

$$v_i^e = \frac{2}{3} \frac{\varepsilon E k_B T}{\eta e} f(\kappa a_i) \phi\left(\frac{e\zeta_i}{k_B T}\right) \quad (2.4.7)$$

Dentro de la respuesta lineal de la función  $\phi\left(\frac{e\zeta_i}{k_B T}\right)$ , la Ec (2.4.7) proporciona los resultados asíntóticos descritos arriba (Ecs. (2.4.2) y (2.4.4)). En particular, la constante de proporcionalidad en la ecuación de Smoluchowski (Ec. 2.4.2) debe ser  $\frac{2}{3} k_B T f(\kappa a_i) C$ ,

donde  $C$  se obtiene a partir de  $\phi$  evaluado en la zona lineal. Asimismo, la Ec. (2.4.7) indica que se espera una respuesta más compleja de la velocidad electroforética para un potencial zeta de partícula alto, como por ejemplo la saturación de la velocidad de migración (evolución hacia un valor constante para valores de potencial zeta de partícula en aumento), así como la presencia de un máximo en la relación entre la movilidad de la partícula y el potencial zeta de la partícula.

Una conclusión relevante en esta sección es que para el caso particular de analitos cargados pequeños tales como drogas y aminoácidos (en una primera instancia) con  $\kappa a_i < 1$  (o sea  $l_D \gg a_i$ ), las Ecs. (2.4.3), (2.4.5) y (2.4.6) se consideran directamente en el modelo básico de la CZE propuesto en esta Tesis (ver Capítulo 3). En este contexto, la condición  $\kappa a_i < 1$  se logra si se formula adecuadamente el BGE con relación al tamaño de la partícula. En el caso de moléculas cargadas grandes, tales como proteínas, donde el diámetro de la partícula es relativamente alto, se trata también de diseñar la corrida de la CZE bajo condiciones similares establecidas arriba, disminuyendo cuando sea posible la fuerza iónica del BGE, alcanzando de esta manera las condiciones ideales de la separación en la CZE asociadas con las Ecs. (2.4.5) y (2.4.6).

#### 2.4.2 Determinación de la carga efectiva de un analito

Como se mencionó más arriba, se debe estimar la carga efectiva  $Q_i$  de la partícula que se necesita en la Ec. (2.4.5) de acuerdo a las constantes de disociación para los grupos ácidos y básicos de los analitos (ver, por ejemplo, Kenndler, 1998a y Poppe, 1998, para una discusión en relación a este aspecto específico). En este sentido, se define, por ejemplo, la fracción de carga negativa  $\alpha_i^-$  de un grupo ácido con un  $pK_a$  particular a través de la expresión,

$$\alpha_i^- = -\frac{10^{-(pK_a - pH)}}{1 + 10^{-(pK_a - pH)}} \quad (2.4.8)$$

Por otro lado, la fracción positiva de un grupo básico  $\alpha_i^+$  es,

$$\alpha_i^+ = \frac{10^{(pK_b - pH)}}{1 + 10^{(pK_b - pH)}} \quad (2.4.9)$$

En consecuencia, las Ecs. (2.4.8) y (2.4.9) son estimaciones apropiadas de las cargas efectivas de analitos con grupos monovalentes como fue remarcado por Poppe

(1998), involucrando moléculas cargadas pequeñas, por ejemplo, algunas drogas, las cuales se consideran y ejemplifican en el Capítulo 3 de la Parte II de esta Tesis. Por el contrario, para la estimación de la carga efectiva de las moléculas grandes (péptidos y proteínas) se requieren consideraciones adicionales, que introducen modificaciones relevantes, entre ellas el fenómeno de regulación de cargas. Este último tema se trata y analiza en particular en los Capítulos 4 y 5 de la Parte II, dedicado a proteínas y péptidos, respectivamente. Asimismo, en el Capítulo 7 se extiende el análisis del fenómeno de regulación de cargas a los aminoácidos y se demuestra que este fenómeno está presente aún con moléculas de bajo molecular tal como es el caso de los aminoácidos.

### 2.4.3 Dependencia de la movilidad con la carga y la forma del analito

Es pertinente realizar aquí un breve análisis de la dependencia de la movilidad electroforética  $\mu_i$  (velocidad electroforética por unidad de campo eléctrico aplicado; es decir,  $\mu_i = \frac{v_i}{E}$ ) de un analito  $i$ , con los parámetros intrínsecos del analito (carga efectiva, tamaño y forma). Para ello, uno debe observar que en general  $\mu_i \propto \frac{Q_i}{f_i}$ , siendo  $f_i$  el coeficiente de fricción de la partícula. Esta relación de proporcionalidad, indica que surgen diferencias en las movilidades electroforéticas como consecuencia de diferencias en las propiedades hidrodinámicas (tamaño y forma) y variaciones de las cargas efectivas de los analitos. Asimismo, es claro que no es posible separar a priori este cociente, debido a que ambos términos están acoplados.

La manera en que  $f_i$  se relaciona con el tamaño y la forma del analito (molécula) desde el punto de vista teórico depende en parte del modelo que se usa para describir la conformación de la molécula y de la naturaleza del solvente. Como se mencionó anteriormente, en solución libre, la migración de la partícula se modela, en general, como una esfera. La relación entre el coeficiente de fricción y la forma esférica está dada por la solución de Stokes, donde  $f_i = 6\pi\eta a_i$ . Además para una esfera el radio de la partícula  $a_i$  y la masa de la partícula  $m_p$  se relacionan a través de  $m_p = \rho_p \left( \frac{4}{3} \pi a_i^3 \right)$ , donde  $\rho_p$  es la densidad de la partícula y  $\frac{4}{3} \pi a_i^3$  corresponde al volumen de la partícula considerada

como una esfera. En consecuencia,  $a_i \propto m_p^{1/3}$  y  $f_i \propto m_p^{1/3}$ . A su vez, la masa de la partícula es proporcional a la masa molar  $M$ , en consecuencia  $f_i \propto M^{1/3}$ . Corresponde mencionar que la masa de la partícula genérica  $m_p$  es proporcional a la masa molar  $M$  de la molécula considerada como analito cuando se ignora la hidratación (ver Capítulos 5, 6 y 7). Sin embargo, si la forma del analito es muy diferente a la de una esfera y éste está hidratado (contiene agua ocluida y adherida superficialmente), no es posible usar esta proporcionalidad para cálculos rigurosos. Grossman y Colburn (1992) establecieron relaciones entre la masa y el coeficiente de fricción para distintas conformaciones moleculares, como una primera aproximación (ver Tabla 2.4.1). Por consiguiente, es evidente que la relación entre la movilidad electroforética en la CZE y la masa molar  $M$ , depende fuertemente del modelo que se elige para representar la conformación del analito. En los Capítulos 5 y 7 de la Parte II de esta Tesis, se profundiza este aspecto en lo concerniente a encontrar una expresión de la movilidad electroforética que tenga en cuenta una forma de partícula diferente a la esférica, incluyendo la hidratación como parámetro de ajuste. Estos conceptos se aplican y analizan en particular, en los mencionados capítulos, para péptidos y aminoácidos, respectivamente.

**Tabla 2.4.1.** Relación de proporcionalidad entre la masa molar  $M$  y el coeficiente de fricción  $f$  de acuerdo a distintos modelos moleculares (Grossman y Colburn, 1992).

Modelo molecular	Relación de proporcionalidad
Esfera compacta	$f \sim (M)^{1/3}$
Cadena errática ( <i>random coil</i> )	$f \sim (M)^{0,5-0,6}$
Varilla larga	$f \sim (M)^{0,8}$
Disco ( <i>wide thin disk</i> )	$f \sim (M)^{2/3}$
Cadena errática con drenado libre ( <i>free-draining coil</i> )	$f \sim (M)^{1,0}$

#### 2.4.4 Acerca de las medidas experimentales de la movilidad electroforética

Frecuentemente, por razones prácticas, es más conveniente usar la movilidad electroforética que la velocidad electroforética, debido a que  $\mu_i$  es independiente del campo eléctrico aplicado (Grossman y Colburn, 1992). Asimismo, para cuantificar  $\mu_i$  de un analito mediante CZE se debe tener en cuenta la influencia del EOF debido a que el

resultado que surge en forma directa de los experimentos de la CZE es la movilidad aparente  $\mu_{ap}$ . Esta movilidad aparente contiene dos componentes, uno es la movilidad electroforética  $\mu_i$  y el otro es la movilidad electroosmótica  $\mu_{eo}$ , que se relacionan a través de,

$$\mu_{ap} = \mu_i \pm \mu_{eo} \quad (2.4.10)$$

Si la electroforesis y la electroósmosis actúan en la misma dirección la  $\mu_{ap}$  está dada por la suma de  $\mu_i$  y  $\mu_{eo}$ , mientras que si  $\mu_i$  y  $\mu_{eo}$  actúan en direcciones opuestas,  $\mu_{ap}$  se expresa como la diferencia entre estos dos términos. Si se escribe  $\mu_{ap}$  en función de las cantidades que se miden experimentalmente, se obtiene:  $\mu_{ap} = \frac{v_{ap}}{E} = \frac{L_d L_t}{t_{mi} V}$ ; de la misma

manera,  $\mu_{eo} = \frac{v_{eo}}{E} = \frac{L_d L_t}{t_{mo} V}$ . Combinando ambas expresiones se obtiene,

$$\mu_i = \frac{L_d L_t}{V} \left( \frac{1}{t_{mi}} + \frac{1}{t_{mo}} \right) \quad (2.4.11)$$

donde en este caso se supone que la dirección de la migración electroforética es opuesta a la dirección del EOF.

Es importante recordar que la movilidad es el único parámetro medido por la CZE que tiene significado físico con relación a la estructura del analito. Por consiguiente, es claro que la movilidad electroforética  $\mu_i$  sirve para correlacionar el comportamiento electroforético de una partícula cargada con su estructura molecular. Debido a que los valores de las movilidades son independientes del campo eléctrico, de las dimensiones del capilar y del tiempo de separación, es más conveniente comparar valores de movilidades electroforéticas de diferentes experimentos que valores de tiempos de migración (Grossman y Colburn, 1992), como ya se mencionó. En efecto, se debe tener presente que el carácter estructural del analito y las condiciones del medio que lo rodean, influyen su comportamiento electroforético, el cual es factible de ser medido mediante la CZE. En consecuencia, las separaciones de la CZE son muy sensibles a diferencias sutiles en la estructura del analito. A causa de la complejidad de la estructura nativa de los biopolímeros, es imposible predecir a priori de que manera los cambios estructurales tienen influencia sobre la movilidad electroforética. Algunos autores (ver, por ejemplo, Grossman *et al.*, 1989a; Rickard *et al.*, 1991; Cifuentes y Poppe, 1994) proponen ajustarse a estudios

empíricos para elucidar la relación entre la estructura del analito, las condiciones del solvente y la selectividad de la separación. En esta Tesis, quedará demostrado que es posible encontrar un modelo matemático de la CZE que permite evaluar el cociente carga/fricción; resolviendo en forma acoplada este cociente es factible separar los términos de la relación y estimar el valor de la carga efectiva y el radio hidrodinámico de la partícula, como así también analizar la incidencia de estos parámetros en la separación electroforética.

Consecuentemente, es evidente, que la eficiencia y la selectividad de la separación en la CZE se modelan teniendo en cuenta el efecto del pH, la fuerza iónica, la permitividad eléctrica y la viscosidad del BGE, además de las propiedades inherentes al analito como el tamaño, la forma y la carga efectiva. No obstante, existen parámetros como la hidratación y la orientación molecular cuya influencia resulta difícil de evaluar a través de un modelo sencillo. Sin embargo, en los Capítulos 5 y 7 de la Parte II, se aborda este difícil tema llegando a conclusiones interesantes con relación a la forma de los péptidos y los aminoácidos, respectivamente. Asimismo se evalúa y se analiza la hidratación y la orientación de péptidos y aminoácidos al aplicar un campo eléctrico, en particular aquellos que son modelados como partículas esféricas o cilindros.

De acuerdo con lo narrado en el párrafo anterior y en esta sección, es claro que para modelar la movilidad electroforética de un analito es necesario, previamente, estimar la carga efectiva y el radio hidrodinámico de la partícula. En la Parte II se consideran estos temas con relación a los modelos extendidos que se proponen en la Tesis; y en los diferentes capítulos, se evalúan y analizan los resultados y se establecen conclusiones que surgen de la aplicación de los mismos a casos generales y particulares de interés práctico. En adición, es evidente la necesidad de considerar los efectos de los parámetros inherentes al medio electrolítico (BGE) en el cual se desarrolla la CZE, que se deben tener en cuenta cada vez que se utilice un modelo para evaluar las movilidades electroforéticas experimentales de los analitos y hacer inferencias a partir de estos estudios.

## **2.5 Detección axial de analitos y fenómenos dispersivos**

### **2.5.1 Consideraciones generales**

La teoría referente a la detección axial de analitos es un problema teórico crucial que define la calidad de un modelo de la CZE. Una vez que la carga efectiva de los

analitos, el potencial zeta del capilar y el EOF del BGE se estiman con el desarrollo teórico descrito en las secciones previas para condiciones operacionales bien estipuladas de una corrida de la CZE, las migraciones de las partículas (analitos) se evalúan a lo largo de la coordenada axial  $z$  del tubo capilar con el propósito de registrar en el detector UV la absorbancia en función del tiempo. Luego, a partir de los picos de absorbancia (proporcional a los picos de concentración) se obtiene el tiempo de migración de los analitos siempre y cuando la resolución del electroferograma sea adecuada.

En este sentido, se requieren importantes consideraciones para modelar este aspecto relevante a través de las Ecs. (1.3.5) y (1.3.6) (ver, Capítulo 1) y también los resultados de las secciones previas (ver, las Secciones 2.2, 2.3 y 2.4 en el Capítulo 2). En la CZE se desea generalmente evitar las interacciones eléctricas entre los iones, el cual es el fenómeno que conduce a las distorsiones bien conocidas de frente y de cola de los perfiles de los picos de absorbancia en el detector UV, disminuyendo frecuentemente la resolución (ver por ejemplo, Kenndler, 1998a; Poppe, 1998; Khun y Hoffstetter-Khun, 1993). Es relevante visualizar que este efecto acoplado es consecuencia de la formación de un campo eléctrico no uniforme a lo largo del tubo capilar a concentraciones de los analitos relativamente altas. El mismo, se manifiesta a través del término  $ez_i n_i \omega_i \nabla^2 \psi = -ez_i n_i \omega_i \rho_e / \epsilon$  que aparece en los balances de las concentraciones numéricas de los iones después de combinar las Ecs. (1.3.5) y (1.3.6). Este tipo de fenómeno puede estar presente en la CZE cuando no se encuentran las llamadas condiciones lineales, es decir, cuando se requieren por razones prácticas concentraciones altas de los analitos (ver Tabla 1.2.1 y el texto asociado a la misma). Este fenómeno se estudió exhaustivamente (ver, por ejemplo, Bier *et al.*, 1983; Saville y Palusinski, 1986; Palusinski *et al.*, 1986 y Mosher *et al.*, 1989) a través de un modelo que se designa no-ideal y no-lineal (Poppe, 1998). No obstante, debido a que este modelo requiere algoritmos numéricos complejos como se reporta en la literatura, otra alternativa para analizar este aspecto de la CZE es usar modelos ideales y no-lineales (ver, Sección 1.2 en el Capítulo 1), en los cuales las difusividades de los analitos se desprecian, mientras que las interacciones entre iones se consideran a través de la función reguladora de Kohlrausch (ver, por ejemplo, Khun y Hoffstetter-Khun, 1993; Poppe, 1998). De acuerdo con este análisis concerniente a la clasificación de los modelos de acuerdo a los tipos de fenómenos incluidos en el balance de especies, que se describió previamente en el Capítulo 1, es claro que el modelo básico de la CZE propuesto en esta Tesis se considera no-ideal y lineal. No-ideal, en el sentido

que se incluyen en el modelado de la CZE todos los efectos dispersivos que se describen a continuación en la Sección 2.5.2 y lineal con relación a que se desprecian las interacciones entre los iones debido al efecto de la dilución de la muestra que es una característica intrínseca del formato de la CZE; es decir la difusión por electromigración (electrodispersión) es despreciable. En efecto, se observa que las concentraciones típicas de los analitos están en el orden de  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  M en un volumen de muestra de 10 a 40 nL para los aparatos comerciales de CE usualmente disponibles.

### 2.5.2 Modelado de la detección axial de analitos

Con las consideraciones físicas mencionadas en el párrafo anterior y cuando no está presente la adsorción de los analitos sobre la pared del capilar, el balance que considera la concentración numérica de iones en coordenadas cilíndricas para describir el movimiento de especies cargadas a lo largo del tubo capilar hacia el detector UV es,

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + (v_{eo} + v_i^e) \frac{\partial C_i}{\partial z} \approx D_i \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} r \frac{\partial C_i}{\partial r} + D_i \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \quad (2.5.1)$$

donde  $C_i$  es la concentración molar del analito  $i$  y  $D_i \approx k_B T / 6 \pi \eta a_i$  es el coeficiente de difusión molecular de Stokes-Einstein. Aquí,  $a_i$  es el radio hidrodinámico del analito, también designado radio de Stokes. Es importante señalar aquí que  $D_i$  tiene asociado un único valor de  $a_i$  para el caso de electrolitos fuertes solamente; mientras que para electrolitos débiles se debe interpretar el radio hidrodinámico como un valor promedio calculado con los radios de las fracciones neutra y cargada (ver, por ejemplo, Saville y Palusinski, 1986). La Ec. (2.5.1) plantea el problema clásico de difusión axial de Taylor-Aris, que permite resolver el problema de la concentración radial promedio  $\langle C_i \rangle$  en términos de la posición  $z$ , el tiempo  $t$  y las  $z$ -componentes de las velocidades del analito  $(v_{eo} + v_i^e)$ . En este sentido, el coeficiente de difusión efectiva de Taylor-Aris es  $D_{ief} = k_B T (1 + \chi Pe^2) / (6 \pi \eta a_i)$ , donde  $\chi$  depende del perfil de velocidad efectivo establecido en la Ec. (2.5.1). Aquí el número de Pelet  $Pe_i = (v_{eo} + v_i^e) a_i / D_i$  debe ser menor de  $0,4L/R$  para que la expresión de  $D_{ief}$  sea válida; esta condición se logra fácilmente con las escalas características de la CZE. No obstante que las experiencias de la

CZE de analitos cargados pequeños conducen a  $Pe_i \leq 100$  (en nuestros experimentos  $20 \leq Pe_i \leq 75$ , ver Capítulo 3 en la Parte II), se debe observar que la dispersión axial podría incrementarse con campos eléctricos aplicados altos y radios de capilares grandes; es decir, para un número de Grashof alto (ver también Sección 2.2). De otro modo, para el caso de un flujo casi pistón se comprueba que  $\chi \approx 0$ . Es claro también que los efectos no-lineales asociados a la no-electroneutralidad a lo largo del tubo se desprecian en la Ec. (2.5.1) debido a la condición de dilución de los analitos.

A pesar de que la difusión axial de Taylor-Aris se desprecia porque generalmente se logra un flujo casi pistón para  $N_{Gr}$  pequeños (ver, Ec. 2.2.5), se deben considerar otros fenómenos dispersivos en el coeficiente de dispersión efectivo total  $D_{ief}^T \approx D_i(1 + \mathcal{G}_i)$ , que incluye todos los efectos dispersivos presentes en la CZE a través del parámetro de dispersión del analito  $\mathcal{G}_i$ . Este parámetro se interpreta como la suma de las relaciones de cada efecto dispersivo con el coeficiente de difusión molecular  $D_i$ . Por lo tanto, se define  $\mathcal{G}_i = \sum_j H_j L_d / (2t_{mi} D_i)$  donde  $t_{mi}$  es el tiempo de migración del analito  $i$  y las alturas de

platos teóricos  $H_j$  más relevantes se expresan (ver Kenndler, 1998a) como sigue:

(a)  $R^2 < v > / (48D_i)$  para la inyección hidrodinámica del analito a la velocidad promedio  $< v >$  lograda con la diferencia de presión aplicada.

(b)  $A_p^2 / (12L_d)$  para la apertura  $A_p$  del detector UV.

(c)  $\left( \frac{d \ln m_i}{dT} \right)^2 \sigma^2 E^5 R^6 e z_i / (1536 k_B T k^2)$  para la dispersión térmica, donde  $m_i$  es la cantidad de muestra que se introduce inicialmente en la entrada del capilar y  $k$  es la conductividad térmica del BGE.

(d)  $2D_i / (Em_i) \propto \chi$  para la dispersión axial efectiva ya discutida arriba.

(e)  $4c_{co} C_i h / 9$  para la sobrecarga de muestra (*concentration overload*), que se desprecia debido a la dilución de la muestra, donde  $c_{co}$  es un parámetro empírico y  $h$  es la media distancia del pistón de muestra introducido inicialmente en la entrada del capilar.

(f)  $[K_D^2 R / (R + 2K_D) / D_i + 4K_D / (R + 2K_D) / k_d] < v >$  para la adsorción en la pared donde  $k_d$  es la constante de velocidad de desorción y  $K_D$  es el coeficiente de distribución

de la adsorción en la pared. En este modelo básico se considera que la adsorción de analitos sobre la pared no está presente.

(g)  $R^2 L_d / (4r_c^2)$  para las vueltas del capilar, de radio  $r_c$  dentro del cartucho, asociado con la conexión entre las ramas que van hacia arriba y hacia abajo.

Asimismo, en la práctica el parámetro de dispersión  $\mathcal{D}_i$  se estima a partir de los datos experimentales de área de pico y altura de pico proporcionado por el electroferograma experimental. En el Capítulo 3 se presentan a modo de ejemplo, los valores calculados del parámetro de dispersión  $\mathcal{D}_i$  para algunas drogas de bajo peso molecular, incluyendo en el modelo las ecuaciones que se mencionan arriba.

Con estas consideraciones y a partir del promedio radial de la Ec. (2.5.1) se obtiene,

$$\frac{\partial \langle C_i \rangle}{\partial t} + (v_{eo} + v_i^e) \frac{\partial \langle C_i \rangle}{\partial z} \approx D_{ief}^T \frac{\partial^2 \langle C_i \rangle}{\partial z^2} \quad (2.5.2)$$

La Ec. (2.5.2) requiere condiciones iniciales y de contorno apropiadas para obtener perfiles de concentración confiables en función del tiempo de detección.

En general, se debe considerar que el tiempo de inyección de la muestra afecta la solución que se obtiene para  $\langle C_i \rangle$  a través de la longitud  $h$  del volumen de muestra considerada como un pistón (ver, Sección 2.1). Por consiguiente, debido a que la condición inicial para la Ec. (2.5.2) requiere que la cantidad de muestra que se introduce inicialmente en la entrada del tubo capilar esté confinada a una longitud finita, se impone,

$$\langle C_i \rangle = \langle C_i \rangle_0, \quad t = 0, \quad -h/2 \leq z \leq h/2 \quad (2.5.3)$$

cuando el origen del sistema coordenado se localiza en el centro de un pistón de muestra idealizado. Durante la corrida de la CZE, las condiciones de contorno que se deben cumplir son,

$$\langle C_i \rangle = 0, \quad t > 0, \quad -\infty < z < \infty \quad (2.5.4)$$

En consecuencia se obtiene la siguiente solución para el problema que involucra las Ecs. (2.5.2) a (2.5.4) (Crank, 1976), evaluadas en el detector UV,

$$\langle C_i \rangle = \frac{1}{2} \langle C_i \rangle_0 \left\{ \operatorname{erf} \left[ \frac{[2h - L_d + (v_{eo} + v_i^e)]t}{2\sqrt{D_{ief}^T t}} \right] + \operatorname{erf} \left[ \frac{[L_d - (v_{eo} + v_i^e)]t}{2\sqrt{D_{ief}^T t}} \right] \right\} \quad (2.5.5)$$

Para el caso particular que considera que la muestra que se introduce inicialmente en la entrada de capilar está confinada en un plano, la solución asintótica que se obtiene y

se reporta en la mayoría de los modelos no-ideales y lineales evaluada en el detector UV, es como sigue (ver, por ejemplo, Grossman y Colburn, 1992),

$$\langle C_i \rangle = \frac{m}{2\sqrt{\pi D_{ief}^T t}} \exp\left\{ -\left[ \frac{[L_d - (v_{eo} + v_i^e) t]^2}{D_{ief}^T t} \right] \right\} \quad (2.5.6)$$

La solución simple de la Ec. (2.5.2) considera que la masa de muestra introducida es  $m$  y está idealmente distribuida en un plano (el volumen de muestra no es finito). No obstante, esta hipótesis es demasiado restrictiva y no permite una descripción de las cantidades relativas de los analitos en la zona de detección. Por esta razón, para tener en cuenta la incidencia del tiempo de inyección en la resolución del electroferograma, se usa la condición inicial establecida por la Ec. (2.5.3).

Por consiguiente, es claro que las Ecs. (2.2.1) a (2.2.6), (2.4.3) a (2.4.6) y (2.5.1) a (2.5.4) definen totalmente el modelo básico de la CZE propuesto en esta Tesis para determinar las condiciones apropiadas para una separación mediante la CZE de una mezcla de analitos. Por lo tanto, las soluciones obtenidas para  $\langle C_i \rangle$  en función del tiempo  $t$ , y en consecuencia de los tiempos de migración  $t_{mi}$ , proporcionan el electroferograma de  $N$  analitos.

Con este propósito se elabora con las ecuaciones señaladas en el párrafo anterior, un código numérico simple para predecir el electroferograma de moléculas cargadas de bajo peso molecular. Este tema se vuelve a considerar en la Sección 2.6, en la cual se describe el algoritmo matemático que se usa en el programa computacional. En adición, se presentan ejemplos de las predicciones del modelo básico de la CZE para diferentes analitos en el Capítulo 3 de la Parte II.

Antes de terminar esta sección es interesante mencionar que al presente existen numerosas citas bibliográficas (ver, por ejemplo, Khun-Hoffstetter-Khun, 1993 y las referencias allí incluidas) que consideran los aspectos más fundamentales a cerca de la dispersión de analitos tales como la difusión (ver también, Probstein, 1989), la adsorción sobre la pared del capilar (ver también, Hjertén, 1985; Novotny *et al.*, 1990; Cobb *et al.*, 1990; Towns y Regnier, 1991; Towns *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1992; Schure y Lenhoff, 1993; Štědrý *et al.*, 1995; Minárik *et al.*, 1995), el calentamiento por efecto Joule (ver también, Knox, 1988; Burgi *et al.*, 1991; Grushka *et al.*, 1989; Porras *et al.*, 2003; Xuan y Li, 2004), la dispersión electroforética o electromigración (ver también, Mikkers *et al.*, 1979a y b; Erny *et al.*, 2001; Štědrý *et al.*, 1996, 2003 y 2004), la inyección de la muestra y

el ancho de la zona de detección (ver también, Huang *et al.*, 1989; Vinther y Sørensen, 1991; Schwer *et al.*, 1993; Reijenga y Kašička, 1999). En la bibliografía se indica que los efectos dispersivos más relevantes se pueden mantener bajo control en la instrumentación moderna y se analizan las condiciones adecuadas para minimizarlos. Es evidente que los diferentes efectos nunca se pueden eliminar totalmente, pero su impacto en la eficiencia de la separación se puede controlar con un diseño apropiado del equipo instrumental y con la selección cuidadosa de las condiciones de trabajo. Para controlar éstas últimas los modelos de la CZE pueden ayudar significativamente.

### **2.5.3 Relevancia del BGE en la eficiencia y selectividad de la CZE**

El BGE juega un rol muy importante en el desarrollo de la CZE. Las propiedades como el pH, la fuerza iónica y la composición del BGE afectan tanto la selectividad como la eficiencia de una separación. El pH es, por ejemplo, un factor relevante de la selectividad en la separación electroforética de anfolitos (Friedl y Kenndler, 1994). La fuerza iónica del BGE no solo determina el grado de calentamiento por efecto Joule en el capilar, sino que además tiene una marcada influencia en el EOF y la movilidad electroforética. En adición, la composición del *buffer* puede mejorar tanto la eficiencia como la selectividad de varias formas. Además, los aditivos que se agregan al BGE tales como agentes de formación de complejos químicos o solventes orgánicos (Sarmini y Kenndler, 1998a y b; Roy y Lucy, 2001; Porras y Kenndler, 2005a; Subirats *et al.*, 2005) pueden mejorar o aún facilitar la separación.

En este sentido, el valor de pH del BGE como se mencionó más arriba, es un parámetro de separación muy importante para cambiar la selectividad de un sistema. En general (ver Sección 2.4) la separación en la electroforesis se basa en la diferencia de movilidades, la cual depende del tamaño, la forma y la carga efectiva de los analitos. En efecto, el tamaño de un analito está relacionado con su peso molecular y el grado de hidratación dependiendo a su vez de factores como la fuerza iónica y la polaridad de la solución. En consecuencia, la carga efectiva del analito depende del grado de ionización determinado por los valores de los  $pK$  de los grupos funcionales ácidos o básicos y el pH de la solución. En el caso particular en el que las sustancias a separar están completamente ionizadas en el rango de pH de interés, las variaciones de pH tienen poca influencia en la carga efectiva. Sin embargo, si los grupos funcionales ionizables de los analitos son ácidos

o bases débiles, el pH del BGE en el que se desarrolla la separación presenta un fuerte efecto sobre la carga.

Por consiguiente, resulta evidente que la resolución se puede optimizar muy fácilmente si se encuentra el valor de pH apropiado para una separación específica. Este aspecto se ilustra con ejemplos en el Capítulo 3 con relación a las predicciones del modelo básico de la CZE propuesto en esta Tesis. Este modelo se usa asimismo en un análisis de perturbaciones para elucidar una mejor resolución de un sistema electroforético.

La fuerza iónica se considera también una propiedad importante para mejorar la eficiencia, la resolución y la sensibilidad en un sistema separativo. Existen numerosas publicaciones que tiene en cuenta este aspecto (ver, por ejemplo, Friedl *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1999; Radko *et al.*, 2000). Debido a que la electroforesis y la electroósmosis están basados en los mismos principios, la variación en la concentración de sales tiene el mismo efecto sobre  $\mu_i$  y  $\mu_{eo}$ . La investigación del efecto de la fuerza iónica sobre la electromigración, sin embargo, es una tarea difícil de realizar, porque no existen reglas generales para las diferentes especies que se pueden separar por electroforesis. En efecto, el compuesto cargado puede ser un ión pequeño, una macromolécula o una célula. En adición, se puede comportar como un electrolito débil o fuerte. En el caso particular de las proteínas, la concentración de sales puede tener efectos adicionales sobre la estructura terciaria. Finalmente, no sólo la concentración sino también el tipo de solución electrolítica juega un rol importante en algunos casos. Consecuentemente, se debe considerar a la fuerza iónica como una combinación complicada de factores que afectan una separación mediante la CZE. En el Capítulo 7 de la Parte II se incluyen en el modelo propuesto correcciones de las constantes de disociación a través de los coeficientes de actividad formulados para soluciones electrolíticas no-ideales (ver también, Survay *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1999).

En adición, los BGEs que se preparan en solventes orgánicos puros parecen ser una alternativa a los BGEs acuosos en la CZE (Porrás *et al.*, 2001 y 2003b; Beckers *et al.*, 2003; Assunção *et al.*, 2005; Souaïd y Cottet, 2005; Peng *et al.*, 2005; Busnel *et al.*, 2005). En la literatura se aseveraron varias ventajas generales de los solventes orgánicos sobre el agua, principalmente (i) los solventes orgánicos aumentan la selectividad en la separación; (ii) los solventes orgánicos incrementan la eficiencia de la separación; (iii) en solventes orgánicos se pueden usar voltajes altos en la separación y/o fuerzas iónicas altas del BGE porque la intensidad de corriente es baja comparada con el agua; (iv) debido a la intensidad

de campo eléctrico aplicado alta, en solventes orgánicos el tiempo de análisis es más corto que en BGEs acuosos, y (v) la solubilidad y/o estabilidad de los componentes (ya sea analitos o químicos del BGE) es más alta o mejor en solventes orgánicos. Sin embargo, recientemente, Porras y Kenndler (2005b) evaluaron críticamente estas aseveraciones basados en principios físicos del transporte iónico y la dispersión de zona en solución y señalaron que varias de las ventajas arriba mencionadas están sobreestimadas o incluso no existen. Corresponde aclarar que en las aplicaciones particulares de esta Tesis y en el análisis a través de los modelos no se incluyeron BGEs preparados con solventes orgánicos.

## **2.6. Resumen del modelo básico propuesto para la CZE. Programa computacional**

### **2.6.1 Ecuaciones y código numérico del modelo básico**

Las Ecs. (2.2.1) a (2.2.6), (2.4.3) a (2.4.6) y (2.5.1) a (2.5.4) que se presentaron en las secciones previas de este capítulo definen el modelo básico propuesto en la Parte I de la Tesis para analizar el electroferograma de la CZE. La finalidad principal aquí es determinar las condiciones apropiadas, en la separación mediante CZE, de una mezcla de analitos. Por lo tanto, las soluciones analíticas (Ecs. (2.5.5) y (2.5.6)) obtenidas en la Sección 2.5 para  $\langle C_i \rangle$  en función del tiempo de separación  $t$ , y en consecuencia los tiempos de migración  $t_{mi}$ , proporcionan el electroferograma básico de  $N$  analitos.

Por consiguiente, las ecuaciones principales que constituyen el modelo básico y conforman el programa computacional se presentan a continuación indicando a su vez la función de cada una de ellas:

\* Volumen de inyección de la muestra (analito i),

$$V_i = \frac{\Delta p \pi d_i^4}{128 \eta L_t} t$$

\* Distancia promedio del pistón de muestra introducido inicialmente en la entrada del capilar,

$$h = V_i / (\pi R^2)$$

\* Potencial zeta de tubo en función del tiempo de migración del marcador del EOF,

$$\zeta_t = -\frac{v_{eo}\eta}{E\varepsilon} = -\frac{l_d \eta}{t_{mo} E\varepsilon}$$

\* Velocidad electroforética del analito i, en función del potencial zeta de la partícula,

$$v_i^e = \frac{2}{3} \frac{\varepsilon \zeta_i E}{\eta} f(\kappa a_i)$$

\* Potencial zeta del analito i, válido para  $0 < \kappa a_i < \infty$ ,

$$\zeta_i = \frac{Q_i(pH^i)}{4\pi\varepsilon a_i(1 + \kappa a_i)}$$

\* Velocidad y movilidad electroforética del analito i, en función de la carga efectiva,

$$v_i^e = \frac{Q_i E}{6\pi\eta a_i(1 + \kappa a_i)} f(\kappa a_i)$$

$$\mu_i = \frac{Q_i}{6\pi\eta a_i(1 + \kappa a_i)} f(\kappa a_i)$$

respectivamente, donde,

$$f(\kappa a_i) = 0,988 + 0,509/[1 + (8,416/\kappa a_i)^{0,985}]$$

\* Carga efectiva del analito i,

$$Q_i = \sum_i e\alpha_i^\pm$$

donde para un grupo ácido,

$$\alpha_i^- = -\frac{10^{-(pK_a - pH)}}{1 + 10^{-(pK_a - pH)}}$$

y para un grupo básico,

$$\alpha_i^+ = \frac{10^{(pK_b - pH)}}{1 + 10^{(pK_b - pH)}}$$

\* Detección axial del analito i,

$$\langle C_i \rangle = \frac{1}{2} \langle C_i \rangle_0 \left\{ \operatorname{erf} \left[ \frac{[2h - L_d + (v_{eo} + v_i^e)]t}{2\sqrt{D_{ief}^T t}} \right] + \operatorname{erf} \left[ \frac{[L_d - (v_{eo} + v_i^e)t]}{2\sqrt{D_{ief}^T t}} \right] \right\} \quad \text{ó}$$

$$\langle C_i \rangle = \frac{m}{2\sqrt{\pi D_{ief}^T t}} \exp \left\{ \left[ \frac{[L_d - (v + v_i^e)t]^2}{D_{ief}^T t} \right] \right\}$$

\* Coeficiente de difusión efectivo

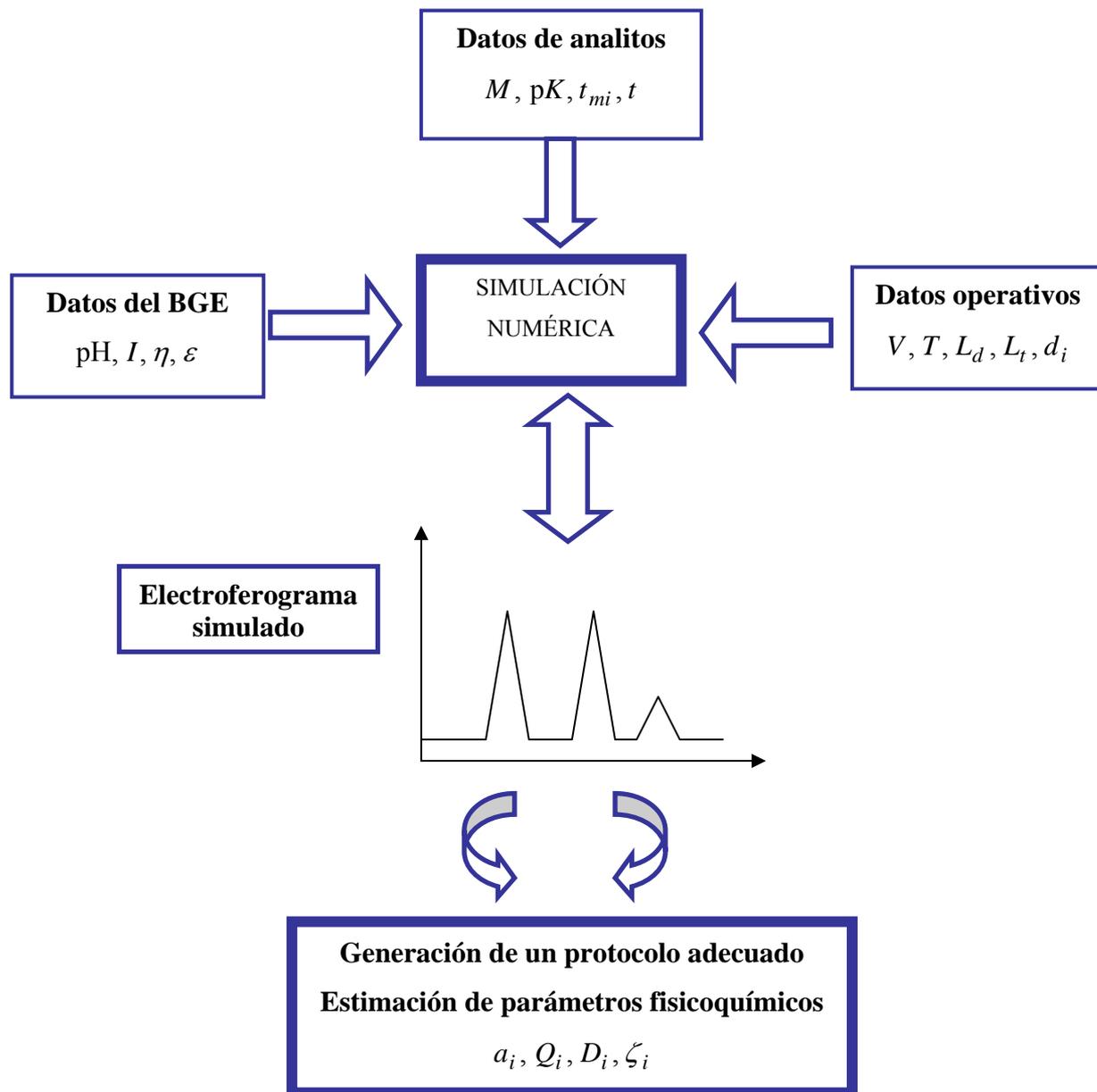
$$D_{ieff}^T = D_i(1 + \mathcal{G}_i)$$

donde el parámetro de dispersión se expresa,

$$\mathcal{G}_i = \sum_j H_j L_d / (2t_{mi} D_i)$$

Con las ecuaciones señaladas aquí se genera un código numérico simple para simular el electroferograma de cada analito de la mezcla (principalmente de bajo peso molecular en esta etapa) que se desean separar mediante la CZE. Por consiguiente, en el programa computacional las variables que se consideran son: el tiempo de inyección de la muestra y la distancia de detección del analito, el campo eléctrico aplicado, el tiempo de migración del analito, los pK de los analitos, el pH y la fuerza iónica de la solución electrolítica, el diámetro y la longitud total del capilar, el potencial zeta del capilar y la temperatura, incluyendo en adición otros aspectos específicos de cada caso particular en estudio, principalmente con relación al tipo de analito. En este sentido la Figura 2.6.1 presenta un esquema con los datos que se ingresan al programa computacional separados en tres bloques (datos del analito, datos del BGE y datos del protocolo específico de la separación). Es claro entonces que el resultado que emerge del algoritmo es el electroferograma básico que se predice teóricamente. Luego es posible modificar los datos de ingreso (de protocolo u operacionales) para obtener el electroferograma más adecuado para lograr la separación deseada (mejor resolución). Asimismo, es posible extraer de la experiencia de la CZE con la aplicación del modelo y el programa computacional mayor información como es la estimación de parámetros fisicoquímicos del analito (radio hidrodinámico, carga efectiva, potencial de zeta y coeficiente de difusión).

Es apropiado mencionar aquí que la solución del modelo básico propuesto en esta Tesis requiere encontrar las raíces  $a_i$  y  $Q_i$  de las ecuaciones no-lineales presentadas arriba, para lo cual se usa el método numérico de Newton-Rhapson del tipo iterativo. Este método también se usa en las versiones extendidas del modelo básico en la Parte II de la Tesis. Finalmente el cálculo numérico descrito brevemente en esta sección se introduce algorítmicamente en el *software* denominado *MATHEMATICA (version 2.2 for Windows-Academic)* o alternativamente se confecciona un programa en lenguaje FORTRAN.



**Figura 2.6.1.** Esquema del programa computacional del modelo básico para la CZE.

Las etapas principales del procedimiento numérico son:

- 1- Ingreso de los datos correspondientes a los analitos: masa molecular y valores de titulación de los grupos ionizables ( $pK_a$ ).
- 2- Ingreso de constantes físicas y datos de protocolo incluyendo las propiedades del BGE ( $pH, I, T, \eta$  y  $\varepsilon$ ). También se introduce el voltaje aplicado  $V$  en la corrida experimental.
- 3- Ingreso de datos correspondientes a las dimensiones del capilar ( $L_d, L_t, d_i$ ).

- 4- Ingreso del tiempo de migración experimental del analito para el BGE específico en uso.
- 5- Con los datos de ingreso, el algoritmo estima la carga efectiva  $Q_i = \sum_i e\alpha_i^\pm$  teniendo en cuenta los grados de disociación  $\alpha_i^-$  y  $\alpha_i^+$  de los grupos ácidos y/o básicos, respectivamente.
- 6- Se introduce una estimación del radio hidrodinámico designado  $a_i^\circ$  para inicializar el método iterativo Newton-Raphson.
- 7- Cuando el software indica convergencia del método iterativo se calculan las propiedades de salida ( $a_i, Q_i, D_i, \zeta_i$ ) en forma explícita.

### 2.6.2 Conclusiones

El modelo básico (no-ideal y lineal) de la CZE presentado en la Parte I de esta Tesis se desarrolla con ecuaciones fundamentales que describen la fisicoquímica asociada a la migración electroforética de analitos simples. No obstante que este modelo se basa en principios esenciales y ecuaciones dinámicas que contienen propiedades fisicoquímicas verdaderas de las soluciones electrolíticas y de los analitos, es relativamente simple de computarizar y usar en el laboratorio. Este modelo básico se usa en la Parte II, donde se consideran aplicaciones específicas con distintos niveles de complejidad, mediante la introducción de nuevos conceptos y modificaciones que expanden y mejoran las capacidades de predicción y análisis del modelo básico, generando los modelos extendidos.

# **PARTE II**

## **Aplicaciones**

# Capítulo 3

## Analitos de bajo peso molecular

---

---

En este capítulo se aplica el modelo básico de la CZE, el cual se desarrolló en la Parte I de la Tesis, a analitos pequeños y cargados, con el fin de ilustrar las capacidades de predicción de este modelo relativamente sencillo. Es decir, con el uso del modelo básico y el ingreso de datos relevantes del analito y de las variables operacionales, es posible simular el electroferograma de un analito de bajo peso molecular, o de una mezcla de analitos que se desean separar mediante la CZE, y encontrar así las condiciones fisicoquímicas apropiadas para la corrida electroforética. Para este estudio se eligen como analitos modelos: drogas (se describen en la Sección 3.1) y aminoácidos (se ilustran en la Sección 3.2). Es también pertinente señalar aquí que en el Capítulo 7, se reconsideran los aminoácidos con un modelo más complejo que incluye la evaluación del fenómeno de regulación de cargas y parámetros adicionales como la forma hidrodinámica y la hidratación.

### 3.1 Drogas

#### 3.1.1 Introducción

En la actualidad, para el análisis de drogas en fluidos biológicos y otros tipos de muestras de interés clínico y/o biotecnológico se utilizan diferentes técnicas. Entre las más usadas se pueden citar el inmunoensayo enzimático, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía en capa delgada (TLC) y la espectrofotometría. Sin embargo estas técnicas presentan algunas desventajas. En efecto, el desarrollo de *kits* para inmunoensayo es costoso y tedioso y puede existir reactividad cruzada con los anticuerpos, lo que conduce a resultados falsos positivos. Asimismo, los procedimientos por HPLC, son laboriosos, requieren una preparación previa de la muestra y un tiempo de análisis largo. Por otro lado, la TLC generalmente provee resultados cualitativos solamente. En este sentido, es interesante mencionar que la CE supera estas desventajas con pre-tratamiento simple de la muestra, velocidad de análisis alta, automatización en la separación y cuantificación aceptable. En consecuencia, la CE tiene una aplicación extensa en este

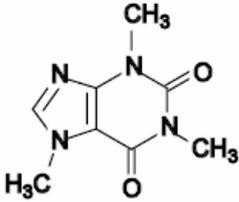
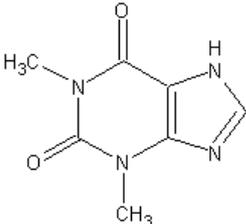
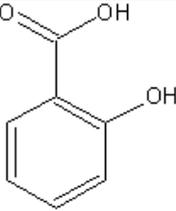
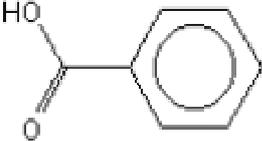
campo que incluye el control de la pureza de drogas en el área farmacéutica, el monitoreo de drogas terapéuticas, el análisis cualitativo y cuantitativo de drogas en el caso de intoxicaciones y la detección de drogas de uso indebido (ver, por ejemplo, Thormann *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1992a y b; Caslavská *et al.*, 1993; Schmutz y Thormann, 1993; Johansson *et al.*, 1993; Thormann *et al.*, 1993; Altria y Rogan, 1994; Thormann *et al.*, 1996; Lucangioli *et al.*, 1997; Conradi *et al.*, 1997; Vogt *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1997; Brunner y DiPiro, 1998; Kataoka *et al.*, 1998; Haque y Stewart, 1999; Malecek *et al.*, 1999; Hudson *et al.*, 1999; Hempel, 2000; Altria *et al.*, 2001; Fabre y Altria, 2001; Welder y Colyer, 2001; Shaw y Guzman, 2002; Lucangioli *et al.*, 2003).

En adición a las ventajas de la CZE como técnica separativa, enumeradas en el párrafo anterior, el uso de un modelo teórico y un programa computacional como los que se presentan en esta Tesis, sirve no solamente para optimizar el sistema particular propuesto para la separación de las drogas bajo estudio, sino que además permite inferir propiedades fisicoquímicas de estos analitos. Es decir, permite el cálculo de la carga efectiva, el radio hidrodinámico, el coeficiente de difusión y el potencial de partícula en las condiciones de pH y fuerzas iónica particulares del BGE en el cual se realiza la separación mediante CZE. Además, como se hace referencia en varias publicaciones recientes (ver, por ejemplo, Yang y Yuan, 1999; Miller *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003; Jia, 2005; Zusková *et al.*, 2006; Šolínová, *et al.*, 2006; Plasson y Cottet, 2006), también es posible la estimación de las constantes de disociación  $pK_a$  (valores promedios) de los analitos, a partir de datos experimentales de la CZE.

En este sentido, con el propósito de demostrar las capacidades de predicción del modelo básico de la CZE propuesto en esta Tesis y aplicarlo a la optimización de una separación, se eligen para el estudio las siguientes drogas modelos: cafeína, teofilina, ácido salicílico y ácido benzoico, cuyas estructuras moleculares y características de carga y constantes de disociación  $pK_a$  se conocen bien. En la Tabla 3.1.1 se presentan las mismas.

Es apropiado señalar que al presente, las referencias bibliográficas relacionadas con drogas farmacéuticas que se pueden determinar mediante CE son numerosas (ver, por ejemplo, la Tabla 4 en Shaw y Guzmán, 2002, en la cual se presenta un grupo amplio de drogas y se mencionan los modos de separación con las citas bibliográficas correspondientes; además se incluyen importantes referencias en este trabajo).

**Tabla 3.1.1.** Drogas modelos y sus características.

Analito	Fórmula química	$M$ (g/mol)	$pK_a$
Cafeína		194.19	12.3
Teofilina		180.17	8.77
Ácido salicílico		138.12	3.0
Ácido benzoico		122.12	4.19

### 3.1.2 Aplicación del modelo básico a la separación y caracterización de drogas

De acuerdo con los fundamentos teóricos concernientes al modelado de la CZE descritos en las distintas secciones del Capítulo 2, en la Parte I de esta Tesis, se considera aquí el modelo básico de la CZE que aplica a analitos de bajo peso molecular. Las ecuaciones principales que constituyen el modelo básico y conforman el programa computacional se sintetizaron en la Sección 2.6.1 del Capítulo 2. Consecuentemente en cada caso de estudio se usa la siguiente estrategia: (i) se ingresan al programa computacional los datos correspondientes al analito bajo estudio (tiempo de migración  $t_{mi}$  y constantes de disociación  $pK_a$ ) y también el tiempo de migración del marcador neutro  $t_{mo}$ , cuando corresponde; (ii) se ingresan los datos correspondientes al BGE que se usa en

la corrida experimental (pH,  $I$ , permitividad eléctrica y viscosidad); (iii) Se ingresan los datos específicos del protocolo que se emplean en la separación (voltaje aplicado, temperatura, tiempo de separación, tiempo de inyección de la muestra y tiempo de inyección del marcador neutro). Con el ingreso de estos datos básicos (ver Figura 2.6.1 en la Sección 2.6) y siguiendo el procedimiento numérico descrito previamente en la Sección 2.6, se reproduce el tiempo de migración del analito bajo estudio y se obtiene así el electroferograma teórico (también designado electroferograma simulado) que corresponde a las condiciones seleccionadas para la separación mediante la CZE. Como se ilustra más abajo, se logra una concordancia muy buena entre el electroferograma experimental y el electroferograma simulado que se obtiene con el modelo básico y el programa computacional propuesto en la Tesis.

### 3.1.3 Técnica experimental de la separación mediante CZE

En las experiencias prácticas que se realizan en esta parte, se usa un equipo Beckman P/ACE 5010 provisto con un detector UV con el fin de generar los electroferogramas correspondientes al marcador de EOF (DMSO) y a los analitos (cafeína, teofilina, ácido benzoico y ácido salicílico). Las soluciones patrones de los analitos se preparan en agua bidestilada a una concentración de 250  $\mu\text{g/ml}$ . El detector UV está situado a 0.20 m desde la entrada del capilar de sílice fundida (*inlet*). La longitud total del capilar es de 0.27 m y el diámetro interno es de 50  $\mu\text{m}$ . El voltaje que se aplica durante la separación es de 15 kV y la temperatura de trabajo se fija en 25 °C (la cual se mantiene constante por medio del sistema de líquido refrigerante que dispone el equipo comercial). Se utiliza la inyección hidrodinámica de los analitos a una diferencia de presión de 0.5 psi (1psi = 6894.76 Pa), con un tiempo de inyección de 3 segundos para los analitos patrones y 1 segundo para el marcador de EOF. El BGE que se utiliza en estas experiencias es borato a diferentes pH y fuerzas iónicas  $I$  (ver Tabla 3.1.2). Las soluciones de estos BGEs se preparan disolviendo la cantidad adecuada de ácido bórico en agua destilada. Luego, se ajusta el pH con el agregado de OHNa 10 M. Los valores de fuerza iónica que se obtienen están en el rango de 10 a 90 mM.

#### *Evaluación del potencial zeta de tubo*

Primero se necesita conocer el potencial zeta de tubo  $\zeta_t$  y se decide evaluarlo experimentalmente usando un marcador neutro (DMSO), como se indicó en la Sección

3.1.3. El tiempo de migración del marcador se mide a los diferentes pH y fuerzas iónicas  $I$  de las experiencias. Debido a que el marcador es neutro, éste se mueve a lo largo del capilar solamente por efecto del EOF. Así, a partir del tiempo de migración experimental del marcador  $t_{mo}$  se obtiene el valor del potencial de tubo  $\zeta_t = \frac{L_d \eta L_t}{t_{mo} \epsilon V}$  (ver en la Sección 2.2 las Ecs. (2.2.9) y (2.2.10)). Esta expresión es válida cuando la velocidad electroosmótica se aproxima a un flujo pistón, principalmente si las variables independientes se seleccionan para minimizar el número de Grashof, como se explicó en la Parte I (ver Secciones 2.2 y 2.3, en el Capítulo 2). En la Tabla 3.1.2 se muestran los valores calculados para el potencial de tubo a diferentes  $I$  y pH dentro del contexto del modelo básico y con el ingreso de los datos experimentales al programa computacional.

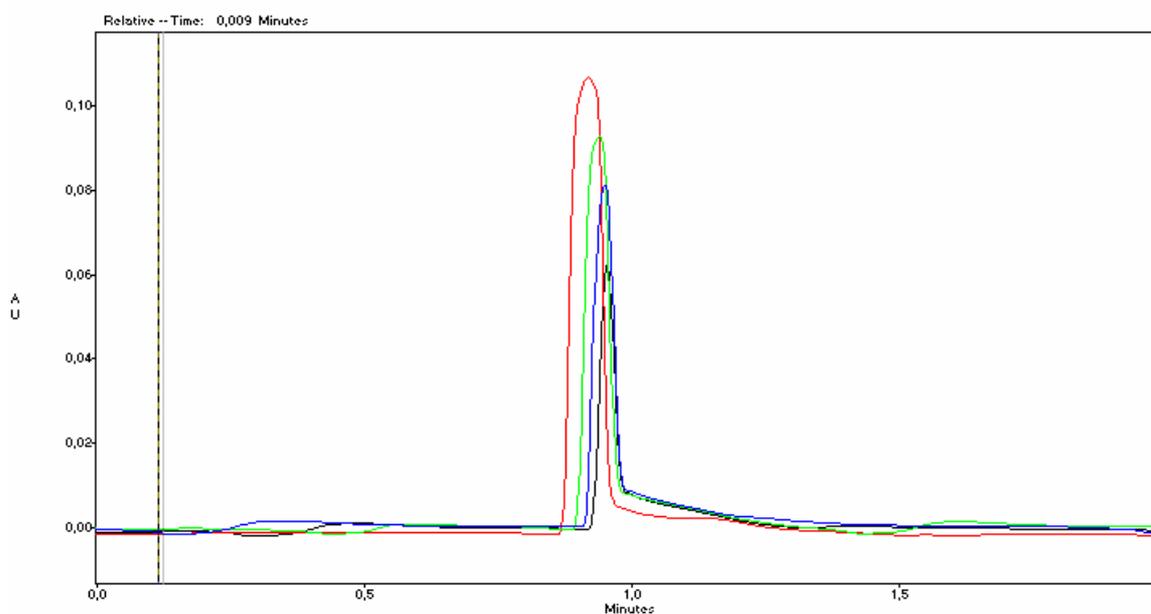
**Tabla 3.1.2.** Estimaciones de potenciales de tubo  $\zeta_t$  que se obtienen a partir de la Ecs. (2.2.9) y (2.2.10) con el modelo básico y el programa computacional, para diferentes valores de pH y fuerzas iónicas  $I$  usados en las experiencias.

pH	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
$I$ (mM)	8.7	21.3	43.9	69.8	88.2
$\zeta_t$ (V)	-0.087	-0.080	-0.073	-0.068	-0.065

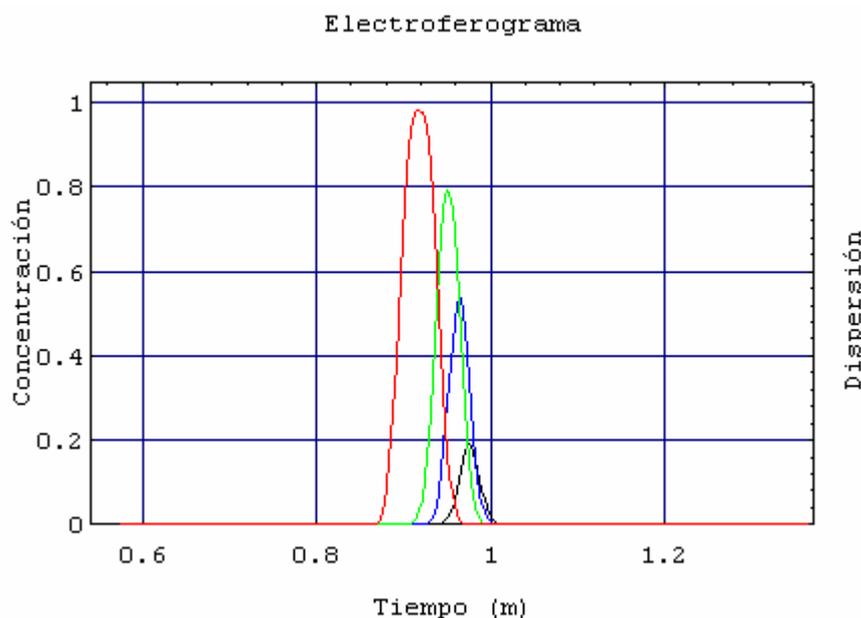
### 3.1.4 Predicciones de los electroferogramas y discusión

Como se mencionó en la Sección 3.1.2, las predicciones numéricas se ajustan a los datos experimentales de los tiempos de migración de los analitos, para diferentes  $I$  y pH, con el fin de validar el modelo básico de la CZE propuesto en esta Tesis. Estos datos se obtienen a partir del equipo comercial disponible y el protocolo experimental mencionado en la Sección 3.1.3. Por consiguiente, con la estrategia que involucra la relación entre la teoría y los experimentos se obtienen las estimaciones del radio hidrodinámico  $a_i$ , el coeficiente de difusión  $D_i$  y el potencial zeta  $\zeta_i$  de cada analito que se presentan en la Tabla 3.1.3. Se adelanta aquí que los valores de estas propiedades tienen el orden de magnitud esperado (ver, por ejemplo, Jandick y Bonn, 1993) indicando así, que el modelo básico propuesto provee una predicción adecuada del electroferograma de cada analito para el caso de moléculas relativamente pequeñas como las que se consideran en esta sección.

En relación con la primera etapa correspondiente a la introducción de la muestra en el capilar y siguiendo los lineamientos teóricos descritos en la Sección 2.1, se ilustra en la Figura 3.1.1 las variaciones en los tiempos de migración de un analito al cambiar el tiempo de inyección de la muestra (2, 3, 5 y 7 segundos) para corridas típicas de la CZE. Es importante mencionar que se incluyen en el análisis los fenómenos dispersivos descritos mediante la Ec. (2.5.5) (ver Sección 2.5 en el Capítulo 2). El analito que se usa en este estudio es cafeína. La Figura 3.1.1 (A) muestra los resultados experimentales y la Figura 3.1.1 (B) presenta las simulaciones que se logran con el uso del modelo básico y el programa computacional. A través de estas figuras es evidente el impacto que puede tener el tiempo de inyección de la muestra sobre la resolución del electroferograma en una corrida característica de la CZE.



**Figura 3.1.1 (A).** Electroferogramas experimentales superpuestos (absorbancia versus tiempo) de la cafeína en corridas típicas de la CZE, para diferentes tiempos de inyección de la muestra: 2 (negro), 3 (azul), 5 (verde) y 7 (rojo) segundos. Las dimensiones del capilar son:  $L_t = 27$  cm y  $d_i = 50$   $\mu$ m. El BGE es borato pH=9.0 y fuerza iónica  $I = 43$  mM. Además  $V = 15$  kV generando 19  $\mu$ Amp, y  $T = 25$   $^{\circ}$ C. La longitud de onda de detección es 214 nm y el tiempo de separación es 2 min. La concentración de cafeína es 1000  $\mu$ g/ml.



**Figura 3.1.1 (B).** Predicción teórica del electroferograma de la cafeína (concentración normalizada versus tiempo) con el modelo básico usando el protocolo descrito en la Figura 3.1.1 (A), cuando se varía el tiempo de inyección de la muestra: 2 (negro), 3 (azul), 5 (verde) y 7 (rojo) segundos.

Con respecto al análisis de los resultados que se presentan en la Tabla 3.1.3 se observa que si se aumentan el pH y la fuerza iónica, el radio hidrodinámico  $a_i$  decrece y el potencial de partícula  $\zeta_i$  aumenta, consistentemente con el tiempo de migración de los analitos. En efecto, para los valores de potenciales zeta de partícula más altos y negativos, las velocidades efectivas de los analitos son menores debido a que en el diseño de los experimentos el sistema de detección de los analitos está cercano al electrodo negativo, y la inyección de la muestra se realiza en el extremo opuesto, cercano al electrodo positivo (ver Figura 1.1, en la Sección 1.1). Consecuentemente, la migración electroforética de las partículas que poseen carga negativa tiene lugar en sentido opuesto al EOF. Asimismo, mientras que el ácido benzoico y el ácido salicílico están totalmente ionizados en el rango de pH en el que se trabaja aquí, se observa que la teofilina cambia su fracción de carga  $\alpha_i^-$  (ver Tabla 3.1.3), desde un valor cercano a cero, a  $\text{pH} \approx 8$ , hasta  $-0.94$  a  $\text{pH} \approx 10$ , como consecuencia del valor de su constante de disociación,  $\text{p}K_a = 8.77$ . En este sentido, en la Tabla 3.1.3 se observa consistentemente una transición del radio hidrodinámico alrededor de  $\text{pH} \approx 9$ . Sobre la base de los resultados que se muestran en la Tabla 3.1.3, la Figura 3.1.2 (a) y (b) ilustra el electroferograma experimental y el electroferograma teórico, respectivamente, que se obtiene cuando se aplica el modelo básico y el programa

computacional a la separación de una droga, por ejemplo, teofilina. Se observa la buena capacidad del modelo para reproducir el tiempo de migración del analito (droga) si se ingresan al programa los datos del protocolo experimental de la separación mediante la CZE y los parámetros correspondientes a la droga bajo análisis, según lo descrito en la Sección 3.1.2.

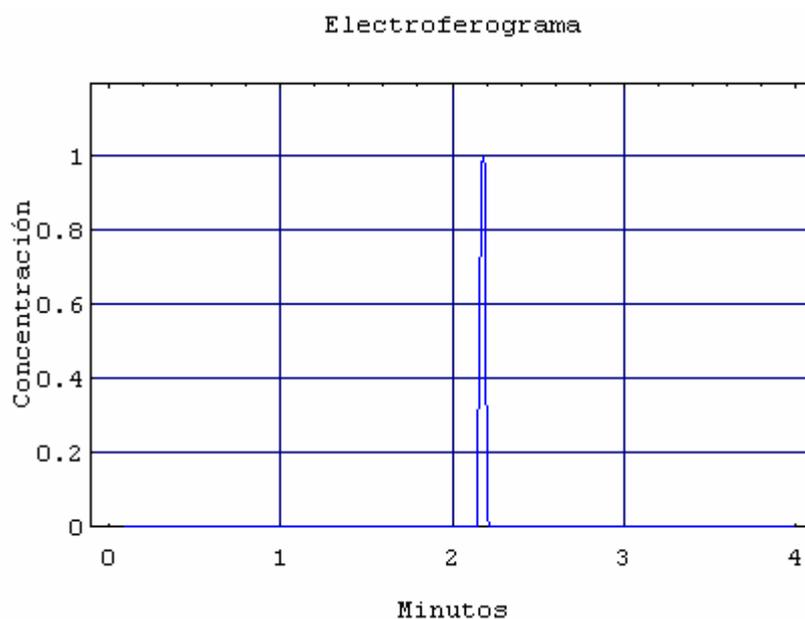
**Tabla 3.1.2.** Tiempos de migración experimental  $t_{mi}$  de los analitos para diferentes pH y fuerzas iónicas  $I$  y estimaciones numéricas de propiedades fisicoquímicas realizadas con el modelo básico.

<b>Ácido benzoico</b>							
pH	$I$ (mM)	$t_{mi}$ (min)	$a_i 10^{10}$ (m)	$\zeta_i$ (V)	$D_i 10^{10}$ (m <sup>2</sup> /s)	$\mathcal{G}_i$	$\kappa 10^{-8}$ (m <sup>-1</sup> )
8.0	8.7	1.45	3.19	0.0528	7.80	29	3.0
8.5	21.3	1.69	2.97	0.0531	8.16	23	4.8
9.0	43.9	2.07	2.77	0.0547	8.75	16	6.8
9.5	69.8	2.44	2.64	0.0555	9.18	12	8.6
10.0	88.2	2.93	2.49	0.0586	9.74	9	9.7
<b>Ácido salicílico</b>							
pH	$I$ (mM)	$t_{mi}$ (min)	$a_i 10^{10}$ (m)	$\zeta_i$ (V)	$D_i 10^{10}$ (m <sup>2</sup> /s)	$\mathcal{G}_i$	$\kappa 10^{-8}$ (m <sup>-1</sup> )
8.0	8.7	1.43	3.21	0.0513	7.55	31	3.0
8.5	21.3	1.65	3.07	0.0514	7.88	25	4.8
9.0	43.9	2.04	2.80	0.0540	8.66	17	6.8
9.5	69.8	2.48	2.62	0.0562	9.25	12	8.6
10.0	88.2	3.10	2.38	0.0613	10.20	8	9.7
<b>Teofilina</b>							
pH	$I$ (mM)	$t_{mi}$ (min)	$a_i 10^{10}$ (m)	$\zeta_i$ (V)	$D_i 10^{10}$ (m <sup>2</sup> /s)	$\mathcal{G}_i$	$\alpha^-$ (C)
8.0	8.7	1.0	1.45	0.0173	16.72	10	0.14
8.5	21.3	1.15	2.60	0.0215	9.33	26	0.35
9.0	43.9	1.50	2.80	0.0339	8.66	23	0.63
9.5	69.8	2.18	2.50	0.0499	9.67	13	0.84
10.0	88.2	2.36	2.73	0.0493	8.88	14	0.94

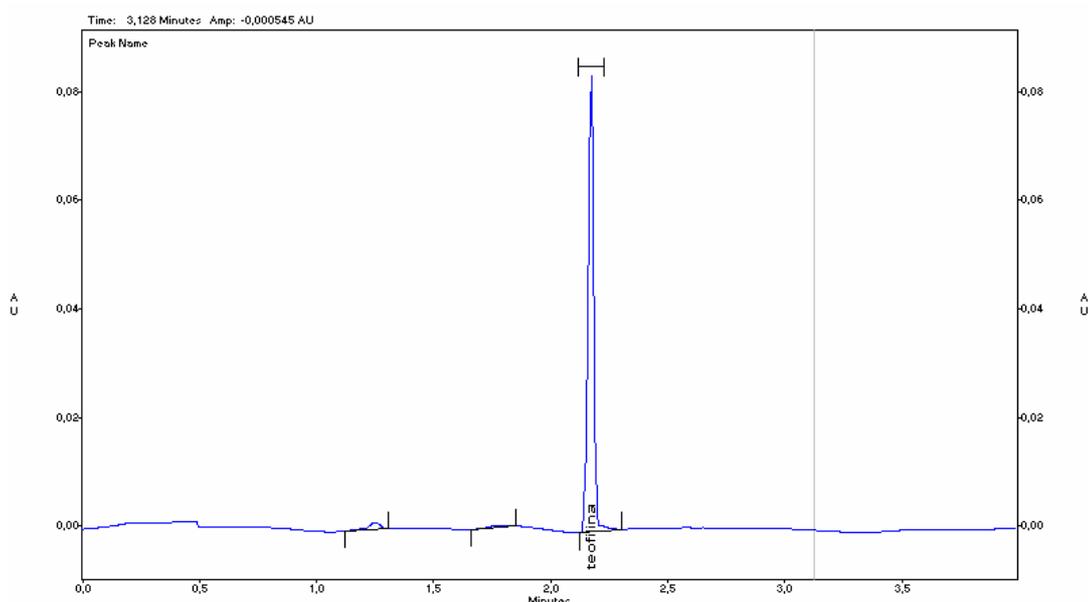
En adición, con respecto al parámetro de dispersión  $\mathcal{G}_i$  (ver Sección 2.5 en el Capítulo 2) se debe tener en cuenta que el mismo está vinculado con el coeficiente de difusión y éste con el radio hidrodinámico de la partícula en estudio; que a su vez, depende fuertemente de las condiciones del medio (pH y fuerza iónica) que determinan la carga neta y la hidratación. En la Tabla 3.1.2 se observa que para los ácidos benzoico y salicílico, los parámetros de dispersión disminuyen a medida que el pH aumenta desde 8 a 10, considerando que el radio de la partícula disminuye debido a que aumenta también la

fuerza iónica, disminuyendo así la capa de hidratación. Para el caso-estudio de la teofilina el análisis de los factores que influyen en la dispersión es más complejo, debido a que se presenta una transición desde una fracción de carga negativa menor a una fracción de carga mayor (desde 0.14 a 0.94). En síntesis, el parámetro de dispersión que depende fuertemente del diseño experimental y de las condiciones del medio en el que se desarrolla la separación también está ligado íntimamente con las características intrínsecas de cada analito, en particular con la carga y la hidratación.

(a)



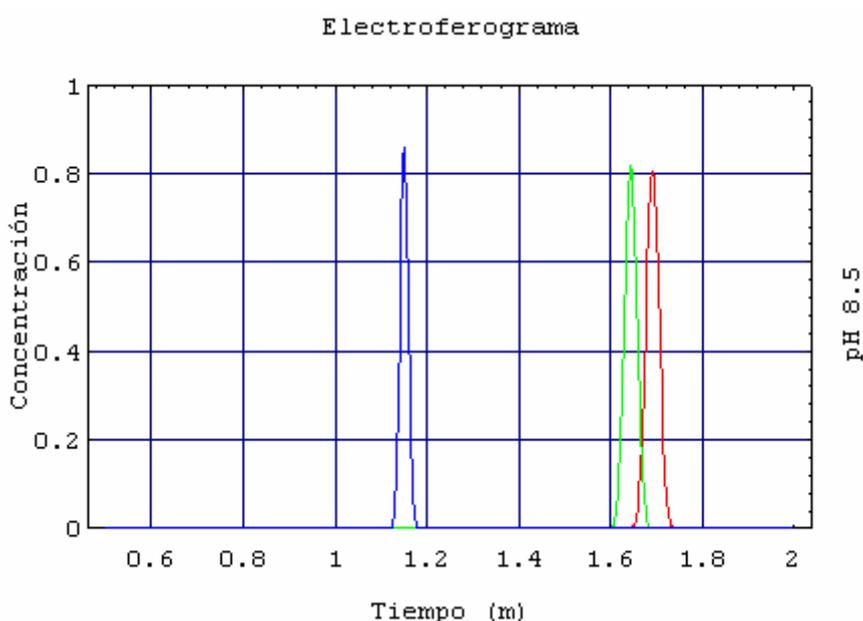
(b)



**Figura 3.1.2.** (a) Electroferograma teórico (concentración adimensional versus tiempo) y (b) Electroferograma experimental (absorbancia versus tiempo) correspondiente a teofilina, a  $\text{pH} = 9.5$ ,  $I = 69.8$  mM según el protocolo descrito para la CZE en la Sección 3.1.3.

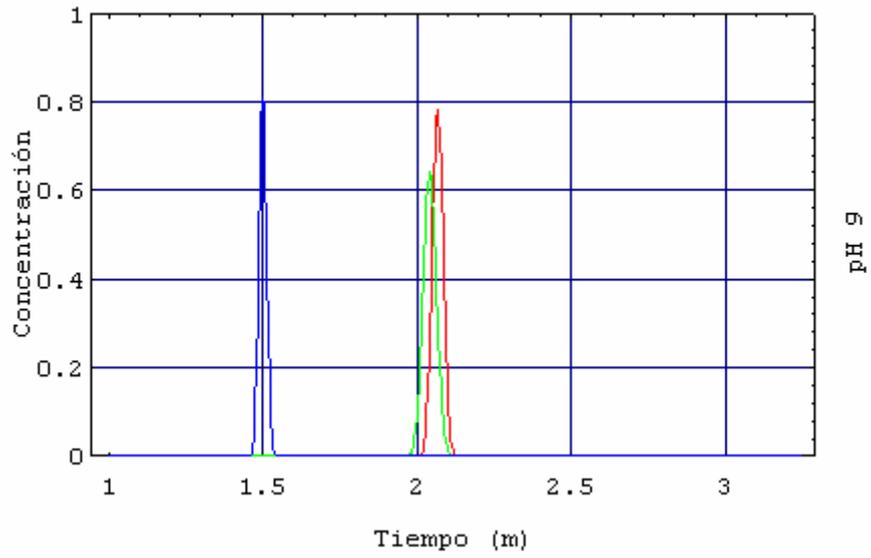
Asimismo, con la aplicación del modelo básico de la CZE, se ilustra como diferentes valores de  $I$  y pH afectan la resolución de los electroferogramas que involucran la separación de una mezcla artificial que contiene a los analitos teofilina, ácido benzoico y ácido salicílico (Ver Figura 3.1.3 a, b, c y d), lo cual resulta el primer desafío de esta Tesis. Así, usando los datos de la Tabla 3.1.3 correspondientes a cada analito se encuentra una buena resolución de la mezcla a  $\text{pH} \approx 10$  y fuerza iónica  $I \approx 88.2$  mM (ver Figura 3.1.3d). Estas predicciones teóricas se validan con el electroferograma experimental (ver Figura 3.1.4) indicando que la condición de modelo lineal se satisface plenamente para los casos que se estudian aquí. En adición, a  $\text{pH} \approx 9$  y fuerza iónica  $I \approx 43.9$  mM los picos correspondientes al ácido salicílico y al ácido benzoico están completamente superpuestos y la separación de estos analitos no es posible para este valor de pH y fuerza iónica del BGE (ver Figura 3.1.3b y Figura 3.1.5). Por consiguiente, se tiene una clara indicación de las condiciones fisicoquímicas más apropiadas para la separación de estos analitos a partir del modelo propuesto como se ilustra en las Figuras 3.1.3. También, se observa que a  $\text{pH} \approx 8.5$  los picos de ácido salicílico y ácido benzoico capturados por el detector UV están invertidos en el electroferograma simulado (Figura 3.1.3a), tal como se presenta en el electroferograma experimental (ver Figura 3.1.6).

(a)



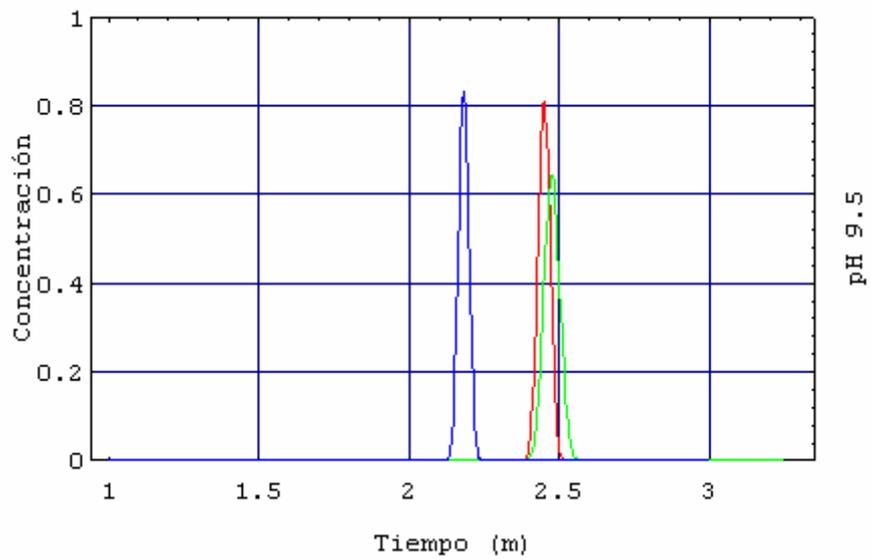
(b)

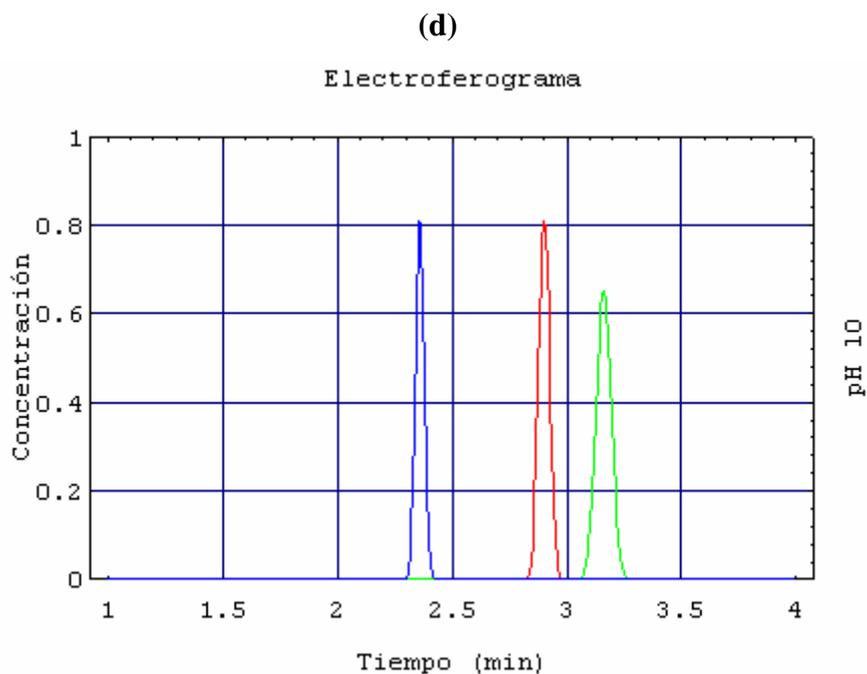
Electroferograma



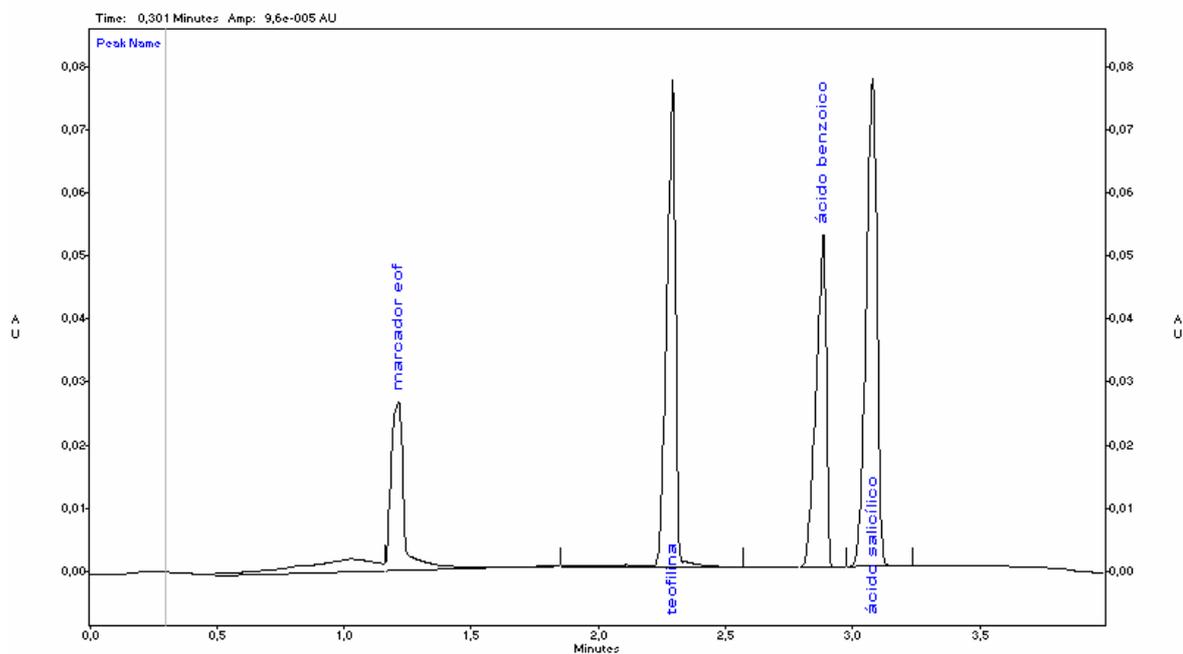
(c)

Electroferograma

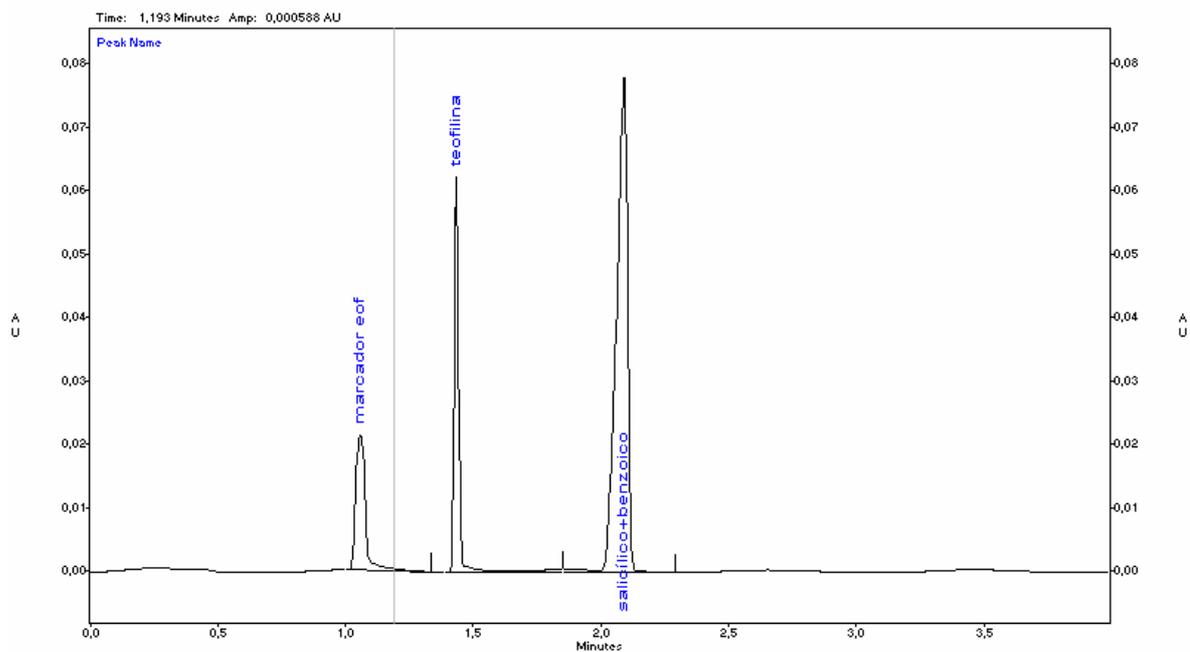




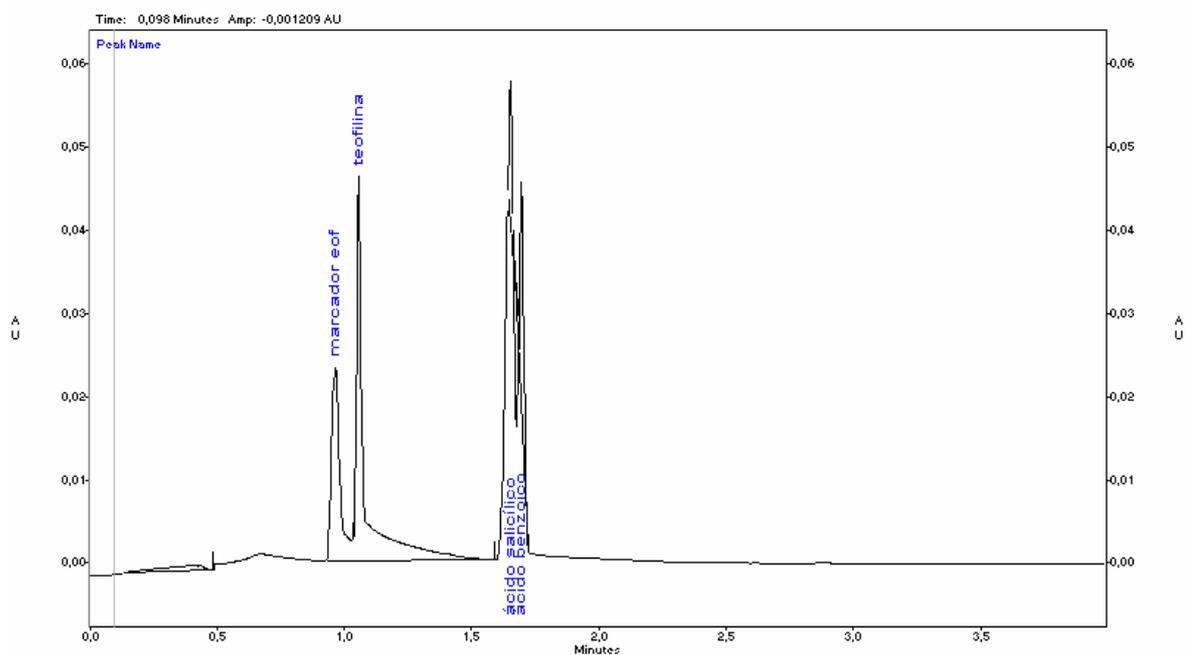
**Figura 3.1.3.** Predicciones con el modelo básico de la CZE de los electroferogramas (concentración adimensional versus tiempo) correspondiente a la separación de una mezcla que contiene teofilina (azul), ácido benzoico (rojo) y ácido salicílico (verde) a diferentes valores de pH y fuerza iónica  $I$  del BGE (ver Tabla 3.1.3). (a) pH = 8.5, (b) pH = 9.0, (c) pH = 9.5 y (d) pH = 10.0.



**Figura 3.1.4** Electroferograma experimental (absorbancia versus tiempo) de una mezcla artificial de teofilina, ácido benzoico y ácido salicílico, a pH = 10 y fuerza iónica  $I = 88.2$  mM del BGE (ver Tabla 3.1.3) de acuerdo al protocolo de trabajo descrito en el texto.



**Figura 3.1.5** Electroferograma experimental (absorbancia versus tiempo) de una mezcla artificial de teofilina, ácido benzoico y ácido salicílico, a pH = 9 y fuerza iónica  $I = 43.9$  mM del BGE (ver Tabla 3.1.3) de acuerdo al protocolo de trabajo descrito en el texto.



**Figura 3.1.6** Electroferograma experimental (absorbancia versus tiempo) de una mezcla artificial de teofilina, ácido benzoico y ácido salicílico, a pH = 8,5 y fuerza iónica  $I = 21.3$  mM del BGE (ver Tabla 3.1.3) de acuerdo al protocolo de trabajo descrito en el texto.

### 3.1.5 Conclusiones

La CZE además de ser una herramienta analítica ampliamente usada para la separación de una gran variedad de analitos, tiene un alto potencial para la estimación de propiedades fisicoquímicas como el radio hidrodinámico, el coeficiente de difusión y el potencial zeta de la partícula, cuando el electroferograma se modela e interpreta a través de las ecuaciones de balance de los fenómenos de transporte acoplados a los efectos electrocinéticos. Más específicamente:

- 1- El modelo básico de la CZE (no-ideal y lineal) que comprende moléculas cargadas pequeñas se valida con datos experimentales.
- 2- Este modelo provee predicciones cuantitativas de interés práctico para la interpretación de electroferogramas de mezclas de analitos.

En consecuencia, con la estrategia que relaciona la teoría con los experimentos es posible predecir y optimizar la separación mediante CZE de una mezcla de analitos de bajo peso molecular como los que se ilustran en esta Sección.

## 3.2 Aminoácidos

### 3.2.1 Introducción

Los aminoácidos son importantes compuestos biológicos y su determinación en fluidos orgánicos, en proteínas y en péptidos puede proveer respuestas por ejemplo, acerca de la composición de las proteínas, los valores nutricionales y las rutas metabólicas. Asimismo, algunos aminoácidos se usan como marcadores en ciertas enfermedades. Usualmente los aminoácidos se resuelven por técnicas cromatográficas como HPLC y la detección se realiza con técnicas espectroscópicas con derivatización pre- o post-columna usando agentes cromóforos o fluorescentes. La CE (en sus modos CZE o MECC) es una técnica micro-analítica que se adapta muy bien para la separación de aminoácidos. Novotny *et al.* (1990) discutieron los problemas asociados con la separación de aminoácidos, los cuales se deben en parte a que los aminoácidos comprenden una mezcla de constituyentes ácidos, básicos y neutros, y a pesar de que a un pH particular se puede mejorar la resolución de un tipo de aminoácido, probablemente se causa el solapamiento de otros. Otro problema asociado con el análisis de aminoácidos es su detección. La mayoría de los aminoácidos excepto fenilalanina, tirosina y triptofano carecen de un cromóforo fuerte, en consecuencia la detección UV directa o por fluorescencia de estos aminoácidos no es posible. No obstante los procedimientos de detección usados previamente en HPLC se adaptaron para la CE (es decir, el uso de la derivatización química) en la cual un cromóforo adecuado o fluoróforo se pega al aminoácido para mejorar su detección. Numerosos estudios se publicaron con relación a este tema (ver por ejemplo, Issaq y Chan, 1995 y las referencias allí incluidas).

Sin entrar en un análisis detallado, en esta sección, se aplica el modelo básico de la CZE, que se presentó en el Capítulo 2 de la Parte I, a la optimización de la separación de una mezcla de aminoácidos. Además de ilustrar la capacidad del modelo para simular las condiciones experimentales y obtener el electroferograma teórico (simulado) que representa la separación de los analitos bajo estudio, se desea evaluar la incidencia que tienen sobre el electroferograma, las perturbaciones de ciertas variables del sistema. Con mayor interés se perturba el pH y la fuerza iónica  $I$ . Posteriormente, considerando que la CE resulta muy útil para la cuantificación de aminoácidos (ver por ejemplo, Hernández *et al.*, 1993a y b; Issaq y Chang, 1995, Wiley, 2002) y en particular de aquellos que son aromáticos, debido a que es posible su detección directa sin necesidad de utilizar una

técnica de derivatización, se aplica el modelo básico de la CZE propuesto en esta Tesis, a la determinación de fenilalanina (Phe) y tirosina (Tyr) en suero (ver también, Tagliaro *et al.*, 1994). Este estudio es de utilidad en la enfermedad conocida como fenilcetonuria (PKU). En efecto, en pacientes que padecen esta alteración metabólica es necesario la cuantificación de los niveles de Phe en suero para la confirmación del diagnóstico de la PKU, y el control posterior de los niveles séricos del aminoácido, luego de instaurada la dieta baja en Phe, imprescindible para mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

### **3.2.2 Aplicación del modelo básico a la separación de aminoácidos mediante CZE**

Considerando que se trata de moléculas de bajo peso molecular, para la simulación de la separación de una mezcla de aminoácidos, se usa el modelo básico descrito anteriormente (ver, Sección 2.6 en el Capítulo 2). Es decir, en esta ilustración de la capacidad predictiva del modelo, no se tiene en cuenta el fenómeno de regulación de cargas que se estudia en particular en el Capítulo 7 para el análisis de estos analitos, como se mencionó al comienzo de este capítulo.

#### ***Protocolo experimental***

En este estudio particular se utiliza, en principio, el protocolo experimental presentado en Castañón *et al.* (1999) para la separación de una mezcla de 11 aminoácidos mediante CZE. El capilar que se utiliza es neutro lo que implica que no existe EOF. Las dimensiones del capilar son:  $L_t = 47$  cm,  $L_d = 40$  cm y  $d_i = 50$   $\mu$ m. El BGE que se usa en la separación es tetraborato de sodio (pH = 9.0 y fuerza iónica  $I = 100$  mM). El aparato se programa con la polaridad invertida. El voltaje aplicado es  $V = 28$  kV y la temperatura de trabajo es  $T = 20$  °C. El tiempo de inyección de la muestra se fija en 3 segundos y el tiempo de separación en 10 minutos.

En la Tabla 3.2.1 se presentan los valores de las constantes de disociación ( $pK_1$ ,  $pK_2$  y  $pK_R$ ) de los grupos amino y carboxilo terminales y los grupos laterales de los aminoácidos, respectivamente, y también los datos fisicoquímicos de la masa molar  $M$  y el punto isoeléctrico  $pI$ , correspondientes a los aminoácidos que componen la mezcla bajo estudio requeridos por el programa computacional y que son útiles para la interpretación de los resultados. Asimismo se incluyen en esta tabla los tiempos de migración experimentales obtenidos de la bibliografía (Castañón *et al.*, 1999) que corresponden a cada aminoácido de la mezcla. Es pertinente señalar que se elige un color (que se señala

entre paréntesis) para la identificación de cada aminoácido en el electroferograma simulado que se obtiene con la aplicación del modelo básico y posteriormente en los electroferogramas perturbados que se logran al variar ligeramente las condiciones ( $I$  y pH) del protocolo de separación.

**Tabla 3.2.1.** Datos fisicoquímicos (Lehninger, 1978) y tiempos de migración experimentales (Castañón *et al.*, 1999) de los aminoácidos en estudio.

Aminoácidos	$M$ (g/mol)	$pK_1$ (a)	$pK_2$ (b)	$pK_R$ (c)	$pI$	$t_{mi}$ (min)
1- Glu (rojo)	147	2.19	9.67	4.25	3.22	4.83
2- Gly (verde)	75	2.34	9.60	-	5.97	5.94
3- Tau (azul)	125	1.50	8.74	-	5.12	6.04
4- Ser (turquesa)	105	2.21	9.15	-	5.68	6.06
5- Ala (fucsia)	89	2.35	9.69	-	6.02	6.08
6- Cys (amarillo)	121	1.71	10.78	8.33	5.02	6.51
7- Pro (fucsia)	115	1.99	10.60	-	6.30	6.64
8- OhPro (turquesa)	131	1.92	9.73	-	5.83	6.75
9- His (rojo)	155	1.82	9.17	6.0	7.58	6.79
10- Tyr (verde)	181	2.20	9.11	10.07	6.65	6.91
11- Phe (azul)	165	1.83	9.13	-	5.48	6.75

(a) Corresponde a la disociación del grupo carboxilo terminal.

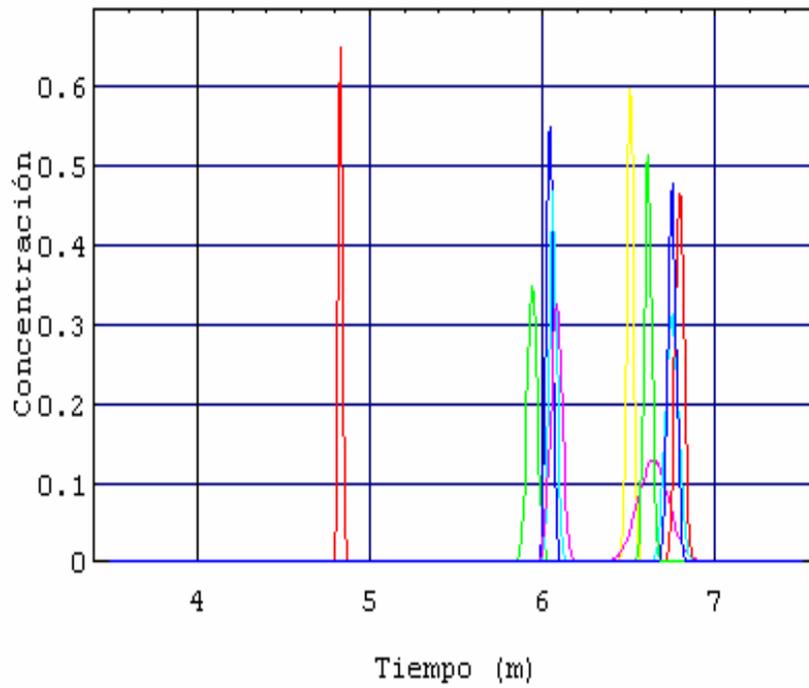
(b) Corresponde a la disociación del grupo amino terminal.

(c) Corresponde a la disociación del grupo lateral.

### 3.2.3 Simulación del electroferograma y predicciones con el modelo básico

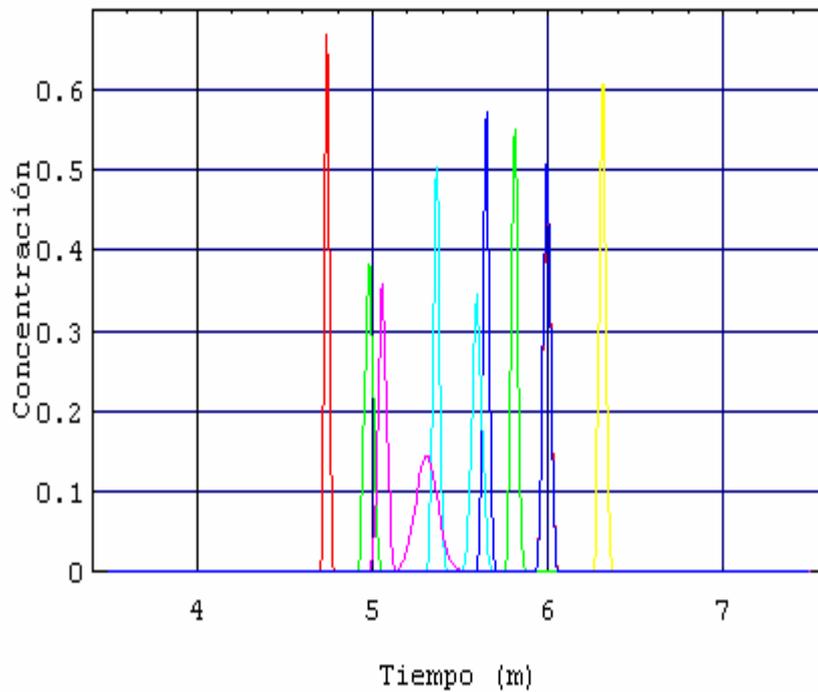
Si se ingresan al programa computacional del modelo básico los tiempos de migración  $t_{mi}$  experimentales correspondientes a cada aminoácido es posible predecir el electroferograma resultante (ver Figura 3.2.1) al aplicar el protocolo de la CZE mencionado arriba. Luego, en esta etapa del trabajo, se desea estudiar como influyen las perturbaciones del pH y la fuerza iónica en la separación de la mezcla, considerando aquí, para simplificar, que la variación del radio hidrodinámico de cada analito con la carga es casi constante para la perturbación introducida. De esta manera se perturba el sistema con una variación de pH y/o fuerza iónica pequeña. Se observan los resultados en los electroferogramas que se simulan en las Figuras 3.2.2, 3.2.3 y 3.2.4. Es evidente en estas figuras, las cuales contienen los electroferogramas perturbados, los corrimientos de picos que se producen cuando se introduce una modificación pequeña del pH y/o de la fuerza iónica. En efecto, esta perturbación y simulación del sistema permite visualizar la separación lograda con el protocolo perturbado.

Electroferograma

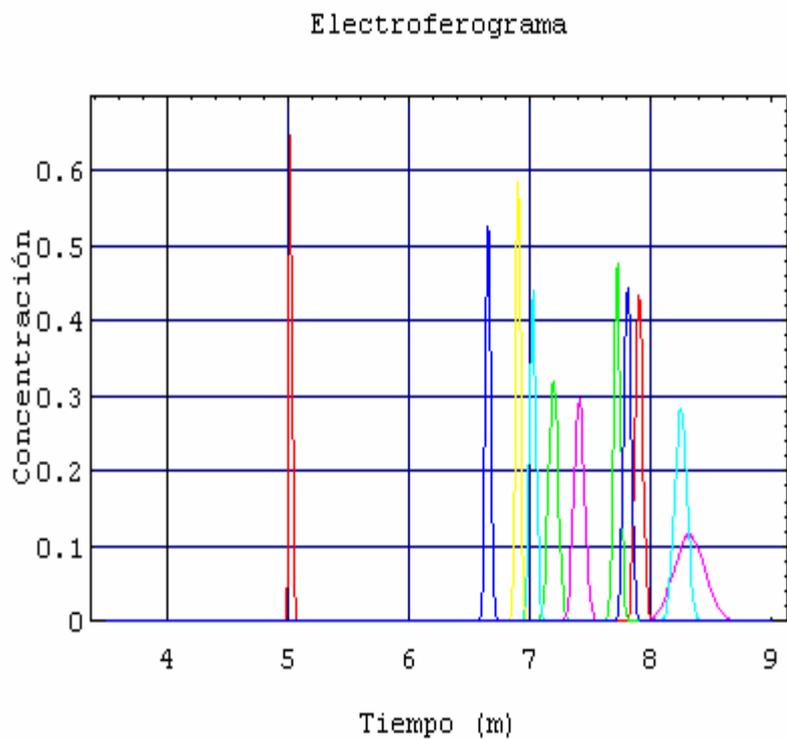


**Figura 3.2.1.** Simulación con el modelo básico del electroferograma que involucra la mezcla de 11 aminoácidos usando el protocolo inicial (pH = 9.0 y fuerza iónica  $I = 100$  mM)

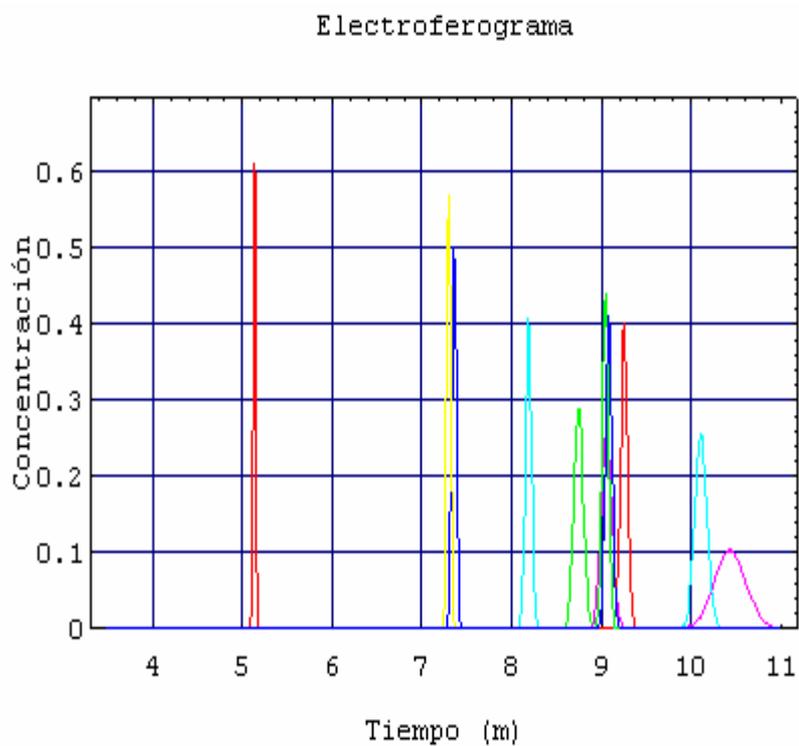
Electroferograma



**Figura 3.2.2.** Perturbación del electroferograma inicial (pH=9.1 y fuerza iónica  $I = 110$  mM)



**Figura 3.2.3.** Perturbación del electroferograma inicial (pH = 8.9 y fuerza iónica  $I = 110$  mM)



**Figura 3.2.4.** Perturbación del electroferograma inicial (pH = 8.8 y fuerza iónica  $I = 110$  mM)

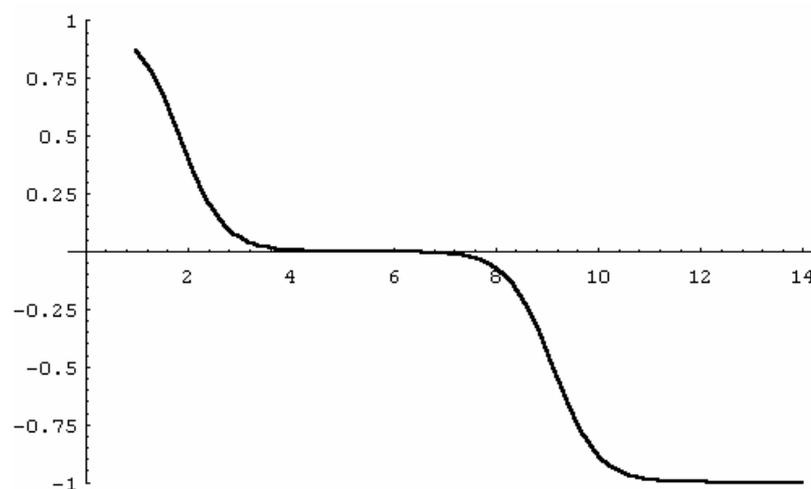
### 3.2.4 Caso simple de estudio: cuantificación de fenilalanina y tirosina en suero mediante CZE

La determinación de fenilalanina (Phe) en suero se emplea para confirmar el diagnóstico de fenilcetonuria (PKU) y para seguir las modificaciones de los niveles séricos de este aminoácido en pacientes que se encuentran bajo tratamiento. La PKU es una enfermedad genética en la cual el déficit de la enzima fenilalanina hidroxilasa es la base de cambios bioquímicos complejos que provocan un aumento de la concentración sérica de Phe. Esta situación juega un rol prominente en el desarrollo del retardo mental que es típico de esta enfermedad. En efecto, de acuerdo a la reacción de hidroxilación de la Phe para dar tirosina (Tyr), al existir déficit o ausencia de la enzima involucrada en esta vía metabólica, se produce un aumento de la concentración sanguínea de Phe y consecuentemente una disminución de los niveles de Tyr. La actividad de esta enzima está limitada al hígado, por lo tanto el diagnóstico se basa en la demostración de alteraciones en el metabolismo de la Phe. La PKU no se traduce en síntomas agudos sino más bien en una alteración del metabolismo proteico en el sistema nervioso central, siendo el elemento clínico más importante el retardo mental irreversible. Es relevante mencionar que el diagnóstico precoz y la posibilidad de controlar el desarrollo de esta patología con una dieta baja en Phe enfatizan la importancia de la realización del *screening* neonatal para PKU y la determinación cuantitativa de los niveles séricos de Phe para el seguimiento ulterior de los niños tratados con dieta.

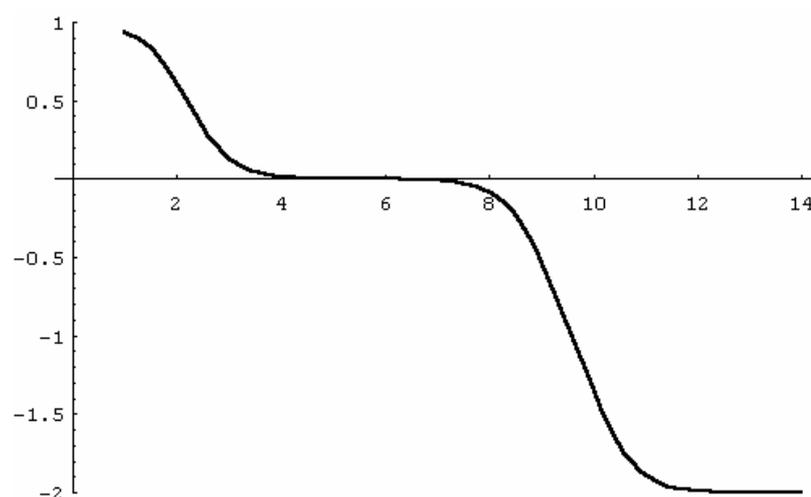
La determinación de Phe en muestras biológicas usualmente se realiza mediante el ensayo fluorométrico, la cromatografía líquida o la cromatografía gaseosa. Es relevante indicar la CZE como una técnica alternativa de interés para la cuantificación de Phe en suero (ver, Willey *et al.*, 2002). En efecto, la CZE se presenta como una excelente herramienta para la cuantificación de aminoácidos en forma rápida, económica y eficiente en especial para aminoácidos aromáticos con los cuales es posible la detección UV directa sin necesidad de utilizar un proceso de derivatización. En este sentido es evidente la necesidad de la optimización de un protocolo para la detección y cuantificación de Phe y Tyr en suero. En adición, el uso del modelo básico de la CZE que se presenta en esta Tesis, favorece el alcance de este propósito.

### ***Estudios realizados con el modelo básico***

Primero, la aplicación del modelo básico de la CZE permite realizar una simulación de la curva de titulación de un aminoácido, es decir determinar la variación del número de carga neta con el pH. Este tipo de gráfico permite seleccionar el rango de pH más efectivo para la separación. En las Figuras 3.2.5 y 3.2.6 se muestran las curvas de titulación para Phe y Tyr, respectivamente.



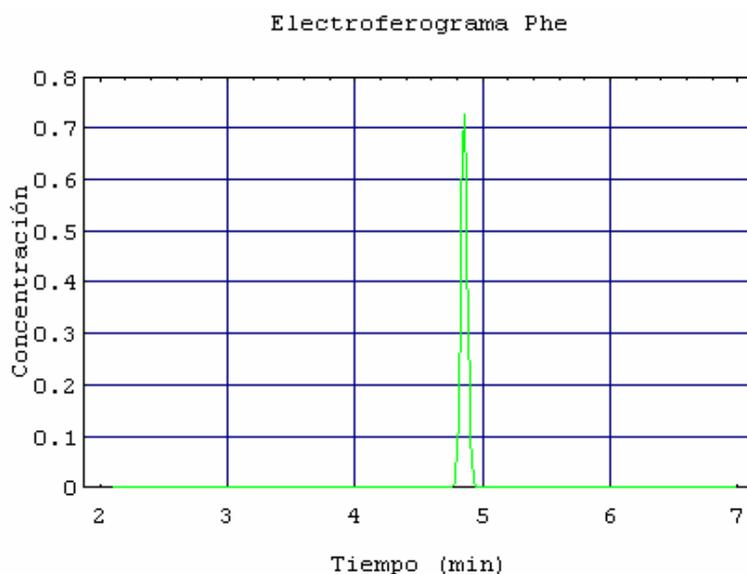
**Figura 3.2.5.** Curva de titulación de la Phe (carga versus pH) obtenida con el modelo básico.



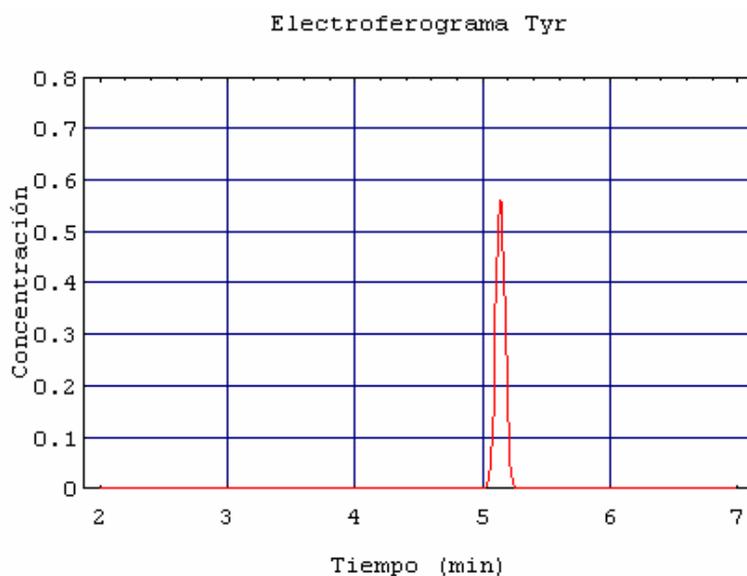
**Figura 3.2.6.** Curva de titulación de la Tyr (carga versus pH) obtenida con el modelo básico.

En efecto, los aminoácidos Phe y Tyr en el rango de pH comprendido entre 4 y 6 presentan cargas muy similares y cercanas a cero, lo cual indicaría la imposibilidad de separarlos en estas condiciones mediante la CZE. Sin embargo, a pH = 9 por ejemplo, la

diferencia de carga entre ellos es mayor y es posible lograr su separación. Teniendo en cuenta estas consideraciones previas se propone un protocolo de trabajo para la separación de estos dos aminoácidos. Así, se selecciona como BGE, borato a  $\text{pH} = 10$  y  $I = 25 \text{ mM}$ ; el voltaje que se aplica es  $V = 15 \text{ kV}$  y las dimensiones del capilar de sílice son  $L_t = 0.47 \text{ m}$ ,  $L_d = 0.40 \text{ m}$  y  $d_i = 75 \text{ }\mu\text{m}$ . Se aplica el modelo básico y el programa computacional para las condiciones de trabajo establecidas y se obtienen los tiempos de migración correspondientes a Phe y Tyr. Los electroferogramas simulados de los aminoácidos individuales se presentan en las Figuras 3.2.7 y 3.2.8, respectivamente.

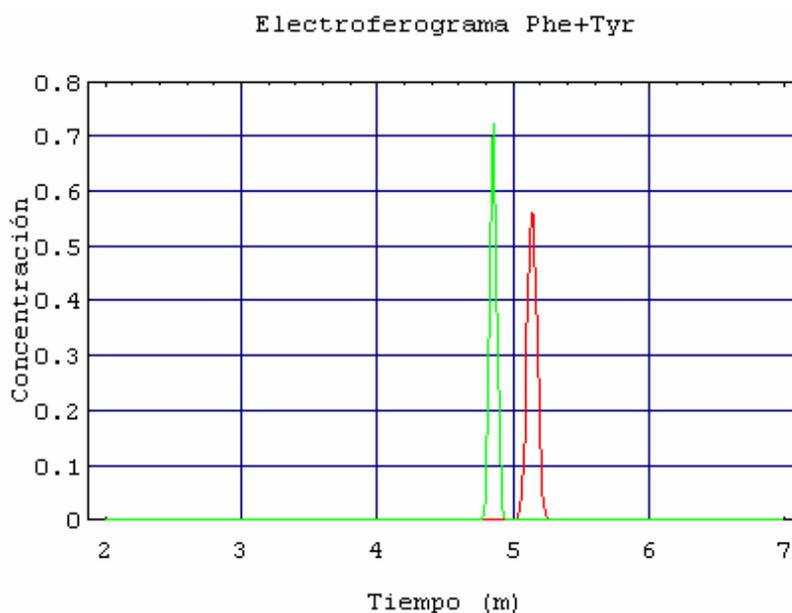


**Figura 3.2.7.** Electroferograma simulado (concentración adimensional versus tiempo) correspondiente a Phe, según el protocolo que se especifica en el texto.



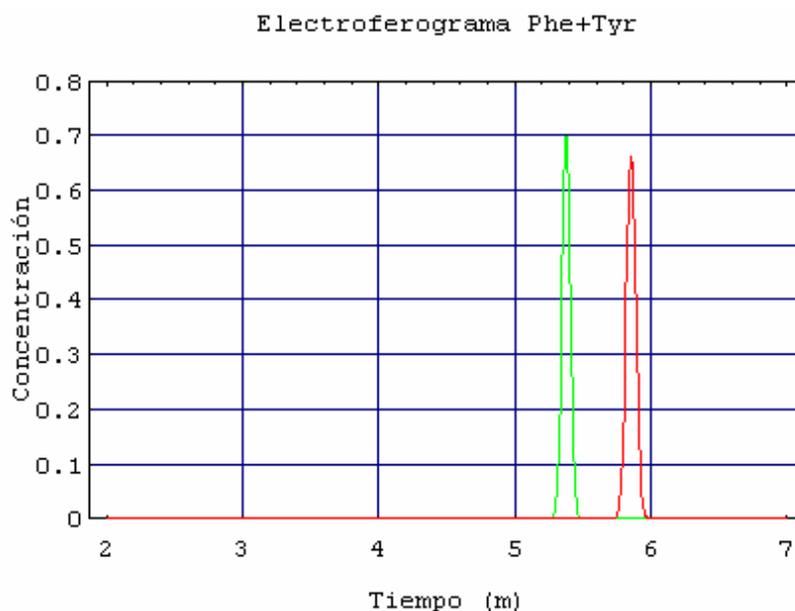
**Figura 3.2.8.** Electroferograma simulado (concentración adimensional versus tiempo) correspondiente a Tyr, según el protocolo que se especifica en el texto.

La simulación con el programa computacional de la separación de una mezcla que contiene Phe y Tyr se muestra en la Figura 3.2.9.



**Figura 3.2.9.** Electroferograma simulado (concentración adimensional versus tiempo) correspondiente a la mezcla de Phe (verde) + Tyr (rojo), según el protocolo que se especifica en el texto.

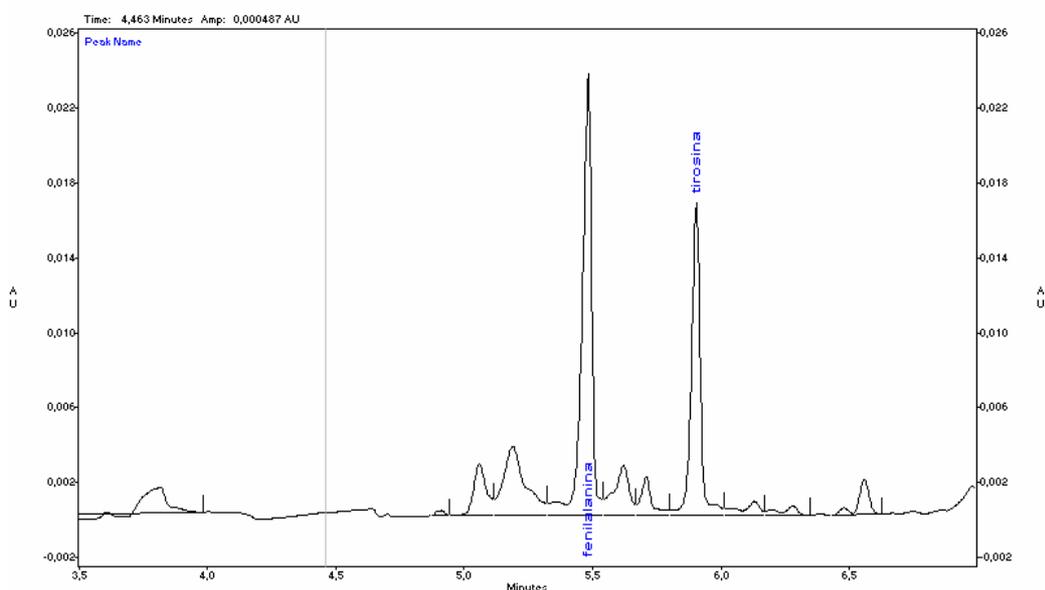
Luego, el electroferograma de la Figura 3.2.9 se modifica (variando el pH a 11) logrando una separación mayor entre los picos correspondiente a los aminoácidos Phe y Tyr. El electroferograma simulado que se obtiene se presenta en la Figura 3.2.10.



**Figura 3.2.10.** Electroferograma simulado (concentración adimensional versus tiempo) correspondiente a la mezcla de Phe (verde) + Tyr (rojo), a pH = 11.0 y fuerza iónica  $I = 25$  mM.

De acuerdo con lo narrado en el párrafo anterior es claro que el uso del modelo básico y el programa computacional de la CZE permite, antes de realizar la experimentación, evaluar las condiciones más favorables para la separación, evitando así los ensayos tediosos de prueba y error.

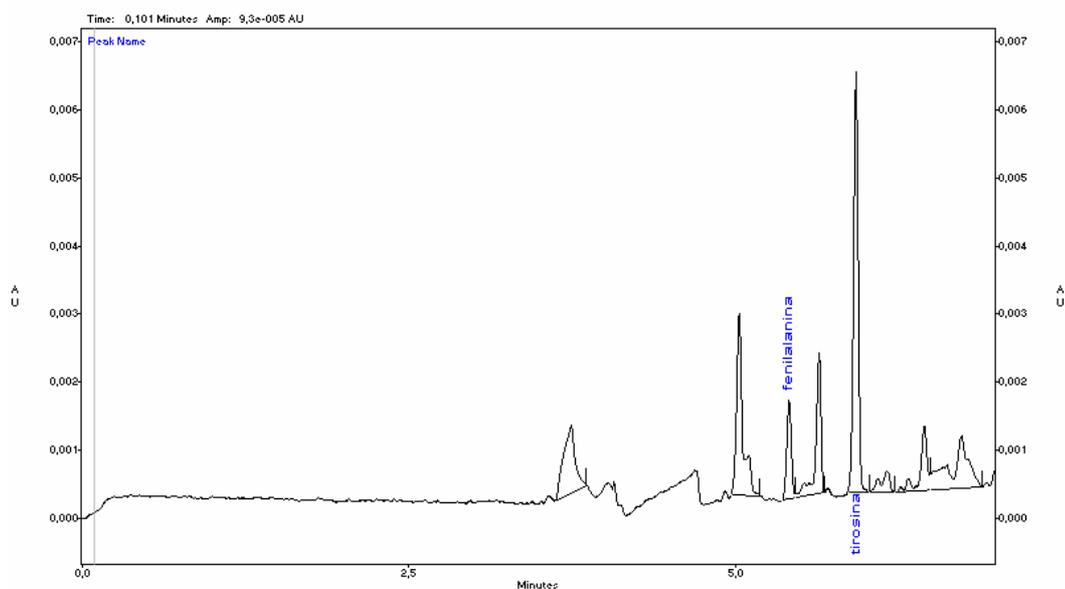
Para verificar los resultados de la simulación que se obtienen con el modelo básico y el programa computacional se reproducen en la práctica las condiciones operacionales seleccionadas como las más apropiadas para la separación de Phe y Tyr mediante la CZE. Para tal fin se utiliza un equipo de electroforesis capilar Beckman P/ACE 5010 provisto con un capilar de sílice fundida de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 47 cm de longitud total (40 cm de longitud al detector). Las condiciones de trabajo son: el BGE es borato 25 mM, pH =11, la temperatura es 20  $^{\circ}\text{C}$ , el voltaje aplicado es 15 KV, el tiempo de corrida es 7 minutos, la inyección de muestra es 7 segundos y la detección es a 200 nm. Es pertinente mencionar que el tratamiento previo de la muestra es mínimo: se desproteinizan 50  $\mu\text{l}$  de suero agregando 200  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo. Luego de la centrifugación a 3500 rpm, el sobrenadante se evapora y el residuo se reconstituye con 100  $\mu\text{l}$  de agua destilada, quedando la muestra en condiciones para ser inyectada directamente en el capilar.



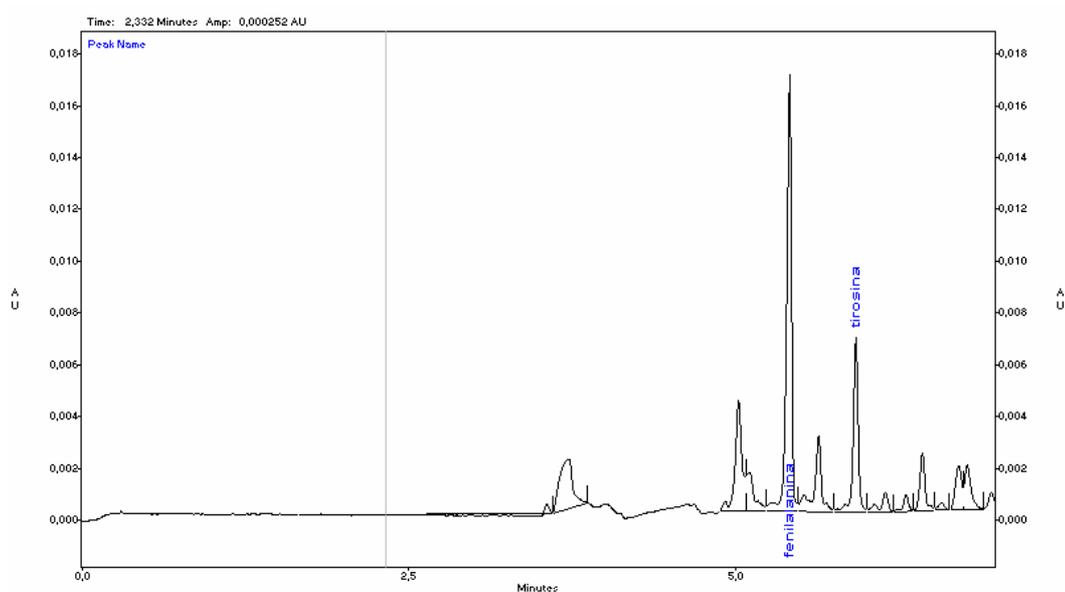
**Figura 3.2.11.** Electroferograma experimental (absorbancia versus tiempo) de una mezcla de Phe y Tyr (patrones) en suero, según el protocolo descrito en el texto.

Se presentan en la Figura 3.2.11 el electroferograma experimental de los patrones de Phe y Tyr que se obtiene luego de la optimización previa con el modelo propuesto. Se observa que los resultados son favorables. En adición, en la Figuras 3.2.12 se presenta la

separación de Phe y Tyr en una muestra de suero normal y en las Figuras 3.2.13 y 3.2.14, una muestra de suero que contiene 100  $\mu\text{g}$  de Phe y 12.5  $\mu\text{g}$  de Phe, respectivamente. Es pertinente señalar que para la cuantificación de Phe y Tyr se realizan curvas de calibrado y ensayos de sensibilidad y reproducibilidad que no se muestran aquí por escapar a los fines de esta Tesis.



**Figura 3.2.12.** Electroferograma experimental (absorbancia versus tiempo) de una muestra de suero normal que contiene 3.3  $\mu\text{g}$  de Phe y 30  $\mu\text{g}$  de Tyr, según el protocolo descrito en el texto.



**Figura 3.2.13.** Electroferograma experimental de una muestra artificial de suero que contiene 25  $\mu\text{g}$  de Phe.

Es claro que la CZE se presenta como una alternativa de interés para la cuantificación directa de Phe en suero para confirmar el diagnóstico de PKU y para el seguimiento de pacientes fenilcetonúricos que se encuentran bajo tratamiento, por ser una técnica sencilla, con bajo costo operativo, un consumo de reactivos mínimo y el empleo de pequeños volúmenes de muestra. En adición, el uso de un modelo para la optimización del método experimental como el que se presenta en esta Tesis resulta muy ventajoso.

### 3.2.5 Conclusiones

El uso del modelo básico para optimizar la separación de aminoácidos mediante la CZE permite disminuir sustancialmente el tiempo de experimentación y evita las aproximaciones de prueba y error. En efecto, este modelo se puede usar en dos etapas:

- a) Cuando los tiempos de migración experimentales de los aminoácidos están disponibles, se simula el electroferograma inicial de una mezcla que los contiene.
- b) Con los resultados de la etapa previa se perturba la velocidad electroforética de cada analito (introduciendo variaciones pequeñas de pH y fuerza iónica  $I$  en el protocolo inicial) lo cual permite adoptar un protocolo adecuado según la separación deseada.
- c) En adición, el análisis que se realiza aquí con el modelo básico y el programa computacional tiene, por ejemplo, una aplicación directa en la optimización de la separación y cuantificación de Phe y Tyr en suero, lo cual es de relevancia para el diagnóstico de PKU y el seguimiento de pacientes fenilcetonúricos que deben ser tratados con una dieta baja en Phe.

Los resultados logrados en este capítulo demuestran que el modelo básico propuesto en la Parte I, permite caracterizar en forma simple una mezcla de analitos de bajo peso molecular para posteriormente, mediante la perturbación de variables fisicoquímicas relevantes mejorar el protocolo propuesto sin necesidad de realizar experimentación adicional.

### Apéndice 3-A

Símbolos de los aminoácidos (Lehninger, 1978).

Aminoácido	Símbolos de tres letras	Símbolos de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Asn + Asp	Asx	B
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Gln + Glu	Glx	Z
Glicocola	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Iso	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

# Capítulo 4

## Proteínas

---

---

### 4.1 Estimación de la carga neta y el radio hidrodinámico de proteínas

#### 4.1.1 Introducción

En la actualidad, entre los diferentes analitos que se pueden analizar mediante CZE, los péptidos y las proteínas son los que más frecuentemente se encuentran en la literatura, debido principalmente al desafío ofrecido por el proyecto proteómico. En este contexto es relevante el estudio asociado específicamente con la formulación adecuada del BGE para una corrida particular de la CZE (ver, por ejemplo, Kenndler, 1998a; Gaš *et al.*, 2001; Jaroš *et al.*, 2002; Berli, *et al.*, 2003). Una de las preguntas básicas en este sentido es de que manera el pH, la fuerza iónica  $I$ , la temperatura  $T$ , la viscosidad del solvente  $\eta$ , y la permitividad  $\varepsilon$  se pueden controlar como propiedades relevantes del BGE para lograr que las proteínas se encuentren en un estado de carga eléctrica apropiado, el cual se define de acuerdo a diferentes propósitos tales como: A) Minimizar el efecto de las interacciones electrostáticas de los grupos cargados de los residuos de aminoácidos en la proteína, para evitar variaciones importantes en los  $pK_i$  ( $i = 1, 2, \dots, N$ , indica aquí distintos grupos cargados en diferentes posiciones en la proteína), conduciendo así a un electroferograma más predecible y a una formulación más racional desde el punto de vista teórico. La evaluación y predicción de los  $\Delta pK_i$  ha ganado mucha atención (ver, por ejemplo, Demchuk y Wade, 1996; Antosiewicz *et al.*, 1996; Beroza y Case, 1996; Beroza y Fredkin, 1996; Beroza *et al.*, 1991; Kuehner *et al.*, 1999; Kao *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002 a y b; Fitch *et al.*, 2002) en el sentido de comprender mejor las funciones de las proteínas en los sistemas biológicos. B) Analizar las teorías electrocinéticas y electrostáticas disponibles para predecir la movilidad del analito con aplicación directa en la interpretación de los resultados de la CZE, expresado a través del electroferograma. Estos gráficos específicos son ricos en información fisicoquímica de los analitos separados, y también muy sensibles a la formulación del solvente que se usa en la separación, es decir, al BGE. Sin embargo, la información extraída a partir del electroferograma se debe manejar con cierto cuidado.

Es conveniente recordar aquí, que la movilidad  $\mu$  de cada analito separado es proporcional al cociente entre la carga neta  $eZ$  y el coeficiente de fricción hidrodinámico  $f$ . Aquí,  $e$  es la carga elemental y  $Z$  es el número de carga neta de la proteína. Los valores del numerador y el denominador en este cociente son difíciles de separar, a menos que se lleven a cabo experimentos complementarios, además de la CZE. Una alternativa es introducir un desarrollo teórico más riguroso que permita modelar estos términos. En este último sentido, es claro que el radio hidrodinámico  $a_H$  es necesario para definir adecuadamente el coeficiente de fricción en términos de la forma más elemental de la partícula, es decir, la forma esférica, cuando se invocan las hipótesis del continuo. En adición, puede ser útil usar otras formas de partículas (Winzor *et al.*, 2004; Winzor, 2004; Allison *et al.*, 2004), para lo cual es necesario introducir información estructural adicional (ver los Capítulos 5 y 7, correspondientes a péptidos y aminoácidos, respectivamente).

Fuera del contexto de la CZE, la estimación de la carga neta de proteínas en un solvente específico se estudia usando detalles de la estructura que se obtienen a partir de datos de la cristalografía por rayos X y de la Resonancia Magnética Nuclear (NMR). En la actualidad, existen modelos computacionales y algoritmos matemáticos (ver Antosiewicz *et al.*, 1996; Beroza y Case, 1996; Beroza y Fredkin, 1996; Beroza *et al.*, 1991 y las referencias allí citadas) que se basan en principios básicos de la electrostática, electrocinética y termodinámica estadística. En esta Tesis, en general, se refiere a estos modelos como “modelos detallados”. En este sentido se lograron resultados valiosos, pero con desarrollos computacionales largos y costosos. Estos modelos son difíciles de aplicar en situaciones prácticas como las que se requieren en la CE. Por ejemplo, se incluyó la flexibilidad de las cadenas laterales para evaluar las interacciones electrostáticas en los modelos de titulación de proteínas, mediante la ecuación de Poisson-Boltzmann y el procedimiento de muestreo de Monte Carlo (Beroza y Case, 1996). Este modelo se designa aquí como Modelo de Poisson-Boltzmann-Monte Carlo (PBMCM), y requiere el promedio de las protonaciones de los grupos cargados de todos los estados posibles de la proteína. Estos estados son del orden de  $(2N_{ca})^{N_c}$ , donde  $N_c$  es el número de sitios cargados y  $N_{ca}$  el número de conformaciones alternativas, incluyendo la conformación básica correspondiente a la estructura cristalina obtenida por rayos X. Estos ensayos computacionales requieren la aplicación de técnicas de diferencias numéricas finitas, con diferentes grados de refinamiento, y frecuentemente el problema resultante conduce a

situaciones inviables computacionalmente, cuando se desea encontrar la energía libre termodinámica mínima de la macromolécula para lograr el resultado correcto (ver también, Beroza y Case, 1996 y You y Bashford, 1995 y las referencias allí incluidas). En otro sentido, estos modelos brindan resultados muy útiles que permiten así la formulación de los modelos más simples. Las predicciones del PBMCM se usan para comparar los resultados obtenidos con los modelos más simples que guardan una relación directa con los datos experimentales de la CZE (Sharma *et al.*, 2003).

Los modelos simples son útiles por presentar una comprensión física importante de los cálculos complejos llevados a cabo por medio de los modelos detallados cuando se desea estimar la carga neta de una proteína en un solvente específico. Por lo tanto, de acuerdo a lo mencionado anteriormente, es claro que la búsqueda de modelos simples, aunque empíricos en algunos aspectos, también es necesaria, como se expresó recientemente en la literatura (ver, por ejemplo, Sharma y Carbeck, 2005; Winzor *et al.*, 2004; Allison *et al.*, 2004; Sharma y Carbeck, 2004; Sharma *et al.*, 2003; Gitlin *et al.*, 2003; Carbeck y Negin, 2001; Menon y Zydney, 2000; Cottet y Gareil, 2000; Carbeck *et al.*, 1999; Menon y Zydney, 1998; Rabiller-Baudry *et al.*, 1998; Córdova *et al.*, 1997; Gao y Whitesides, 1997; Colton *et al.*, 1997; Chae y Lenhoff, 1995; Gao *et al.*, 1994; Compton, 1991).

Más específicamente, para la estimación vía CZE de  $eZ$  y  $a_H$  de una proteína en particular en un BGE con valores definidos de  $pH$ ,  $I$ ,  $T$ ,  $\eta$  y  $\varepsilon$ , se debe fijar el nivel de detalle de la estructura macromolecular en base a la cual se construye el modelo matemático. En adición, este modelo puede tener diferentes propósitos como lo describen Reijenga y Kenndler (1994a) y como se señaló en la Sección 1.2, en el Capítulo 1 de esta Tesis. En general, los requerimientos de la estructura del analito y del modelo, dependen del tipo de problema científico y su aplicación. Por ejemplo, los detalles estructurales que se necesitan para estudiar el problema del plegado (*foldi*ng) de proteínas, o la evaluación de los  $\Delta pK_i$  de los grupos cargados en la proteína, son diferentes de aquellos que se requieren en la formulación de una separación eficiente de una mezcla de estos analitos mediante la CZE (ver Capítulo 3). Con relación a este aspecto, se presenta en este capítulo un análisis de los modelos de la CZE para proteínas cargadas, donde los datos básicos que se usan (correspondientes a la estructura macromolecular del analito) son: la secuencia de aminoácidos (AAS) y los valores de las distancias geométricas  $r_{ij}$  entre los pares de grupos

cargados, designados  $i$  y  $j$  entre los  $N$  pares posibles en una proteína. Estos dos tipos de información están disponibles en la Base de Datos de Proteínas (PDB).

Por consiguiente, en esta sección se proponen y discuten dos modelos fisicoquímicos simples (modelos extendidos que se obtienen a partir del modelo básico de la CZE presentado en la Parte I de esta Tesis) para estimar cada término del cociente  $eZ/f$  de proteínas, cuando se dispone de los datos experimentales de las movilidades electroforéticas para un protocolo de la CZE específico. Aquí, en adición se incluye y modela con cierto detalle el análisis y la evaluación del fenómeno de regulación de cargas, también designado fenómeno de cooperatividad en la unión del protón (ver, por ejemplo, Linderstrøm-Lang, 1924; Menon y Zydney, 2000; Sharma *et al.*, 2003). Se espera que los resultados obtenidos sean de utilidad para aquellos que realizan CZE en laboratorios de investigación y desarrollo, para optimizar y proponer los protocolos apropiados de separaciones de proteínas y, principalmente para obtener información fisicoquímica adicional que contribuya a la caracterización de la proteína en estudio. Esta estrategia se considera desde diferentes puntos de vista, como se infiere a partir de los trabajos publicados recientemente (Winzor, 2004 y Sharma y Carbeck, 2004), los cuales presentan ventajas prácticas y dificultades de cálculo, como así también estimaciones de radios hidrodinámicos de proteínas, usualmente supuestos como una constante. Por consiguiente, estos aspectos se analizan y discuten más adelante.

Antes de proponer los modelos fisicoquímicos extendidos de la CZE en esta Tesis, es conveniente realizar un análisis de los antecedentes del tema en consideración. Para comenzar, se debe tener en cuenta que la determinación de la carga eléctrica de una proteína en solución es relevante para estudiar y develar su comportamiento en diferentes mecanismos biológicos. Las interacciones electrostáticas afectan significativamente la estabilidad, actividad, conformación y purificación/aislamiento de muchas proteínas. La carga neta de una proteína en solución está determinada por la extensión en la ionización de los residuos ácidos y básicos, en combinación con la unión específica de aniones, cationes y ligandos cargados. Esta carga neta resulta así una función compleja del pH, la fuerza iónica y la composición detallada de la solución electrolítica (Menom y Zydney, 1998). En los primeros trabajos relacionados con el tema se planteaba que la determinación de la carga de una proteína era difícil o imposible, especialmente si no se conocía bien su secuencia. Solamente el cálculo del punto isoeléctrico (pI) era accesible experimentalmente. En efecto, la evaluación de la carga neta a partir de la secuencia de

aminoácidos es directa si se conocen los valores de los  $pK_i$  de cada uno de los residuos de los aminoácidos cargados y el valor de pH del medio que los rodea, aunque en la práctica la estructura terciaria y la composición de la secuencia pueden modificar los valores esperados de las constantes de ionización. En estudios previos generalmente se evaluaron la carga de la proteína y la unión de iones por titulación directa, equilibrio de diálisis, electroforesis libre o NMR. En este sentido, tanto la titulación directa como el equilibrio de diálisis requieren cantidades relativamente grandes de proteínas y medidas muy exactas. Por otro lado, las técnicas de NMR, si bien proporcionan información detallada de las propiedades de los sitios específicos de unión de iones, son complicadas y demasiado costosas para ser usadas en la evaluación de la carga efectiva de una proteína.

En los últimos años la combinación de las escaleras de carga de proteínas y la CE se convirtieron en una herramienta biofísica que se utiliza para la medición de propiedades electrostáticas e interacciones de proteínas. Ejemplos de lo mencionado anteriormente incluyen estimaciones de la carga neta (Gao *et al.*, 1994), el radio hidrodinámico de proteínas (Carbeck y Negin, 2001) y el peso molecular (Gao y Whitesides, 1997), los valores de los  $pK_i$  de los grupos titulables (Córdova *et al.*, 1997), los efectos de interacciones entre grupos cargados de la proteína y ligandos de unión (Caravella *et al.*, 1999) y la estabilidad de proteínas (Negin y Carbeck, 2002). De acuerdo a lo citado en la bibliografía, el análisis de las escaleras de carga usando la CZE resulta un método útil para determinar  $Z$  y  $a_H$  de proteínas y estudiar las interacciones electrostáticas (las cuales a su vez, controlan este fenómeno). No obstante, la validez de esta aseveración se analiza y discute más adelante en esta sección.

Las escaleras de carga son colecciones de derivados de proteínas producidos por la modificación química parcial de grupos cargados de la proteína (Gao *et al.*, 1994; Colton *et al.*, 1997; Carbeck *et al.*, 1999). El procedimiento más común involucra la acetilación de los residuos de lisina (Lys) con anhídrido acético (Gao y Whitesides, 1997) o la conversión de los residuos de ácidos glutámico o aspártico a grupos hidroxámicos (amidación) con hidroxilamina (Carbeck *et al.*, 1999). En la CZE, estas colecciones se separan en picos discretos, cada pico o “escalón” de la escalera está compuesto por una familia de derivados de la proteína que tienen el mismo número de modificaciones químicas y aproximadamente la misma carga neta. Por consiguiente, el principio básico de este método es producir una serie de derivados químicos de una proteína bloqueando uno o más

de los grupos cargados. Como se mencionó se desarrollaron varios procedimientos químicos diferentes, siendo el más simple la acetilación de las Lys usando anhídrido acético. Es pertinente indicar que es conveniente modificar la carga de las proteínas acetilando los grupos  $\epsilon\text{-NH}_3^+$  de la Lys, debido a que las Lys son generalmente abundantes en las proteínas (su frecuencia de ocurrencia es 5,9 %, basada en 1021 proteínas de secuencias conocidas). Además, la Lys es reactiva y está predominantemente distribuida en la superficie de las proteínas solubles en agua (Creighton, 1993). De esta manera, las Lys acetiladas no están protonadas y la proteína modificada tendrá un grupo cargado positivamente menos que la proteína nativa. Debido a que las proteínas tienen un número importante de grupos Lys estas reacciones generan una serie de derivados de la proteína con diferentes cargas, es decir, una “escalera de carga”. La concentración y movilidad electroforética de cada elemento de esta escalera se analiza luego mediante CZE. Como la movilidad electroforética es directamente proporcional a la carga de la proteína, los datos de las movilidades de los diferentes elementos de la escalera de carga se usan para calcular la carga neta  $eZ$  de la proteína nativa y también un valor constante de  $a_H$  para los primeros picos de la escalera de carga de la proteína. Es importante señalar que este método presenta desventajas prácticas tales como la necesidad de modificar químicamente la proteína y la estimación de  $a_H$  a partir de la pendiente de la recta definida por la movilidad electroforética de las primeras fracciones convertidas en función de  $n\Delta Z$ . En esta expresión,  $n$  es el número de grupos cargados convertidos a neutros, independiente de las posiciones que ocupan en la proteína y  $\Delta Z$  es el cambio de carga a partir de dos números consecutivos de conversiones en la proteína debido a la modificación química en los grupos cargados. El conocimiento de  $\Delta Z$  es esencial para el uso de las escaleras de carga en la descripción cuantitativa de las propiedades electrostáticas y las interacciones de proteínas. En esta Tesis, este modelo se designa Modelo de Regresión Lineal de la escalera de carga (LRCLM) basado en el uso del análisis de regresión lineal de las movilidades de la escalera de carga de la proteína. En este modelo usualmente se introduce la aproximación  $|\Delta Z| \cong 1$  (Sharma y Carbeck, 2004). En este sentido, Sharma *et al.* (2003) y Allison *et al.* (2004) sugieren una corrección interesante basada en un trabajo previo (Lee *et al.*, 2002a) para evitar esta imposición, teniendo en cuenta que en la mayoría de los casos estudiados, este cambio no es necesariamente igual a uno.

Uno de los primeros trabajos que presentó un procedimiento para estimar la carga neta de una proteína en solución a valores arbitrarios de pH, usando la CZE y la escalera de cargas corresponde a Gao *et al.* (1994). Estos autores compararon la movilidad electroforética de la anhidrasa carbónica bovina con una serie de derivados de la proteína obtenidos por acetilación de la misma, los cuales diferían en una unidad de carga en la carga efectiva. Luego, suponiendo que la diferencia en los coeficientes de fricción  $f$  es pequeña se eliminaba la ambigüedad que hace imposible interpretar la movilidad electroforética de proteínas directamente en términos de sus cargas. En efecto, este tipo de análisis permitía la estimación de la carga neta de una proteína sin conocer su composición, estructura, o secuencia de aminoácidos. No obstante, considerar que  $f$  no varía, o sea adoptar un radio hidrodinámico constante para todas las fracciones de la escalera puede generar imprecisiones en ciertos casos, como quedará evidenciado y probado en esta Tesis. Este es uno de los objetivos de esta sección, además de estimar la carga neta de una proteína.

La base del análisis que utilizaron estos autores es una expresión aproximada para la movilidad electroforética de una proteína  $\mu = C_p \frac{eZ}{M^\alpha}$  (Gao *et al.*, 1994), donde la movilidad es proporcional (a través de la constante de proporcionalidad  $C_p$ ) a su carga neta  $eZ$ , y está inversamente relacionada con su coeficiente de fricción, el cual a su vez depende del radio hidrodinámico  $a_H$  y éste de la masa molar  $M$  de la proteína a través de la función  $M^\alpha$  (típicamente  $\alpha = 2/3$  para proteínas globulares). No obstante, la relación entre la estructura y el coeficiente de fricción y el valor de la constante de proporcionalidad dependen de la forma, la carga y la distribución de cargas que no se conocen *a priori*. Esta dependencia hace imposible relacionar analíticamente la movilidad electroforética de una proteína con su carga, aún cuando sea conocida su secuencia de aminoácidos y otros detalles de su estructura. Es decir, la relación carga/fricción de la proteína en la CZE se debe separar en el sentido que se necesita conocer al menos uno de los componentes del cociente. Si la carga de la proteína se modifica de  $Z_0$  a  $Z_n$  (correspondiendo  $Z_0$  a la carga de la proteína nativa y  $Z_n$  a la carga de la proteína acetilada en  $n$  escalones) de tal forma que se supone que el coeficiente de fricción no cambia significativamente, consecuentemente el cociente de movilidades de la proteína nativa o no modificada  $\mu_0$  y

la proteína modificada  $\mu_n$  es  $\mu_0 / \mu_n \cong Z_0 / Z_n$ . En esta ecuación también se supone que las dos constantes desconocidas  $C_p$  y  $\alpha$  no varían significativamente. Esta ecuación aproximada es el punto de partida de los análisis que estos autores y otros (ver también, Colton *et al.*, 1997; Gao y Whitesides, 1997; Córdova *et al.*, 1997; Menon y Zydney, 1998; Carbeck *et al.*, 1999; Caravella *et al.*, 1999) utilizaron para determinar la carga neta de diferentes proteínas haciendo uso de las escaleras de carga y la CZE. No obstante, una limitación significativa de estos resultados es que todos suponen  $\Delta Z = -1$  para el caso de las Lys acetiladas, y se impone un valor de radio teórico que se obtiene de una experiencia adicional (sedimentación, difusión, etc.) o se calcula a partir del dato del peso molecular, suponiendo una partícula esférica.

En el año 2000, Menom y Zydney señalaron que se debe tener en cuenta el fenómeno de regulación de carga que produce alteraciones en la extensión de la ionización de los aminoácidos, asociado al hecho de las diferencias que existen entre el pH cercano a la molécula y el que corresponde a la solución. Este modelo, originalmente desarrollado por Linderstrøm-Lang en 1924, describe el rol de la cooperatividad en la unión del protón en las curvas de titulación, para predecir la contribución al valor de  $\Delta Z$ . El modelo de Linderstrøm-Lang (LLM), al cual Menon y Zydney se refirieron como “modelo con regulación de carga”, después de cálculos similares realizados en partículas coloidales sintéticas (ver también, Hunter, 1981), se basa en los potenciales electrostáticos que se calculan a partir de la teoría de Debye-Hückel. Esta teoría trata a las proteínas como esferas cargadas con una distribución uniforme de cargas sobre la superficie. Se supone que la presencia de potenciales electrostáticos finitos en la superficie de la esfera altera la unión del protón afectando la concentración local de protones. Menon y Zydney (2000) usaron este modelo para calcular la carga neta de los escalones de la escalera de carga de la anhidrasa carbónica bovina. Estos autores compararon los resultados de los cálculos con los valores de carga neta estimados a partir de medidas de movilidad electroforética y concluyeron que la cooperatividad electrostática tiene un efecto significativo sobre  $\Delta Z$ , cambiando el valor ideal de -1 a -0.86 para pH = 8.4.

En consecuencia, un modelo clásico para estimar la carga neta de una proteína es el LLM (Linderstrøm-Lang, 1924), presentado y discutido además en Sharma *et al.* (2003). Cuando las hipótesis que subyacen, enunciadas en el párrafo anterior, se aceptan, el LLM tiene la limitación que  $a_H$  no se conoce. Una alternativa es usar un valor de radio

hidrodinámico obtenido a partir de la predicción del LRCLM, suponiendo que es constante para los primeros escalones de la escalera de carga de la proteína (Sharma *et al.*, 2003).

Considerando los aspectos prácticos de los modelos que se mencionaron antes, un procedimiento conveniente es resolver el problema matemático completo asociado con las ecuaciones básicas propuestas en estos trabajos, teniendo como dato experimental solamente el valor de la movilidad electroforética de la proteína nativa, sin necesidad de realizar, por ejemplo, la CZE de la escalera de carga de la proteína. Este modelo se designa en esta Tesis como Modelo de Linderstrøm-Lang de la Electroforesis Capilar (LLCEM) basado en el uso del LLM y un único dato de la movilidad electroforética experimental de la CZE (Piaggio *et al.*, 2005a). En general, se observa que cambios de  $eZ$  afectan a  $a_H$ , incluso en la precisión requerida y discutida en trabajos previos. Este aspecto se analiza e ilustra más adelante en la Sección 4.1.3, siendo un resultado relevante y original de esta Tesis.

Otra propuesta para resolver el problema central que se estudia aquí, es estimar  $a_H$  a partir de la determinación del coeficiente de sedimentación o del coeficiente de difusión (Winzor *et al.*, 2004). Este método necesita la evaluación de la función  $a_H(pH, I, T, \eta, \varepsilon)$ , teniendo en cuenta los valores que pueden tomar las variables independientes consideradas. En el marco propuesto del modelado del cociente  $eZ/f$  es claro que los métodos clásicos (ver una revisión completa de estos métodos en Winzor, 2004) estiman la carga neta de una proteína independientemente de un modelo, sin usar la secuencia de aminoácidos (AAS) en general.

La mayoría de los modelos simples que evalúan  $eZ$  y eventualmente  $a_H$  vía la CZE, como se mencionó, tienen como punto de referencia el LLM, el cual puede dar solo una aproximación de  $eZ$ . Por el contrario, el LLCEM, propuesto en esta Tesis provee  $eZ$  y  $a_H$  a partir de un único dato experimental de  $\mu$ , en la medida que el problema matemático se resuelva completamente; ésto significa sin una estimación de un valor constante de  $a_H$ . En efecto, el LLM lleva a cabo una corrección de la carga sin regulación  $eZ^T$  de la proteína, que se calcula directamente a partir del conocimiento de los valores de los  $pK_i^T$  ( $i=1,2,\dots,N$ ) y el número  $n_i$  de cada tipo de los  $N_c$  grupos cargados en la proteína al pH cercano a la partícula. Esta es otra conclusión interesante de esta Tesis, en el sentido que el LLM no ha sido completamente resuelto (esto significa en términos del LLCEM) en

la mayoría de las circunstancias en que fue aplicado. Este aspecto se analiza con más detalles más abajo.

Por consiguiente, esta sección está organizada como sigue. En la Sección 4.1.2 se presenta y resuelve numéricamente el LLCCEM, el cual se reduce asintóticamente al LLM cuando el  $a_H$  se supone constante y se estima a partir de otra fuente. Asimismo en esta sección, el LLCCEM se reconsidera para incluir las interacciones electrostáticas entre pares de grupos cargados a través de perturbaciones de carga, definidas como la diferencia entre las cargas sin regulación y regulada de cada grupo cargado. Este modelo se designa como Modelo Perturbado de Linderstrøm-Lang de la Electroforesis Capilar (PLLCEM) debido a las perturbaciones de carga que se introducen (Piaggio *et al.*, 2005a). Para la formulación del PLLCEM se consideran varias suposiciones de trabajos previos (Lee *et al.*, 2002a; Sharma *et al.*, 2003; Allison *et al.*, 2004). Se pone énfasis en la estrategia matemática para resolver los problemas resultantes bien establecidos, asociados con ambos modelos (LLCEM y PLLCEM), identificando un número igual de ecuaciones e incógnitas. También se describen los pasos básicos del algoritmo numérico incluyendo el criterio de convergencia establecido dentro de cada proceso iterativo. En la Sección 4.1.3 se presentan los resultados numéricos para proteínas típicas estudiadas en la literatura, facilitando así las comparaciones de los cálculos propios con las predicciones de otros modelos. Finalmente, en la Sección 4.1.4 se discuten varias limitaciones asociadas con los modelos para la estimación de la carga neta de proteínas y el radio hidrodinámico a partir de la estructura de la proteína, la ASS y la movilidad electroforética experimental. Estas conclusiones establecen, además, claros requerimientos para futuras investigaciones en este tema.

#### **4.1.2 Modelado de la carga neta y el radio hidrodinámico de proteínas vía CZE**

Los modelos que se estudian aquí consideran proteínas globulares que tienen al menos estructura terciaria, la cual, en principio, se supone equivalente a una esfera de radio hidrodinámico  $a_H$  con  $f = 6\pi\eta a_H$ . Aunque está hipótesis se puede eliminar para incluir otras formas de partícula (Winzor *et al.*, 2004; Allison *et al.*, 2004) se pospone esta discusión para una presentación clara y simple de los modelos. En primer lugar se describe el PLLCEM debido a que éste se reduce al LLCCEM cuando no se consideran las interacciones electrostáticas entre pares de grupos cargados.

## ***PLLCEM***

La proteína tiene una carga neta  $eZ$  para un protocolo particular de la CZE, que se expresa,

$$eZ = \sum_{i=1}^N eZ_i \quad (4.1.1)$$

donde  $eZ_i$  es la carga del grupo cargado  $i$  en la proteína. El valor de  $Z_i$  se calcula a través de,

$$Z_i = \pm \frac{1}{1 + 10^{\mp(pK_i^r - pH_i)}} \quad (4.1.2)$$

donde los signos (+) y (-) se definen de acuerdo a las propiedades ácidas o básicas de los grupos cargados. Asimismo,  $pH_i$  es el pH estimado cerca del grupo cargado  $i$ , generando esta descripción una posible aproximación matemática para describir el fenómeno de cooperatividad en la unión del protón (ver más adelante la definición de  $\Delta pK_i$ ). Las Ecs. (4.1.1) y (4.1.2) presentan un problema bastante difícil de resolver porque se requieren cuantificaciones de detalles fisicoquímicos en el entorno de los grupos cargados dentro del dominio de la proteína. En este sentido, es apropiado visualizar que los modelos detallados describen el fenómeno de cooperatividad en la unión del protón a través de cambios de energía libre asociado con: (a) la solvatación de los grupos cargados, (b) la interacción electrostática entre los grupos cargados de la proteína y los iones solvatados (usualmente se usa la ecuación de Poisson-Boltzmann para un radio atómico de 1.4 Å, donde se estima una permitividad eléctrica diferente a la del BGE), (c) la interacción electrostática entre grupos cargados tanto con otros grupos cargados como con dipolos presentes en la proteína. Por otro lado, en los modelos simples, se introduce el radio hidrodinámico  $a_H$  para evaluar el campo promedio del cambio de energía libre asociado con (b), mientras que aquellos que pertenecen a (a) y (c) son tratados como perturbaciones de los grupos cargados definido en la Ec. (4.1.5). Estos cambios de energía libre están asociados con los potenciales eléctricos, la suma de los cuales determina la distribución de Boltzmann del protón cerca del grupo cargado genérico  $i$ . De esta manera, el  $pH_i$  se puede expresar mediante tres términos cuando se desprecian los efectos de los dipolos, como sigue (ver también el Apéndice 4-A):

$$\text{pH}_i = \text{pH}^* + \frac{e^2}{\ln(10)k_B T} \left[ \frac{\Delta Z_i}{4\pi r_i^\circ \varepsilon} \left( \frac{\varepsilon}{\varepsilon'} - 1 \right) + \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^N \frac{\Delta Z_j}{4\pi \varepsilon'} \frac{\exp(-\kappa' r_{ij})}{r_{ij}} \right] \quad (4.1.3)$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $\varepsilon'$  es la permitividad dentro del dominio de la proteína (este aspecto se explica más adelante). Debido a que la inversa de la longitud de Debye (Russel *et al.*, 1989) es  $\kappa = \sqrt{2e^2 I N_A 10^3 / \varepsilon k_B T}$ , donde  $N_A$  es el número de Avogadro, se obtiene  $\kappa' = \kappa \sqrt{\varepsilon' / \varepsilon}$ . En la Ec. (4.1.3),  $\text{pH}^*$  es el pH cerca de la superficie de la proteína (supuesta como una partícula) y se evalúa usando la aproximación de campo promedio introducida junto con la inclusión del radio hidrodinámico de la proteína. Por consiguiente, se supone que la partícula proteica tiene un potencial de superficie descrito por la ecuación de Poisson-Boltzmann para un solvente con propiedades características de pH,  $I$ ,  $T$ ,  $\eta$ ,  $\varepsilon$ . Con el fin de generar un problema simple se usa la solución de Henry para la movilidad electroforética de la partícula, aceptando la aproximación de Debye-Hückel. Sin embargo, esta aproximación no limita necesariamente el desarrollo del modelo, como se discute más adelante. Consecuentemente, se expresa (ver, también Apéndice 4-A),

$$\text{pH}^* = \text{pH} + \frac{e^2 Z}{\ln(10)k_B T 4\pi \varepsilon a_H (1 + \kappa a_H)} \quad (4.1.4)$$

La Ec. (4.1.4) refleja las interacciones electrostáticas e hidrodinámicas entre la proteína y el BGE, e inevitablemente la introducción de  $a_H$  genera una suposición que no se encuentra en los modelos detallados. Por lo tanto, aquí se procede con la bien conocida partícula de Henry y sus hipótesis asociadas (ver, por ejemplo, Russel *et al.*, 1989).

El segundo término de lado derecho de la Ec. (4.1.3) está asociado con la perturbación de la energía libre cuando los grupos cargados de los aminoácidos en solución (que definen la carga sin regulación) se transfieren a una cavidad en la proteína (Demchuk y Wade, 1996); aquí el radio atómico  $r_i^\circ$  se evalúa mediante la ecuación de Born (Atkins, 1995). El tercer término involucra el efecto sobre el estado de protonación del grupo cargado  $i$  causado por las interacciones electrostáticas con cargas perturbadas  $\Delta Z_j$  de otros grupos cargados  $j=1,2,\dots,(N_c - 1)$  en la proteína. Para evaluar este término, se obtienen datos de las distancias  $r_{ij}$  entre pares de grupos cargados del PDB. Así, de esta

fuerza se obtienen las coordenadas (posición genérica del vector  $\mathbf{r}_i$ ) de cada átomo cargado referido a un sistema coordenado. Las distancias entre pares de átomos cargados se calculan fácilmente como  $r_{ij} = \sqrt{(\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j) \cdot (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)}$ . Estas distancias corresponden a la proteína nativa y se obtienen a partir de la cristalografía por rayos X. Cuando existen iones unidos a la proteína, también se necesita conocer cuáles son los grupos cargados coordinados para estimar las distancias adicionales que involucran estos iones (ver, en la Sección 4.1.3, los ejemplos correspondientes al  $\text{Zn}^{+2}$  en la anhidrasa carbónica humana y anhidrasa carbónica bovina). Para los objetivos del presente modelo se consideran solamente cargas puntuales. Por consiguiente, la expresión,

$$\Delta Z_j = Z_j - Z_j^f \quad (4.1.5)$$

se necesita en la Ec. (4.1.3), donde  $Z_j^f$  es la carga no regulada del sitio  $j$ . De esta manera la interacción electrostática entre pares de grupos cargados se presenta en el modelo como una perturbación de la solución de campo promedio (*mean field solution*) asociada con una partícula de radio  $a_H$ .

La otra ecuación relevante en el modelo es la expresión de la movilidad electroforética  $\mu$  de la proteína en el BGE, que se obtiene experimentalmente y se expresa (para potenciales de partículas altos se requiere la ecuación de Poisson-Boltzmann con condiciones límites) como sigue:

$$\mu = \frac{eZ}{6\pi\eta a_H (1 + \kappa a_H)} f(\kappa a_H) \quad (4.1.6)$$

donde  $f(\kappa a_H)$  es la función de Henry expresada aquí a través de la ecuación de ajuste explícita (Piaggio y Deiber, 2003):

$$f(\kappa a_H) = 0,998 + 0,509/[1 + (8,416/\kappa a_H)^{0,985}] \quad (4.1.7)$$

Las Ecs. (4.1.1) a (4.1.6) componen el PLLCEM de esta Tesis (las Ecs. (4.1.2), (4.1.3) y (4.1.5) son genéricas para cualquier  $i$  y proveen  $3N$  ecuaciones), donde el grupo  $\{a_H, Z, Z_i, \text{pH}^*, \text{pH}_i, \Delta Z_i\}$  de  $3(N+1)$  incógnitas se obtiene mediante un algoritmo numérico (que se describe más adelante) cuando se conoce el valor experimental de  $\mu$  para un protocolo de la CZE bien definido. Es precisamente en este aspecto donde la elección del  $\text{pH}$ ,  $I$ ,  $T$ ,  $\eta$  y  $\varepsilon$  es relevante en la caracterización de proteínas mediante la CZE.

Con relación al PLLCEM se observa que no es necesario estimar  $a_H$  a partir de otra técnica adicional. En efecto, el radio hidrodinámico de la proteína es solución directa del modelo. Esta conclusión introduce una diferencia sustancial con los trabajos previos donde el modelado se lleva a cabo con la estimación de  $a_H$  constante. Este parámetro, por supuesto, es inevitable cuando se consideran datos de la CZE.

Después que el modelo se resuelve para una proteína en particular en un solvente específico, es de interés estimar los valores de los  $\Delta pK_i$ , teniendo como estado de referencia los valores de  $pK_i^f$  (a veces seleccionados iguales a aquellos de los aminoácidos libres en solución, designados  $pK_i^\circ$ ), los cuales definen la carga no regulada  $eZ^f$  (eventualmente  $eZ^\circ$ ) de una proteína. Por consiguiente,

$$\Delta pK_i = pK_i^f - pK_i = \frac{e\zeta_i}{\ln(10)k_B T} \quad (4.1.8)$$

donde  $\zeta_i$  es el potencial eléctrico del grupo cargado  $i$ , expresado según,

$$\zeta_i = \frac{eZ}{4\pi\epsilon a_H(1 + \kappa a_H)} + \frac{e\Delta Z_i}{4\pi\epsilon r_i^\circ} \left( \frac{\epsilon}{\epsilon'} - 1 \right) + \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^N \frac{e\Delta Z_j}{4\pi\epsilon'} \frac{\exp(-\kappa' r_{ij})}{r_{ij}} \quad (4.1.9)$$

consistentemente con las Ecs. (4.1.3) y (4.1.4) (ver también el Apéndice 4-A de esta Sección). Asimismo, el potencial de la partícula es  $\zeta = eZ / 4\pi\epsilon a_H(1 + \kappa a_H)$ .

A partir de las Ecs. (4.1.3) y (4.1.8) se ve que  $pK_i^f - pH_i \equiv pK_i - pH$ . Además,  $\Delta pK_i = pK_i^f - pK_i = pH_i - pH = \Delta pH_i$ . Esta última expresión indica que las variaciones en los  $\Delta pK_i$  de los grupos cargados de la proteína son una consecuencia directa de las variaciones en los  $\Delta pH_i$ , la cual es la diferencia entre el pH cercano al grupo cargado en la proteína y el pH del solvente, es decir, el BGE.

Un aspecto a considerar antes de describir el modelo designado LLCCEM es la inclusión de la forma de la partícula en estos modelos. Este efecto se puede tener en cuenta simplemente introduciendo información estructural adicional de la proteína (Winzor, 2004; Allison *et al.*, 2004). En consecuencia, la forma de la partícula se debe definir *a priori* especificando, por ejemplo el cociente entre el eje mayor y el eje menor para esferoides del tipo prolato u oblato (Yoon y Kim, 1989). Luego una dimensión se expresa en función de la otra y la forma básica de la solución de Henry se retiene (ver más detalles con relación a este aspecto en el Capítulo 5, donde se analiza la CZE de péptidos). También, se puede

llevar a cabo una simulación numérica, usando el método de elementos finitos de frontera (Allison *et al.*, 2004), el cual es un procedimiento significativamente más complejo poniendo énfasis principalmente en la fricción hidrodinámica ejercida por el solvente sobre partículas de forma irregular. Este aspecto hidrodinámico puede ser una estrategia importante para explorar las formas más detalladas de las proteínas de acuerdo con su estado de hidratación.

### **LLCEM**

El LLCEM se obtiene asintóticamente despreciando los términos que contienen  $\Delta Z_j = Z_j - Z_j^r$  asociado con las perturbaciones de los grupos cargados en el PLLCEM. Por consiguiente, la Ec. (4.1.2) se reduce a,

$$Z_i = \pm \frac{n_i}{1 + 10^{\pm(pK_i^r - pH^*)}} \quad (4.1.10)$$

Las ecuaciones (4.1.1), (4.1.4), (4.1.6) y (4.1.10) componen el LLCEM de este trabajo (la Ec. (4.1.10) es genérica para cualquier  $i$  y provee  $N$  ecuaciones) donde el grupo  $\{a_H, Z, Z_i, pH^*\}$  de  $(N + 3)$  incógnitas se obtiene mediante un algoritmo numérico apropiado (ver su descripción más adelante), cuando se dispone del dato experimental de  $\mu$  para un protocolo de la CZE bien definido.

A partir de la Ec. (4.1.10) es claro que el LLCEM no puede distinguir posiciones de los grupos cargados en la proteína. En efecto, a partir de las Ecs. (4.1.3) y (4.1.8), se encuentra que  $pK_i^r - pH^* = pK_i - pH$  y  $\Delta pK_i = pK_i^r - pK_i = pH^* - pH = \Delta pH$ , indicando que el LLCEM predice el mismo  $\Delta pK_i$  para cualquier grupo cargado  $i$ , independientemente de la posición de este grupo en la secuencia de aminoácidos de la proteína, debido a que en este modelo el  $\Delta pH$  es el mismo para todos los grupos cargados. A pesar de esta limitación, es importante observar que los efectos de las interacciones electrostáticas son pequeños para proteínas con una carga neta baja. Aún más, se puede usar en la separación mediante CZE un solvente con un pH tal que minimice los efectos de los  $\Delta pK_i$  sobre los valores de  $eZ$  y  $a_H$ .

Un aspecto relevante con relación al LLCEM es que los valores de  $eZ$  y  $a_H$  para una proteína particular en un BGE específico, se obtienen midiendo solamente la movilidad electroforética de la proteína  $\mu$ . Los resultados así generados son una buena

aproximación de los valores esperados, como se ilustra en la Sección 4.1.3.

### ***Procedimiento numérico***

Se describe solamente el algoritmo del PLLCEM debido a que el correspondiente al LLCCEM es similar y más simple. Las Ecs. (4.1.1) a (4.1.6) se resuelven mediante un procedimiento numérico escrito en FORTRAN que está compuesto de los siguientes pasos principales:

1- Se ingresan las constantes físicas, los datos de protocolo que incluyen las propiedades del solvente ( $\text{pH}$ ,  $I$ ,  $T$ ,  $\eta$  y  $\varepsilon$ ), los valores de referencia de los  $\text{p}K_i^T$  (ver más adelante la discusión concerniente a este aspecto) y una estimación de la permitividad eléctrica en el dominio del solvente-proteína  $\varepsilon'$  (un valor comprendido entre  $5\varepsilon_0$  y  $80\varepsilon_0$ , donde  $\varepsilon_0$  es la permitividad eléctrica del vacío; ver también, más abajo, la discusión sobre este aspecto con relación a la lisozima).

2- Se ingresa la secuencia de aminoácidos de la proteína que se obtiene del PDB donde la información alfanumérica se convierte en dos dígitos: uno indicando el tipo de aminoácido y el otro se refiere a la posición del mismo en la secuencia para ser usado en la lógica del programa.

3- Se ingresan las propiedades estructurales de la proteína obtenidas a partir del PDB que incluyen el conjunto  $\{r_{ij}\}$  de las distancias entre pares de los  $N$  sitios cargados de la estructura cristalográfica obtenida por rayos-X, tomando las posiciones de los correspondientes átomos cargados.

4- Se ingresa el dato experimental de la movilidad electroforética de la proteína para el BGE específico.

5- Con estos datos de ingreso el algoritmo busca la cantidad de cada tipo de grupo cargado,

y se obtiene de esta manera una estimación de la carga neta no regulada  $eZ^T = \sum_{i=1}^N eZ_i^T$  de

la proteína al  $\text{pH}$  del BGE con el conjunto de  $\{\text{p}K_i^T\}$ . Por supuesto, este resultado es bastante diferente del que se encuentra experimentalmente.

6- Se introduce una estimación del radio hidrodinámico designado  $a_H^\circ$  para inicializar el programa. Este valor se obtiene de la distancia promedio al centro de la proteína de los aminoácidos externos ubicados en una franja de alrededor de  $7 \text{ \AA}$  (aproximadamente la longitud de dos enlaces peptídicos).

7- La iteración comienza con las inicializaciones  $\text{pH}_i = \text{pH}$  y  $Z_i = Z_i^f$  y las evaluaciones de las Ecs. (4.1.1) a (4.1.5). Luego, con el valor de  $eZ$  a cada iteración, se resuelve la Ec. (4.1.6) para encontrar la raíz  $a_H$  mediante el método de Newton-Raphson. Este procedimiento requiere satisfacer el valor experimental de  $\mu$  con un error relativo de  $10^{-6}$ . Luego de resolver  $a_H$  a cada iteración  $k$ , se impone un criterio de convergencia adicional, de tal manera que se debe satisfacer la siguiente ecuación para detener el proceso de iteración,

$$\frac{|a_H^k - a_H^{k-1}|}{a_H^k} \leq 10^{-6} \quad (4.1.11)$$

8- Una vez que se obtiene el valor de  $a_H$ , el cual es solución rigurosa del problema matemático establecido por el modelo, se procede con los otros cálculos usando las Ecs. (4.1.8) y (4.1.9) y los datos de ingreso básicos. En este trabajo, los resultados numéricos se informan con un error de 1/100 y se usa la unidad Å para el radio hidrodinámico como la más apropiada para la discusión de los resultados.

Antes de terminar esta sección, es relevante indicar que la evaluación de  $a_H$ , en cada iteración en el algoritmo numérico descrito, requiere un error relativo muy bajo debido a la forma de  $f(\kappa a_H)$  cuando  $\kappa a_H$  toma valores intermedios. Esta situación es común para las proteínas que se usan en este estudio.

Finalmente, en este contexto de análisis, los límites de validez cuando se aplica la aproximación de Debye-Hückel y la solución de Henry en los modelos mencionados, se exploran con la ayuda de las soluciones numéricas del problema de Poisson-Boltzmann presentado en O'Brien y White (1978). Por consiguiente, se evalúa la ordenada

$$Y = \frac{3}{2} \frac{e\mu\eta}{\varepsilon k_B T}, \text{ la abscisa } X = \frac{e\zeta}{k_B T} \text{ y el parámetro } P = \kappa a_H \text{ con } \zeta \text{ y } a_H \text{ obtenidos a}$$

partir del PLLCEM y el LLCCEM, el dato experimental de  $\mu$  y aquellos valores correspondientes al protocolo de la CZE, con el fin de conocer si los puntos calculados están próximos a la curva correspondiente en los gráficos generalizados de movilidad presentados además por Russel *et al.*, (1989). Es simple concluir, en general, que para  $Y \approx X$  y tanto  $Y$  como  $X$  menores que 2, los resultados del modelo son compatibles con las hipótesis consideradas para  $P < 3$ . No obstante, es interesante señalar que el desarrollo de estos modelos no tiene limitaciones en este sentido. En efecto, a pesar de que es fácil

visualizar que cuando se invocan las hipótesis clásicas, el problema matemático es cerrado, fuera de este rango de validez, se debe incluir la ecuación de Poisson-Boltzmann con condiciones de contorno apropiadas. De esta manera los modelos resultantes requerirían más tiempo desde el punto de vista computacional pero sería todavía factible resolverlos.

#### 4.1.3 Resultados y discusión

Para ilustrar las predicciones numéricas del LLCCEM y el PLLCEM, se usan los datos experimentales de las movilidades electroforética disponibles en la literatura para protocolos bien definidos. Estos datos involucran cuatro proteínas: lisozima, anhidrasa carbónica humana, anhidrasa carbónica bovina y nucleasa estafilocócica.

##### *Lisozima (Hen Egg White Lysozyme, 2LYZ)*

La 2LYZ está constituida por 129 aminoácidos y la secuencia escrita con el código de una letra (ver Apéndice 3-A en el Capítulo 3) que se obtiene a partir del PDB es la siguiente:

KVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGSTDYGILQINSRWWC  
NDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNCAKKIVSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGCR

Para el estudio de la 2LYZ se usaron los datos experimentales reportados en Sharma *et al.* (2003), donde el protocolo de la CZE usado fue: *buffer* Tris 25 mM-Gly 192 mM,  $I = 8$  mM y  $\text{pH} = 8.4$  y  $T = 25^\circ\text{C}$ . El capilar que se utilizó fue de sílice de  $L_t = 30$  cm,  $L_d = 20$  cm y  $d_i = 50 \mu\text{m}$  y se aplicó un voltaje de 10 kV durante la separación. Se extrajeron los datos correspondientes a los tiempos de migración de la proteína nativa y las seis acetilaciones a partir del electroferograma experimental y se calcularon las movilidades electroforéticas, que se presentan en la Tabla 4.1.1. El número y tipo de aminoácidos cargados presentes en la molécula de 2LYZ es:  $n_{\text{Arg}} = 11$ ;  $n_{\text{Asp}} = 7$ ;  $n_{\text{Glu}} = 2$ ;  $n_{\text{His}} = 1$ ;  $n_{\text{Lys}} = 6$ ;  $n_{\text{Tyr}} = 11$ ;  $n_{\text{Cys}} = 8$ ;  $n_{\text{COOHt}} = 1$ ;  $n_{\text{NH}_2\text{t}} = 1$  y el grupo de  $\text{pK}_i^r$  que se usan es:  $\text{pK}_{\text{Arg}}^r = 12.5$ ;  $\text{pK}_{\text{Asp}}^r = 4.0$ ;  $\text{pK}_{\text{Glu}}^r = 4.4$ ;  $\text{pK}_{\text{His}}^r = 6.3$ ;  $\text{pK}_{\text{Lys}}^r = 10.5$ ;  $\text{pK}_{\text{Tyr}}^r = 9.6$ ;  $\text{pK}_{\text{COOHt}}^r = 3.8$ ;  $\text{pK}_{\text{NH}_2\text{t}}^r = 7.5$  (Sharma *et al.*, 2003). Es interesante destacar que si bien en la secuencia de la molécula de 2LYZ están presentes 8 Cys, éstas no se contabilizan para el cálculo de carga neta debido a que se encuentran formando cuatro puentes disulfuro de la siguiente manera: Cys 6 con Cys 127; Cys 30 con Cys 125; Cys 64 con Cys 80 y Cys 76 con Cys 94. Este dato correspondiente a la

conformación molecular es importante tenerlo en cuenta al momento de evaluar los residuos cargados que intervendrán en el cálculo de la carga neta.

Primero, con el LLCCEM, a partir de los datos experimentales de las movilidades electroforéticas para la proteína nativa y las sucesivas acetilaciones, se estiman el número de carga neta  $Z$ , el radio hidrodinámico  $a_H$ , el potencial de partícula  $\zeta$  y el pH cercano a la molécula  $\text{pH}^*$ , que se presentan en la Tabla 4.1.1. El número de Lys que se pueden acetilar se designan como Lys-n, variando n en este caso de 1 a 6. Esto formalmente indica que la solución del LLCCEM provee como resultados numéricos tanto la carga neta de la proteína como el radio hidrodinámico. Asimismo los valores de  $\text{pH}^*$  calculados son mayores al pH del BGE indicando que la  $[\text{H}^+]$  es menor cerca de la proteína como se espera para una proteína con carga neta positiva. También se incluyen en la Tabla 4.1.1 los valores de la variación de carga neta  $\Delta Z$  entre la molécula de 2LYZ acetilada en un paso y el paso anterior y los  $\Delta \text{pK}$ . Este último aspecto se analiza con más detalles más abajo. Con relación a los valores de  $\Delta Z$  calculados es importante señalar que no son iguales a -1 como suponen algunos autores en sus trabajos. En este caso bajo análisis se obtiene un valor promedio  $\Delta Z = -0.91$ , comprobando también así la existencia del fenómeno de regulación de cargas (Linderstrøm-Lang, 1924; Menon y Zydney, 2000).

**Tabla 4.1.1.** Valores estimados del radio hidrodinámico  $a_H$ , el número de carga neta  $Z$ , el potencial de partícula  $\zeta$  y el  $\text{pH}^*$  de la 2LYZ con el LLCCEM.

Proteína	$\mu 10^7$ ( $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$Z$	$\Delta Z$	$a_H$ ( $\text{\AA}$ )	$\zeta$ (V)	$\text{pH}^*$	$\Delta \text{pK} = \text{pH}^* - \text{pH}$
Nativa	0.167	6.34	-	22.22	0.032	8.93	0.53
Lys-1	0.144	5.47	-0.87	22.21	0.027	8.86	0.46
Lys-2	0.123	4.57	-0.90	21.85	0.023	8.79	0.39
Lys-3	0.102	3.65	-0.92	21.28	0.019	8.73	0.33
Lys-4	0.081	2.73	-0.92	20.34	0.015	8.66	0.26
Lys-5	0.056	1.81	-0.92	19.69	0.011	8.58	0.16
Lys-6	0.032	0.87	-0.94	17.35	0.006	8.50	0.10

En adición, se usa el PLLCEM para estudiar la 2LYZ considerando el parámetro  $\varepsilon'$  y las interacciones electrostáticas entre los pares de grupos cargados. Las distancias  $\{r_{ij}\}$

se obtienen a partir del PDB. Debido a que el valor de  $\epsilon'$  depende de la hidratación y compactación de la proteína con relación a la formulación del BGE, su predicción directa es bastante difícil. Al presente, la elección es usar un valor estimado como se indica más abajo comprendido entre  $5\epsilon_o$  y  $80\epsilon_o$ , de acuerdo a trabajos anteriores (Demchuck y Wade, 1996; Fitch *et al.*, 2002). En esta Tesis, se considera un valor de  $\epsilon' = 20\epsilon_o$  en la mayoría de los cálculos como una aproximación, basada en la capacidad del modelo (PLLCEM) para predecir resultados comparables a aquellos reportados con el PBMCM (ver, más adelante). Para la 2LYZ se encuentra  $a_H = 22.26 \text{ \AA}$ ,  $Z = 6.87$  y  $\zeta = 0.032 \text{ V}$ .

Al comparar los resultados que se obtienen con ambos modelos, es importante señalar, la diferencia de la carga neta calculada para la 2LYZ nativa con el LLCCEM y el PLLCEM, lo cual pone en evidencia la interacción entre los grupos cargados y la importancia de tener en cuenta las distancias  $\{r_{ij}\}$  entre dichos grupos al momento de efectuar el cálculo de carga neta. En consecuencia, el efecto de las interacciones electrostáticas entre los grupos cargados afecta principalmente el cálculo de la carga neta de la proteína, mientras que el potencial de partícula no cambia dentro del margen de error considerado aquí. Los valores de  $\Delta pK_i$  que se obtienen con el PLLCEM no exceden de 0.63. Este valor corresponde a Asp en la posición 66. Es claro que la diferencia de carga de la proteína nativa entre las dos situaciones analizadas aquí es alrededor de 7.7 %. Asimismo, la evaluación de coordenadas adimensionales (ver, O'Brian y White, 1978) conduce a  $Y \approx X \approx 1.2$  y  $P = 0.65$ , indicando que la aproximación de Debye-Hückel y la solución de Henry son válidas. En lo que sigue, no se comentará nada más de estas coordenadas en la medida que se verifican los requerimientos cuantitativos para su validez.

La Tabla 4.1.2 presenta una comparación de los valores de la carga neta y el radio hidrodinámico obtenidos para la 2LYZ nativa, con el protocolo de trabajo especificado arriba, usando el LLCCEM y el PLLCEM con los valores estimados con los modelos de Poisson Boltzmann-Monte Carlo (PBMCM), modelo de Regresión Lineal de Escalera de Cargas (RLCLM), y modelo de Linderstrøm-Lang (LLM) presentados en el trabajo de Sharma *et al.* (2003). Se observa en esta tabla que la carga neta que se calcula para la proteína nativa con el LLCCEM es muy próxima a la que se estima con el LLM. Los radios que se obtienen a partir del PLLCEM, LLCCEM y LRCLM son casi los mismos, mientras que el valor reportado por el LLM es un valor impuesto en los cálculos, que resulta de un promedio de los radios que se miden usando escaleras de carga en soluciones de fuerza

iónica igual a 8, 33 y 108 mM. Se debe enfatizar que el resultado del radio hidrodinámico que surge del LLCCEM o PLLCEM es solución rigurosa de las ecuaciones planteadas en los modelos propuestos, es decir, no se impone un valor de radio constante como lo hace el LLM o RLCLM. Este último aspecto muestra la necesidad de encontrar  $a_H$  como una raíz del LLM.

**Tabla 4.1.2.** Predicciones del número de carga neta  $Z$  y el radio hidrodinámico  $a_H$  de la 2LYZ nativa con el LLCCEM y el PLLCEM y comparación con los valores obtenidos con otros modelos.

Modelo	LLCEM	PLLCEM	PBMCM (a)	LRCLM (a)	LLM (a)
$Z$	6.34	6.87	6.90	7.30	6.30
$a_H$ (Å)	22.22	22.26	(b)	22.35	(c)

(a) Sharma *et al.*, 2003, (b) Valor no requerido, (c) El valor de radio hidrodinámico impuesto es de 21 Å.

Un estudio crucial consiste en verificar la hipótesis de trabajos previos que consideran el radio hidrodinámico constante para diferentes escalones de la escalera de cargas de la 2LYZ. La Figura 4.1.1 muestra que los valores de  $a_H$  que se calculan con el PLLCEM y el LLCCEM son casi constantes solamente para los tres primeros escalones. Estos resultados muestran que existe una funcionalidad entre  $a_H$  y  $eZ$ , dentro del marco teórico de la electrostática y la electrocinética. Por consiguiente, a medida que la proteína pierde cargas positivas a lo largo de la escalera de carga de seis acilaciones, cambiando la carga neta de 6.87 a 0.94,  $a_H$  decrece como se indica en la Figura 4.1.1 principalmente debido a la disminución de las repulsiones electrostáticas (ver, también más adelante la discusión concerniente al efecto despreciable sobre el  $a_H$  del anhídrido acético usado como agente acetilante). Por consiguiente, utilizar la pendiente de la curva de  $\mu$  versus  $n\Delta Z$  para calcular el radio hidrodinámico de una proteína, suponiendo un valor constante (Sharma *et al.*, 2003), resulta incorrecto. Esta figura también muestra que los valores de  $Z$  que se obtienen con ambos modelos en función de  $n$  son próximos.

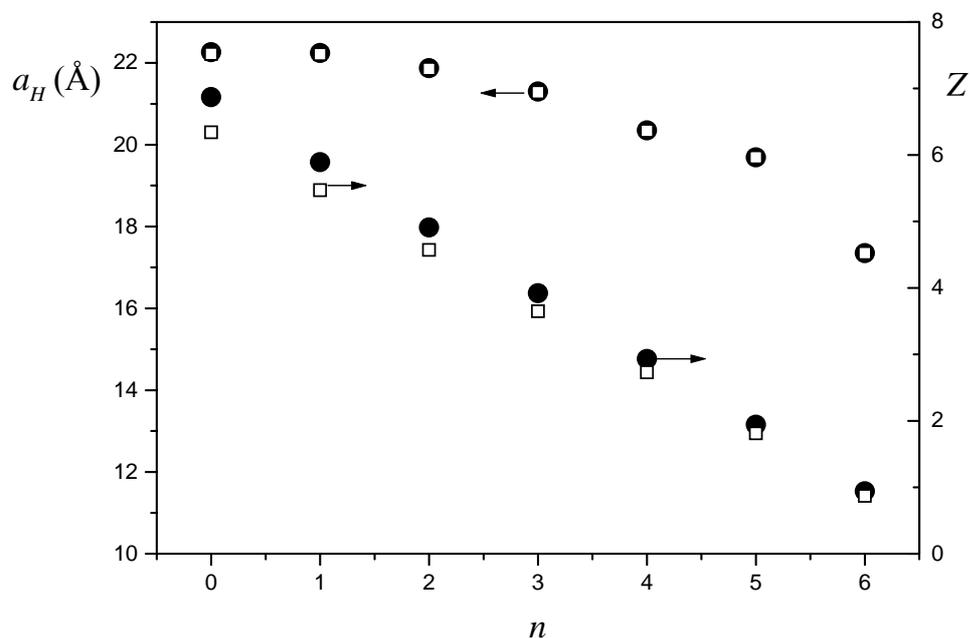
Es pertinente mencionar aquí que el radio hidrodinámico de la 2LYZ que se calcula a partir del dato experimental del coeficiente de difusión a dilución infinita medido por la técnica de *light scattering* (DLS) tiene un valor de  $18.6 \pm 1.0$  Å (Grigsby *et al.*, 2000). La estructura cristalina de esta proteína determinada por cristalografía de rayos-X es un elipsoide de revolución tipo prolato con un semieje mayor de 22.5 Å y un semieje menor

de 15 Å. No obstante, por su naturaleza compacta y rápido giro rotacional en solución la 2LYZ se puede considerar de forma aproximadamente esférica. El radio equivalente de la esfera es de 17.2 Å. La diferencia del radio hidrodinámico calculado con el radio de la estructura cristalina de 1.4 Å se atribuye posiblemente a la unión de iones  $Mg^{2+}$  a la superficie de la proteína y a la estructuración del agua (hidratación de la superficie de la proteína). Otros autores reportan valores del radio hidrodinámico de 18.5 Å, 19 Å y 22 Å en diferentes soluciones de distinta fuerza iónica y pH. Las diferencias en los valores del radio hidrodinámico de la 2LYZ existentes en la literatura se pueden deber a diferencias en el tipo y concentración de sal y técnicas experimentales utilizadas en su determinación. Una clara observación de los diversos estudios por DLS de la 2LYZ en soluciones salinas indica que la medida del radio hidrodinámico es siempre superior a la del radio encontrado a partir de la estructura cristalina. Las moléculas de agua están unidas a la superficie de la proteína y difunden con la proteína. Aproximadamente 0.3 g de agua se unen por cada gramo de proteína. En la superficie de la proteína, los iones de la sal se unen debido a interacciones específicas proteína-sal. La hidratación de la superficie de la proteína y la unión de iones afectan la difusividad medida. Los efectos de los iones dependen fuertemente del tipo y concentración de la sal y en menor grado del pH. En consecuencia, es relevante destacar la importancia de poder estimar el radio hidrodinámico en las condiciones específicas de pH y fuerza iónica en las que se realiza la experiencia y esto es posible mediante el uso del LLCCEM y PLLCEM.

Es relevante señalar aquí que el número de sitios de acetilación posibles en la proteína  $N_{ASS}$  para un valor particular de  $n$  (el número de grupos cargados convertidos) es  $N_{ASS} = n_a! / (n_a - n)! n!$ , donde  $n_a$  se refiere al número total de conversiones a través del procedimiento de la escalera de cargas. Por ejemplo, para  $n = 3$  de las seis Lys de la 2LYZ conduce a  $N_{ASS} = 20$ . Por lo tanto, se pueden calcular los parámetros promedios de estas posibilidades que corresponden a un  $n$  particular. Sin embargo, los cálculos con los modelos simples muestran, en general, una dependencia muy pequeña de los resultados sobre  $N_{ASS}$ .

Como se mencionó más arriba, con el LLCCEM, se calcula para la proteína nativa un valor de  $pH^* = 8.93$  (para un pH de trabajo igual a 8.4), y en consecuencia resulta  $\Delta pK = pH^* - pH = 0.53$  y se demuestra que este  $\Delta pK$  es igual a plantear

$\Delta pK_i = pK_i^r - pK_i$  (ver para su deducción, el Apéndice 4-A). Por consiguiente, a partir de la estimación de este valor de  $\Delta pK$  es posible obtener los nuevos valores modificados de los  $pK_i^r$  de los residuos cargados, designados  $pK_i$  que se presentan en la Tabla 4.1.3. En este caso bajo estudio (proteína cargada positivamente) los valores de los  $pK$  corregidos ( $pK_i$ ) son menores que los  $pK$  de referencia ( $pK_i^r$ ), verificándose en consecuencia las propuestas que se presentaron en la Sección 4.1.2.



**Figura 4.1.1.** Radio hidrodinámico  $a_H$  y número de carga neta  $Z$  de la 2LYZ en función del número  $n$  de grupos  $\epsilon$ -amino acetilados de la Lys. Los símbolos ( $\bullet$ ) y ( $\square$ ) corresponden a las predicciones numéricas del PLLCEM y el LLCCEM, respectivamente.

Un análisis más exhaustivo de la 2LYZ indica que mientras el LLCCEM y el LLM proveen valores de  $\Delta pK_i$  uniformes (esto significa que los  $\Delta pK_i$  son los mismos para todos los grupos cargados en la proteína), el PLLCEM hace una clara distinción de los  $\Delta pK_i$  porque se incluyen en el modelo los datos de  $r_{ij}$  (ver párrafo debajo de la Ec. 4.1.9 y el Apéndice 4-A, donde se deducen las expresiones matemáticas correspondientes). Por ejemplo, se encuentra con el PLLCEM, que el amino terminal  $pK_{\text{NH}_2t}$  de la 2LYZ toma

un valor de 7.47 para la proteína no modificada, casi en la trocha del valor experimental reportado como 7.5 en Sharma *et al.* (2003) para una fuerza iónica más alta (33 mM) que la que se estudia aquí (8 mM). Se lleva a cabo esta comparación aproximada, con esta diferencia en la  $I$ , porque la movilidad electroforética de la 2LYZ no está disponible para el valor más alto de fuerza iónica en Sharma *et al.* (2003) para realizar los cálculos exactos. Para la proteína paracetilada (lo cual significa que todos los residuos de Lys están acetilados) se obtiene  $pK_{\text{NH}_{2t}} \approx 7.74$  cuando  $\epsilon' \approx 10$  para aproximar de nuevo el dato reportado experimentalmente como 7.8 en Sharma *et al.* (2003), indicando también un cambio en el medio solvente-proteína. Este resultado, en adición, muestra la necesidad de una buena estimación de  $\epsilon'$ , independiente de cualquier proceso de ajuste como se describió previamente, y por lo tanto es una clara limitación del PLLCEM en el estado presente de su formulación. Es relevante señalar que esta limitación es intrínseca también al PBMCM (modelo detallado) donde la especificación de  $\epsilon'$  alrededor de los grupos cargados dentro del dominio de la proteína es una cuestión abierta (Beroza y Case, 1996; Beroza y Fredkin, 1996; Beroza *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 2003) y se requieren futuras investigaciones para avanzar en este difícil punto. Por otro lado, cuando se usa el LLCCEM en esta comparación,  $pK_{\text{NH}_{2t}}$  es alrededor de 6.97 para la proteína no modificada y 7.40 para la proteína paracetilada, las cuales son aproximaciones con  $\Delta pK_i$  uniformes como se estableció arriba.

**Tabla 4.1.3.** Valores de referencia de los residuos cargados  $pK_i^r$  y valores corregidos  $pK_i$  en la 2LYZ, obtenidos con el LLCCEM.

Residuo cargado	$pK_i^r$	$pK_i$
Asp	4.0	3.47
Glu	4.4	3.87
Tyr	9.6	9.07
Arg	12.5	11.97
Lys	10.5	9.97
His	6.3	5.77
COOHt	3.8	3.27
NH <sub>2t</sub>	7.5	6.97

#### **Anhidrasa carbónica humana** (*Human carbonic anhydrase*, 1CA2)

La secuencia de 259 aminoácidos correspondiente a la 1CA2, extraída del PDB y que se escribe con el código de una letra es:

SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKPLSVSYDQATSLRILNNGHAFN  
VEFDDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQFHFHWGSLDGQGSEHTVDKCKYAAELHLVHWNTKYGDFG  
KAVQQPDGLAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVLDSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYPGSL  
TTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK

Los datos del protocolo experimental son (Sharma y Carbeck, 2004):  $pH = 8.4$ ,  $I = 10$  mM,  $V = 15$  kV y  $T = 25^\circ C$ . Las dimensiones de capilar son:  $d_i = 50$   $\mu m$ ,  $L_t = 47$  cm y  $L_d = 40$  cm. El número de grupos cargados obtenidos a partir de la secuencia son:  $n_{Asp} = 19$ ;  $n_{Glu} = 13$ ;  $n_{Cys} = 1$ ;  $n_{His} = 12$ ;  $n_{Lys} = 23$   $n_{Arg} = 7$ ;  $n_{Tyr} = 8$ ;  $n_{COOHt} = 1$ . En adición, el grupo amino terminal se considera preacetilado y por consiguiente no reactivo y el ión  $Zn^{+2}-OH$  está coordinado por tres residuos de His, con un  $pK_{Zn^{+2}-OH}^r = 7.0$  (Caravella *et al.*, 1999). El grupo de  $pK_i^r$  que se usa es:  $pK_{Arg}^r = 12.0$ ;  $pK_{Asp}^r = 4.0$ ;  $pK_{Glu}^r = 4.4$ ;  $pK_{His}^r = 6.5$ ;  $pK_{Lys}^r = 10.7$ ;  $pK_{Cys}^r = 9.3$ ;  $pK_{Tyr}^r = 10.2$ ;  $pK_{COOHt}^r = 4.9$  (Creighton, 1993). Asimismo, el conjunto de distancias  $\{r_{ij}\}$  se extrae del PDB. Se calculan los valores de las movilidades electroforéticas de la proteína nativa y las 20 acetilaciones, a partir de los tiempos de migración experimentales que se obtienen del electroferograma de la escalera de carga de la 1CA2, reportado en la literatura (Sharma y Carbeck, 2004) y se presentan en la Tabla 4.1.4. Es pertinente mencionar que no se consideran Lys 21, 22 y 23 porque éstos últimos tres escalones no están bien resueltos en el electroferograma.

Los valores de la carga neta, el radio hidrodinámico, el potencial de partícula y el  $pH^*$ , estimados con el LLCCEM partiendo de los datos experimentales de las movilidades electroforéticas se muestran en la Tabla 4.1.4 para la 1CA2 nativa y las acetilaciones sucesivas. Considerando las 20 acetilaciones es posible obtener un valor promedio de  $\Delta Z = -0.94$ . Nuevamente se verifica, a diferencia de lo presentado por otros autores (Sharma y Carbeck, 2004), que el valor de  $\Delta Z$  es distinto de  $-1$  y que varía ligeramente en cada escalón de la escalera de cargas (ver Tabla 4.1.4). En efecto, una vez más se hace evidente la existencia del fenómeno de regulación de cargas. Asimismo, en este caso en estudio, a partir del valor de  $\Delta pK_i = -0.13$  que se estima con el LLCCEM para la proteína nativa, se obtienen los valores de los  $pK_i$  modificados para los diferentes residuos cargados. A diferencia del caso anterior, al tratarse de una proteína con carga negativa, los

valores de los  $pK_i$  resultan mayores a los valores de referencia. Los valores  $Z$  y  $a_H$  de la 1CA2 nativa que se calculan con el LLCCEM y el PLLCEM en general comparan bien con aquellos encontrados por otros autores (Sharma y Carbeck, 2004), como se reporta en la Tabla 4.1.5. Sin embargo, se concluye que solamente los cálculos para los primeros escalones de la escalera de carga de la proteína dan resultados próximos a los que se obtienen directamente con el PLLCEM y el LLCCEM.

**Tabla 4.1.4.** Valores estimados del número de carga neta  $Z$ , el radio hidrodinámico  $a_H$ , el potencial de partícula  $\zeta$  y el  $pH^*$  para la 1CA2 con el LLCCEM.

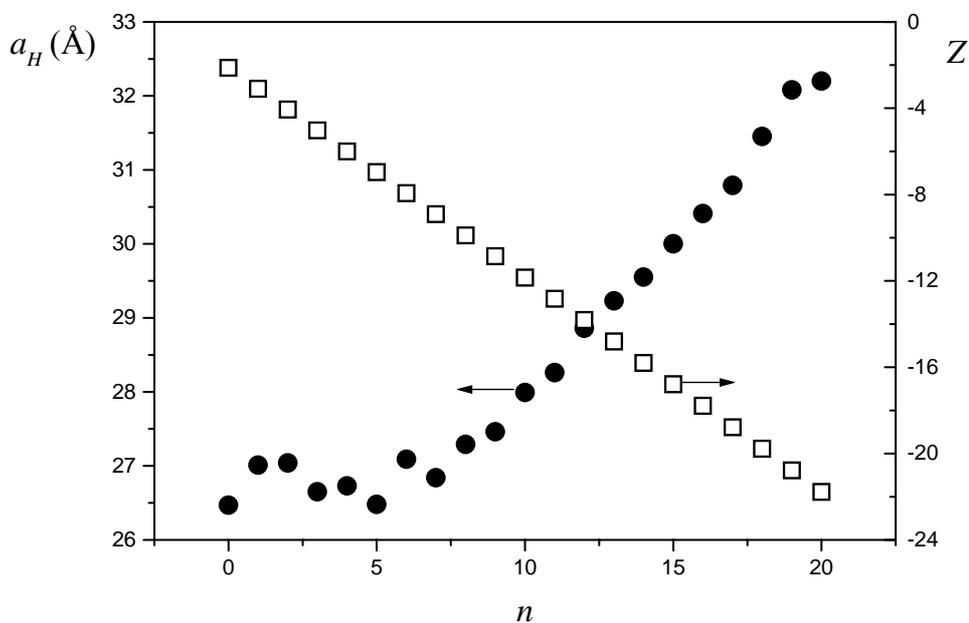
Proteína	$\mu \cdot 10^7$ ( $m^2 V^{-1} s^{-1}$ )	$Z$	$\Delta Z$	$a_H$ (Å)	$\zeta$ (V)	$pH^*$	$\Delta pK_i = pH^* - pH$
Nativa	-0.041	-2.06	--	26.33	-0.008	8.27	-0.13
Lys-1	-0.058	-3.00	0.94	26.88	-0.011	8.22	-0.18
Lys-2	-0.076	-3.94	0.94	26.91	-0.014	8.16	-0.24
Lys-3	-0.096	-4.87	0.93	26.51	-0.018	8.10	-0.3
Lys-4	-0.114	-5.81	0.94	26.58	-0.021	8.04	-0.36
Lys-5	-0.134	-6.73	0.92	26.33	-0.025	7.98	-0.42
Lys-6	-0.148	-7.68	0.95	26.93	-0.028	7.93	-0.47
Lys-7	-0.168	-8.60	0.92	26.68	-0.031	7.87	-0.53
Lys-8	-0.182	-9.54	0.94	27.12	-0.034	7.82	-0.58
Lys-9	-0.198	-10.47	0.93	27.28	-0.037	7.77	-0.63
Lys-10	-0.210	-11.41	0.94	27.81	-0.039	7.74	-0.66
Lys-11	-0.224	-12.34	0.93	28.08	-0.042	7.69	-0.71
Lys-12	-0.234	-13.28	0.94	28.67	-0.044	7.66	-0.74
Lys-13	-0.246	-14.22	0.94	29.03	-0.046	7.62	-0.78
Lys-14	-0.258	-15.14	0.92	29.35	-0.048	7.59	-0.81
Lys-15	-0.268	-16.08	0.94	29.80	-0.050	7.56	-0.84
Lys-16	-0.278	-17.02	0.94	30.21	-0.052	7.53	-0.87
Lys-17	-0.288	-17.95	0.93	30.58	-0.054	7.49	-0.91
Lys-18	-0.294	-18.90	0.95	31.25	-0.055	7.48	-0.92
Lys-19	-0.300	-19.86	0.96	31.88	-0.056	7.46	-0.94
Lys-20	-0.312	-20.77	0.91	31.99	-0.058	7.42	-0.98

**Tabla 4.1.5.** Predicciones del número de carga neta  $Z$  y el radio hidrodinámico  $a_H$  de la 1CA2 que se obtienen con el LLCCEM y el PLLCEM y comparación con el RLCLM.

Modelos	LLCEM	PLLCEM	RLCLM [a]
$Z$	-2.06	-2.13	-2.30
$a_H$ (Å)	26.33	26.47	27.00

[a] Sharma y Carbeck (2004).

Asimismo, la Figura 4.1.2 muestra la variación de  $a_H$  en función del número de acetilaciones  $n$ . En esta figura, se observa que para las primeras siete acetilaciones el radio hidrodinámico es aproximadamente constante. Sin embargo, para  $n > 7$  la suposición de un  $a_H$  constante (Sharma y Carbeck, 2004) no es aceptable. Como se observa en esta figura  $a_H$  sufre un marcado incremento a medida que crece el número de lisinas acetiladas. Es relevante señalar aquí que el PLLCEM y el LLCCEM proporcionan la carga neta  $eZ$  y el radio hidrodinámico  $a_H$ , sin la necesidad de utilizar la estrategia de generar una escalera de cargas, y que los resultados obtenidos comparan bien con aquellos encontrados con el LRCLM, los cuales son válidos únicamente para las primeras acetilaciones.



**Figura 4.1.2.** Predicciones del radio hidrodinámico  $a_H$  y el número de carga neta  $Z$  de la 1CA2 en función del número  $n$  de los grupos  $\epsilon$ -amino acetilados de la Lys con el PLLCEM.

### **Anhidrasa carbónica bovina (Bovine carbonic anhydrase, 1V9E)**

La secuencia de 259 aminoácidos de la 1V9E escrita con el código de una letra que se obtiene del PDB es:

HSFNVEYDDSDQKAVLKDGLTGTYRLVQFHFHWGSSDDQGSEHTVDRKKYAAELHLVHWNTKY  
GDFGTAAQQPDGLAVVGVFLKVGDNALQKVLDAALDSIKTKGKSTDFPNFDPGSLLPNVLSHHW  
GYGKHNGPEHWHKDFPIANGERQSPVDIDTKAVVQDPALKPLALVYGEATSRRMVNNGDYWTYP  
GSLTTPPLLESVTWIVLKEPISVSSQMLKFRTLNFNAEGEPPELLMLANWRPAQPLKNRQVRGFPK

Los datos experimentales y de protocolo corresponden a Gitlin *et al.* (2003). Se usan en la corrida de la CZE las mismas condiciones que aquellas que se usaron para la 1CA2. El número de aminoácidos cargados que se obtienen a partir del PDB es:  $n_{\text{Asp}} = 19$ ;  $n_{\text{Glu}} = 11$ ;  $n_{\text{His}} = 11$ ;  $n_{\text{Lys}} = 18$ ;  $n_{\text{Arg}} = 9$ ;  $n_{\text{Tyr}} = 7$ ;  $n_{\text{COOHt}} = 1$ ;  $n_{\text{NH}_2\text{t}} = 1$ ;  $n_{\text{Zn}^{+2}\text{OH}} = 1$ . En adición, el grupo amino terminal se considera preacetilado y el ión  $\text{Zn}^{+2}\text{-OH}$  está coordinado por tres residuos de His, con un  $\text{pK}_{\text{Zn}^{+2}\text{-OH}}^{\text{r}} = 7.0$  (Gitlin *et al.*, 2003). Los  $\text{pK}_i^{\text{r}}$  que se usan son:  $\text{pK}_{\text{Arg}}^{\text{r}} = 12.5$ ;  $\text{pK}_{\text{Asp}}^{\text{r}} = 3.5$ ;  $\text{pK}_{\text{Glu}}^{\text{r}} = 4.5$ ;  $\text{pK}_{\text{His}}^{\text{r}} = 6.2$ ;  $\text{pK}_{\text{Lys}}^{\text{r}} = 10.3$ ;  $\text{pK}_{\text{Tyr}}^{\text{r}} = 10.3$ ;  $\text{pK}_{\text{NH}_2\text{t}}^{\text{r}} = 0$ ;  $\text{pK}_{\text{COOHt}}^{\text{r}} = 3.2$ ;  $\text{pK}_{\text{Zn}^{+2}\text{OH}}^{\text{r}} = 7.0$  (Gitlin *et al.*, 2003). A partir de los tiempos de migración correspondientes a la proteína nativa y a las 18 acetilaciones sucesivas, que se obtienen del electroferograma experimental de la escalera de carga reportado en la literatura (Gitlin *et al.*, 2003), se calculan las movilidades electroforéticas que figuran en la Tabla 4.1.6. Con estos datos se ingresa al programa computacional y se estiman con el LLCCEM, los valores de la carga neta, el radio hidrodinámico, el potencial de partícula y el  $\text{pH}^*$  que se presentan en la Tabla 4.1.6. En adición, se calculan el  $\Delta Z$  y el  $\Delta \text{pK}$  para la proteína nativa y las sucesivas acetilaciones. De acuerdo con los resultados obtenidos para la 1V9E, el radio hidrodinámico se puede considerar aproximadamente constante hasta la acetilación número 4, luego aumenta a medida que se incrementa la carga negativa en función del número de acetilaciones. En la Figura 4.1.3 también se visualiza y enfatiza este efecto. En este caso en estudio, el  $\text{pH}^*$  es menor que el pH del BGE, como se espera, debido a que se trata de una proteína con carga neta negativa, por consiguiente existe una mayor concentración de  $[\text{H}^+]$  cerca de la molécula que en el seno de la solución. En adición, el conjunto de distancias  $\{r_{ij}\}$  se obtienen a partir del PDB y los valores de  $a_H$  y  $eZ$  de la 1V9E nativa y

las sucesivas acetilaciones se recalculan con el PLLCEM. Los valores estimados con el PLLCEM y el LLCCEM comparan bastante bien con aquellos encontrados por otros autores como se presentan en la Tabla 4.1.7. Es interesante señalar aquí que la diferencia en la predicción de la carga neta entre el PLLCEM y el LRCLM es aproximadamente 10%, lo que indicaría una sobreestimación en la estimación de la carga calculada con el LRCLM según lo reportado en Gitlin *et al.* (2003). Sin embargo, la comparación de la predicción del radio hidrodinámico muestra una significativa diferencia en este caso, teniendo en cuenta que Gitlin *et al.* (2003) usa un valor de 20.5 Å, el cual se calculó con un valor promedio del volumen específico parcial de proteínas (0.72 mL/g) y se despreciaron los efectos electrocinéticos al nivel de la partícula de Henry. Es evidente entonces que este radio hidrodinámico no es la raíz que resulta de la aplicación del LLCCEM y el PLLCEM. Además, Gitlin *et al.* (2003) en su trabajo usa un valor de radio hidrodinámico de 25.0 Å en el LLM y en este caso obtiene un valor de carga neta de -3.0, el cual es más cercano a las predicciones de los modelos presentados en esta Tesis.

**Tabla 4.1.6.** Valores estimados de la carga neta  $Z$ , el radio hidrodinámico  $a_H$ , el potencial de partícula  $\zeta$  y el  $\text{pH}^*$  de la 1V9E con el LLCCEM.

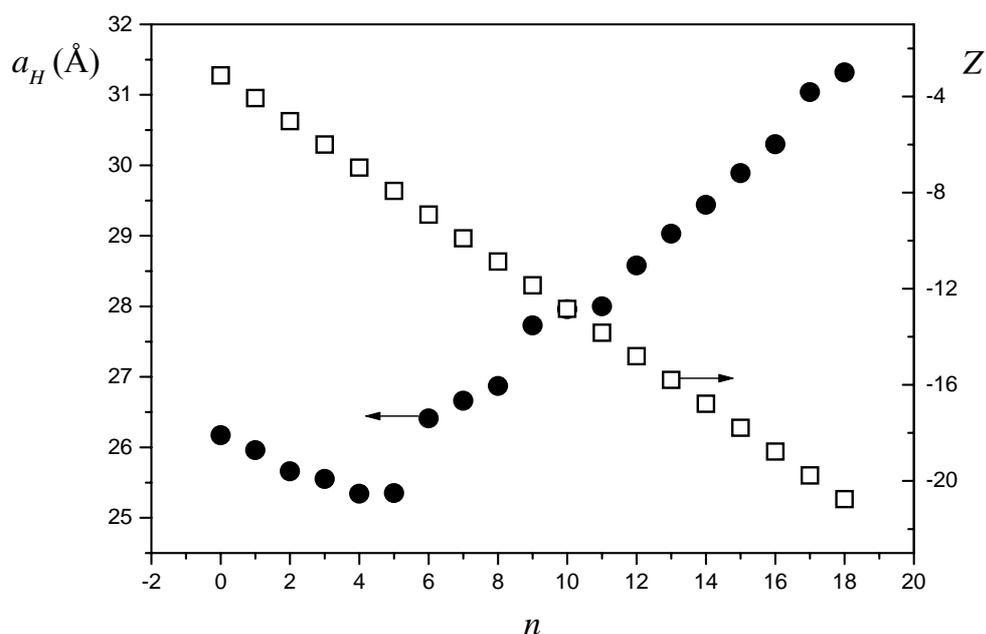
Proteína	$\mu \cdot 10^8$ ( $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$Z$	$\Delta Z$	$a_H$ (Å)	$\zeta$ (V)	$\text{pH}^*$	$\Delta \text{p}K_i = \text{pH}^* - \text{pH}$
Nativa	-0.62	-3.06	-	25.99	-0.012	8.20	-0.20
Lys-1	-0.82	-4.00	0.94	25.80	-0.015	8.14	-0.26
Lys-2	-1.03	-4.95	0.95	25.51	-0.019	8.07	-0.33
Lys-3	-1.235	-5.90	0.95	25.40	-0.023	8.01	-0.39
Lys-4	-1.45	-6.84	0.94	25.18	-0.027	7.94	-0.46
Lys-5	-1.65	-7.79	0.95	25.19	-0.031	7.88	-0.52
Lys-6	-1.75	-8.76	0.97	26.26	-0.033	7.85	-0.55
Lys-7	-1.91	-9.71	0.95	26.55	-0.036	7.80	-0.60
Lys-8	-2.08	-10.66	0.95	26.70	-0.039	7.74	-0.66
Lys-9	-2.17	-11.63	0.97	27.55	-0.041	7.71	-0.69
Lys-10	-2.32	-12.59	0.96	27.78	-0.043	7.67	-0.73
Lys-11	-2.49	-13.53	0.94	27.81	-0.046	7.61	-0.79
Lys-12	-2.59	-14.49	0.96	28.38	-0.048	7.58	-0.82
Lys-13	-2.70	-15.45	0.96	28.83	-0.050	7.55	-0.85
Lys-14	-2.81	-16.40	0.95	29.23	-0.052	7.51	-0.89
Lys-15	-2.91	-17.36	0.96	29.67	-0.054	7.48	-0.92
Lys-16	-3.01	-18.31	0.95	30.08	-0.056	7.45	-0.95
Lys-17	-3.06	-19.29	0.98	30.83	-0.057	7.44	-0.96
Lys-18	-3.17	-20.24	0.95	31.10	-0.059	7.40	-1.0

**Tabla 4.1.7.** Predicciones del número de carga neta  $Z$  y el radio hidrodinámico  $a_H$  de la 1V9E nativa, que se obtiene con el LLCCEM y el PLLCEM y comparación con otros modelos.

Modelos	LLCEM	PLLCEM	LRCLM (a)	LLM (a)	HM (a)
$Z$	-3.06	-3.12	-3.40	-3.00	-2.4 (c)
$a_H$ (Å)	25.99	26.17	20.50	(b)	(b)
$\Delta Z$ (d)	-0.95	-0.98	-1.0	-0.93	-0.76

(a) Gitlin *et al.*(2003). (b) Se impone un valor de radio hidrodinámico de 20.5 Å. (c) Con un radio de 25.0 Å se obtiene un valor de carga neta igual a -3.0. (d) Valor promedio, considerando todas las acetilaciones.

Es importante indicar, que para la 1V9E, el  $a_H$  en función del número de acetilaciones  $n$  es aproximadamente constante para las primeras cinco acetilaciones solamente, como se muestra en la Figura 4.1.3. Sin embargo, para  $n > 5$  la suposición de un radio hidrodinámico  $a_H$  constante no es apropiado. De esta manera, las mismas conclusiones que se mencionaron antes para la 1CA2, se validan aquí.



**Figura 4.1.3.** Predicciones del radio hidrodinámico  $a_H$  y el número de carga neta  $Z$  de la 1V9E en función del número  $n$  de los grupos  $\epsilon$ -amino acetilados de la Lys con el PLLCEM.

Como se visualiza en la Tabla 4.1.6, a partir del LLCCEM, se obtiene una estimación de los valores de  $\Delta Z$  para dos acilaciones consecutivas en la 1V9E. Para los primeros cinco escalones, el  $\Delta Z$  toma valores entre -0.94 y -0.95; en consecuencia para los cálculos

prácticos el  $\Delta Z$  se puede considerar aproximadamente constante para esta proteína, no obstante diferente de -1.

Es relevante señalar aquí que en las Tablas 4.1.4 y 4.1.6 y en las Figuras 4.1.2 y 4.1.3, los valores de  $a_H$  reportados para la 1CA2 y la 1V9E, respectivamente, cubren un número alto de acilaciones (20 y 18, en cada caso). Para un número de acilaciones tan alto, el valor de la coordenada  $P$  no excede de 1.06, mientras que  $Y$  y  $X$  permanecen bajos, indicando que la aproximación de la linealización de Poisson-Boltzmann es válida aún y no se observa el efecto paramétrico de  $P$  sobre los resultados.

Asimismo, es interesante mencionar que el valor de  $\Delta pK_i$  calculado con el LLCCEM es -0.20 para la 1V9E nativa. En la Tabla 4.1.8 se presentan los valores de los  $pK_i^r$  y de los  $pK_i$  modificados, luego de la regulación. Como se espera, para este caso (proteína con carga neta negativa), los valores de los  $pK_i$  son mayores que los valores de referencia  $pK_i^r$ .

**Tabla 4.1.8.** Valores de los  $pK_i^r$  de los residuos cargados y los valores modificados  $pK_i$ , en la 1V9E, estimados con el LLCCEM.

Residuo cargado	$pK_i^r$	$pK_i$
Asp	3.5	3.7
Glu	4.5	4.7
Tyr	10.3	10.5
Arg	12.5	12.7
Lys	10.3	10.5
His	6.2	6.4
COOH <sub>t</sub>	3.2	3.4
NH <sub>2t</sub>	7.0	7.2

Antes de considerar una proteína diferente, es apropiado analizar el efecto del peso molecular del agente acetilante que se usa para producir la escalera de carga dentro del contexto de los modelos que se presentan en esta Tesis. Con este propósito, se usan las movilidades electroforéticas propuestas en Colton *et al.* (1997) para este tipo de análisis con el LLCCEM y el PLLCEM. En estos cálculos se consideran dos agentes acetilantes: anhídrido acético (bajo peso molecular) y N-hidroxisuccinimidil colato (alto peso molecular de 389 Da). En coincidencia con estos autores se encuentra que a medida que crece el número de acilaciones  $n$  en la 1V9E, existe una diferencia mayor en los radios hidrodinámicos entre los dos tipos de acetilaciones, indicando que el agente de alto peso

molecular provee un cambio del radio adicional, aparte de aquel que se observa debido a otros efectos fisicoquímicos asociados con la carga neta de la proteína. Por lo tanto, cuando se incluyen 5, 10, y 13 acetilaciones, por ejemplo, en la 1V9E, los resultados del LLCCEM indican que las diferencias en los radios hidrodinámicos a cada acetilación son 1.53, 1.95 y 2.64 Å, respectivamente, mientras que la carga neta permanece casi invariable (los cambios son menores a 0.16). Sin embargo, cuando se consideran 1 a 3 acetilaciones por ejemplo, no se observan diferencias cuando se usan estos dos agentes acetilantes diferentes. Asimismo, se encuentran resultados similares con el PLLCEM. En este sentido, se debe señalar que en este trabajo, se usaron los datos de las movilidades electroforéticas de las proteínas modificadas con el agente acetilante de bajo peso molecular solamente, para evitar el efecto de cambio químico producido en la proteína, sobre las predicciones del  $a_H$ .

#### ***Nucleasa estafilocócica*** (*Staphylococcal nuclease*, 1STN)

Otro estudio que se realiza en esta Tesis corresponde a la 1STN donde se incluyen variaciones en los valores de pH y fuerza iónica del BGE de acuerdo a los datos de la CZE disponibles en la literatura (Kálman *et al.*, 1995a y b) para una  $T = 25^\circ C$ . La secuencia de 149 aminoácidos de la 1STN que se obtiene del PDB es:

ATSTKKLHKEPATLIKAIDGDTVKLMYKGQPMTRLLLLVDTPETKHPKKGVEKYGPEASAFTKKMV  
ENAKKIEVEFDKGRQRTDKYGRGLAYIYADGKVMNEALVRQGLAKVAYVYKPNNTHEQHRLRSEA  
QAKKEKLNWSEDNADSGQ

El grupo de  $pK_i^r$  que se usan aquí es  $\{pK_{Arg}^r = 12.0; pK_{Asp}^r = 4.0; pK_{Glu}^r = 4.4; pK_{His}^r = 6.5; pK_{Lys}^r = 10.7; pK_{Tyr}^r = 10.2; pK_{COOHt}^r = 4.9; pK_{NH_2t}^r = 7.4\}$  (Creighton, 1993). El número de grupos cargados que se calculan a partir del PDB es  $\{n_{Asp} = 8; n_{Glu} = 12; n_{His} = 4; n_{Lys} = 23; n_{Arg} = 5; n_{Tyr} = 7; n_{COOHt} = 1; n_{NH_2t} = 1\}$ . El conjunto de distancias  $r_{ij}$  se obtienen a partir del PDB.

La Tabla 4.1.9 presenta los resultados numéricos que se obtienen con el PLLCEM y el LLCCEM para la 1STN. Es claro que ambos modelos consideran el fenómeno de regulación de cargas, no obstante con el PLLCEM se incluyen en el modelo las interacciones entre los grupos cargados, en consecuencia es necesario la incorporación en

el modelo de las distancias entre los grupos cargados  $\{r_{ij}\}$ . Esto explica las diferencias que se observan en los resultados que surgen de los dos modelos.

**Tabla 4.1.9.** Valores estimados del número de carga neta  $Z$ , el radio hidrodinámico  $a_H$ , el potencial de partícula  $\zeta$  y el  $\text{pH}^*$  de la 1STN, a distintos valores de  $I$  y  $\text{pH}$ , con el LLCCEM y el PLLCEM.

pH	$I$ (M)	$\mu \cdot 10^8$ ( $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$Z$ (LLCEM)	$Z$ (PLLCEM)	$a_H$ (Å) (LLCEM)	$a_H$ (Å) (PLLCEM)	$\zeta$ (V) (a)	$\text{pH}^*$ (b)
2.8	0.0055	2.45	+29.30	+31.08	52.57	54.44	0.045	3.56
4.1	0.055	2.04	+17.78	+20.60	28.44	30.97	0.036	4.71
5.7	0.036	1.85	+10.69	+11.22	23.62	24.28	0.034	6.27
6.8	0.0255	1.81	+8.0	+8.32	20.86	21.41	0.033	7.37
8.9	0.014	1.31	+5.29	+5.66	21.59	22.52	0.025	9.32
9.5	0.0065	0.81	+2.74	+3.78	21.17	26.65	0.015	9.76

(a) y (b) Se obtienen valores similares de estos parámetros con el LLCCEM y el PLLCEM.

En la Tabla 4.1.10 se comparan los resultados numéricos que se obtienen con el PLLCEM con aquellos valores reportados en Winzor *et al.* (2004) y en Kálman *et al.* (1995). Esta tabla muestra que los valores de  $Z$  que se obtienen con el PLLCEM son próximos a aquellos reportados en Winsor *et al.* (2004), mientras que los valores de  $a_H$  que se obtienen son bastante diferentes de aquellos reportados en Winzor *et al.* (2004) y en Kálmán *et al.* (1995). Es pertinente señalar que en la primera cita se usa el mismo radio hidrodinámico para tres pHs diferentes, y las estimaciones de  $a_H$  y  $Z$  que se reportan en Kálmán *et al.* (1995) se obtuvieron a partir de experiencias de la CZE, que involucran mutaciones puntuales de la proteína (un procedimiento que se puede considerar como un escalón de la escalera de cargas). En este sentido, es posible encontrar desviaciones de los valores esperados porque se necesita para una mejor predicción una escalera de cargas con más escalones. Por consiguiente, las ventajas del PLLCEM y el LLCCEM sobre otros modelos simples son claras, ya que proveen como solución ambos  $a_H$  y  $Z$ .

Asimismo, hay que señalar que se presentan mayores diferencias entre los valores estimados con el LLCCEM y el PLLCEM en esta proteína que en las que se analizaron previamente. En efecto, esto se explica aquí, debido a que el análisis se hace a diferentes pH y a determinados valores de pH las interacciones entre los grupos cargados pueden ser muy importantes. A  $\text{pH}=8.9$  las diferencias que se observan entre ambos modelos son

menores, teniendo en cuenta que en este punto, cercano al pI de la proteína, las interacciones entre los grupos cargados son mínimas.

**Tabla 4.1.10.** Comparación de los valores del número de carga neta  $Z$  y el radio hidrodinámico  $a_H$  de la 1STN estimados con el PLLCEM con los reportados por otros autores.

pH	$I$ (M)	$Z$ (PLLCEM)	$Z$ Kálmán <i>et al.</i> (1995)	$Z$ Winsor <i>et al.</i> (2004)	$a_H$ (Å) (PLLCEM)	$a_H$ (Å) Kálmán <i>et al.</i> (1995)	$a_H$ (Å) Winsor <i>et al.</i> (2004)
2.8	0.0055	+31.08	+33.0	-	54.44	50.1	-
4.1	0.055	+20.60	+20.6	+19.6	30.97	26.8	27 (a)
5.7	0.036	+11.22	+14.8	+13.2	24.28	25.2	21 (b)
6.8	0.0255	+8.32	+12.9	+9.5	21.41	25.1	21 (b)
8.9	0.014	+5.66	+7.49	+5.6	22.52	24.6	21 (b)
9.5	0.0065	+3.78	+5.40	-	26.65	30.5	-

(a) Este valor de radio hidrodinámico se estableció a partir del radio de giración de 21 Å correspondiente al estado hinchado (*swollen*) de la proteína. (b) Valor de radio hidrodinámico correspondiente al radio de Stokes (forma compacta) de la 1STN según Winsor *et al.* (2004).

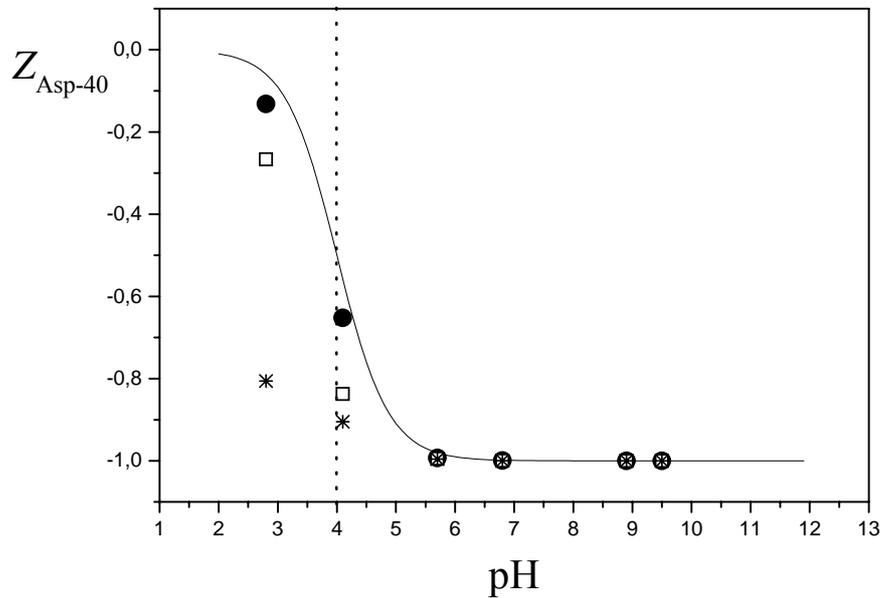
Para esta proteína en estudio, también se evalúa el efecto del pH del solvente sobre la  $Z_i$  de algunos grupos cargados con valores de  $pK_i^r$  bajo, intermedio y alto. En efecto, usando las movilidades de la 1STN a diferentes pH se construyen las Figuras 4.1.4 a 4.1.6, las cuales muestran la evolución del número de carga neta de un grupo seleccionado en la proteína a medida que el pH cambia de 2.8 a 9.5. En estas figuras se presentan,  $Z_i^r$  y  $Z_i$  de un grupo cargado  $i$  particular, estimados con el LLCCEM y el PLLCEM. Por ejemplo, la Fig. 4.1.4 para Asp-40, con un valor de  $pK_{Asp}^r = 4.0$ , muestra que  $Z_i$  es casi el mismo que  $Z_i^r$ , excepto para  $pH = 4 \pm 2$  donde el  $\Delta pK_{Asp-40}$  adquiere importancia en los cálculos. La Fig. 4.1.5 ilustra este aspecto para la His-121 donde las diferencias en las estimaciones del número de carga neta están alrededor de un pH cercano al  $pK_{His}^r = 6.5$ . La Fig. 4.1.6 representa otro caso donde el pH del BGE es bastante alto afectando por ejemplo a Lys-6 con un  $pK_{Lys}^r = 10.7$ . Con estos resultados, se prueba formalmente el efecto de las interacciones entre grupos cargados y la variación del pH cercano a la molécula es principalmente relevante para aquellos grupos que tienen un valor de  $pK_i^r$  cercano al pH del solvente (Sharma *et al.*, 2003; Colton *et al.*, 1997). Por consiguiente, se

puede formular un BGE eligiendo el pH con la restricción de que este valor debe estar alejado (o cercano) al  $pK_i^r$  de un grupo cargado específico para evitar (o no) la dependencia sobre la magnitud del  $\Delta pK_i$  con el fin de lograr una adecuada separación en la CZE.

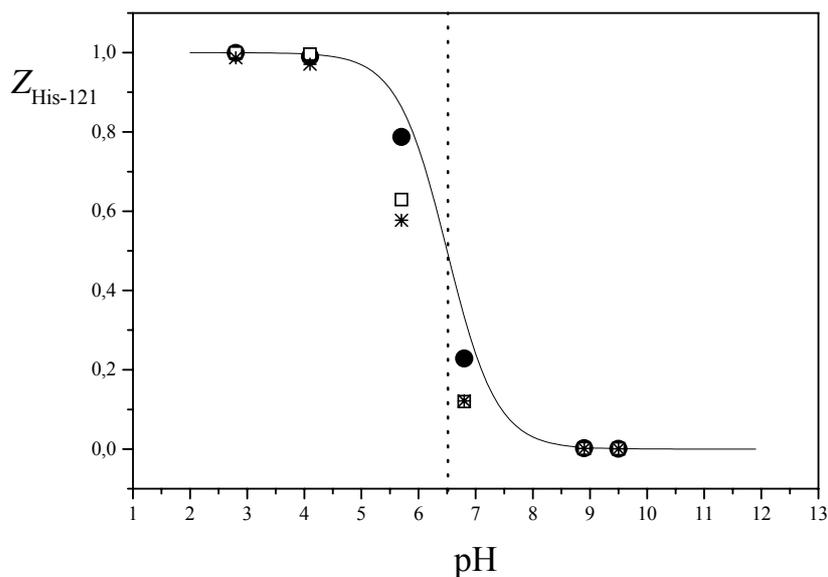
En adición, en las Figuras 4.1.4 a 4.1.6, se presentan los cálculos realizados con el LLM. En este modelo, el radio hidrodinámico  $a_H$  es una imposición y un valor fijo, como se explicó antes, y por lo tanto difiere conceptualmente del PLLCEM y el LLCCEM. En este sentido, si se usa como estimación, por ejemplo,  $a_H = 21 \text{ \AA}$  (este valor es apropiado para pH alrededor de 6.8, ver Tabla 4.1.10), las predicciones de  $Z_{\text{Asp-40}}$  (Fig. 4.1.4) y  $Z_{\text{His-121}}$  (Fig. 4.1.5) con el LLM proveen valores que se desvían de aquellos obtenidos con el PLLCEM y el LLCCEM. Esta situación es muy crítica para pH = 4.1 y 2.8 con relación a  $Z_{\text{Asp-40}}$  donde la 1STN se desnaturaliza (estado *swollen* ácido a pH = 4.1 y *random coil* a pH = 2.8 ). Por consiguiente, a este pH extremo un radio fijo para el LLM y distancias fijas  $r_{ij}$  para el PLLCEM no son más apropiadas. En efecto, en estas condiciones fisicoquímicas extremas, el LLCCEM puede dar la mejor respuesta al problema, porque este modelo no incluye este tipo de imposiciones. Por supuesto, las predicciones no esperadas del LLM pueden ser consecuencia de la imposición de un radio constante en las estimaciones, como se mencionó arriba en la presentación de los modelos. Asimismo, es evidente por este análisis, que el LLM como se usó en la literatura la mayoría de las veces, no está completamente resuelto para predecir el valor de  $a_H$  a diferentes pH y fuerzas iónicas.

Es pertinente mencionar que Kálmán *et al.* (1995a y b) para estimar la carga neta de la 1STN utilizaron mutantes de la proteína nativa (es decir proteínas donde ocurrió una mutación puntual al cambiar un aminoácido por otro, obtenidas por mutagénesis a sitio dirigido). Estos autores consideraron que la diferencia en el número de carga neta entre la proteína nativa o *wild type* y la mutante se conoce y es igual a +1, -1, +2, -2 o 0, de acuerdo a la mutación propuesta. Asimismo, usan los valores de las movilidades electroforéticas experimentales en la expresión  $\mu_{wt} - \mu_m / \mu_{wt} = 1 / Z_{wt} (Z_{wt} - Z_m)$ , donde  $\mu_{wt}$  y  $\mu_m$  son las movilidades de la proteína nativa y de la mutante, respectivamente y  $(Z_{wt} - Z_m)$  corresponde a la diferencia del número de carga neta entre la proteína nativa y la mutante,

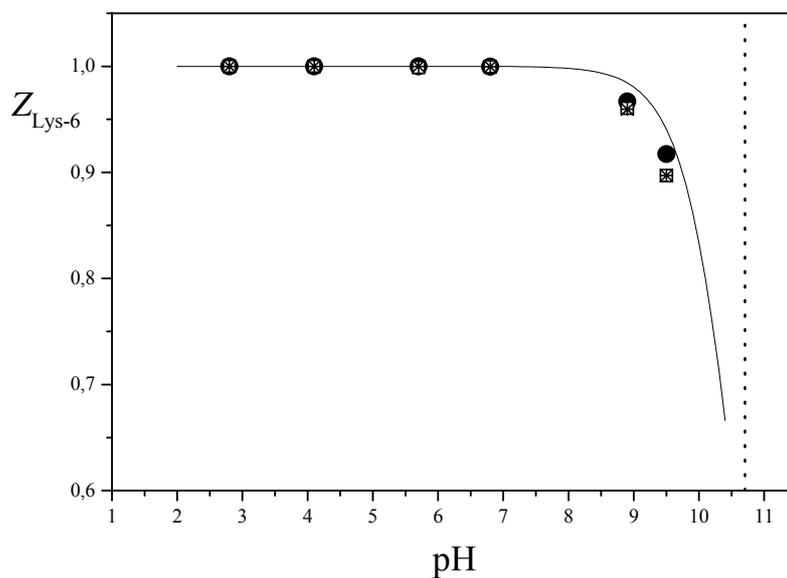
que suponen conocida, en consecuencia, queda como única incógnita de la expresión, el número de carga neta de la proteína nativa  $Z_{wt}$ . Es evidente que en esta ecuación se considera que el radio no varía con la mutación ( $a_{H_{wt}} \cong a_{H_m}$ ). La validez de esta suposición se discute más abajo. Asimismo, al asignar un número entero a la diferencia del número de carga neta implica que no se considera la existencia del fenómeno de regulación de cargas. A partir de los cálculos realizados con el LLCCEM se analizará más adelante en este capítulo, que para la diferencia ( $Z_{wt} - Z_m$ ) se obtiene un número no entero. Estas dos consideraciones explicarían las diferencias observadas en los resultados cuando se comparan con los que se surgen de la aplicación del LLCCEM y el PLLCEM.



**Figura 4.1.4.** Número de carga neta  $Z_{Asp-40}$  de la 1STN en función del pH (ver Tabla 4.1.9 para los valores de  $I$ ). La línea llena se refiere a la predicción de la carga sin considerar el fenómeno de regulación de cargas. Los símbolos (●), (□) y (\*) indican las predicciones numéricas del PLLCEM, el LLCCEM y el LLM, respectivamente. La línea punteada vertical está ubicada al pH igual al  $pK_{Asp}^I = 4$ . El LLM usa un radio hidrodinámico constante de 21 Å.



**Figura 4.1.5.** Número de carga neta  $Z_{\text{His-121}}$  de la 1STN en función del pH (ver Tabla 4.1.9 para los valores de  $I$ ). La línea llena se refiere a la predicción de la carga neta sin considerar el fenómeno de regulación de cargas. Los símbolos (●), (□) y (\*) indican las predicciones numéricas del PLLCEM, LLCCEM y LLM, respectivamente. La línea de puntos vertical está ubicada al pH igual al  $\text{p}K_{\text{His}}^{\text{r}} = 6.5$ . El LLM usa un radio hidrodinámico constante de 21 Å.



**Figura 4.1.6.** Número de carga neta  $Z_{\text{Lys-6}}$  de la 1STN en función del pH (ver la Tabla 4.1.9 para los valores de  $I$ ). La línea llena se refiere a la predicción de la carga sin considerar el fenómeno de regulación de cargas. Los símbolos (●), (□) y (\*) indican las predicciones numéricas del PLLCEM, LLCCEM y LLM, respectivamente. La línea de puntos vertical está ubicada al pH igual al  $\text{p}K_{\text{Lys}}^{\text{r}} = 10.7$ . El LLM usa un radio hidrodinámico constante de 21 Å.

Recientemente, Winzor (2004) criticó el uso de mutaciones y escaleras de carga para estimar la carga neta de una proteína, como así también la asignación de un radio constante para la proteína nativa y su mutante o para las sucesivas acetilaciones según lo descrito con anterioridad. Este autor propuso una forma alternativa para obtener la carga neta a partir del dato de movilidad electroforética y sugiere que se comete menos error si en lugar de la forma esférica se adopta el modelo de elipsoide del tipo prolato. Con este propósito usó la ecuación tradicional de movilidad electroforética propuesta por Abramson (1936) e incluyó un término que corrige por forma (ver para más detalles Winzor, 2004 y Winzor *et al.*, 2004). A pesar de que este autor estimó la carga directamente de la ecuación de movilidad electroforética (no usó los  $pK_i^r$  de los grupos cargados), debe introducir un valor de radio hidrodinámico estimado a partir de otra medida experimental, como se describe en la nota al pie de la Tabla 4.1.10. Este método sugerido por Winzor (2004) se considera erróneo, debido a que se impone un valor de radio hidrodinámico, asignando el mismo valor para diferentes condiciones de  $I$  y pH, despreciando la interacción que existe entre la carga neta y el radio hidrodinámico, en relación con las condiciones del medio.

Si se analizan las variaciones de  $a_H$  en función del pH y si se correlaciona con el tipo de conformación característica que puede adoptar la molécula de 1STN en solución, se observa en la Tabla 4.1.11 las coincidencias y diferencias entre los valores de  $a_H$  obtenidos por Kálmán *et al.* (1995) y los estimados con el LLCCEM y el PLLCEM. Cabe mencionar que por cromatografía de filtración por gel, el radio de la 1STN a pH entre 5.7 y 8.9 es de 21 Å y no se encuentran análisis en la bibliografía que expliquen el incremento en el radio del 12 % a pH = 9.5, observado por Kálmán *et al.* (1995). Estos autores para explicar este incremento suponen la existencia de otro tipo de conformación en el cual la proteína se encontraría hinchada (lo describen como estado *swollen* básico). Si se aplica el LLCCEM a esta situación en particular no se observa este comportamiento y el radio hidrodinámico sigue la trocha de ir disminuyendo a medida que disminuye la carga neta y la proteína se acerca al valor de pH igual al pI (pI = 9.9 para la 1STN). Con el PLLCEM el valor de  $a_H$  que se obtiene es mayor y se aproxima al valor estimado por estos autores. Sin duda, este tema requiere futuras investigaciones, aunque se estima que el fenómeno de *swelling* está relacionado con las interacciones electroestáticas entre grupos cargados y el agua.

**Tabla 4.1.11.** Relación del radio hidrodinámico  $a_H$  y el tipo de conformación que adopta la proteína en solución, en función del pH. Comparación de los valores de  $a_H$  reportados en Kálmán *et al.* (1995) con aquellos que se obtienen con el PLLCEM y el LLCCEM.

pH	$a_H$ (Å)	Tipo de conformación (*)	$a_H$ (Å)	$a_H$ (Å)
	(Kálmán <i>et al.</i> , 1995)		(LLCEM)	(PLLCEM)
2.8	50.1	Cadena errática ( <i>random coil</i> )	52.34	54.44
4.1	26.8	Estado <i>swollen</i> ácido	28.28	30.97
5.7	25.2	Estructura terciaria compacta	23.52	24.28
6.8	25.1	Estructura terciaria compacta	20.85	21.41
8.9	24.6	Estructura terciaria compacta	21.48	22.52
9.5	30.5	Estado <i>swollen</i> básico	20.94	26.65

(\*) Descriptas por Kálmán *et al.* (1995).

Es también pertinente analizar la consideración presentada por Kálmán *et al.* (1995a y b) con relación a la constancia del radio hidrodinámico al producir una mutación puntual (cambio de un aminoácido por otro) en la molécula de 1STN, o las pequeñas variaciones observadas en el radio a partir de estudios por cristalografía de rayos X y/o datos de NMR y su relación con la exposición al solvente, que explicarían en ciertos casos las diferencias de movilidades electroforéticas y consecuentemente la posibilidad de separarlas mediante la CZE. Con este propósito, partiendo de las movilidades electroforéticas experimentales, se estiman con el LLCCEM la carga neta y el radio hidrodinámico de 12 mutantes de la 1STN, que se obtuvieron por la técnica de mutagénesis a sitio dirigido y que se analizaron específicamente en Kálmán *et al.* (1995). El protocolo de trabajo que se usó en la CZE fue: pH = 8.9 y  $I = 14 \text{ mM}$  y  $T = 25^\circ \text{C}$ . En la Tabla 4.1.12 se presentan los valores estimados de la carga neta y el radio hidrodinámico que se obtienen con el LLCCEM. Se señala en la línea 1 de esta tabla, la proteína nativa (*wild type*) y en las líneas sucesivas de 2 a 12 se indican las mutantes bajo estudio, indicando en cada mutación puntual el cambio de aminoácido que tiene lugar. Asimismo, se presenta la diferencia en la carga neta,  $\Delta Z = Z_{wt} - Z_m$  y en el radio hidrodinámico  $\Delta a_H = a_{H_{wt}} - a_{H_m}$ , entre la proteína nativa y la mutante, respectivamente.

Es interesante mencionar las conclusiones que se extraen a partir del análisis de los resultados que se presentan en la Tabla 4.1.12: (a) Se puede considerar que al ocurrir una

**Tabla 4.1.12.** Valores estimados del número de carga neta  $Z$  y el radio hidrodinámico  $a_H$  de mutantes de la 1STN con el LLCCEM y las diferencias de  $\Delta Z$  y  $\Delta a_H$  calculadas entre la proteína *wild type* y las mutantes.

	Proteína	$\mu \cdot 10^8$ ( $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$Z$	$\Delta Z$ <sup>(a)</sup>	$a_H$ (Å)	$\Delta a_H$ (Å)	$\Delta a_H$ (%)
1	<i>Wild type</i>	1.31	+5.29	0.00	21.48	0.00	0
2	Asn118→Gly	1.28	+5.33	0.04 (0)	21.94	0.46	+2.1
3	Pro117→Thr	1.28	+5.33	0.04 (0)	21.94	0.46	+2.1
4	Pro117→Gly	1.28	+5.33	0.04 (0)	21.94	0.46	+2.1
5	Pro117→Ala	1.28	+5.33	0.04 (0)	21.94	0.46	+2.1
6	Pro47→Ala	1.31	+5.29	0.00 (0)	21.48	0.00	0
7	His124→Leu	1.31	+5.29	0.00 (0)	21.47	0.01	0.04
8	Lys116→Gly	1.14	+4.52	0.77 (-1)	21.18	0.30	-1.4
9	Lys116→Ala	1.16	+4.49	0.80 (-1)	20.85	0.63	-2.9
10	Lys116→Met	1.16	+4.49	0.80 (-1)	20.85	0.63	-2.9
11	Lys116→Asp	0.98	+3.67	1.62 (-2)	20.36	1.12	-5.2
12	Lys116→Glu	0.96	+3.69	1.60 (-2)	20.74	0.74	-3.5

(a) Los valores de  $\Delta Z$  que figuran entre paréntesis corresponden a los que usaron Kálmán *et al.* (1995) en sus cálculos.

mutación puntual el radio hidrodinámico  $a_H$  varía muy poco. En la mayoría de los casos en estudio, la variación del  $a_H$  es menor a 1 Å y en promedio la variación del  $a_H$  es menor al 1.9 %. Se puede demostrar de esta manera, con el análisis de las mutantes de la 1STN, al aplicar el LLCCEM que, en general, la suposición hecha por Kálmán *et al.* (1995a y b) es aceptable. Se puede considerar entonces que el radio hidrodinámico  $a_H$  es aproximadamente constante o varía muy poco con una mutación puntual, de la misma manera que se consideró el  $a_H$  aproximadamente constante para los primeros escalones de una escalera de carga. No obstante, se recuerda que a medida que crece el número de acetilaciones esta consideración pierde validez. (b) Los valores de  $\Delta Z$  calculados con el LLCCEM no son números enteros sino fracciones de carga. Estos cálculos ponen en evidencia el fenómeno de regulación de cargas, que no fue considerado en el trabajo de Kálmán *et al.* (1995a y b). (c) Para el análisis de las mutaciones en Pro117 y Asn118 se debe tener en cuenta que las mutaciones cambian ligeramente la conformación de la región. Al reemplazar Asn118 por Gly la pérdida del enlace de hidrógeno desestabiliza la unión y la estructura de la proteína se vuelve menos compacta. Esta situación determina un aumento pequeño del tamaño molecular de la mutante Asn118→Gly con respecto a la forma *wild type*. En la Tabla 4.1.12 para las mutaciones 2 y 3, se calcula una variación del radio de 2.1 %. (d) Para los casos 5 y 6 se observa que la misma mutación (Pro→Ala) pero en distinto sitio (Pro117 ó Pro47) da como resultado una variación en la carga muy

pequeña y una variación en el radio pequeña, siendo estos resultados coincidentes con los reportados en Kálmán *et al.* (1995b). Estos autores suponen la misma estructura tridimensional para la mutación Pro47→Ala que para la proteína *wild type*. La separación entre Pro47→Ala y Pro117→Ala se debe a una variación muy pequeña en el tamaño de estas dos proteínas lo cual se verifica con los cálculos realizados con el LLCCEM ( $\Delta a_H = 0.46$ ), es decir, una variación en el radio hidrodinámico del 2.1 % y en consecuencia la proteína de mayor tamaño (Pro117→Ala) presenta menor movilidad electroforética. (e) Los casos de mutaciones en Lys116 (casos 8, 9 y 10) producen variantes con una movilidad electroforética menor que la proteína nativa. Este comportamiento se debe fundamentalmente a la diferencia de carga entre las mutantes y la *wild type* (0.77 ó 0.80) debido a que las estructuras cristalinas son semejantes. La menor movilidad electroforética observada en Lys116→Gly en relación a Lys116→Ala y Lys116→Met se explica en función de la diferencia calculada en el radio hidrodinámico,  $\Delta a_H = 0.33$ . (f) Los casos 11 y 12, que corresponden a las mutaciones Lys116→Asp y Lys116→Glu presentan menor movilidad que la proteína nativa debido a la diferencia de carga de  $-1.62$  ( $-2$ , según Kálmán *et al.*, 1995b). La diferencia de movilidad pequeña entre Lys116→Asp y Lys116→Glu de acuerdo al LLCCEM se explica por el radio hidrodinámico menor de Lys116→Asp (a igualdad de carga). Este último resultado estaría en contradicción con lo expresado en Kálmán *et al.* (1995b), los cuales explican la diferencia de las movilidades entre las mutantes considerando que en Lys116→Asp existiría un parcial apantallamiento de la carga negativa del aspartato y a pesar de su mayor tamaño exhibiría una movilidad mayor que Lys116→Glu donde la carga negativa en la posición 116 está completamente expuesta al solvente.

En el contexto de esta sección es interesante además, un estudio de las predicciones de los modelos propuestos cuando se varía la fuerza iónica  $I$  del BGE a un pH fijo. A partir de las Ecs. (4.1.3) y (4.1.4) se infiere que en la medida que  $I$  y por lo tanto  $\kappa$  se mantienen suficientemente altas, se deben esperar valores de los  $\Delta pK_i$  pequeños. Carbeck *et al.* (1999) realizaron un estudio de las movilidades electroforéticas de la 1V9E, a pH constante e igual a 8.4 pero variando la fuerza iónica. Por consiguiente los datos experimentales reportados en Carbeck *et al.* (1999) se usan aquí para analizar la sensibilidad de la  $I$  en las predicciones del LLCCEM (este modelo no requiere las distancias cristalográficas, y por lo tanto, es más simple para hacer los cálculos). La Tabla

4.1.13 muestra los resultados que se obtienen cuando se estudia la proteína nativa. Así,  $a_H$  decrece y  $Z$  aumenta con los incrementos de  $I$  (el segundo parámetro sin embargo, muy débilmente). No obstante que estos resultados son en parte consistente con el punto de vista físico que se espera de una doble capa eléctrica pequeña alrededor de la partícula, es importante poner énfasis en el hecho que la solución numérica que se obtiene es el resultado de desentrañar un problema matemático no-lineal fuertemente acoplado, incluso en el caso del LLCCEM. Así, el efecto de  $I$  se observa principalmente a través del parámetro  $\kappa$  situado en el denominador y en la función  $f(\kappa a_H)$ , ambos pertenecientes a la Ec. (4.1.6); el cual a su vez implica movilidades menores para este estudio en el proceso numérico iterativo descrito en la Sección 4.1.2. Asimismo, este efecto también se valida, cuando se consideran los efectos electrostáticos entre pares de grupos cargados con el PLLCEM. Otros cálculos realizados para diferentes acetilaciones muestran la misma tendencia con la variación de  $I$ .

**Tabla 4.1.13.** Predicciones del número de carga neta  $Z$  y el radio hidrodinámico  $a_H$  de la 1V9E con el LLCCEM, para el mismo protocolo usado en la Tabla 4.1.6, con diferentes valores de fuerza iónica  $I$  (varias concentraciones de  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  en el BGE).

$[\text{Li}_2\text{SO}_4]$ mM	$Z$	$a_H$ (Å)	$\Delta pK_i$
0	-3.06	25.99	-0.20
10	-3.09	24.13	-0.15
30	-3.12	23.19	-0.12
50	-3.13	22.23	-0.11

Asimismo, es importante señalar que se obtienen efectos diferentes cuando la permitividad eléctrica del solvente acuoso se modifica agregando, por ejemplo, un solvente orgánico al BGE (Porrás *et al.*, 2003), a pesar de que en este caso el problema requiere disponer de un nuevo grupo de  $pK_i^f$  referidos a las condiciones termodinámicas de las disociaciones de los grupos cargados en ese medio (Beckers *et al.*, 2003; Včeláková *et al.*, 2004).

#### **Albúmina sérica humana** (*Human serum albumin*, 1AO6)

Con el propósito de ilustrar las predicciones de los modelos con una proteína de peso molecular mayor que las que se analizaron antes, se realiza un estudio experimental y teórico con la albúmina sérica humana. La secuencia de la 1AO6 es de 585 aminoácidos y se obtiene del PDB:

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSL  
 HTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVPEVDVMCTAFHDNE  
 ETFLKKYLYEIIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFECCQAADKAAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQR  
 LKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAK  
 YICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFGLM  
 FLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFE  
 QLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC  
 VLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAL  
 VELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

Los datos del protocolo experimental son:  $\text{pH} = 9.8$ ,  $I = 110 \text{ mM}$ ,  $V = 10 \text{ kV}$  y  $T = 20^\circ \text{C}$ . Las dimensiones de capilar de sílice son:  $d_i = 50 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $L_t = 27 \text{ cm}$  y  $L_d = 20 \text{ cm}$ . El ensayo de la CZE conduce a:  $t_{mi} = 4.573 \text{ minutos}$ ;  $t_{mo} = 2.547 \text{ minutos}$  y en consecuencia un valor de movilidad electroforética efectiva igual a  $-1.57 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . En la Tabla 4.1.15 se presenta el número de aminoácidos cargados que se obtienen a partir de la ASS y los valores de los  $\text{pK}_i^r$  que se obtienen de dos fuentes diferentes (Nelson y Cox, 2001 y Creighton, 1993). En este caso se considera que 34 Cys estando formando puentes disulfuro y se desprecian los iones unidos para esta ilustración.

**Tabla 4.1.14.** Número de aminoácidos cargados presentes en la 1AO6 y  $\text{pK}_i^r$  según distintas fuentes.

Aminoácido Cargado	Cantidad	$\text{pK}_i^r = \text{pK}_i^\circ$	
		Nelson y Cox (2001)	Creighton (1993)
Cys	35	8.18	9.3
Asp	36	3.65	4.0
Glu	62	4.25	4.4
His	16	6.0	6.5
Lys	59	10.53	10.7
Arg	24	12.48	12.0
Tyr	18	10.07	10.2
$\text{NH}_2$ (Asp)	1	9.82	7.4
$\text{COOH}$ (Leu)	1	2.36	4.9

El LLCCEM genera los siguientes resultados numéricos:  $\zeta = -30 \text{ mV}$ ,  $a_H = 30.74 \text{ \AA}$ ,  $Z = -22.22$  y  $\text{pH}^* = 9.28$ , mientras que el PLLCEM con  $\varepsilon' \approx 70\varepsilon_0$  proporciona:  $\zeta = -30 \text{ mV}$ ,  $a_H = 31.73 \text{ \AA}$ ,  $Z = -24.14$  y  $\text{pH}^* = 9.29$ . Estos valores de  $\text{pH}^*$  indican, por supuesto, que existe una concentración de protones más alta cercana a la molécula. También se observa que el número de carga neta de esta proteína es relativamente más alto con relación a las proteínas que se analizaron anteriormente. Asimismo, el valor de la permitividad eléctrica  $\varepsilon'$  en el dominio de la proteína es relativamente alto para una estimación de la carga que de valores aproximados al estimado

con el LLCCEM. Además, para esta proteína  $Y \approx 1.3$ ,  $X \approx 1.2$  y  $P = 3.44$ . De esta manera, a pesar de que las coordenadas  $X$  e  $Y$  son bastante próximas y aún bajas, se encuentra un valor de  $P$  relativamente alto, y las curvas paramétricas  $Y$  versus  $X$  comienzan a separarse una de otra. En consecuencia, a este nivel de número de cargas y tamaño de la proteína, las hipótesis clásicas que se introducen con el PLLCEM comienzan a fallar, y entonces se hace necesario resolver la ecuación de Poisson-Boltzmann completa.

Finalmente, es importante señalar que, en general, los valores de  $pK_i^r$  se presentan en la literatura con una precisión experimental de alrededor 1/10 dependiendo de la técnica usada para sus mediciones. Además, estos valores difieren de una fuente a otra (ver, por ejemplo, valores reportados en la Tabla 4.1.14). La Tabla 4.1.15 ilustra las diferencias que se obtienen en los parámetros  $a_H$  y  $Z$  para la 1AO6 estimados con el LLCCEM si se usan los valores de los  $pK_i^r$  de distintas fuentes. Este error experimental está alrededor del mismo valor que las variaciones de carga neta encontradas en las mutaciones o en un escalón de la escalera de carga. Por consiguiente este error experimental también afecta los resultados numéricos provistos por el LLCCEM y el PLLCEM. En este sentido, la calidad de los datos que se ingresan al programa computacional es relevante. En la actualidad, existe dificultad para encontrar datos de los  $pK_i^r$  para diferentes BGE que se puedan usar con confianza, como lo señalan Vceláková *et al.* (2004). Consecuentemente, en futuras investigaciones se deberá poner énfasis en mejorar las determinaciones experimentales de los  $pK_i^r$  en diferentes solventes y a fuerzas iónicas bien especificadas (Vceláková *et al.*, 2004).

**Tabla 4.1.15.** Predicciones del número carga neta  $Z$ , el radio hidrodinámico  $a_H$ , el potencial de partícula  $\zeta$  y el  $pH^*$  para la 1AO6 con el LLCCEM, si se usan valores de  $pK_i^r$  de distintas fuentes.

Fuente de $pK_i^r$	$Z$	$a_H$ (Å)	$\zeta$ (V)	$pH^*$
Nelson y Cox (2001)	-21.89	30.42	-0.030	9.29
Creighton (1993)	-22.22	30.74	-0.030	9.28

En adición, con el propósito de visualizar como los errores experimentales asociados con los  $pK_i^r$  pueden afectar los cálculos provistos por el PLLCEM, se imponen arbitrariamente errores a los  $pK_i^r$  usados con la 2LYZ. De esta manera, se supone que el

$pK_i^r$  de un grupo cargado particular contiene un error de  $\pm 1$  y también  $\pm 0.1$ . Los resultados se presentan en la Tabla 4.1.16, en la cual se observa que una precisión de 1/10 es aceptable para las predicciones del modelo, incluso para aquellos grupos cargados que tiene un  $pK_i^r$  próximo al pH del protocolo de trabajo. Por otro lado, un error de  $\pm 1$  es detrimental para algunas proteínas, como se ilustra en la Tabla 4.1.16 para la 2LYZ. Por lo tanto, se concluye que los cálculos obtenidos a partir del PLLCEM proveen una guía importante acerca de la manera de seleccionar el pH de un protocolo apropiado para separar una mezcla de proteínas mediante CZE. Los valores de  $a'_H$  y  $Z'$  reportados corresponden a los cálculos con cada  $pK_i^r$  modificado por el error indicado, mientras que  $a_H$  y  $Z$  son los valores de referencia propuestos en la Tabla 4.1.2. Solamente se reportan las máximas diferencias.

**Tabla 4.1.16.** Predicciones del número de carga neta  $Z'$  y el radio hidrodinámico  $a'_H$  de la 2LYZ con el PLLCEM para el mismo protocolo usado en la Tabla 4.1.2, cuando se introduce un error de  $\pm 1$  y  $\pm 0.1$  unidades de  $pK_i^r$  en un grupo cargado en la proteína (uno por vez).

$pK_i^r$	$a'_H$ (Å)	$Z'$	$a'_H - a_H$ (Å)	$Z' - Z$
$pK_{Asp}^r \pm 1$	22.26	6.872	0.000	0.001
$pK_{Glu}^r \pm 1$	22.26	6.872	0.000	0.001
$pK_{His}^r \pm 1$	22.33	6.918	0.07	0.047
$pK_{Lys}^r \pm 1$	18.36	6.863	-3.90	-0.008
$pK_{Arg}^r \pm 1$	22.21	6.845	-0.05	-0.026
$pK_{Tyr}^r \pm 1$	16.89	6.882	-5.37	0.011
$pK_{Asp}^r \pm 0.1$	22.26	6.871	0.000	0.000
$pK_{Glu}^r \pm 0.1$	22.26	6.871	0.000	0.000
$pK_{His}^r \pm 0.1$	22.26	6.872	0.000	0.001
$pK_{Lys}^r \pm 0.1$	22.16	6.850	-0.100	-0.021
$pK_{Arg}^r \pm 0.1$	22.26	6.872	0.000	0.001
$pK_{Tyr}^r \pm 0.1$	21.94	6.879	-0.320	0.008

Continuando con la discusión de los resultados, es apropiado señalar aquí las limitaciones que se encuentran en los modelos como PLLCEM, LLCCEM, LRCLM y LLM para su aplicación directa a problemas prácticos.

#### 4.1.4 Limitaciones de los modelos extendidos

Las limitaciones que se encuentran en los modelos extendidos como los que se presentan en esta Tesis se resumen de la siguiente manera:

(1) Un requerimiento crítico en el uso del PLLCEM es la determinación de  $\varepsilon'$ , la cual es bastante difícil de estimar *a priori* para una proteína en particular sin tener datos disponibles, por ejemplo a partir del PBMCM. También una estimación posible de  $\varepsilon'$  se obtiene si se logra con el PLLCEM la misma carga que la que se reporta por otros métodos clásicos. En adición, el LLCCEM proporciona una estimación en este sentido, ya que no considera el ambiente interior de la proteína en los cálculos. Sin embargo, la fortaleza del PLLCEM es que provee una estimación de las interacciones entre grupos cargados en la proteína y se pueden distinguir los valores de los  $\Delta pK_i$  entre los grupos cargados, en la medida que se disponga del valor de  $\varepsilon'$ .

(2) Los modelos propuestos presentan la dificultad que se requiere el conjunto de  $\{pK_i^f\}$  y el error inherente a las evaluaciones experimentales asociadas con las constantes de disociación pueden introducir una sensibilidad paramétrica relevante en estos modelos (principalmente cuando los errores podrían exceder aproximadamente 1/10 unidades de  $pK_i^f$ ), originando cambios en los resultados de mismo orden de magnitud que aquellos predichos por los  $\Delta pK_i$ . En este sentido, un error no mayor del 1/10 parece aceptable, por ejemplo, para la 2LYZ.

(3) Los cálculos con el PLLCEM y el LLCCEM indican que la hipótesis de  $a_H$  constante y  $|\Delta Z| \cong 1$  para evaluar  $n\Delta Z$  en el LRCLM es una aproximación para las primeras fracciones convertidas en la electroforesis de la escalera de carga de proteínas.

(4) Las predicciones de  $eZ$  a partir del LLM pueden estar próximas a aquellas que se encuentran con el LLCCEM en la medida que el valor de  $a_H$  impuesto en el primer modelo esté también próximo al valor numérico que se obtiene con el último. Ambos modelos, por supuesto, no tienen en cuenta la diferencia entre  $pH_i$  y  $pH^*$  proporcionando el mismo  $\Delta pK_i$  para todos los grupos cargados. El LLM puede dar predicciones inapropiadas con relación a los  $\Delta pK_i$  como consecuencia de la imposición de un radio constante en los cálculos, como se mencionó anteriormente en la presentación de estos modelos.

(5) Cuando la proteína sufre cambios importantes en su estructura nativa, las distancias cristalográficas  $r_{ij}$  no están disponibles en general, y el PLLCEM puede no ser útil en estos

casos, donde los resultados obtenidos con los  $r_{ij}$  de la proteína nativa involucran una aproximación adicional. En esta situación, se prefiere usar el LLCCEM, donde solamente se consideran el recuento de los  $n_i$  y los iones asociados.

(6) Por supuesto, aquellos métodos de naturaleza más empírica e independientes de un modelo que estiman la carga neta de una proteína, como los propuestos por Winzor (2004) y Winzor *et al.* (2004), se pueden usar como puntos de referencias para superar varias incertidumbres concernientes a los modelos simples descritos aquí. Los resultados obtenidos con el PBCEM son útiles también en este sentido, pero son escasos y no se disponen fácilmente.

De acuerdo con la discusión anterior es claro que se requiere profundizar la investigación en el desarrollo de estos tipos de modelos antes que se puedan usar en aplicaciones prácticas directas. No obstante, es también relevante indicar que la visualización conceptual de los diferentes fenómenos que participan en la determinación de la carga neta y el radio hidrodinámico de una proteína en diferentes solventes se torna evidente a través de los modelos extendidos (LLCEM y PLLCEM) propuestos en esta Tesis. En la medida en que se analizan las proteínas nativas y está disponible una estimación de  $\epsilon'$ , se sugiere usar en la práctica el PLLCEM, el cual provee resultados cercanos a los del PBCEM. Por otro lado, cuando la proteína sufre cambios importantes en su estructura nativa, se prefiere usar el LLCCEM donde se consideran el recuento de los  $n_i$  y los iones unidos, mientras que se ignoran las distancias cristalográficas  $r_{ij}$ . Por supuesto, los métodos de naturaleza bastante independiente de un modelo como los propuestos por Winzor (2004), se deben usar, principalmente cuando no se conoce bien la estructura de la proteína y los posibles iones unidos. En general, la precisión de cada método es todavía un tema para debatir en la literatura.

#### **4.1.5 Conclusiones**

Con el uso de los modelos extendidos propuestos en esta Tesis (LLCEM y PLLCEM) es posible estimar la carga neta  $Z$  y el radio hidrodinámico  $a_H$  de una proteína a partir de un único dato experimental (el tiempo de migración o la movilidad electroforética). Ambos parámetros,  $Z$  y  $a_H$  son resultados rigurosos de las ecuaciones planteadas, sin tener la necesidad de imponer un valor del radio (obtenido a partir de otras experiencias adicionales) ni asignar un valor constante a  $\Delta Z$ . De acuerdo con el grado de

exactitud requerida se puede utilizar el modelo con regulación local (PLLCEM) que tiene en cuenta las distancias  $r_{ij}$  entre los grupos cargados e incluye variaciones en los  $pK_i$  de los grupos cargados. Asimismo, surge del análisis de los resultados que si se modela el medio que rodea a la proteína en estudio (variando el pH, la fuerza iónica y la permitividad) es posible minimizar los errores en los  $\Delta pK_i$  y hacer uso del modelo más simple (LLCEM).

Con relación a lo expresado en el párrafo anterior se pueden mencionar las siguientes consideraciones: (a) Si el pH de trabajo se encuentra alejado de la mayoría de los  $pK_i^f$  de los residuos ionizables (variación estimada de  $\pm 2$  unidades de pH), las variaciones en los  $pK_i$  son mínimas; (b) Si la fuerza iónica se incrementa también es posible minimizar esta variación en los  $pK_i^f$ ; (c) Si tenemos en cuenta la ubicación de los residuos (ocultos o expuestos al solvente) se obtienen mejores resultados con el modelo si se asigna una permitividad diferente para estos dos tipos de residuos, es decir, si se considera el interior de la proteína con una permitividad baja.

En consecuencia, se señalan como conclusiones más relevantes que surgen del estudio y el análisis de las proteínas presentadas en esta Sección, las siguientes:

- ◆ Se observan diferencias en los valores de la carga neta de acuerdo a la consideración o no del fenómeno de regulación de cargas. Es evidente la influencia que tiene introducir el concepto de  $pH^*$  (que resulta en general diferente al pH del BGE).
- ◆ Es relevante destacar que con el LLCEM o PLLCEM es posible la estimación de la carga neta y el radio hidrodinámico de una proteína a un protocolo específico a partir del dato experimental del tiempo de migración o la movilidad electroforética, sin la necesidad de recurrir a una modificación química en la molécula, de acuerdo a la propuesta de los autores que usan la generación de escaleras de carga, o de introducir una mutación en la secuencia de la proteína con el mismo objeto.
- ◆ Las predicciones numéricas de la carga neta que se obtienen con el PLLCEM y el LLCEM comparan bien con los resultados presentados en la literatura, incluso con los modelos detallados como el PBMCM.
- ◆ La exactitud en el valor de la carga neta estimada depende en gran medida de la calidad de los datos impuestos y surge entonces el problema de la variabilidad de los datos de los  $pK_i^f$  que provienen de distintas fuentes. Esto se puede señalar como una desventaja de los

modelos propuestos y que requiere futuras investigaciones con el fin de disponer de datos más confiables.

- ◆ En el uso de las escaleras de carga la asignación de un radio hidrodinámico constante o su estimación gráfica resulta de acuerdo a lo documentado aquí erróneo. Se hace evidente, mediante cálculos y figuras, las variaciones que experimenta el radio hidrodinámico a medida que aumenta el número de Lys acetiladas. Sólo sería posible considerar un radio hidrodinámico aproximadamente constante para los primeros escalones de la escalera de carga, dependiendo de la proteína en estudio.
- ◆ Es importante considerar la interacción entre la carga neta de la proteína y el radio hidrodinámico con relación a las propiedades fisicoquímicas del solvente usado en la CZE como el pH, la fuerza iónica, la permitividad eléctrica y la viscosidad.
- ◆ Un aspecto crucial es la estimación apropiada de la permitividad eléctrica dentro del dominio proteína-solvente, el cual permanece como un tópico de futuras investigaciones tanto para los modelos simples como para los modelos detallados.
- ◆ Con respecto a los primeros trabajos sobre el tema que consideraron un valor de  $\Delta Z$  constante e igual a -1 entre los sucesivos escalones de una escalera de carga, también queda demostrado en esta Tesis y en las últimas publicaciones que resulta incorrecto. Si se tiene en cuenta el fenómeno de regulación de cargas es posible estimar un valor de  $\Delta Z$  menor que -1 y con diferencias entre los distintos escalones.
- ◆ Para el caso de las mutaciones puntuales (sustitución de un aminoácido por otro) se puede considerar, como una buena aproximación, que el radio hidrodinámico no varía ó varía muy poco a los efectos de poder realizar estimaciones con los modelos, en el caso de desconocer la mutación involucrada. Esta última conclusión se analizará en la Sección 4.2, con relación al estudio de aloalbúminas.

En forma general es posible concluir que el PLLCEM y el LLCCEM conducen a una estimación del radio hidrodinámico y la carga neta de una proteína como resultado de las soluciones numéricas, cuando se dispone de la movilidad electroforética experimental a un protocolo particular, el conjunto de los  $pK_i^f$  de los aminoácidos cargados y los datos básicos del PDB (incluyendo los iones unidos). Las predicciones numéricas de la carga neta obtenidas con estos modelos comparan bien con los resultados previos reportados en la literatura, incluyendo aquellas de los modelos detallados como el PBMCM. Las predicciones de los modelos extendidos propuestos en esta Tesis también son buenas

cuando la carga neta y el radio hidrodinámico que se obtienen se comparan con las respuestas asintóticas del LRCLM, el cual provee un radio aproximadamente constante para los primeros escalones de la escalera de carga. A través de los cálculos presentados en este capítulo de la Tesis, se encontró que el radio hidrodinámico es sensible a los cambios en la carga neta de la proteína para la 2LYZ, 1CA2, 1V9E y 1STN que se estudiaron aquí.

En la medida que los modelos simples se necesitan para situaciones prácticas de la CZE, es importante considerar la interacción entre la carga neta y el radio hidrodinámico con relación a las propiedades fisicoquímicas del solvente usado como el pH, la fuerza iónica, la permitividad eléctrica y la viscosidad. En adición un aspecto crucial que se debe señalar es la estimación adecuada de la permitividad eléctrica dentro del dominio de la proteína-solvente, el cual permanece como un tópico de futuras investigaciones tanto para los modelos detallados como simples. En un contexto más amplio, el PLLCEM y el LLCCEM son herramientas complementarias de los métodos clásicos independientes de los modelos, para obtener una estimación de los  $\Delta pK_i$  asociados con los grupos cargados en el ambiente proteína-solvente.

#### 4.1.6 Apéndice 4-A

Siguiendo la distribución de iones de Boltzmann, la concentración de protones  $[H_i^+]$  alrededor de los grupos cargados  $i$  de la proteína se expresa como,

$$[H_i^+] = [H^+] \exp\left(-\frac{e\zeta_i}{k_B T}\right) \quad (A-1)$$

En la Ec. (A-1),  $[H^+]$  es la concentración molar de protones en el BGE. Luego, la Ec. (A-1) se puede describir como sigue,

$$pH_i = pH + \frac{1}{\ln(10)} \frac{e\zeta_i}{k_B T} \quad (A-2)$$

donde  $\zeta_i$  es el potencial eléctrico del grupo cargado  $i$  que se expresa como,

$$\zeta_i = \zeta + \Delta\zeta_i^B + \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^N \Delta\zeta_{ij} \quad (A-3)$$

Esta ecuación comprende (a) el potencial de partícula (aproximación de campo medio) (Russel *et al.*, 1989),

$$\zeta = \frac{eZ}{4\pi\epsilon a_H(1 + \kappa a_H)} \quad (\text{A-4})$$

(b) la perturbación del potencial electrostático del grupo  $i$ ,  $\Delta\zeta_i^B$ , el cual está asociado con la transferencia de un grupo cargado  $i$  en solución a una cavidad en la proteína (Atkins, 1995), se expresa como,

$$\Delta\zeta_i^B = \frac{e\Delta Z_i}{4\pi r_i^\circ \epsilon} \left( \frac{\epsilon}{\epsilon'} - 1 \right) \quad (\text{A-5})$$

y (c) la perturbación del potencial electrostático en el grupo  $i$ ,  $\Delta\zeta_{ij}$  debido a la presencia de un grupo cargado  $j$  a la distancia  $r_{ij}$  se expresa (Allison *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002; Tanford, 1961) como,

$$\Delta\zeta_{ij} = \frac{e\Delta Z_j}{4\pi\epsilon'} \frac{\exp(-\kappa' r_{ij})}{r_{ij}} \quad (\text{A-6})$$

A partir de las Ecs. (A-1) hasta (A-6) fácilmente se obtiene la Ec. (4.1.3).

En adición, el pH cercano a la partícula se deriva a partir de,

$$[\text{H}^+]^* = [\text{H}^+] \exp\left(-\frac{e\zeta}{k_B T}\right) \quad (\text{A-7})$$

donde  $[\text{H}^+]^*$  es la concentración molar de protones cerca de la partícula, y por consiguiente,

$$\text{pH}^* = \text{pH} + \frac{1}{\ln(10)} \frac{e\zeta}{k_B T} \quad (\text{A-8})$$

A partir de las Ecs. (A-4) y (A-8), fácilmente se obtiene la Ec. (4.1.4).

Finalmente, dado que  $K_i^r = K_i \exp\left(-\frac{e\zeta_i}{k_B T}\right)$  donde  $\text{p}K_i$  es la constante efectiva de disociación del grupo cargado  $i$  en el ambiente proteína-solvente, se encuentra también que,

$$\text{p}K_i^r = \text{p}K_i + \frac{1}{\ln(10)} \frac{e\zeta_i}{k_B T} \quad (\text{A-9})$$

Esta ecuación combinada con la Ec. (A-2) conduce a la expresión para el  $\Delta\text{p}K_i$  usada en los cálculos realizados con el PLLCEM.

## 4.2 Aplicación del LLCCEM a la detección y caracterización de aloalbúminas

### 4.2.1 Introducción

La albúmina sérica humana (HSA) es una proteína no glicosilada compuesta por una única cadena constituida por 585 aminoácidos. Se sabe que mutaciones inherentes producen variantes genéticas circulantes, las cuales se denominan aloalbúminas, y en principio se cree que no están claramente asociadas con una enfermedad. No obstante, las variantes genéticas de la HSA son motivo de estudio en varios laboratorios para definir el defecto molecular y establecer una correlación con las propiedades funcionales y la estabilidad de la molécula. Consecuentemente la aloalbuminemia (también designada bisalbuminemia) es una anomalía rara, en la cual están presentes en el suero humano dos tipos de albúmina: la normal y la variante. Se propuso (ver por ejemplo, Tárnoky, 1980; Withana, 1995) que esta situación ocurre debido a una anomalía genética en la síntesis de la molécula de albúmina o a un fenómeno transitorio siguiente a una sobredosis de ciertas drogas, por ejemplo, penicilina y cefalotina (Tárnoky, 1980; Arvan *et al.*, 1968). Asimismo, los pacientes con ascitis pancreática pueden presentar una bisalbuminemia transitoria, que no se detecta después del tratamiento médico o quirúrgico (Kobayashi *et al.*, 1995). Por medio de estudios inmunoquímicos se demostró que ambas fracciones presentan pesos moleculares casi idénticos e iguales propiedades antigénicas. Estos resultados sugieren que la heterogeneidad electroforética se debe principalmente a la diferencia en la carga eléctrica de los dos componentes (Margni *et al.*, 1970; Thakar *et al.*, 1997). Por consiguiente, la albúmina variante (también designada mutante) puede presentar una movilidad electroforética más rápida o más lenta que la albúmina normal (Margni *et al.*, 1970).

A pesar de que se cree que la bisalbuminemia no está asociada con ninguna enfermedad específica, como se mencionó en el párrafo anterior, una búsqueda bibliográfica minuciosa señaló casos de bisalbuminemia que se presentan simultáneamente con diabetes mellitus (Scheurlen, 1955), desórdenes lipídicos, síndrome nefrótico (Hoang *et al.*, 1999) y mieloma múltiple (Thakar *et al.*, 1997; Pola y Tichý, 1985). Es también interesante mencionar que algunas variantes de albúmina podrían tener una afinidad alterada por hormonas esteroides, ácidos grasos (Nielsen *et al.*, 1997; Minchiotti *et al.*, 1999), tiroxina (Petersen *et al.*, 1994) y algunas drogas (Hoang *et al.*, 1999; Arvan *et al.*,

1968; Kragh-Hansen *et al.*, 1990a y b). En efecto, un número elevado de trabajos (Brennan *et al.*, 1990; Arai, *et al.*, 1990; Madison *et al.*, 1991; Minchiotti, *et al.*, 1992; Galliano *et al.*, 1993; Madison *et al.*, 1994; Sakamoto *et al.*, 1995; Minchiotti *et al.*, 1997; Galliano *et al.*, 1998; Brennan, 1998; Chua *et al.*, 1998; Amoresano *et al.*, 1998; Savva *et al.*, 1998; Galliano *et al.*, 1999) proveen conclusiones relevantes desde el punto de vista clínico y biológico. En estos trabajos se realizaron programas experimentales detallados, donde en adición se estudiaron las mutaciones por medio de la determinación de la secuencia de aminoácidos y/o nucleótidos. Para los trabajos mencionados arriba es evidente la importancia de la detección rápida y efectiva de las aloalbúminas.

Con relación a la frecuencia de aparición de estas aloalbúminas, un número creciente de variantes genéticas (Nielsen, *et al.*, 1997) de la HSA y proalbúmina se encontraron en estudios genéticos de población, mediante electroforesis clínica de rutina y *screening* en dadores de sangre (ver, Tabla 4.2.1 en la que se presentan diferentes casos de aloalbuminemia reportados en la literatura). Es evidente que la posibilidad de encontrar una variante de HSA depende del método electroforético que se use. Los *screening* que se realizaron con las técnicas electroforéticas convencionales en acetato de celulosa (Tárnoky, 1980; Sakamoto, *et al.*, 1995) o agarosa (Carlson *et al.*, 1992) indicaron una frecuencia de 1:1000-1:2500 en Europa y en poblaciones de descendencia europea. Sin embargo, Neel *et al.* (1986) examinaron más de 10000 niños en Japón, cuyos padres no habían estado expuestos a las radiaciones de las bombas atómicas en Hiroshima y Nagasaki y reportaron una frecuencia de 1:300-1:400. Estos autores usaron la técnica más sensible de electroforesis vertical en gel de almidón y realizaron corridas a diferentes valores de pH. Se infiere, que debido a la sensibilidad limitada de los métodos que se aplican usualmente, la frecuencia mencionada es menor que la real. En efecto, es posible que las variantes de albúmina sean más frecuentes y podrían tener un impacto biológico mayor que el que se considera hasta el momento.

Por consiguiente, se sugiere la CZE como una técnica de interés para separar las proteínas séricas humanas (Henskens *et al.*, 1998), en reemplazo de la electroforesis en gel de agarosa o en acetato de celulosa. La CZE presenta ventajas debido a que ofrece una rápida separación de los componentes, con buena resolución y el uso de una cantidad de muestra mínima (Chen *et al.*, 1991; Dolnik, 1999; Jenkins *et al.*, 1995; Jenkins y Guerin, 1995). Asimismo, no es necesario el uso de técnicas de coloración y decoloración y permite la cuantificación simultánea sin hacer uso de la densitometría.

**Tabla 4.2.1.** Casos de aloalbuminemia resultantes de la revisión bibliográfica.

Albúmina variante	Mutación	Referencia bibliográfica
Besana Brianza	Asp 494 → Asn	Minchiotti <i>et al.</i> , 1997
Malmö-95	Asp 63 → Asn	Sakamoto <i>et al.</i> , 1995
Paris-2	Asp 563 → Asn	Minchiotti <i>et al.</i> , 1992
Verona B	Asp 563 → Asn	Minchiotti <i>et al.</i> , 1992
Dalakarlia	Asp 63 → Asn	Carlson <i>et al.</i> , 1992
Casebrook	Asp 494 → Asn	Peach y Brennan, 1991
Bergamo	Asp 341 → Gly	Minchiotti <i>et al.</i> , 1997
Niigata	Asp 269 → Gly	Sugita <i>et al.</i> , 1987
Brest	Asp 314 → Val	Minchiotti <i>et al.</i> , 1999
Milano Slow	Asp 375 → His	Galliano <i>et al.</i> , 1998
Parklands	Asp 365 → His	Brennan, 1985
Vibo Valentia	Glu 82 → Lys	Galliano <i>et al.</i> , 1993
Ortonovo	Glu 505 → Lys	Galliano <i>et al.</i> , 1993
Sondrio	Glu 333 → Lys	Minchiotti <i>et al.</i> , 1992
Kashmir	Glu 501 → Lys	Savva <i>et al.</i> , 1990
Torino	Glu 60 → Lys	Galliano, 1990
Porto Alegre II	Glu 501 → Lys	Arai <i>et al.</i> , 1989
Roma	Glu 321 → Lys	Galliano <i>et al.</i> , 1988
Verona	Glu 570 → Lys	Minchiotti <i>et al.</i> , 1987
Fortaleza	Glu 501 → Lys	Brennan <i>et al.</i> , (datos no publicados)
Tregasio	Val 122 → Glu	Minchiotti <i>et al.</i> , 1997
Maddaloni	Val 533 → Met	Minchiotti <i>et al.</i> , 1997
Trieste	Lys 359 → Asn	Galliano <i>et al.</i> , 1998
Caserta	Lys 276 → Asn	Madison <i>et al.</i> , 1994
Tagliacozzo	Lys 313 → Asn	Galliano <i>et al.</i> , 1990
Tradate-2	Lys 225 → Gln	Madison <i>et al.</i> , 1994
Herborn	Lys 240 → Glu	Minchiotti <i>et al.</i> , 1993
Castel di Sangro	Lys 536 → Glu	Minchiotti <i>et al.</i> , 1990
Maku	Lys 541 → Glu	Arai <i>et al.</i> , 1989
Liprizzi	Arg 410 → Cys	Galliano <i>et al.</i> , 1998
Asola	Tyr 140 → Cys	Minchiotti <i>et al.</i> , 1995

**Nota:** En la primer columna se menciona el caso de aloalbuminemia reportado en la bibliografía, que generalmente se designa con el nombre de la localidad de origen. En la segunda columna se describe la mutación que involucra la sustitución de un aminoácido por otro. En la tercer columna se cita la fuente bibliográfica correspondiente.

#### 4.2.2 Motivación del estudio

El aspecto central relevante a la detección de aloalbúminas mediante CZE, es que las variantes de albúmina se buscaron frecuentemente vía electroforesis en acetato de celulosa o gel de agarosa, las cuales tienen típicamente un poder resolutivo menor en el proceso separativo, con una chance importante de que la diferencia de carga efectiva pequeña entre la albúmina normal y la variante no sea suficiente para dar una banda de separación visible. Las ventajas de la CZE para la separación de proteínas séricas se

señalaron en varios trabajos publicados en la literatura (Chen, 1991; Chen *et al.*, 1991; Jenkins y Guerin, 1995; Bossuyt *et al.*, 1998). En adición, recientemente se reportó a través de un estudio experimental que la sensibilidad en la detección de aloalbúminas se puede mejorar sustancialmente cuando se usa la CZE (Jaeggi-Groisman, *et al.*, 2000; Kalambokis *et al.*, 2002). Estos últimos estudios específicos no son abundantes en la literatura, y aún se requieren futuras investigaciones para elucidar las condiciones fisicoquímicas más apropiadas (principalmente pH y fuerza iónica del BGE) que conduzcan a una resolución aceptable en la separación entre la albúmina normal y la variante, así como a una adecuada interpretación teórica de los datos obtenidos. Al presente, existe acuerdo en que el uso de la CZE permitirá el descubrimiento de un número mayor de casos de aloalbuminemia, incrementando así la frecuencia de detección reportada en la literatura (Jaeggi-Groisman *et al.*, 2000). En efecto, las conclusiones de Nielsen *et al.* (1997) en este sentido son relevantes al expresar que sin duda la probabilidad de encontrar una variante de albúmina depende del método electroforético que se use.

A pesar de que el énfasis está puesto en la necesidad de presentar una técnica rápida y eficiente para la detección de aloalbúminas, en esta Tesis se considera, en adición, la incorporación de un modelo apropiado y simple (LLCEM) que es capaz de interpretar los resultados que emergen a partir del electroferograma experimental de la CZE, el cual podría ampliar el objetivo requerido desde el punto de vista experimental.

Por consiguiente, la propuesta de esta sección es aplicar el LLCEM al caso particular de estudio en el cual los analitos son aloalbúminas presentes en el suero humano; y si se acepta la suposición que los radios hidrodinámicos de la albúmina normal y de la variante, en el mismo BGE y bajo el mismo protocolo experimental, son aproximadamente iguales (ver, Kálmán *et al.*, 1995 y Sección 4.1.3 de esta Tesis) es posible estimar numéricamente, el electroferograma de una mutación propuesta. Asimismo, es posible calcular los parámetros fisicoquímicos que sirven para caracterizar a la albúmina normal y a la variante como la carga eléctrica efectiva, el pH cercano a la molécula, el radio hidrodinámico y otros parámetros derivados directamente de éstos. En efecto, primero se aplica el LLCEM propuesto en esta Tesis a dos casos de aloalbuminemia (Sección 4.2.5), detectados en el Hospital de Niños Dr. Orlando Alassia de Santa Fe, en los cuales las imágenes de los electroferogramas experimentales de los sueros mostraron un doble pico de albúmina y, en adición, se observó la ausencia de gamaglobulinas (agamaglobulinemia). De acuerdo con nuestro conocimiento, esta asociación no ha sido reportada previamente en

la literatura. Luego, el sistema teórico y computacional generado se usa para estudiar casos relevantes de aloalbúminas reportados en la literatura (Sección 4.2.6). Esta sección mostrará particularmente que la CZE se puede usar como una herramienta importante para una detección rápida y eficiente de aloalbúminas y en adición, a través del uso de un modelo es posible estimar parámetros fisicoquímicos que permiten caracterizar estas proteínas. Se espera además sugerir una guía aproximada concerniente a las mutaciones probables. Los datos experimentales que se obtienen a partir de un equipo comercial de CE se utilizan para los cálculos numéricos requeridos en el estudio de los casos de aloalbuminemia que se consideran en esta sección de la Tesis.

**Tabla 4.2.2.** Las mutaciones que se consideran en este trabajo se señalan con un rectángulo gris. En esta matriz  $M_{i,j}$ , la primer columna ( $\forall i, j=1$ ) indica los aminoácidos que son sustituidos en la secuencia de la albúmina normal, mientras que la primer línea ( $i=1, \forall j$ ) se refiere al aminoácido sustituido que genera la aloalbúmina. Las mutaciones  $(i,1) \Rightarrow (1,j)$  se indican con un rectángulo gris localizado a través de  $(i,j)$ . Las mutaciones que involucran el cambio de un aminoácido por sí mismo (indicados con x) y aquellos asociados con una sustitución de un aminoácido neutro por otro neutro se excluyen en el código numérico en un primer análisis, debido a que no se espera un cambio en la movilidad electroforética, en la medida que  $a_{H_1} \cong a_{H_2}$ , para cualquier protocolo de la CZE.

	Ala	Val	Leu	Ile	Pro	Phe	Trp	Met	Gly	Ser	Thr	Cys	Tyr	Asn	Gln	Asp	Glu	Lys	Arg	His
Ala	x																			
Val		x																		
Leu			x																	
Ile				x																
Pro					x															
Phe						x														
Trp							x													
Met								x												
Gly									x											
Ser										x										
Thr											x									
Cys												x								
Tyr													x							
Asn														x						
Gln															x					
Asp																x				
Glu																	x			
Lys																		x		
Arg																			x	
His																				x

En primer lugar, se proponen las mutaciones que podrían ocurrir (desde el punto de vista probabilístico, sin entrar en el análisis del código genético), haciendo uso de un sistema matricial que involucra a los 20 aminoácidos que se encuentran presentes en la molécula de HSA (ver Tabla 4.2.2). No se consideran en el estudio aquellas mutaciones que involucran el cambio de un aminoácido neutro por otro neutro, que en principio no darían lugar a una diferencia apreciable en la movilidad electroforética. Sin embargo, es pertinente señalar que si se considera el fenómeno de regulación de cargas es posible observar en la mutación de un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro distinto, una diferencia pequeña en las cargas, acoplada a la diferencia en los radios hidrodinámicos y consecuentemente una diferencia en las movilidades electroforéticas (ver Tabla 4.1.13 y la discusión relacionada con este aspecto en la Sección 4.1). Para simplificar el análisis tampoco se contempla el uso del PLLCEM que incluiría, por ejemplo, las interacciones entre los grupos cargados, además de las otras hipótesis que lo componen. En el Apéndice del Capítulo 3 se presentó una tabla con los símbolos de tres letras y una letra que se usan habitualmente para referirse a los aminoácidos (Lehninger, 1978) y que sirve para la lectura de esta sección (ver Apéndice 3-A).

#### **4.2.3 Consideraciones para la aplicación del LLCCEM a la detección de aloalbúminas**

Con el propósito de aplicar el LLCCEM (descrito en la Sección 4.1) a la detección de aloalbúminas, se introduce aquí la siguiente convención con respecto a la designación de los analitos. Así,  $i$  toma valores de 0 para un marcador neutro (marcador de EOF), 1 para la albúmina normal y 2 para cualquier aloalbúmina generada por una mutación específica, es decir,  $i = 0, 1, 2$ . En términos generales, en las determinaciones electroforéticas sobre soportes como la agarosa o el acetato de celulosa, la velocidad electroforética de una aloalbúmina que involucra una mutación con un cambio en la carga efectiva puede ser más rápida (conferido por una carga neta negativa mayor) o más lenta (conferido por una carga negativa menor) que aquella de la albúmina normal. Sin embargo, en la CZE se designan con la propiedad opuesta (debido a la magnitud del EOF), es decir nos referimos como más lenta (carga neta negativa mayor) o más rápida (carga neta negativa menor) cuando la detección se realiza mediante la CZE. En los casos clínicos que se estudian aquí, las albúminas tienen carga neta negativa a pH alrededor de 9.7 para el protocolo experimental usado que se describe más abajo, y la migración efectiva en el capilar de sílice está dominada por el EOF hacia el electrodo negativo. Por consiguiente,

cuanto mayor es el número de carga neta negativa, más lenta resulta la migración electroforética hacia el electrodo negativo.

Es pertinente describir dos simulaciones (Simulación I y II) que son necesarias para estudiar la detección de aloalbúminas y que se basan en el LLCCEM (modelo extendido discutido en la Sección 4.1 y que se obtuvo a partir del modelo básico de la CZE, presentado en el Capítulo 2). Antes de describir cada una, se mencionan los objetivos que se desean lograr. Para un protocolo específico de la CZE, la Simulación I usa como dato principal el tiempo de migración  $t_{m1}$  de la fracción albúmina normal que se obtiene directamente del pico correspondiente en el electroferograma experimental del suero bajo estudio (se necesitan corridas previas de sueros normales bajo el mismo protocolo para poder identificarlo). De esta manera se obtiene como resultado el radio hidrodinámico  $a_{H1}$  y la carga efectiva  $Q_1 = eZ_1$  de la albúmina normal. Es claro que para el cálculo de la carga efectiva, se debe conocer la secuencia de aminoácidos como se analiza más adelante. Siguiendo con el procedimiento, se usa el tiempo de migración experimental  $t_{m2}$  correspondiente a la aloalbúmina (albúmina variante en la cual se desconoce la mutación involucrada), para evaluar la carga efectiva  $Q_2 = eZ_2$ , suponiendo que ambas proteínas tienen un radio hidrodinámico casi idéntico  $a_{H1} \cong a_{H2}$ , como una primera aproximación en esta sección (ver también, Kálmán *et al.*, 1995). Consecuentemente, con estos resultados la diferencia de carga entre la albúmina variante y la normal  $\Delta Q = (Z_2 - Z_1)e$ , se encuentra fácilmente, siendo  $\Delta Q$  positiva cuando la aloalbúmina es más rápida que la albúmina normal y negativa para la situación que se la califica como más lenta.

La Simulación II utiliza la información que se obtiene en la Simulación I para investigar la mutación probable del aminoácido que dio lugar a la aloalbuminemia en la muestra de suero bajo estudio. Con este propósito, se introducen en la secuencia de aminoácidos conocida de la albúmina normal todas las mutaciones posibles que darían lugar a un cambio en la carga efectiva. Es claro que la magnitud de  $\Delta Q$  es indicativo del tipo de mutación involucrada. De acuerdo con la Tabla 4.2.2 existen 224 mutaciones posibles (señaladas con los rectángulos grises). Por consiguiente, el proceso se lleva a cabo hasta que  $\Delta\hat{Q}$  y el tiempo de migración  $\hat{t}_{m2}$  son lo suficientemente próximos a los valores que se obtuvieron en la Simulación I. El sombrero sobre cualquier símbolo indica que el valor obtenido con el código numérico corresponde a una mutación particular. En

consecuencia, a través de estos cálculos que se obtienen a partir de un modelo simple (LLCEM), es posible descartar las mutaciones improbables y sugerir las mutaciones probables, que por supuesto, se deberán luego confirmar con el programa experimental más complejo que se señala en la literatura (Madison *et al.*, 1991; Minchiotti *et al.*, 1999). Los dos procedimientos numéricos que se mencionaron arriba se describen a continuación. Cabe aclarar que para esta aplicación se usa el LLCEM partiendo de las variables más primitivas del electroferograma como son los tiempos de migración y teniendo en cuenta en este caso la presencia del EOF.

### ***Diseño de cálculos para la Simulación I***

Para los cálculos que se necesitan en esta parte, el grupo  $\Theta$  de parámetros fijos y las variables del protocolo que se expresan (ver su descripción en la Lista de Símbolos),

$$\Theta = \left\{ R, L_t, L_d, h, E, \Delta p, T, \eta, \text{pH}, I, n_i^b, N_A, \varepsilon, k_B, e, \kappa, K_S, C_{in}, n_S, N_m, N_n, t_{in}, t_{m1} \right\}$$

se especifican dentro del contexto del modelo básico de la CZE, y se definen a través de las ecuaciones descriptas en el Capítulo 2. En consecuencia el potencial zeta del capilar se obtiene con la ecuación implícita Ec. (2.3.10) usando el método numérico de Newton-Raphson para encontrar la raíz de  $\zeta_t$ , que es necesaria para evaluar el EOF (ver Sección 2.3 en el Capítulo 2 y Berli *et al.*, 2003). Otra alternativa para evaluar el potencial zeta del capilar es usar directamente la expresión (ver Sección 2.2, Capítulo 2),

$$v_{eo} = -\frac{E \varepsilon \zeta_t}{\eta} \quad (4.2.1)$$

cuando se dispone del tiempo de migración de un marcador neutro de EOF (por ejemplo, DMSO). Otro cálculo relevante es la valencia efectiva de la albúmina normal  $Z_1$  en función del  $\text{pH}_1^*$ , que se obtiene siguiendo los lineamientos descriptos en la Sección 4.1 y con la ecuación resultante,

$$z_1(\text{pH}_1^*) = -\sum_{m=1}^4 \frac{N_m}{1 + 10^{(\text{pK}_m^r - \text{pH}_1^*)}} + \sum_{n=1}^3 \frac{N_n}{1 + 10^{-(\text{pK}_n^r - \text{pH}_1^*)}} + \frac{1}{1 + 10^{-(\text{pK}_{\text{NH}_3}^r - \text{pH}_1^*)}} - \frac{1}{1 + 10^{(\text{pK}_{\text{COOH}}^r - \text{pH}_1^*)}} \quad (4.2.2)$$

donde  $N_m$  se refiere a los grupos ionizables de los residuos ácidos (Asp, Glu, Cys y Tyr) y  $N_n$  se utiliza para los residuos básicos (His, Arg y Lys). En la Tabla 4.1.14 (ver Sección 4.1) se reportaron el número de residuos de los aminoácidos ionizables presentes en la HSA (código en el PDB: 1AO6) y los valores aproximados de los  $\text{pK}_i^r$ , que se toman

iguales a los  $pK_i^\circ$  (Nelson y Cox, 2001) en esta aplicación. Se observa que el pH cercano a la molécula (albúmina normal)  $pH_1^*$ , no se conoce y se debe estimar, a partir de la distribución de la concentración de protones de Boltzmann (ver Apéndice 4-A) según,

$$pH_1^* = pH + 0.43429 \frac{e\zeta_1}{k_B T} \quad (4.2.3)$$

En consecuencia, con la ecuación que define el potencial de la partícula (aproximación del campo promedio)  $\zeta_i = \frac{Q_i}{4\pi\epsilon a_i(1+\kappa a_i)}$  y la Ec. (4.2.2) se encuentra,

$$\zeta_1 = \frac{e Z_1(pH_1^*)}{4\pi\epsilon a_{H_1}(1+\kappa a_{H_1})} \quad (4.2.4)$$

donde  $\zeta_1 = \frac{3}{2}(\zeta_1^E + \zeta_t)/f(\kappa a_{H_1})$  y  $\zeta_1^E = \frac{\eta(L_d - h)}{E\epsilon t_{m1}}$  es el potencial eléctrico efectivo de

la partícula teniendo en cuenta la migración electroforética (ver Ec. (2.4.5) en la Sección 2.4 del Capítulo 2) y el EOF (ver también Ec. (4.2.5), más abajo). Esta última expresión se calcula directamente a partir del dato experimental del  $t_{m1}$ . Aquí, la longitud de detección  $L_d$  se corrige por la variación  $h$  que corresponde a la mitad de la longitud total del tapón de la muestra de suero que se inyecta inicialmente en el capilar.

En efecto, resolviendo el sistema de ecuaciones acopladas compuesto por las Ecs. (4.2.2), (4.2.3) y (4.2.4) se estima el valor de  $a_{H_1}$ , como se indicó arriba. Así, en esta etapa del análisis se obtienen con más cálculos los resultados electrocinéticos para la albúmina normal:  $Z_1$ ,  $pH_1^*$ ,  $\zeta_1$  y  $Q_1 = eZ_1$ . En consecuencia, la velocidad electroforética efectiva  $v_1^E = (l_d - h)/t_{m1}$  de la albúmina normal se encuentra fácilmente a partir de las Ecs. (4.2.1), (2.4.5) y (4.2.4),

$$v_1^E = \frac{EZ_1ef(\kappa a_{H_1})}{6\pi\eta a_{H_1}(1+\kappa a_{H_1})} - \frac{E\epsilon\zeta_t}{\eta} = \frac{E\epsilon\zeta_1^E}{\eta} \quad (4.2.5)$$

El procedimiento para la Simulación I se completa con la estimación de la carga efectiva de la aloalbúmina  $Q_2 = eZ_2$ . Por consiguiente, la velocidad correspondiente a la

aloalbúmina  $v_2 = (L_d - h)\left(\frac{1}{t_{m2}} - \frac{1}{t_{mo}}\right) = v_2^E - v_{eo}$  se evalúa con el dato experimental  $t_{m2}$

y el tiempo de migración  $t_{mo} = -\frac{\eta(L_d - h)}{E\varepsilon\zeta_t}$  asociado con el EOF y la ecuación que relaciona el potencial de tubo con la velocidad electroosmótica, y con ayuda de las Ecs (4.2.1), (2.4.5) y (4.2.4), se encuentra,

$$Z_2 = (L_d - h) \left( \frac{1}{t_{m2}} - \frac{1}{t_{mo}} \right) \frac{6\pi\eta a_{H_2} (1 + \kappa a_{H_2})}{eEf(\kappa a_{H_2})} \quad (4.2.6)$$

bajo la suposición que  $a_{H_2} \cong a_{H_1}$  como una primera aproximación (ver, Kálmán *et al.*, 1995a y b, para más detalles que justifican esta suposición).

### ***Diseño de cálculos para la Simulación II***

Para los cálculos que se necesitan en esta parte se define un grupo de parámetros modificados  $\Theta$ , donde el sombrero sobre los símbolos se usa para indicar aquellas variables que cambiaron debido a la mutación. En consecuencia, se expresa,

$$\Theta = \left\{ R, L, L_d, h, E, \Delta p, T, \eta, \text{pH}, I, n_i^b, N_A, \varepsilon, k_B, e, \kappa, K_S, C_{in}, n_S, \hat{N}_m, \hat{N}_n, t_{in} \right\}$$

donde  $\hat{N}_m$  y  $\hat{N}_n$  indican el número de grupos residuales de los aminoácidos en una aloalbúmina particular (ver Tabla 4.2.2 en la cual se indican las mutaciones probables que se analizan aquí y que involucran un cambio en la carga efectiva). El tiempo de migración  $\hat{t}_{m2}$  de la albúmina variante no se incluye en este grupo  $\Theta$  porque se desconoce y se debe determinar, como se indica más abajo. Consecuentemente, se tiene nuevamente un sistema de ecuaciones algebraicas como en la Simulación I, pero ahora se desconoce el pH cercano a la molécula (albúmina variante), es decir,  $\hat{\text{pH}}_2^*$ . En efecto, resolviendo el sistema de Ecs. (4.2.2), (4.2.3) y (4.2.4) con  $i=2$ ,  $\hat{N}_m$ ,  $\hat{N}_n$  y  $\hat{a}_{H_2} \cong a_{H_2}$ , se obtiene el valor del  $\hat{\text{pH}}_2^*$ . Luego este valor permite estimar los siguientes parámetros electrocinéticos para la aloalbúmina:  $\hat{Z}_2$ ,  $\hat{\zeta}_2$ ,  $\hat{Q}_2 = e\hat{Z}_2$ , y  $\hat{v}_2^E$ . En adición, el  $\hat{t}_{m2}$  que se desconoce se encuentra fácilmente a partir de,

$$\hat{t}_{m2} = \frac{L_d - h}{\frac{\hat{Z}_2 e E f(\kappa \hat{a}_{H_2})}{6\pi \eta \hat{a}_{H_2} (1 + \kappa \hat{a}_{H_2})} - \frac{\varepsilon \zeta_t E}{\eta}} \quad (4.2.7)$$

que se obtiene con la Ec (4.2.4) y la sustitución del subíndice 2 por 1. La Ec. (4.2.7) es útil para estimar el tiempo de migración de mutaciones particulares. Consecuentemente, para

sugerir las mutaciones probables compatibles con los resultados de la Simulación I, se deben realizar las siguientes comparaciones:  $\Delta Z = Z_2 - Z_1$  con  $\Delta \bar{Z} = \bar{Z}_2 - Z_1$  y  $t_{m2}$  con  $\hat{t}_{m2}$ . Cuanto más próximo es  $\Delta Z$  a  $\Delta \bar{Z}$  y  $t_{m2}$  a  $\hat{t}_{m2}$ , aumenta la probabilidad que las mutaciones bajo análisis correspondan a la aloalbúmina detectada en la corrida de la CZE. Por supuesto, esta aplicación del LLCCEM solo tiene como objeto ilustrar con ciertas aproximaciones las capacidades del modelo, pero no intenta reemplazar los programas experimentales que son necesarios para definir una mutación.

#### 4.2.4 Protocolo experimental

Para la CZE las muestras de suero se diluyen 20 veces en PBS (solución salina de fosfatos 0.02 M, NaCl 0.15 M, pH = 7.4). Se usa un equipo Beckman P/ACE 5010 con un capilar de sílice fundida ( $d_i = 50 \mu\text{m}$ ,  $L_t = 27 \text{ cm}$  y  $L_d = 20 \text{ cm}$ ). Las muestras diluidas se introducen en el capilar por presión (0.5 psi) durante 4 segundos. El BGE que se usa es borato (pH = 9.72 y  $I = 120 \text{ mM}$ ) y el sistema está termostaticado a 20 °C. El voltaje que se aplica es 12 kV durante 6 minutos (se observa una intensidad de corriente de 56  $\mu\text{Amp}$ ). La detección se realiza a 200 nm. Las condiciones del ensayo de la CZE que se usan en este estudio son ligeramente diferentes de aquellas que reportan otros autores (ver, por ejemplo, Henskens *et al.*, 1998). Entre cada corrida, el capilar se lava y reacondiciona durante 1 minuto con NaOH 1 M, 1 minuto con agua bidestilada y luego 1 minuto con el BGE.

Los resultados señalan que la composición del BGE es de crucial importancia en la separación. La fuerza iónica y el pH del buffer tienen gran influencia en la optimización del electroferograma (Jenkins y Guerin, 1995). En este trabajo estos parámetros se ajustaron con el fin de lograr una óptima separación entre la albúmina normal y la variante. En efecto, no es posible sugerir un BGE estándar que sea capaz de detectar todas las variantes posibles. En general, dependiendo del tipo de aloalbúmina en estudio, el pH y la  $I$  del BGE se deben ajustar apropiadamente dentro del rango de valores reportado aquí para lograr la mejor resolución en el electroferograma.

#### 4.2.5 Presentación de dos casos clínicos de aloalbuminemia

Se reseñan brevemente los dos casos clínicos evaluados en el Hospital de Niños Dr. O. Alassia y que motivaron el presente estudio con relación a la detección de aloalbúminas en suero mediante la CZE.

##### *Caso clínico 1*

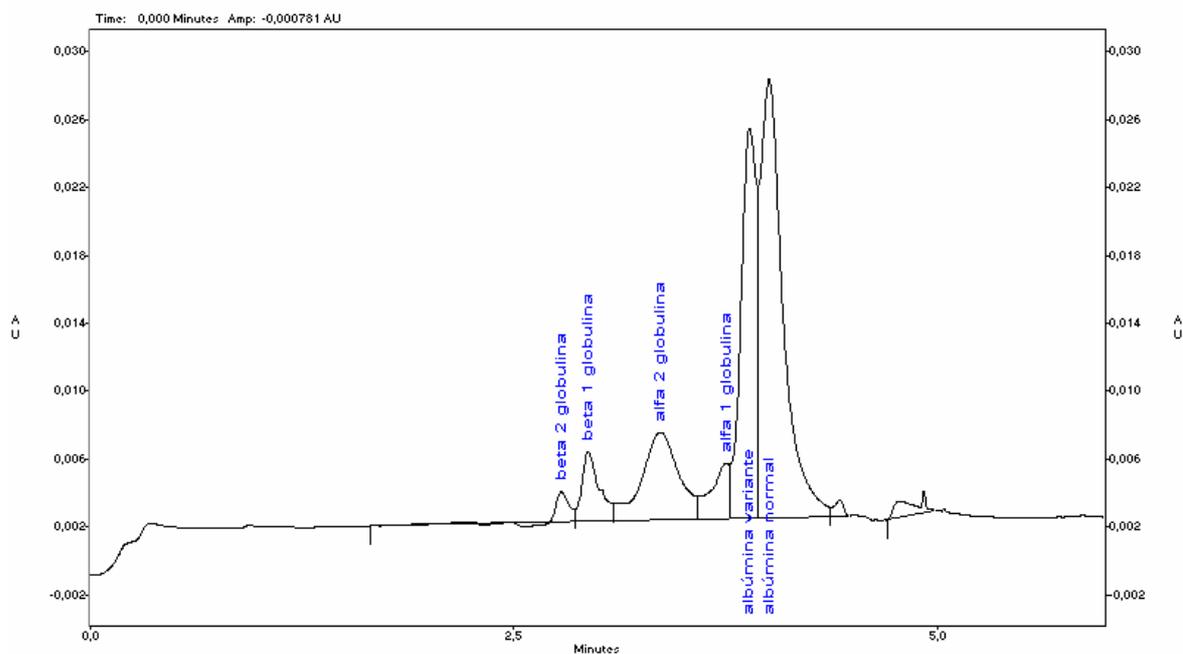
Niño de cinco años con periódicas admisiones en el hospital por infecciones recurrentes. Los datos de laboratorio relacionados con el tema en estudio muestran una concentración de proteínas totales en suero igual a 5.5 g % y de albúmina igual a 4.26 g %. El proteinograma electroforético realizado por la técnica tradicional en acetato de celulosa muestra ausencia de la fracción gamaglobulinas (ver Figura 4.2.1.a). Con el fin de facilitar la interpretación del mismo se presenta en la Figura 4.2.1.b una imagen electroforética normal. El electroferograma de la CZE con el protocolo que se especificó arriba, confirma la ausencia de gamaglobulinas y señala además un doble pico de albúmina característico de la aloalbuminemia que se muestra en la Figura 4.2.2.a. El análisis de las áreas de picos establece que la albúmina normal y la variante se encuentran presentes en el suero en cantidades casi equivalentes, como se indica en la Tabla 4.2.3. El perfil normal de las proteínas del suero que se obtiene en la CZE se presenta en la Figura 4.2.2.b.



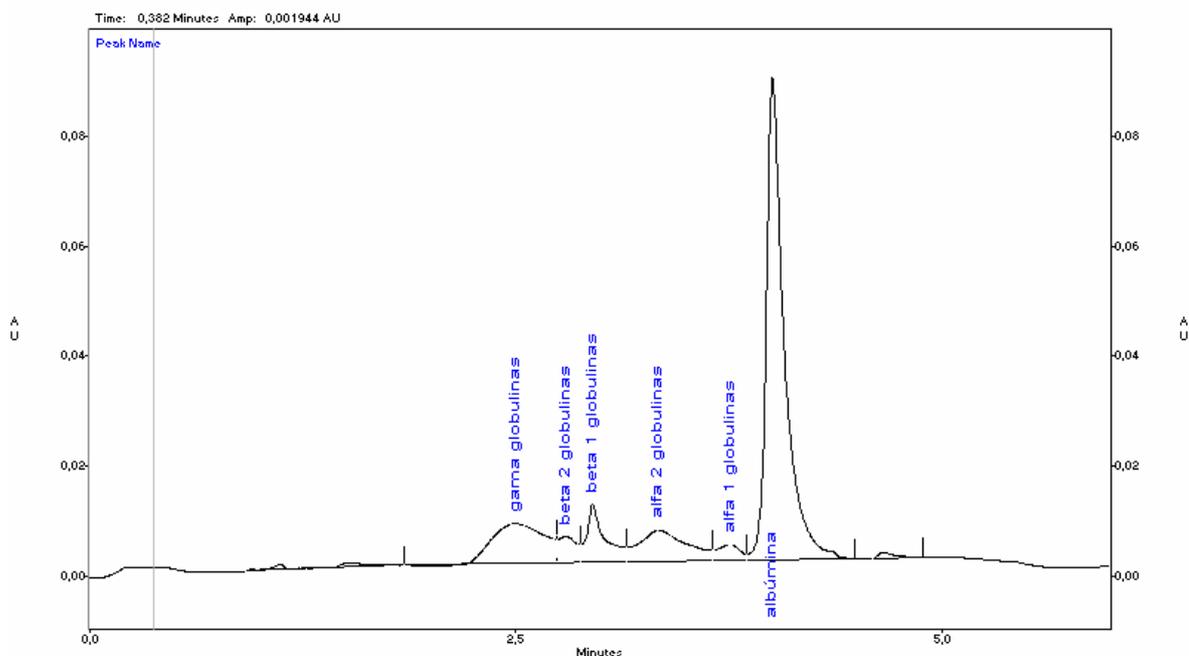
**Figura 4.2.1.a.** Imagen de la separación de las proteínas del suero (caso clínico 1) en acetato de celulosa en la que no se evidencia la condición de aloalbuminemia que se observa en el electroferograma de la CZE.



**Figura 4.2.1.b.** Imagen electroforética normal correspondiente a la separación de las proteínas del suero humano en acetato de celulosa.



**Figura 4.2.2.a.** Electroferograma de la CZE que muestra el doble pico de albúmina (caso clínico 1) característico de la condición de aloalbuminemia y ausencia de la fracción gamaglobulina. La letra AU en la ordenada indica absorbancia mientras que el tiempo de migración se reporta en minutos en la abscisa.



**Figura 4.2.2.b.** Electroferograma normal de una muestra de suero humano obtenido mediante CZE. La letra AU en la ordenada indica absorbancia mientras que el tiempo de migración se reporta en minutos en la abscisa.

## ***Caso clínico 2***

Niño de dos años, hermano del anterior, que concurre a la consulta para ser evaluado clínicamente. Los análisis de laboratorio señalan una concentración de proteínas totales en suero igual a 6.65 g % y albúmina igual a 3.82 g %. Las imágenes del proteinograma electroforético y del electroferograma de la CZE son idénticas a las del caso clínico 1. En consecuencia, para este caso en estudio también se confirma la presencia de aloalbúminas en el suero. Es apropiado señalar que estas aloalbúminas no se detectaron usando la técnica convencional en acetato de celulosa. Asimismo, es pertinente mencionar que la aloalbuminemia se mantuvo en el tiempo. En tres estudios separados en el tiempo con una diferencia de 3 meses se obtuvieron electroferogramas idénticos. Es importante señalar también que los pacientes no estaban bajo tratamiento con antibióticos al realizar los ensayos, de lo cual se infiere que los casos se corresponden con un defecto genético y se descarta la posibilidad de una aloalbuminemia transitoria.

Evaluando los resultados presentados arriba, es concluyente que la técnica de rutina que se usa para evaluar las proteínas del suero (proteinograma por electroforesis en acetato de celulosa) no reveló la presencia de aloalbúminas cuando se analizaron las muestras correspondientes a estos dos casos clínicos. Por el contrario, en la imagen obtenida por CZE es evidente esta condición. Por consiguiente, se puede decir que la selección del método electroforético es decisiva para el diagnóstico de aloalbuminemia. En consecuencia, se sugiere que el uso regular de la CZE para el análisis de las proteínas séricas en los laboratorios clínicos permitiría aumentar la frecuencia de detección de los casos de aloalbuminemia.

### **4.2.6 Evaluación de los resultados que surgen del LLCCEM**

A continuación se aplica la Simulación I usando el dato experimental  $t_{m1}$  que se obtiene a partir del electroferograma correspondiente al caso clínico 1 en estudio. Los resultados se reportan en la Tabla 4.2.3. Se encuentra a través del código numérico que  $a_{H_1} = 31.48 \text{ \AA}$ ;  $\zeta_1 = -0.027 \text{ V}$ ;  $\zeta_t = -0.047 \text{ V}$ ;  $v_1^E = 8.211 \cdot 10^{-4} \text{ m/s}$  y  $\text{pH}_1^* = 9.26$ . Por consiguiente, con la Ec. (4.2.4) y el valor experimental  $t_{m2}$  se calcula la diferencia del número de carga neta  $\Delta Z = Z_2 - Z_1 = 0.87$  (la aloalbúmina es más rápida que la albúmina normal), el cual es el valor de referencia que se usa en la Simulación II.

Como primera aproximación, con la suposición que  $a_{H_2} \cong a_{H_1}$ , la simulación II se usa para buscar las mutaciones probables y descartar las que no podrían estar presentes en el caso bajo estudio. Se estudian todas las mutaciones señaladas con un rectángulo gris en la Tabla 4.2.2. Aquí, para ilustrar las capacidades del LLCCEM se seleccionan 30 mutaciones representativas, que se muestran en la Tabla 4.2.4. Así, esta tabla presenta en las posiciones 1 a 8 las mutaciones designadas rápidas (se indican con la letra F) que dan una diferencia del número de carga neta próximo al valor de referencia que se encontró en la Simulación I (Tabla 4.2.3). Para este propósito específico se descartan las variantes lentas (señaladas con la letra S) y se centra la atención únicamente en las ocho variantes rápidas referidas arriba teniendo en cuenta que se espera  $\Delta\bar{Z} > 0$ . Consecuentemente, en principio, las variantes señaladas en las posiciones 1 a 8 se podrían proponer como las mutaciones probables en el contexto de estos cálculos y con las aproximaciones mencionadas, para ser confirmadas posteriormente con las técnicas experimentales convencionales. Sin embargo, las mutaciones indicadas en las posiciones 1, 2, 6 y 7 se descartan teniendo en cuenta la lectura del código genético y la existencia de una mutación puntual (por ejemplo, Tyr (UAU)  $\rightarrow$  Lys (AAA)), reduciéndose así el número de mutaciones probables. Para las mutaciones que se reportan en la Tabla 4.2.4, se observa también que el  $\text{pH}^*$  toma valores entre 9.22 y 9.29 y el que corresponde para la albúmina normal es 9.26, mientras que el de las variantes más probables están alrededor de 9.27. Estos resultados son consistentes con la Ec. (4.2.2) en el sentido que la diferencia de  $\text{pH}^*$  entre la albúmina normal y la variante es proporcional al valor de  $\Delta Z$ .

**Tabla 4.2.3.** Tiempos de migración experimentales que se obtienen a partir del electroferograma de la CZE y resultados que surgen del código numérico para la albúmina normal y la variante correspondiente al caso clínico 1 de aloalbuminemia que se estudia en este trabajo.

Analito	Tiempo de migración $t_{mi}$ (min)	Número de carga neta $Z_i$	Diferencia en el número de carga neta $\Delta Z = Z_2 - Z_1$	% de cada fracción de albúmina en el suero
Albúmina Normal (1)	4.02	- 21.58	0.0	55
Albúmina Variante (2)	3.90	- 20.71	+0.87	45

**Tabla 4.2.4.** Resultados numéricos que se obtienen con el LLCCEM y el código numérico que involucra un grupo seleccionado de mutaciones de la Tabla 4.2.1 y que se discuten en el texto. El radio hidrodinámico de la albúmina normal para el protocolo especificado en la Sección 4.2.4 es  $a_1 = 31.48 \text{ \AA}$ . F y S indican si la aloalbúmina es más rápida o más lenta, respectivamente, que la albúmina normal en la corrida de la CZE bajo consideración. El número de carga neta de la albúmina normal para el protocolo usado es  $Z_1 = -21.58$ .

	Mutaciones bajo análisis	Tiempo de migración $\hat{t}_{m2}$ (min)	Número de carga neta $\bar{Z}_2$	Diferencia del número de carga neta $\Delta Z$	Potencial zeta de la partícula $\hat{\zeta}_2$ (V)	Velocidad efectiva en la CZE $\hat{v}_2^E$ ( $10^4 \text{ m/s}$ )	$\hat{p}H_2^*$
1	Tyr → Lys (F)	3.902	-20.72	+0.86	-0.026	8.46	9.27
2	Tyr → Arg (F)	3.895	-20.68	+0.90	-0.026	8.48	9.27
3	Asp → Gly (F)	3.909	-20.78	+0.80	-0.026	8.44	9.27
4	Glu → Gly (F)	3.909	-20.78	+0.80	-0.026	8.44	9.27
5	Asp → His(F)	3.909	-20.78	+0.80	-0.026	8.44	9.27
6	Glu → His (F)	3.909	-20.78	+0.80	-0.026	8.44	9.27
7	Val → Arg (F)	3.909	-20.78	+0.80	-0.026	8.44	9.27
8	His → Arg (F)	3.909	-20.79	+0.79	-0.026	8.44	9.27
9	His → Val	4.020	-21.58	0.00	-0.027	8.21	9.26
10	Val → His	4.020	-21.58	0.00	-0.027	8.21	9.26
11	Lys → Arg (F)	4.014	-21.54	+0.04	-0.027	8.22	9.26
12	Arg → Lys (S)	4.025	-21.62	-0.04	-0.027	8.19	9.25
13	Cys → Asp (S)	4.032	-21.66	-0.08	-0.027	8.19	9.25
14	Asp → Cys (F)	4.008	-21.49	+0.09	-0.027	8.24	9.26
15	Val → Tyr (S)	4.035	-21.68	-0.10	-0.027	8.18	9.25
16	His → Tyr (S)	4.035	-21.68	-0.10	-0.027	8.18	9.25
17	Tyr → Val (F)	4.005	-21.47	+0.11	-0.027	8.24	9.26
18	Tyr → His (F)	4.005	-21.47	+0.11	-0.027	8.24	9.26
19	Asp → Lys (F)	3.811	-20.04	+1.54	-0.025	8.66	9.29
20	Cys → Lys (F)	3.821	-20.12	+1.46	-0.025	8.64	9.29
21	Cys → Val (F)	3.920	-20.87	+0.71	-0.026	8.42	9.27
22	Cys → Tyr (F)	3.935	-20.97	+0.61	-0.026	8.39	9.27
23	Arg → Asp (S)	4.263	-23.17	-1.59	-0.029	7.74	9.22
24	Lys → Cys (S)	4.242	-23.04	-1.46	-0.029	7.78	9.22
25	Lys → Tyr (S)	4.147	-22.44	-0.86	-0.028	7.96	9.24
26	Val → Asp (S)	4.137	-22.37	-0.79	-0.028	7.98	9.24
27	Lys → His (S)	4.131	-22.33	-0.75	-0.028	7.99	9.24
28	His → Cys (S)	4.124	-22.29	-0.71	-0.028	8.00	9.24
29	Val → Cys (S)	4.124	-22.28	-0.70	-0.028	8.00	9.24
30	Tyr → Cys (S)	4.109	-22.18	-0.60	-0.028	8.03	9.24

Asimismo, es interesante el resultado que se surge a partir del análisis de la Tabla 4.2.4 que indica que las mutaciones que se estudiaron con el modelo y el código numérico

conducen a un cambio en la carga efectiva que no necesariamente es un número entero (como se reporta en la bibliografía sobre el tema), sino un valor decimal comprendido entre  $\pm 1$  y  $\pm 2$ . Este aspecto es consistente con el hecho que el número de carga efectiva de las proteínas dependen del equilibrio que se alcanza entre los grupos residuales de los aminoácidos ácidos y básicos al  $\text{pH}^*$ . En la Tabla 4.2.4 las mutaciones indicadas en las posiciones 19 a 30 ilustran estos aspectos relevantes. En adición, en la misma tabla, en las posiciones 9 a 18, se presentan varias mutaciones con el fin de ilustrar la importancia de la formulación adecuada del BGE en la detección de aloalbúminas. En efecto, estas mutaciones con  $\Delta Z = Z_2 - Z_1 \approx 0$ , indican claramente la necesidad de reformular el protocolo (redefinir el  $\text{pH}$  y/o la fuerza iónica) propuestos en la Sección 4.2.4, si estas aloalbúminas deberían ser detectadas por la CZE.

Es relevante señalar que el electroferograma de la CZE junto con un modelo simple como el que se aplica en esta sección permiten la determinación de los parámetros fisicoquímicos que caracterizan a la albúmina normal y a la variante y brinda la posibilidad de sugerir con cierta aproximación las mutaciones probables o al menos descartar las improbables en un caso de alobuminemia específico bajo estudio. Esta motivación para asistir al programa experimental convencional en la detección y caracterización de aloalbúminas también fue reportado en la literatura (Amoresano *et al.*, 1998) usando técnicas de espectrometría de masa, principalmente para aquellos casos que involucran cambios en el pro-péptido de la molécula de albúmina donde los cambios de peso molecular son evidentes.

#### **4.2.7 Extensión de las predicciones del modelo a otros casos de aloalbúminas**

El propósito de esta sección es analizar brevemente las predicciones del LLCCEM si se aplica a varios casos interesantes de aloalbúminas reportados en la literatura. Se espera encontrar consistencia con las predicciones numéricas del modelo para cada caso, y también lograr, a través de los resultados numéricos, comprensión fisicoquímica adicional de fenómenos no explicados previamente en la literatura. Con este fin, se preparó la Tabla 4.2.5 que incluye seis casos de mutaciones, donde los resultados previos que se obtuvieron con la técnica de electroforesis en acetato de celulosa (ACE) a  $\text{pH} = 8.6$ , se comparan con aquellos que surgen de la aplicación del LLCCEM a  $\text{pH} = 9.72$  ( $\text{pH}^*$  comprendido entre 9.22 y 9.29).

### Caso I.

La mutación His3→Tyr provoca una aloalbúmina determinada vía ACE inexplicablemente más lenta (S) que la albúmina normal (Madison *et al.*, 1994). No obstante, con la aplicación del LLCCEM se encuentra consistencia con el resultado esperado para esta técnica, en el sentido que la variante resulta más lenta (S). Se debe recordar que las migraciones de las aloalbúminas en ACE y CZE tienen la calificación opuesta con relación a S o F, para un caso particular, como se describió arriba. En base a los cálculos, para este caso en estudio, a los pH indicados en la Tabla 4.2.5, no se obtiene una buena resolución del electroferograma porque la diferencia de carga efectiva es muy pequeña, así  $\Delta\bar{Z} = -0.10$ . En efecto, se espera que His y Tyr estén casi neutros a los pH de ambos estudios. Por lo tanto se requiere trabajar a otro pH para evitar los valores de  $\Delta\bar{Z} \rightarrow 0$ .

**Tabla 4.2.5.** Casos de aloalbuminemia reportados en la literatura y seleccionados para el estudio con el LLCCEM y el código numérico presentado en esta Tesis. F y S indican que la aloalbúmina es más rápida o más lenta que la albúmina normal, respectivamente. ACE se refiere a la electroforesis en acetato de celulosa a pH = 8.6. La CZE es a pH = 9.72.

Caso	Mutación y Referencia	ACE		CZE		
		$\Delta Z$	Movilidad	$\Delta\bar{Z}$	Movilidad	pH*
I	Albúmina Larino His3→Tyr (Madison <i>et al.</i> , 1994)	(*)	S	- 0.10	S	9.25
II	Albúmina Tradate-2 Lys225→Gln (Madison <i>et al.</i> , 1994)	- 1	F	- 0.76	S	9.24
III	Albúmina Ortonovo Glu505→Lys (Galliano <i>et al.</i> , 1993)	+ 2	S	+ 1.54	F	9.29
IV	Albúmina Milano Fast Lys573→Glu (Arai <i>et al.</i> , 1990)	- 2	F	- 1.56	S	9.22
V	Albúmina Paris – 2 Asp563→Asn (Minchiotti <i>et al.</i> , 1992)	+ 1	S	+ 0.79	F	9.27
VI	Albúmina Sondrio Glu333→Lys (Minchiotti <i>et al.</i> , 1992)	+ 2	S	+ 1.54	F	9.29

(\*) Dato no reportado.

### **Caso II.**

La ACE y las predicciones de la CZE son consistentes con respecto al comportamiento F o S, respectivamente, de la aloalbúmina generada con la mutación Lys225→Gln. Se observa que el código numérico del modelo de la CZE estima un cambio del número de carga efectiva comprendido como se espera entre 0 y -1, pero no es necesariamente un número entero, dependiendo este resultado del  $\text{pH}^*$ , es decir del fenómeno de regulación de cargas que incluye el modelo en su propuesta.

### **Caso III.**

La ACE indica que la aloalbúmina (mutación Glu505→Lys) es S, consistente con el hecho que la variante tiene dos cargas positivas adicionales como máximo a un pH relativamente alto. Así en la ACE, esta variante migra hacia el electrodo positivo más lentamente que la albúmina normal. Este resultado se correlaciona con el obtenido en la CZE donde la variante es F y  $\Delta\hat{Z} = +1.54$  (valor comprendido entre +1 y +2 como se espera), permitiendo que la aloalbúmina migre más rápido hacia el detector ubicado cercano al electrodo negativo. Así, una vez más el cambio del número de carga efectiva no es un número entero, debido a que depende del  $\text{pH}^*$ .

### **Caso IV.**

Este caso es el opuesto al caso III. Aquí el cambio del número de carga efectiva está comprendido entre -2 y -1. En adición, se encuentra consistencia entre los resultados de la ACE y la CZE, en relación al tipo de movilidad (F o S).

### **Casos V y VI.**

Las aloalbúminas asociadas con los casos V y VI (mutaciones Asp563→Asn y Glu333→Lys, respectivamente) exhiben idéntica movilidad electroforética a tres pH diferentes como se reporta en la literatura para la ACE (Minchiotti *et al.*, 1992), a pesar de que se esperan cambios del número de la carga efectiva de +1 y +2. En este sentido, se encuentra consistencia con los resultados numéricos provistos mediante la CZE donde los cambios de carga efectiva que se calculan son +0.79 y +1.54, respectivamente. Para estos casos Minchiotti *et al.* (1992) sugieren que existe una mayor exposición al solvente en el segmento C-terminal (caso V) en relación a la otra sustitución localizada en el dominio central (caso VI). En consecuencia, en el contexto del modelo desarrollado en esta Tesis es equivalente, en cierto grado, a señalar que no todos los grupos que se ionizan en la macromolécula están expuestos al mismo  $\text{pH}^*$ . Es evidente entonces que para este tipo de

situación la hipótesis de un  $\text{pH}^*$  uniforme no es estrictamente válida, y la distribución de protones en el interior de la macromolécula requiere estudios posteriores. Para estos casos sería útil el PLLCEM en el sentido que distingue las posiciones de los grupos ionizables, permitiendo estimar diferentes valores de  $\text{pH}_i$  (distintos  $\text{pK}_i$ ). En futuras investigaciones para estas situaciones particulares este efecto se deberá considerar.

Para enfatizar la conclusión señalada en el párrafo anterior, resultados adicionales permiten ilustrar este aspecto en el modelado de la detección de aloalbúminas a través de la CZE. En efecto, es el caso reportado por Galliano *et al.* (1990), relacionado con la misma mutación (Glu→Lys) pero localizada en sitios diferentes de la secuencia (Glu en posición 82, 321, 60 y 570) que dan como resultado movilidades experimentales distintas. Los autores consideran que estos resultados podrían deberse a una diferencia en los  $\text{pK}$ s de los residuos involucrados, a interacciones electrostáticas con otros aminoácidos cargados y a cambios conformacionales provocados por las sustituciones. En consecuencia, para esta situación particular, la hipótesis que considera  $a_{H2} \cong a_{H1}$  se debe reconsiderar en el modelo. En futuras investigaciones se tendrán en cuenta estos efectos más complejos. Por otro lado, es claro que el complemento de diferentes estudios y técnicas permitirá la elucidación apropiada de los casos de aloalbúminas que resultan difíciles de explicar en el presente.

#### **4.2.8 Conclusiones**

Esta Sección de la Tesis muestra que la CZE tiene un alto potencial como herramienta rápida y sencilla para detectar casos de aloalbuminemia. El uso regular de la CZE para el análisis de las proteínas séricas humana en los laboratorios clínicos permitiría probablemente aumentar la frecuencia de aparición de esta anomalía. En adición, el modelo simple de la CZE propuesto (LLCEM) explica los datos experimentales que consideran albúminas cargadas y provee predicciones cuantitativas de interés práctico para la interpretación del electroferograma de las aloalbúminas. También es posible estimar propiedades fisicoquímicas como el radio hidrodinámico y la carga eléctrica efectiva de la albúmina normal y de la variante. En este sentido, la carga efectiva de la proteína se determina considerando el fenómeno de regulación de carga, el cual está asociado con la extensión de la ionización de los aminoácidos debido a la diferencia entre el  $\text{pH}$  cercano a la molécula y el que corresponde al seno de la solución. Asimismo, el modelo permite

analizar numéricamente en forma aproximada las mutaciones probables asociadas con un doble pico de albúmina presente en el electroferograma. Las mutaciones que se estudiaron con el modelo conducen a un cambio del número de carga efectiva que no son números enteros sino valores decimales comprendidos entre  $\pm 1$  y  $\pm 2$ , lo que es consistente con el hecho que los números de carga neta de las proteínas dependen del equilibrio alcanzado por los residuos ácidos y básicos al pH cercano a la molécula.

#### **4.2.9 Propuestas de futuras investigaciones en el tema específico**

En futuras investigaciones sería de interés considerar la relación entre la aloalbuminemia y la agamaglobulinemia presente en los dos casos clínicos en estudio y que no existe evidencia de su reporte previo en la literatura. Este aspecto merece un análisis teórico y experimental más exhaustivo. Por otro lado, sería relevante verificar si las mutaciones señaladas como probables por LLCCEM, se verifican con las técnicas utilizadas para tal fin en la actualidad, es decir la secuenciación de aminoácidos o genes. Eventualmente sería pertinente y de interés evaluar las variantes estudiadas y confirmadas por otras metodologías que se reportaron en la literatura con los modelos de la CZE propuestos en esta Tesis.

En adición, sería importante reconsiderar el estudio de las aloalbúminas usando el PLLCEM que incluye en su formulación las interacciones entre los grupos cargados y, asimismo evaluar con los modelos propuestos aspectos fisicoquímicos adicionales como la hidratación y una forma de partícula diferente a la esférica, que se describe y aplica en los Capítulos 5 y 7 a péptidos y aminoácidos, respectivamente.

# Capítulo 5

## Péptidos

---

---

### 5.1 Introducción

Los péptidos representan una clase extensa y muy importante de biomoléculas. Ellos cumplen una función clave en el control y regulación de muchos procesos vitales en todos los organismos vivos, actuando, por ejemplo, como hormonas, neurotransmisores, inmunomoduladores, coenzimas, sustratos o inhibidores enzimáticos, ligandos para receptores, drogas, toxinas y antibióticos. Además, en la era actual de la proteómica, donde el análisis exhaustivo del proteoma representa el principal acercamiento para comprender las bases moleculares de los procesos biológicos y para el descubrimiento de nuevas drogas, la importancia de los péptidos es aún creciente; debido a que la estructura y función de muchas proteínas se identifican vía el estudio de sus fragmentos peptídicos luego de la digestión química o enzimática.

En los últimos años, la separación, análisis, aislamiento y caracterización de péptidos se transformaron en uno de los campos de aplicación más importantes de la CE (ver, por ejemplo, Messana *et al.*, 1997; Righetti, 2001; Saenz Nebot *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003; Kašička, 1999, 2001 y 2006). En consecuencia, se espera en un futuro cercano, como resultado de los avances combinados en la investigación del proteoma y la biotecnología, que exista un aumento del desarrollo y diseño de nuevas drogas que tengan como base a los péptidos. De esta manera, la posibilidad de predecir y analizar las movi­lidades de los péptidos y su separación mediante la CZE, previo a la realización de la corrida experimental, resulta de interés en la investigación farmacéutica (Righetti, 2001; Idei *et al.*, 2003).

Como se planteó en general para distintas moléculas en la CZE, el mecanismo de separación de los péptidos está basado en las diferentes movi­lidades electroforéticas de estos analitos al aplicar un campo eléctrico externo, debido a las diferencias en la relación carga/fricción (esta última definida usualmente a través del radio equivalente de Stokes). Si se considera el carácter anfótero de los péptidos, el pH del BGE aparece como uno de los parámetros clave a controlar para obtener una buena separación (Sanz-Nebot *et al.*, 2002;

Koval *et al.*, 2003). Asimismo, la fuerza iónica del BGE se puede manipular para obtener mejoras en el desarrollo de la separación (Cross y Cao, 1997; Corradini *et al.*, 2003). En consecuencia, el procedimiento generalmente seguido para obtener una buena separación de péptidos, es hacer un estudio sistemático acerca de estos parámetros (pH y fuerza iónica), preparando BGEs de diferentes concentraciones y pH hasta alcanzar las condiciones en las cuales los péptidos están convenientemente separados. Sin embargo, este procedimiento es largo y tedioso. Con el propósito de superar esta dificultad, al presente, se encuentran en la literatura varios modelos que predicen la movilidad electroforética de diferentes tipos de péptidos (ver, por ejemplo, Cifuentes y Poppe, 1994 y 1995; Janini *et al.*, 1999; Simó *et al.*, 2002; Simó y Cifuentes, 2003; Simó *et al.*, 2005; Jalali-Heravi *et al.*, 2005a y b; Benavente *et al.*, 2006; Xin *et al.*, 2006).

Además de las conclusiones relevantes que se presentan en la literatura, es claro que la estimación de la movilidad electroforética  $\mu$  requiere la evaluación del número de carga neta  $Z$  y el coeficiente de fricción hidrodinámico  $f$  con suficiente exactitud como para identificar la separación de los péptidos que resultan, por ejemplo, de la digestión enzimática de una proteína. Este problema básico, con relevantes aplicaciones en la industria farmacéutica y biotecnológica, como se mencionó antes, se estudió intensamente, principalmente desde el trabajo de Offord (1966) hasta el presente con logros importantes, aunque se observan varios aspectos fisicoquímicos que aún requieren elucidación para una mejor comprensión en relación al significado físico de las movilidades de los péptidos (Grossman *et al.*, 1989; Rickard *et al.*, 1991; Compton y O'Grady, 1991; Grossman y Colburn, 1992; Survey *et al.*, 1993; Gaus *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1993; Cifuentes y Poppe, 1994 y 1995; Basak y Lasdich, 1995; Adamson y Reynolds, 1995; Survey *et al.*, 1996; Cross y Wong, 2001; Cross y Garnham, 2001; Kim *et al.*, 2002; Šolonívá *et al.*, 2004). El procedimiento más frecuente usado en estos trabajos para analizar este difícil problema se realiza mediante dos pasos básicos: (a) se estima la carga neta del péptido  $eZ$ , donde  $e$  es la carga elemental y  $Z$  es el número de carga neta del péptido, a partir de valores promedios de las constantes de disociación  $pK_i$  de los grupos cargados que se suponen como los valores actuales en la cadena cargada (los valores de  $pK_i$  reportados por Rickard *et al.*, 1991, son los más ampliamente usados) o como alternativa se usa la carga neta del péptido  $eZ^\circ$ , calculada a partir de las constantes de disociación  $pK_i^\circ$  de las cadenas laterales y grupos terminales de los aminoácidos libres que participan en la AAS

que compone la molécula del péptido (Grossman *et al.*, 1989a); (b) se considera el coeficiente de fricción proporcional a la masa molar  $M$  del péptido (eventualmente al número de residuos de aminoácidos  $N$  elevado a una potencia fraccional). En este sentido, los modelos propuestos en la literatura sugieren una proporcionalidad entre  $\mu$  y  $eZ/M^m$  donde  $m$  toma los valores de  $2/3$ ,  $1/3$  y  $1/2$  (ver, por ejemplo, Offord, 1966; Rickard *et al.*, 1991; Compton y O'Grady, 1991; Basak y Ladish, 1995; Janini *et al.*, 1999; Cross y Wong, 2001; Cross y Garnham, 2001; Cross y Wong, 2002a y b; Šolínová *et al.*, 2004) en estudios que involucran diferentes péptidos. Una de las consideraciones físicas introducidas por Offord (1966), que fue relevante en la evolución de este tema al presente, es que un ión que se mueve a través de un BGE experimenta una fuerza de retardo que es proporcional a su área superficial, conduciendo a la expresión  $\mu \propto 1/M^{2/3}$ , en contraposición a lo que se espera a partir del coeficiente de fricción de Stokes, el cual genera para una partícula esférica simple  $\mu \propto 1/M^{1/3}$ . Compton y O'Grady (1991) presentan una explicación de los diferentes valores de  $m$  que se obtienen considerando el movimiento de una partícula cargada en el contexto de la teoría de Debye-Hückel-Henry donde también se incluye la fuerza iónica  $I$ . Así, estos autores concluyen que  $\mu$  depende en forma continua de  $M$  entre las asíntotas  $M^{-1/3}$  y  $M^{-2/3}$ . También reportan que las moléculas pequeñas en BGE de fuerzas iónicas bajas se correlacionan mejor con  $M^{-1/3}$ , mientras que las moléculas grandes en BGE de fuerzas iónicas altas se correlacionan mejor con  $M^{-2/3}$ . Asimismo, las moléculas de tamaño intermedio en BGE de fuerza iónica media muestran una dependencia con  $M^{-1/2}$ .

Tomando una propuesta diferente a la discutida más arriba, Grossman *et al.* (1989a) consideran al péptido como un polímero lineal clásico con  $N$  residuos de aminoácidos y proponen que  $\mu \propto \ln[1 + eZ^\circ]/N^{0.43}$  para la CZE de péptidos. La dependencia logarítmica de la carga neta se introduce para compensar la supresión electrostática de carga, que se vuelve importante para los péptidos altamente cargados. En este sentido, Cifuentes y Poppe (1994) presentan una modificación del modelo lineal clásico de Grossman *et al.* (1989a), reteniendo la dependencia logarítmica de la movilidad con la carga pero sustituyendo  $M$  por  $N$  para mejorar esta correlación en la predicción de la movilidad electroforética de péptidos.

Al presente, se encuentran importantes trabajos de revisión (Cifuentes y Poppe, 1997; Adamson y Reynolds, 1997; Messana *et al.*, 1997; Kašička, 1999, 2001 y 2006) con relación a la separación de péptidos vía CZE, cada uno enfatizando diferentes aspectos concernientes a la predicción de las movilidades de los péptidos en términos de la carga neta y la masa molar. En consecuencia, es posible concluir que varios fenómenos básicos como por ejemplo, las variaciones en los  $pK_i$ , la hidratación y el radio hidrodinámico, necesitan ser incluidos en el modelado de la CZE de péptidos.

Es interesante también indicar que Compton y O'Grady (1991) presentaron un análisis con relación a la diferencia entre el número de carga obtenido por titulación  $Z^t$  y el número de carga actual  $Z$  de un péptido; los cuales son diferentes del número de carga  $Z^c$  calculado directamente a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach y las constantes de disociación (ver también, Cifuentes y Poppe, 1994; Mosher *et al.*, 1993; Winzor, 2003, para una discusión sobre este aspecto). El mismo problema básico se analizó previamente para proteínas globulares en el Capítulo 4 y en la literatura (ver Piaggio *et al.*, 2005a; Allison *et al.*, 2004; Gitlin *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2003; Menom y Zydney, 2000 y 1998; Carbeck *et al.*, 1999, donde se presentan referencias adicionales y apropiadas para los fines de este capítulo) y más recientemente para péptidos (Xin *et al.*, 2006) que consideran la variación  $\Delta pK_i = pK_i^f - pK_i$  de cualquier grupo cargado  $i$ , evaluado como la diferencia en las constantes de disociación de los grupos cargados en el estado de referencia y en el péptido, respectivamente. También se encontró que este fenómeno, que se asocia principalmente al estado electrostático de un analito cargado, tiene influencia en el valor del radio hidrodinámico de proteínas (Piaggio *et al.*, 2005a).

Cross y Cao (1997) consideraron la ecuación de Offord e incluyeron el efecto de la fuerza iónica. En este sentido, Cross y Wong (2001), Cross y Garnham (2001) y Cross y Wong (2002a y b), discutieron el efecto de la hidratación de los péptidos (expresado como el número de moléculas de agua  $n_w$  por unidad de carga neta) como uno de los orígenes de las diferencias en las movilidades electroforéticas de los péptidos que se presentan entre los datos experimentales y los valores calculados con la ecuación de Offord. A partir del análisis de la literatura se encuentra que los diferentes tipos de correlaciones, incluyendo sus comportamientos asintóticos, requieren una imposición precisa del valor de la carga neta, además de la evaluación apropiada del coeficiente de fricción.

Janini *et al.* (2001) presentaron una serie importante de datos experimentales concerniente a la evaluación de las movilidades electroforéticas de 102 péptidos a través de la CZE con un protocolo determinado a  $\text{pH} = 2.5$ . Estos datos son relevantes para su aplicación en la validación de desarrollos teóricos que comprenden separaciones electroforéticas de péptidos. Anteriormente, Janini *et al.* (1999), usando 58 péptidos analizaron la calidad del ajuste basado en  $M^m$ , como se indicó más arriba. Estos autores encontraron que  $\mu \propto 1/M^{2/3}$  proporcionó el mejor ajuste de los datos experimentales cuando la carga neta se calculó con los valores promedios de  $\text{p}K_i$  (ver, Rickard *et al.*, 1991 y el Apéndice 5-A en este capítulo). Es relevante mencionar que un número tan alto de péptidos estudiados experimentalmente y disponibles en la literatura, introduce la posibilidad de llevar adelante procedimientos de simulación para predecir la movilidad electroforética de péptidos, las cuales son propuestas diferentes de aquellas llevadas a cabo previamente. De esta manera, Janini *et al.* (2001) correlacionaron la movilidad electroforética de péptidos con  $N$ ,  $M$  y  $W$  (este último parámetro es la masa promedio de las cadenas laterales en el péptido). En esta misma dirección, Jalali-Heravi *et al.* (2005a) usaron el análisis de regresión múltiple y el modelado por redes neuronales artificiales para predecir las movilidades electroforéticas de estos 102 péptidos, donde los parámetros independientes relevantes son aquellos que componen la ecuación de Offord, la constante de corrección estérica y la refractividad molar, entre el grupo de parámetros que controlan el fenómeno básico (ver también, Jalali-Heravi *et al.*, 2005b, donde estos autores analizan otro grupo importante de 125 péptidos). Recientemente, Xin *et al.* (2006) propusieron un modelado detallado dentro del contexto basado en la estructura para predecir la movilidad de 58 péptidos incluidos en el grupo de los 102 péptidos. En este tipo de modelado de detalle el radio hidrodinámico y la forma no se necesitan porque el coeficiente de fricción se obtiene a partir de una cadena errática de  $2N$  cuentas, donde dos cuentas representan cada aminoácido. De esta manera, se formularon alrededor de 100 conformaciones diferentes del péptido para obtener un resultado final representativo de  $\mu$  y  $Z$ . En este sentido, en este capítulo se usan más adelante, los resultados del trabajo de Xin *et al.* (2006), para realizar comparaciones numéricas con relación a la evaluación de la carga neta de los péptidos con los modelos más simples que se analizan aquí.

No obstante, en la actualidad, a pesar de la gran cantidad de trabajos publicados en relación a este tema (Grossman *et al.*, 1989a y b; Rickard *et al.*, 1991; Basak y Ladish,

1995; Castagnola *et al.*, 1996; Messana *et al.*, 1997; Adamson y Reynolds, 1997; Cross y Cao, 1997; Hearn *et al.*, 2000; Janini *et al.*, 2001; Sanz-Nebot *et al.*, 2001a y b; Sanz-Nebot *et al.*, 2002; Winzor, 2003; Šolínová *et al.*, 2004), aún no hay acuerdo sobre la mejor propuesta para la correlación de la movilidad electroforética de péptidos con los parámetros de carga, tamaño y forma. Existen en los diversos grupos de investigación diferentes puntos de vista, a menudo en conflicto.

En consecuencia, el propósito de este capítulo de la Tesis es precisamente explorar la validez de los modelos simples de la CZE, para analizar las movilidades electroforéticas de péptidos. Estos modelos se basan principalmente en teorías fisicoquímicas fundamentales que utilizan expresiones analíticas que se resuelven con análisis numéricos relativamente simples. En este sentido, se propone extender el uso del LLCCEM y su versión perturbada PLLCEM (presentados y aplicados antes a la CZE de proteínas globulares en el Capítulo 4; ver también, Piaggio *et al.*, 2005a) para la interpretación de las movilidades electroforéticas de péptidos medidas mediante la CZE. Por consiguiente, se indican aquí varias diferencias sustanciales entre las características fisicoquímicas de estos dos tipos de analitos (proteínas y péptidos) dentro del marco de los modelos usados, y se incluyen también importantes consideraciones como el tamaño del péptido y la forma hidrodinámica. Asimismo se presentan los efectos de los  $\Delta pK_i$  sobre la carga neta  $eZ$  del péptido y la hidratación  $\delta$  sobre el radio hidrodinámico  $a_H$  de la esfera equivalente. En este trabajo la hidratación del péptido se expresa como el cociente entre la masa de solvente y la masa del péptido anhidro. Se pone énfasis en el hecho que a pesar de que los modelos de la CZE son capaces de cuantificar separadamente la carga neta y el coeficiente de fricción, estos términos están físicamente acoplados, en consecuencia una variación en la carga neta produce un cambio apreciable en el radio hidrodinámico. En el contexto de la CZE se espera distinguir los péptidos unos de otros a través de sus formas asociando el volumen hidrodinámico a las partículas equivalentes esféricas o esferoidales, entre otras conclusiones. También, se mencionan varias limitaciones concernientes al LLCCEM y el PLLCEM y algunos requerimientos para futuras investigaciones, principalmente aquellas relacionadas con los cálculos de la carga neta y el coeficiente de fricción, este último incluyendo la hidratación y otros fenómenos complejos que afectan el volumen total de la partícula.

Con estas propuestas este Capítulo de la Tesis está organizado como sigue: Primero, en la Sección 5.2, se considera la importancia del problema de la regulación de

cargas (cooperatividad en la unión del protón) en la determinación de la carga neta del péptido (ver, por ejemplo, Demchuck y Wade, 1996; Antosiewicz *et al.*, 1996; Beroza y Case, 1996; Beroza y Fredkin, 1996; Beroza *et al.*, 1991; You y Bashford, 1995, para un análisis detallado de este fenómeno). Luego, se analiza la estimación de  $eZ$  para una cadena peptídica en solución a un pH y fuerza iónica determinados, y se consideran las distinciones que se deben hacer entre el modelado de la CZE de péptidos y proteínas globulares. A continuación, se describe brevemente la reformulación del LLCCEM y el PLLCEM para estudiar las movilidades electroforéticas de 102 péptidos reportados en Janini *et al.* (1999 y 2001). En la Sección 5.3 se presenta una discusión sobre la importancia de incluir el fenómeno de hidratación en el volumen hidrodinámico del péptido. En la Sección 5.4 se introduce un tratamiento aproximado de los péptidos con forma hidrodinámicas no-esférica dentro del marco de estos modelos. Luego, en la Sección 5.5, se analizan los resultados y se discuten las interacciones electrostáticas entre pares de grupos cargados y el efecto de la permitividad eléctrica en el dominio del péptido en un contexto amplio considerando los aspectos relacionados con los valores de  $\Delta pK_i$ . Finalmente, en la Sección 5.6, se presentan las principales conclusiones de esta parte de la Tesis.

## **5.2 Estimaciones de la carga neta, el tamaño y la forma hidrodinámica de péptidos**

La evaluación de la carga neta de un péptido requiere el conocimiento de los valores actuales de los  $pK_i$  de los grupos cargados en las cadenas laterales y de los grupos terminales  $-\text{COOH}$  y  $-\text{NH}_2$  de los aminoácidos. Esta dificultad conduce a la necesidad de usar valores promedios de los  $pK_i$  en la mayoría de los cálculos prácticos (Cifuentes y Poppe, 1994; Rickard *et al.*, 1991). Estos valores actuales son principalmente una consecuencia de los efectos electrostáticos asociados con las interacciones entre los grupos cargados en la cadena y los iones en el BGE, conduciendo a variaciones (*shifts*) en los valores de referencia  $pK_i^r$  (a veces seleccionados iguales a aquellos de los aminoácidos libres), designadas en esta Tesis  $\Delta pK_i$  (Piaggio *et al.*, 2005a; Allison *et al.*, 2004; Gitlin *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2003; Menom y Zydney 2000; Carbeck *et al.*, 1999). Por consiguiente, los  $pK_i$  en la cadena cargada son diferentes (principalmente los de los grupos carboxilo y amino terminales) de los valores de los  $pK_i^\circ$  de los aminoácidos libres

correspondientes a la secuencia. Esta diferencia se discute brevemente considerando el pH del microambiente alrededor del grupo cargado, designado aquí  $\text{pH}_i$  y expresado, como una primera aproximación (los dipolos eléctricos y otros efectos menores se desprecian; Piaggio *et al.*, 2005a),

$$\text{pH}_i = \text{pH}_i^\infty + \frac{e^2}{\ln(10)k_B T} \left\{ \frac{Z_i}{4\pi\epsilon' r_i^\circ (1 + \kappa r_i^\circ)} + \frac{Z_i}{4\pi\epsilon' r_i^\circ} \left( \frac{\epsilon'}{\epsilon_\circ} - 1 \right) + \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{N_c} \frac{Z_j}{4\pi\epsilon' r_{ij}} \exp(-\kappa' r_{ij}) \right\} \quad (5.2.1)$$

para obtener luego la valencia del grupo cargado  $i$ ,

$$Z_i = \pm \frac{1}{1 + 10^{\mp(\text{p}K_i^f - \text{pH}_i)}} \quad (5.2.2)$$

En la Ec. (5.2.1)  $r_{ij}$  es la distancia genérica entre los pares  $i$ - $j$  de grupos cargados, mientras que en la Ec. (5.2.2) los signos (+) y (-) se definen de acuerdo a las propiedades básicas o ácidas de los grupos cargados, respectivamente y no se hacen correcciones por las pequeñas desviaciones de la idealidad (ver también, Survay *et al.*, 1996 para una discusión con relación a este aspecto). Asimismo,  $N_c$  es el número de grupos cargados en la cadena y el  $\text{p}K_i^f$  se evalúa con la constante de disociación del grupo cargado  $i$  en un estado de referencia, que se define y analiza más abajo. Por lo tanto, la carga neta del péptido que resulta de la Ec. (5.2.2) es,

$$eZ = \sum_{i=1}^{N_c} eZ_i \quad (5.2.3)$$

En la Ec. (5.2.1), el  $\text{pH}_i^\infty$  se evalúa alejado del grupo cargado  $i$  pero aún dentro de su microambiente. Este valor es claramente diferente del pH del BGE. También,  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta y  $r_i^\circ$  es el radio efectivo del grupo cargado  $i$ . En adición,  $\epsilon_\circ$ ,  $\epsilon$  y  $\epsilon'$  son las permitividades eléctricas en el vacío, en el BGE y dentro del dominio del péptido, respectivamente. Debido a que la inversa de la longitud de Debye es  $\kappa = \sqrt{2e^2 N_A / 10^3 \epsilon k_B T}$ , donde  $N_A$  es el número de Avogadro, se obtiene  $\kappa' = \kappa \sqrt{\epsilon' / \epsilon}$ .

La Ec. (5.2.1) se asocia con tres cambios diferentes de energía libre: (a) la interacción electrostática entre grupos cargados del péptido y los iones del solvente (se usa habitualmente la ecuación de Poisson Boltzmann para un radio atómico de 1.4 Å, donde se estima una permitividad eléctrica  $\varepsilon'$  diferente de aquella del BGE), (b) el cambio de energía de solvatación de los grupos cargados a partir de estados de referencia del péptido, y (c) la interacción electrostática de los grupos cargados con otros grupos cargados presentes en el péptido. Estos cambios de energía libre están también asociados con potenciales eléctricos, la suma de los cuales determina la distribución de Boltzmann de los protones cerca del grupo cargado genérico  $i$ . A partir de este análisis, es evidente que se requieren los valores de cada  $\text{pH}_i$  para describir el fenómeno de cooperatividad en la unión del protón (ver también más abajo lo concerniente a la definición del  $\Delta\text{p}K_i$ ). No obstante, las Ecs. (5.2.1) a (5.2.3) presentan un difícil problema a resolver, porque los detalles fisicoquímicos en las cercanías de cada grupo cargado dentro del dominio del péptido requieren cuantificaciones (Demchuck y Wade, 1996; Antosiewicz *et al.*, 1996; Beroza y Case, 1996; Beroza y Fredkin, 1996; Beroza *et al.*, 1991; You y Bashford, 1995). Una posibilidad para tener una expresión simple de la Ec. (5.2.1) es introducir el radio hidrodinámico  $a_H$  para evaluar el campo promedio del cambio de energía libre asociado con (a), mientras que aquellas pertenecientes a (b) y (c) se tratan como perturbaciones de los grupos cargados (ver, Sección 4.1 en el Capítulo 4 y Piaggio *et al.*, 2005a). De esta manera, la interacción electrostática entre grupos cargados se presenta en el modelo como una perturbación de la solución de campo promedio asociado con un radio de partícula  $a_H$  o eventualmente una partícula diferente de una esfera (ver Sección 5.4). Esta propuesta indica que el  $\text{pH}_i$  se expresa aproximadamente a través de tres términos, como sigue (Piaggio *et al.*, 2005a):

$$\text{pH}_i = \text{pH}^* + \frac{e^2}{\ln(10)k_B T} \left[ \frac{\Delta Z_i}{4\pi r_i^\circ \varepsilon} \left( \frac{\varepsilon}{\varepsilon'} - 1 \right) + \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{N_c} \frac{\Delta Z_j}{4\pi \varepsilon'} \frac{\exp(-\kappa' r_{ij})}{r_{ij}} \right] \quad (5.2.4)$$

donde para el propósito de este modelo se requiere  $\Delta Z_j = Z_j - Z_j^{\text{r}}$ , siendo  $Z_j^{\text{r}}$  la carga de referencia del sitio  $j$ , designado  $Z_j^\circ$  cuando en particular  $\text{p}K_j^{\text{r}} \approx \text{p}K_j^\circ$ . Asimismo,  $\text{pH}^*$  es el pH cerca del péptido (supuesto como una partícula hidrodinámica) y se evalúa usando la aproximación de campo promedio introducida junto con la inclusión del radio

hidrodinámico del analito. De esta manera, la partícula del analito se supone que tiene un potencial de superficie provisto por la ecuación de Poisson-Boltzmann para un solvente con propiedades de  $pH$ ,  $I$ ,  $T$ ,  $\varepsilon$  y viscosidad  $\eta$  definidas (ver, por ejemplo, Beckers y Boček, 2003; Boušková *et al.*, 2004; Beckers *et al.*, 2003). Con el fin de generar un problema simple, aquí se usa la solución de Henry para la movilidad electroforética de una partícula esférica, donde se invoca la aproximación de Debye-Hückel. Sin embargo, esta aproximación no necesariamente limita la aplicación básica del modelo cuando se incluye la ecuación completa de Poisson-Boltzmann (O' Brien y White, 1978), se expresa (Piaggio *et al.*, 2005a),

$$pH^* = pH + \frac{e^2 Z}{\ln(10) k_B T 4\pi \varepsilon a_H (1 + \kappa a_H)} \quad (5.2.5)$$

Es evidente que la Ec. (5.2.4) refleja las interacciones hidrodinámicas y electrostáticas entre el péptido y el BGE, e inevitablemente la introducción de  $a_H$  genera una suposición evitando modelos más detallados. Por consiguiente, se prosigue con la bien conocida partícula de Henry y sus hipótesis asociadas (ver, por ejemplo, Russell *et al.*, 1989; Saville, 1977).

Es interesante observar que el segundo término del lado derecho de la Ec. (5.2.4) se relaciona con la perturbación de la energía libre cuando los grupos cargados en el estado de referencia son transferidos a una cavidad en el péptido; aquí el radio efectivo  $r_i^\circ$  del grupo cargado  $i$  se evalúa a través de la ecuación de Born (Atkins, 1995). El tercer término considera el efecto del estado de protonación del grupo cargado  $i$  causado por las interacciones electrostáticas con cargas perturbadas  $\Delta Z_j$  de otros grupos cargados  $j=1,2,\dots,(N_c - 1)$  en el péptido. Por lo tanto, para evaluar la Ec. (5.2.4) se estiman los datos de las distancias promedios  $r_{ij}$  a partir del PDB para el caso específico de proteínas globulares (estas distancias correspondientes a las proteínas nativas se obtienen a partir de cristalografía por Rayos X y NMR). Sin embargo, no se puede usar esta fuente de datos para los péptidos, los cuales tienen un gran número de conformaciones sujetas a movimiento browniano localmente importante dentro de la cadena peptídica. Debido a que el problema de encontrar valores estadísticos promedio de  $r_{ij}$  para cadenas cargadas como los péptidos es bastante difícil al presente estado del arte de este tema específico (ver, por ejemplo, Xin *et al.*, 2006), se considera como una estimación aproximada de la distancia

promedio entre grupos cargados la expresión  $r_{ij} \approx sL\sqrt{|i-j|}$  (Tanford, 1961; Piaggio *et al.*, 2006a). Esta ecuación involucra la distancia promedio entre dos grupos cargados arbitrarios  $i$  y  $j$  en la cadena estadística gaussiana básica, la cual, además, se corrige en promedio por un factor  $s$  debido a la presencia de fuerzas de atracción y de repulsión entre diferentes partes de la cadena. Estas fuerzas se generan por la presencia de cargas positivas y negativas correspondientes a los residuos de los aminoácidos cargados (ver también Sección 5.5). Aquí  $L \approx 3.8 \text{ \AA}$  para el plano asociado al enlace peptídico (Flory, 1969). De esta manera, para valores altos de  $s$  en un extremo, predominan las fuerzas repulsivas y se espera una cadena abierta, donde el fenómeno de regulación de cargas debido a las interacciones electrostáticas (último término del lado derecho de la Ec. (5.2.4)) es débil (corresponden valores relativamente altos de  $r_{ij}$ ) y el coeficiente de fricción es proporcional a la longitud de la cadena completa. Por otro lado, para valores bajos de  $s$ , las fuerzas atractivas son relevantes, acrecentando el fenómeno de regulación de cargas debido a las interacciones electrostáticas y el coeficiente de fricción es proporcional a una dimensión fractal de la cadena completa. El hecho es que existe una interacción compleja entre el número de carga neta, el tamaño y la forma de los péptidos, incluyendo la hidratación que se ilustra en la Sección 5.3.

Por esta razón en el contexto de análisis, para aplicar el PLLCEM y el LLCCEM a los valores de las movilidades electroforéticas disponibles en la literatura, la otra ecuación relevante es,

$$\mu = \frac{eZ}{6\pi\eta a_H(1 + \kappa a_H)} f(\kappa a_H) \quad (5.2.6)$$

donde  $f(\kappa a_H)$  es la función de Henry que se expresa aquí a través de una ecuación de ajuste explícita (ver Ec. (4.1.7) en el Capítulo 4).

Es también claro que el LLCCEM no distingue posiciones de los grupos cargados en el péptido (ver también, Piaggio *et al.*, 2005a) porque se impone la condición donde  $\text{pH}_i \approx \text{pH}^*$  en la Ec. (5.2.4). Así, a partir de la Ec. (5.2.5), se encuentra que  $\Delta \text{p}K_i = \text{p}K_i^T - \text{p}K_i = \text{pH}^* - \text{pH} = \Delta \text{pH}$  indicando esta relación que se obtiene el mismo  $\Delta \text{p}K_i$  para los grupos cargados  $i$  como una aproximación, en el contexto de este modelo simple, independientemente de la posición de estos grupos en la AAS del péptido. Este resultado es una consecuencia de que el  $\text{pH}^*$  es el valor de  $\text{pH}$  de campo medio para el

BGE que rodea al péptido como así también dentro del dominio del péptido donde se encuentran las cadenas cargadas. Por otro lado, para el PLLCEM se obtiene  $\Delta pK_i = pK_i^r - pK_i = pH_i - pH = \Delta pH_i$ , válido para cada grupo cargado con su microambiente asociado; así las variaciones en las constantes de disociación de los grupos cargados difieren unas de otras en este modelo. En efecto, el valor de  $pH_i$  es el pH estimado para cada grupo cargado  $i$  debido a las interacciones electrostáticas descritas por el último término en el lado derecho de la Ec. (5.2.4), el cual se tiene perturbando el valor de  $pH^*$ . El aspecto relevante concerniente a los dos modelos considerados en esta Tesis es que los valores de  $eZ$  y  $a_H$  de un péptido determinado en un BGE bien definido se obtienen midiendo solamente la movilidad electroforética  $\mu$  del péptido. De esta manera, no hay necesidad de estimar  $a_H$  a partir de otra fuente experimental. En realidad, el radio hidrodinámico del péptido es una solución directa que surge de estos modelos.

Las Ecs. (5.2.2), (5.2.3), (5.2.5) y (5.2.6) componen el LLCCEM (la Ec. (5.2.2) es genérica para cualquier  $i$  y provee  $N_c$  ecuaciones) donde el grupo  $\{a_H, Z, Z_i, pH^*\}$  de  $(N_c+3)$  incógnitas se obtiene mediante un algoritmo numérico apropiado, descripto, además, cuando se conoce el valor experimental  $\mu$  bajo un protocolo de la CZE bien-definido. Cuando se usa el PLLCEM se tiene el grupo  $\{a_H, Z, pH^*, Z_i, pH_i, \Delta Z_i\}$  de  $3(N_c+1)$  incógnitas que se obtienen con un algoritmo similar (ver, para más detalles, Sección 4.1 en el Capítulo 4 y Piaggio *et al.*, 2005a).

Sin embargo, para evaluar  $eZ$  y  $a_H$  a través de estos modelos, se debe, además, considerar cuidadosamente un problema adicional. Se refiere a la elección del conjunto de  $\{pK_i^r\}$ . Para proteínas se encontró apropiado usar  $\{pK_i^r\}$  estimados para los grupos cargados de las cadenas laterales y valores promedios reportados en la literatura para los grupos carboxilo y amino terminales, principalmente para que sea posible comparar los resultados con diferentes autores (Piaggio *et al.*, 2005a). En aquel caso particular el efecto de la incertidumbre asociado con los valores de los  $pK_i^r$  de los grupos terminales era pequeña teniendo en cuenta que las proteínas estudiadas tenían un número relativamente más alto de  $N_c$  grupos cargados que aquellos de los péptidos (considerando los 102 estudiados en este capítulo). De esta manera, cualquier pequeña diferencia en los valores

asignados a los  $pK_i^r$  se minimizaba sustancialmente por el  $N_c$  alto. Esto no es necesariamente el caso de los péptidos donde los dos  $pK_i^r$  terminales pueden tener un efecto relevante en la carga neta, dependiendo principalmente del pH del BGE. Para el caso particular del presente trabajo, donde los datos experimentales de las movilidades electroforéticas que se usan corresponden a Janini *et al.* (1999 y 2001) a  $\text{pH} = 2.5$ , es claro que el  $pK_{\text{COOH}_t}^r$  del carboxilo terminal y los carboxilos de las cadenas laterales de los aminoácidos Asp y Glu son los únicos grupos cargados afectados por el fenómeno de regulación de cargas (Hearn *et al.*, 2000). Así, a  $\text{pH} = 2.5$  los grupos amino en el péptido son definitivamente positivos por lo que resulta un analito con carga neta positiva para el análisis en la CZE. Este aspecto es consistente con el hecho que la CZE de péptidos se realiza en el rango de pH bajo, principalmente para minimizar el efecto de los  $\Delta pK_i$  en los cálculos de la carga neta. Por consiguiente, más adelante, se analiza y discute el efecto del grupo carboxilo terminal (designado en este trabajo  $pK_{\text{COOH}_t}^r$ ) sobre la carga neta del péptido. Asimismo, con relación a este último aspecto, Castagnola *et al.* (1994, 1996 y 1998) reportaron que los valores promedios de los  $pK_{\text{COOH}_t}^r$  para los carboxilos terminales son bastante diferentes a aquellos correspondientes a los aminoácidos libres  $pK_{\text{COOH}_t}^o$ . Esto se debe en parte al hecho que el aminoácido terminal en el enlace peptídico ya no tiene más la vecindad del  $-\text{NH}_3^+$ , cambiando esto significativamente el microambiente cercano al  $-\text{COOH}$  terminal. Además, a parte de este aspecto específico, se debe tener en cuenta la interacción electrostática, como se indica en las Ecs. (5.1) y (5.4). En este capítulo de la Tesis se usan para los cálculos los valores de los  $\{pK_i^r\}$  reportados en Antosiewicz *et al.* (1996) y en Xin *et al.* (2006) (ver también Tabla 5.1 y Apéndice 5-A de este Capítulo), los que luego se corrigen con los correspondientes  $\Delta pK_i$  como se indica más arriba. Es apropiado también señalar aquí que cuando los modelos de movilidades electroforéticas incluyen, por ejemplo la estimación cuantitativa del fenómeno de regulación de cargas y en consecuencia se considera la corrección de los  $\{pK_i^r\}$  a través de los valores modificados, el uso de los valores promedios no es apropiado, debido a que éstos en principio ya contienen estas correcciones en base a un procedimiento bastante empírico (ver, Rickard *et al.*, 1991 para una discusión completa de estos últimos aspectos físicos).

### 5.3 La hidratación como parte del tamaño hidrodinámico de los péptidos

El estado de hidratación de los péptidos y las proteínas ha sido un tema de mucho interés en la literatura (ver por ejemplo, Fennema, 1977; Edinger *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2003 y las referencias allí citadas). Para el propósito de este capítulo que estudia la CZE de péptidos, es interesante señalar que Liu *et al.* (2003) analizaron la adición secuencial de moléculas de agua a una serie de pequeños péptidos protonados. Estos autores encontraron que: (a) la primera capa de moléculas de agua se une al péptido más fuertemente que las otras posibles capas; (b) los péptidos pequeños ( $N \approx 2$  o 3) unen las primeras pocas moléculas de agua más fuertemente que los péptidos más grandes; (c) las primeras moléculas de agua se unen más fuertemente a los péptidos con mayor carga neta; (d) las moléculas de agua se unen menos fuertemente al grupo guanidinio (correspondiente a Arg contenida en los péptidos) que al grupo amino protonado. Además, mediante cálculos por dinámica molecular, también se encontró que las moléculas de agua en los péptidos pequeños se unen preferentemente a los sitios protonados hasta que se completa la formación de la capa de solvatación. Posteriormente, más moléculas de agua se agregan a la primera capa (incluyendo, como una posibilidad, grupos funcionales cargados que están inicialmente alejados en el péptido). Para péptidos más grandes, sin embargo, los sitios cargados alejados en la cadena compiten con los grupos más cercanos para unir las primeras moléculas de agua. Dentro de este análisis mecanístico, es apropiado indicar que la hidratación tiene una influencia relevante en las conformaciones de las cadenas y, por consiguiente, en la carga neta del péptido y biomacromoléculas en general; siendo estos aspectos importantes para definir sus actividades biológicas.

Sin entrar en una revisión exhaustiva del fenómeno de hidratación de las biomacromoléculas, es evidente a partir del párrafo anterior, que el análisis de la movilidad electroforética de un péptido considerando la carga neta  $eZ$  y el coeficiente de fricción (evaluado a través de la masa molar  $M$ ) no es suficiente, en principio, para estimar las hidrataciones de los péptidos (ver también, Cross y Wong, 2001; Cross y Garnham, 2001, Cross y Wong, 2002a y b, para una discusión concerniente a este aspecto de la CZE de péptidos), a pesar de que este procedimiento conduce a correlaciones buenas y resultados relevantes al presente, como se concluye a partir de la literatura y la discusión en la Sección 5.5. De esta manera, se expresa que el uso del radio hidrodinámico  $a_H$  en lugar de  $M$  para evaluar el coeficiente de fricción del péptido es una alternativa que puede ayudar a interpretar el fenómeno de hidratación al nivel de información que se obtiene a partir de

experiencias de la CZE. Esta estimación se logra con el uso del PLLCEM y el LLCCEM, como se describe más abajo.

Para las propuestas de este capítulo la hidratación se define aquí como el agua unida al péptido que migra sin distinción relativa a la naturaleza del tipo de enlace (estructural, entrapada, etc.; ver por ejemplo, Fennema, 1977). En este sentido, es claro que la CZE es un problema hidrodinámico acoplado a la interacción electrostática partícula-solvente. Estas dos consideraciones permiten definir un volumen hidrodinámico del péptido  $V_H = 4\pi a_H^3 / 3$ , que se puede descomponer en el volumen compacto del péptido  $V_c = Mv_p / N_A = 4\pi a_c^3 / 3$  ( $a_c$  es el radio de la esfera compacta equivalente y  $v_p$  es el volumen específico del péptido que se supone aproximadamente  $0.7 \text{ cm}^3/\text{g}$ ) y un volumen adicional ( $V_H - V_c$ ) debido a la hidratación indicando que  $a_H > a_c$  (Tanford, 1961). Este cambio de volumen es por supuesto afectado por el impedimento al empaquetamiento de las cadenas laterales, y por la repulsión-atracción electrostática debido a zonas hidrofílicas e hidrofóbicas de la cadena. Por consiguiente, los resultados que emergen de los dos modelos usados aquí deben satisfacer la condición  $a_H > a_c$ . En adición, debido a que la hidratación es el efecto predominante que aumenta el  $V_c$  hasta el valor de  $V_H$  (Tanford, 1961), se obtiene una estimación de  $\delta$  a partir del conocimiento numérico de ambos  $a_H$  y  $a_c$  a través de  $\delta = [(a_H / a_c)^3 - 1](v_p / v_w)$ , donde  $v_w$  es el volumen específico del BGE, que se supone igual a  $1 \text{ cm}^3/\text{g}$ . De esta manera, se encuentra que 88 de los 102 péptidos estudiados se pueden describir a través del PLLCEM y el LLCCEM como una esfera equivalente de radio  $a_H$ , y las hidrataciones estimadas con el análisis de esta Sección se presentan en la Tabla 5.1. Además, los valores aproximados de las hidrataciones se pueden estimar con la siguiente expresión:

$$\delta \approx c_1 + c_2 Z^{c_3} \quad (5.3.1)$$

que ajusta bien los valores reportados en la Tabla 5.1, donde  $c_1 \approx 0.154$ ,  $c_2 \approx 0.215$  y  $c_3 \approx 1.273$  con un coeficiente de correlación de 0.94. Esta ecuación conduce a valores de hidratación aproximadamente similares a los reportados para los péptidos en Cross y Garnham (2001) con valores de carga relativamente bajos ( $Z < 8$ ), que se estiman como  $\delta \approx 18n_w / M$ , donde  $n_w$  es una función de  $Z$  (ver también Sección 5.5, en relación a los coeficientes de difusión reportados en Xin *et al.*, 2006). Por otro lado, los restantes 14

péptidos de los 102 bajo análisis (ver Tablas 5.2 y 5.3) conducen a un radio hidrodinámico no-físico porque los valores numéricos satisfacen la expresión no esperada  $a_H \leq a_c$ , o las hidrataciones que se calculan son diferentes del valor promedio que se obtiene con la Ec. (5.3.1). Por consiguiente, una posible explicación de estos resultados es que la forma hidrodinámica de estos péptidos no se puede suponer esférica. Este aspecto se analiza a continuación, en la Sección 5.4, mientras que una discusión posterior se presenta en la Sección 5.5.

#### 5.4 CZE de péptidos con formas hidrodinámicas no-esféricas

Ambos modelos, PLLCEM y LLCCEM, descriptos previamente se modifican para incluir la forma no-esférica de los analitos. En efecto, tomando como base trabajos previos (Xin *et al.*, 2006; Allison *et al.*, 2004; Winzor, 2004; Abramson, 1939), la movilidad electroforética  $\mu_p$  de una partícula no-esférica se puede expresar en términos de la movilidad electroforética  $\mu$  de una partícula esférica equivalente con un volumen equivalente  $4\pi a_H^e{}^3 / 3$  donde  $a_H^e$  es el radio esférico equivalente. Este procedimiento implica la expresión simple (ver también Ec. (5.2.6)),

$$\mu_p = \Omega \mu \quad (5.4.1)$$

donde  $\Omega$  se evalúa mediante la teoría apropiada que corresponde a la movilidad electroforética de partículas no-esféricas. Con este fin se usan las soluciones analíticas aproximadas de la movilidad electroforética de partículas esferoidales del tipo prolato u oblató provistas por Yoon y Kim (1989). De esta manera, combinando las Ecs. (5.2.6) y (5.4.1) con estas soluciones simples que se reportan en la literatura citada, y usando las definiciones de esta Sección, se obtiene,

$$\Omega = \frac{3}{2} C / f(\kappa a_H^e) \quad (5.4.2)$$

y,

$$a_H^e = \frac{aE_x}{\frac{1}{2} \ln \left[ \frac{1+E_x}{1-E_x} \right]} \quad (5.4.3)$$

para esferoide del tipo prolato, y

$$a_H^e = \frac{aE_x}{\text{Cot}^{-1} \left[ \frac{\sqrt{1-E_x^2}}{E_x} \right]} \quad (5.4.4)$$

para esferoide del tipo oblato, ambos con ejes  $a > c$  y excentricidad  $E_x = \sqrt{1-(c/a)^2}$ . En estas ecuaciones, el coeficiente  $C$  se calcula como una función de  $\kappa c$  y  $c/a$  a partir de los gráficos reportados en Yoom y Kim (1989). Las ecuaciones aproximadas (5.4.3) y (5.4.4) se aplican solamente para  $\kappa a E_x < 1$  debido a la expansión llevada a cabo en las soluciones exactas que corresponden a funciones armónicas esferoidales. Además,  $\frac{aeE}{k_B T} < 1$  es una restricción (Russell *et al.*, 1989; Saville, 1977) para minimizar la convección de los iones del BGE alrededor de la partícula (esta expresión también implica que se aplica la hipótesis de Henry). Debido a que los péptidos son partículas pequeñas, estas restricciones en general se satisfacen, aún para valores de campo eléctrico  $E$  aplicados altos, encontrados en las corridas prácticas de la CZE.

En consecuencia, resolviendo la Ec. (5.4.1) para un dato experimental determinado  $\mu_p$  se encuentra  $a_H^e$  y  $Z$  para un valor inicial de  $\Omega$  mediante el algoritmo numérico disponible para resolver el LLCCEM y el PLLCEM. Este es un proceso iterativo sobre  $\Omega$  y se considera convergente cuando la hidratación calculada se aproxima a la predicción de la Ec. (5.3.1) como restricción de referencia básica. Esta última condición, a parte del concepto físico involucrado, permite reducir el número de partículas esferoidales que satisfacen la movilidad electroforética determinada por la Ec. (5.4.1). Luego, con los valores de  $\Omega$  y  $a_H^e$ , se ajusta la forma final de la partícula esferoidal considerando básicamente tres posibilidades: (1) la partícula esferoidal migra paralelo a la dirección del campo eléctrico aplicado tomando  $C = C^{\parallel}$  provisto en Yoom y Kim (1989). (2) la partícula esferoidal migra perpendicular a la dirección del campo eléctrico aplicado tomado  $C = C^{\perp}$  (este caso se debe excluir para  $\Omega > 1$  requerido en los cálculos (ver Tabla 5.2); lo contrario es también cierto); (3) la partícula esferoidal migra con un valor promedio  $\langle C \rangle = \alpha C^{\parallel} + C^{\perp}(1 - \alpha)$ , donde  $0 < \alpha < 1$  indica el grado de colinealidad en la orientación de la partícula con la dirección del campo eléctrico aplicado (axialmente a lo largo del tubo capilar). Si se supone que todas las orientaciones de la partícula son igualmente probables (es decir si se desprecia la minimización de la energía electrostática

asociada con el ángulo comprendido entre el eje mayor  $a$  y la dirección de  $E$  ) se encuentra que  $\alpha = 1/3$  a través de los ángulos de Euler de la partícula (ver, por ejemplo, Happel y Brenner, 1965). Esta situación, sin embargo, considera solamente que una partícula no cargada cambia de orientaciones debido al movimiento browniano en el proceso de sedimentación. Se muestra más abajo que este no es el caso para los péptidos cargados y pequeños con forma esferoidal, como consecuencia del campo eléctrico aplicado en la corrida de la CZE. En efecto, se considera que el péptido tiene un momento dipolar global debido a las diferentes posiciones de los centros de carga positivo y negativo, y que probablemente tiene tendencia a estar alineado con el campo eléctrico aplicado. Estos resultados se observan en las Tablas 5.2 y 5.3 donde  $\alpha \neq 1/3$  para la mayoría de los péptidos no-ésféricos.

Un análisis similar se lleva a cabo para los péptidos considerados como partículas cilíndricas. De esta manera, aunque la Ec. (5.4.2) aún se aplica, ahora en lugar de la Ec. (5.4.3) o (5.4.4), se obtiene (ver también, Abramson, 1939; Winzor, 2004),

$$\frac{K_o(\kappa c)}{\kappa c K_1(\kappa c)} = \frac{(2b/3)^{1/3}}{b(1 + \frac{\kappa c}{(2b/3)^{1/3}})} \quad (5.4.5)$$

donde el balance de volumen entre la esfera equivalente y el cilindro indica que

$a_H = c/(2b/3)^{1/3}$  con  $b = c/a$ . A parte de  $C^{\parallel} = 1$ , datos numéricos adicionales de  $C^{\perp}$  para un cilindro se presentan en Yoom y Kim (1989) y se ajustan aquí con la siguiente expresión:

$$C^{\perp} = \exp\left\{-\frac{(0.707 + 9.0310^{-6}\kappa c)}{(1 + 0.232\kappa c)}\right\} \quad (5.4.6)$$

Antes de terminar esta Sección, es relevante indicar que en tanto se usen las soluciones analíticas de la movilidad electroforética concerniente a partículas esferoidales del tipo prolato u oblató como las que se reportan en Yoom y Kim (1989) (ver también Ecs. (5.4.3) y (5.4.4)) la condición de volúmenes iguales entre la esfera equivalente de radio  $a_H^e$  y las partículas esferoidales se satisface sistemáticamente a través de las Ecs. (5.4.1) a (5.4.4) con una precisión numérica que decrece significativamente para valores altos de excentricidad, como se demuestra a partir del análisis algebraico simple de las Ecs. (5.4.3) y (5.4.4) junto con el balance de volumen, el cual se expresa  $a_H^e{}^3 = ac^2$  para la esfera equivalente y el esferoide del tipo prolato. Además, para valores relativamente altos

de  $\kappa a E_x$  se encuentra que se aplica la aproximación de cuerpo finito, que indica que la forma del péptido es cercana a un cilindro y son útiles entonces las Ecs. (5.4.5) y (5.4.6). Todos estos aspectos se ilustran numéricamente en las Tablas 5.2 y 5.3 y se discuten en la Sección 5.5.

## 5.5 Resultados y discusión

En la Tabla 5.1 se presentan los resultados numéricos obtenidos con el PLLCEM y el LLCCEM para 88 péptidos (designados aquí Grupo A) que satisfacen la condición  $a_H > a_c$ , y se muestran también los valores de hidratación predichos en promedio por los modelos que se usan para el ajuste de la Ec. (5.3.1) y que se suponen en principio como partículas esféricas. En esta tabla las diferencias de predicciones con el LLCCEM de  $a_H$  y  $Z$  se especifican entre paréntesis para visualizar el efecto del segundo término de la Ec. (5.2.4) que considera los efectos de solvatación y la interacción electrostática entre grupos cargados a través de  $\Delta Z_i$  y  $\Delta Z_j$ , respectivamente. En este sentido, se concluye que la aproximación  $\text{pH}_i \approx \text{pH}^*$  introducida por el LLCCEM es aceptable para aquellos péptidos que tienen principalmente cadenas laterales positivas o neutras. De esta manera los residuos de aminoácidos Asp y Glu no deben estar presentes para que esta hipótesis sea válida, como se infiere a partir de la AAS y de los valores reportados en la Tabla 5.1. Además, las perturbaciones  $\Delta Z_i$  y  $\Delta Z_j$ , son en general más relevantes en aquellos péptidos que tienen al menos dos residuos laterales cargados negativos incluyendo Asp o Glu (ver principalmente los péptidos N°: 1, 2, 22, 23, 25, 30, 32, 33, 48, 52, 66, 67, 69, 79, 85, 86). Para este tipo de péptidos se encuentran excepciones en la Tabla 5.1 (por ejemplo, los péptidos N° 43, 44, 46 y 47) y probablemente la explicación se basa en algunos efectos de hidratación asociados con los grupos laterales neutros como Leu, Val, Pro, Tyr, Gln y Thr vecinos a las cargas negativas. Aquellos péptidos que tienen solo un grupo lateral con carga negativa presentan un efecto minimizado con relación al fenómeno de regulación de cargas asociados con las perturbaciones  $\Delta Z_i$  y  $\Delta Z_j$  de la Ec. (5.2.4) (ver, principalmente los péptidos N°: 13, 14, 17, 18, 26, 27, 29, 31, 34, 35, 45, 47, 50, 73, 74, 76). También, es interesante indicar que las excepciones de estos péptidos son aquellos que presentan un grupo lateral con carga negativa situado en el último  $C_\alpha$ , introduciendo una perturbación más evidente (Péptidos N°: 71, 72, 84) probablemente debido a un grado de libertad

conformacional más alto de esta carga ubicada al final de la cadena peptídica y también a causa de su interacción contigua con el grupo carboxilo terminal negativo. Otra excepción es el péptido N° 65 que tiene un residuo Asp negativo que interacciona con tres Arg cercanas, cargadas positivamente.

En general, a partir de los valores de  $a_H$  y  $Z$  que se obtienen con ambos modelos, se observa que el fenómeno de regulación de cargas en la electroforesis de estos péptidos está presente principalmente al nivel de la aproximación de campo promedio correspondiente al segundo término de la Ec. (5.2.5), teniendo en cuenta que los valores numéricos obtenidos con estos modelos son bastante similares. Además, se presenta en esta tabla un aumento del pH cercano a la molécula, como se espera, teniendo en cuenta que a  $\text{pH} = 2.5$  los péptidos tienen cargas netas positivas y en consecuencia se calcula una concentración de protones más baja en el ambiente global de los péptidos con ambos modelos, originando una  $Z < Z^r$ , aquí  $Z^r$  es el número de carga neta de referencia del

péptido calculado a partir de  $\sum_{i=1}^{N_c} Z_i^r$ . En adición, las hidrataciones que se estiman a partir

de los valores conocidos de  $a_H$  y  $a_c$  se usan para generar las constantes requeridas en la Ec. (5.3.1) aproximada, como se explicó antes.

Asimismo, se obtienen otras conclusiones interesantes a partir de la Tabla 5.1. Para péptidos con carga baja y tamaño grande, es posible encontrar un gran número de conformaciones de la cadena, minimizando así la energía total de la cadena a una forma aproximadamente esférica. En adición, aquellos péptidos con tamaño grande y que tienen un número de cargas positivas alto, presentan valores de hidratación altos sin entrar en el régimen de polielectrolitos extendidos, conservando así una forma casi esférica (por ejemplo, los péptidos N°: 62, 63, 64). Estos últimos péptidos no tienen aún un número suficiente de cargas para conseguir una transición a conformaciones más complejas en el sentido de lo reportado en la literatura (ver, por ejemplo, Dobrynin, 2004). En efecto, es posible encontrar diferentes conformaciones de polianfolitos en solución, las cuales dependen en principio, de la diferencia (equivalente en forma aproximada a la carga neta) y de la suma de cargas positivas y negativas presentes en la cadena. También, se encuentra en la Tabla 5.1 que para péptidos pequeños (no aplica aquí la estadística aleatoria de la cadena) los valores de carga neta relativamente altos determinan una hidratación significativa de los péptidos para conformar las correspondientes cadenas de las unidades

hidrodinámicas de forma casi esférica, como por ejemplo, los péptidos N°: 57, 59, 61. Esta situación se revierte para la mayoría de los péptidos pequeños con carga neta baja, que se deben describir como partículas no-esféricas (ver Tablas 5.2 y 5.3).

**Tabla 5.1.** Predicciones numéricas del radio hidrodinámico  $a_H$ , el número de carga neta  $Z$ , el pH cercano a la molécula  $\text{pH}^*$  y la hidratación  $\delta$  de 88 péptidos (Grupo A) estudiados con el PLLCM. Los resultados obtenidos con el LLCCEM se presentan entre paréntesis, solamente cuando las predicciones del modelo son diferentes. Parámetros usados:  $\text{pH} = 2.5$ ,  $I = 35.3$  mM,  $T = 295$  K,  $\eta = 0.00097$  Pa s y  $s = 1$ . Además,  $\text{p}K_{\text{COOHt}}^r = 3.8$ ,  $\text{p}K_{\text{NH}_2\text{t}}^r = 7.5$ ,  $\text{p}K_{\text{Arg}}^r = 12.0$ ,  $\text{p}K_{\text{His}}^r = 6.3$ ,  $\text{p}K_{\text{Lys}}^r = 10.4$ ,  $\text{p}K_{\text{Asp}}^r = 4.0$ ,  $\text{p}K_{\text{Glu}}^r = 4.4$ ,  $\text{p}K_{\text{Cys}}^r = 8.3$ ,  $\text{p}K_{\text{Tyr}}^r = 9.6$  (Xin *et al.*, 2006). Los datos experimentales de las movilidades electroforéticas y las AAS de los péptidos corresponden a Janini *et al.* (1999 y 2001).

N°	AAS	$\mu 10^8$ ( $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$a_H$ ( $\text{\AA}$ )	$Z$	$\text{pH}^*$	$\delta$
1	DD	1.031	5.08 (4.97)	0.78 (0.76)	2.86	0.63
2	EE	1.252	4.52 (4.47)	0.82 (0.81)	2.94	0.14
3	FL	1.333	4.50	0.87	2.97	0.13
4	FF	1.281	4.67	0.88	2.95	0.12
5	YY	1.210	4.92	0.88	2.92	0.17
6	WW	1.105	5.35	0.89	2.88	0.29
7	SSS	1.324	4.53	0.87	2.96	0.14
8	FFF	1.038	5.65	0.90	2.86	0.29
9	YGGFL	0.975	5.97	0.90	2.84	0.27
10	YGGFM	0.953	6.09	0.90	2.83	0.29
11	RPPGF	1.836	6.31	1.82	3.14	0.41
12	AAGIGILTV	0.651	8.33	0.92	2.72	1.09
13	YMDGTMSQV	0.602	8.52 (8.51)	0.88	2.71	0.81
14	VLQELNVTV	0.665	8.06 (8.05)	0.90	2.73	0.60
15	RPPGFSPFR	1.971	8.37 (8.36)	2.80 (2.81)	3.18	0.72
16	AFLPWHRLF	1.656	9.63	2.84	3.07	1.20
17	VISNDVCAQV	0.583	8.74 (8.73)	0.88	2.70	0.91
18	KLVVVGADGV	1.313	8.13 (8.10)	1.80 (1.79)	2.95	0.72
19	KLVVVGAAGV	1.410	7.91	1.87	2.99	0.67
20	NSFCMGGMNRR	1.830	8.89	2.82	3.13	0.69
21	RPKPQQFFGLM	1.698	9.44	2.84	3.08	0.87
22	ACLGRDRRTEE	2.097	9.60 (9.48)	3.58 (3.52)	3.22	1.01
23	DAEKSDICTDEY	0.991	9.51 9.42	1.67 1.65	2.84	0.87
24	TTIHNYICNSS	1.059	9.94	1.90	2.86	1.05
25	PHRERCSDSDGL-ace	1.949	10.41 (10.35)	3.71 (3.69)	3.17	1.37
26	ACPGTDRRTGGGN	1.508	10.13 (10.11)	2.77 (2.76)	3.02	1.38
27	ACPGKDRRTGGGN	1.911	10.53 (10.51)	3.70 (3.69)	3.16	1.58
28	MGGMNWRPILTIIT	1.020	10.23	1.90	2.85	0.98
29	SPALNKMFCELAKT	1.571	9.94 (9.93)	2.81	3.04	0.90
30	HMTEVVRHCPHHER	2.641	12.63 (12.57)	6.57 (6.53)	3.40	2.17
31	LAKTCPVRLWVDSTPP	1.512	10.11 (10.09)	2.77 (2.76)	3.02	0.76
32	VVRRCPHQRCSDSDGI	2.146	11.26 (11.15)	4.55 (4.49)	3.24	1.27

33	LGRNSFEVCVCACPGRD	1.366	10.89 (10.84)	2.77 (2.75)	2.97	1.08
34	KLVVVGAGDVGKSALTI	1.369	10.93 (10.92)	2.79	2.97	1.33
35	TPPGTRVQQSQHMTEV	1.417	10.79 (10.77)	2.83	2.99	0.97
36	YKLVVVGAAAGVGKSALT	1.422	10.85	2.87	2.99	1.27
37	YKLVVVGACGVGKSALT	1.434	10.78	2.86	2.99	1.20
38	YNYMCNSSGMGMNRRP	1.430	10.80	2.86	2.99	0.94
39	YKLVVVGAVGVGKSALT	1.506	10.38	2.86	3.02	1.00
40	YKLVVVGARGVGKSALT	1.780	11.38	3.83	3.11	1.46
41	PPPGTRVRVMAIYKQSQ	1.820	11.18	3.83	3.12	1.13
42	DGLAPPQHRIRVEGNLR	1.949	12.24 (12.21)	4.64 (4.63)	3.17	1.70
43	VPYEPPEVGSVYHHPLQLHV	1.532	12.55 (12.54)	3.78 (3.77)	3.02	1.47
44	FLTPKKLQCVDLHVISNDVCA QVHPQKVTK	1.868	16.15 (16.13)	6.60 (6.58)	3.13	2.44
45	HQIINMWQEVGKAMYAPPI SGQIRRIHIGPGRAFYTTKN	1.753	18.89 (18.88)	7.80 (7.79)	3.09	3.09
46	IITLEDSSNLLGRNSF	1.133	9.02 (9.04)	1.80 (1.79)	2.89	0.36
47	GSDCTTIHCNYM	1.241	8.50 (8.49)	1.80	2.93	0.46
48	LDDRNTFRRSVVVPYE	1.830	10.62 (10.52)	3.58 (3.54)	3.13	0.84
49	SSCMGGMNQRPIIT	1.066	9.89	1.89	2.87	0.64
50	YLSGADLNL	0.623	8.29	0.88	2.72	0.79
51	AAANLVPMVATV	0.615	8.72	0.92	2.71	0.75
52	HMTEVRRYPHHER	2.642	12.62 (12.57)	6.57 (6.53)	3.40	2.05
53	FIGITEAAANLVPMVATV	0.473	10.52	0.91	2.66	0.92
54	HG	2.704	4.33	1.69	3.45	0.27
55	RTHCQSHYRRRHCSR	2.896	14.40	8.67	3.48	3.10
56	RK	3.200	5.38	2.60	3.62	0.60
57	KKK	3.303	6.78	3.58	3.65	1.26
58	DRVIEVVQAYRAIRHIPRRIR	2.083	23.13 (23.11)	12.56 (12.55)	3.19	5.59
59	KKKK	3.303	8.21	4.59	3.64	1.93
60	CRHRRRHRRGC	2.968	14.14	8.66	3.51	4.08
61	KKKKK	3.303	9.53	5.59	3.64	2.62
62	CRHRRRHRRGC	2.968	12.26	9.66	3.50	4.81
63	HRSCRRRKRSCRHR	3.027	17.13	11.65	3.52	5.49
64	RTHGQSHYRRRHCRRLHRI HRRQ	2.901	21.51	15.68	3.46	6.82
65	ACHGRDRRT	2.654	9.61 (9.55)	4.54 (4.50)	3.41	1.39
66	ACPGRNRRTTEENL	1.940	10.37 (10.30)	3.68 (3.65)	3.17	1.01
67	ACSGRDRRTEE	2.191	9.24 (9.11)	3.56 (3.49)	3.26	0.86
68	ANSK	2.091	5.60	1.79	3.23	0.36
69	EPPEVGS DYHHPLQLHV	1.691	11.42 (11.38)	3.66 (3.64)	3.08	1.22
70	GIGAVLK	1.550	7.31	1.85	3.04	0.80
71	HMTE	1.891	6.04 (6.00)	1.77 (1.76)	3.16	0.38
72	KSSQYIKANSKFIGITE	1.705	11.68 (11.65)	3.80 (3.79)	3.08	1.40
73	KSSQYIKANSKFIGITEAAANL VPMVATV	1.421	13.38 (13.37)	3.83	2.98	1.28
74	LAKTYPVQLWVDS	1.051	9.75 (9.73)	1.83	2.86	0.84
75	LAPPQH LIQVEGNLRV	1.505	10.30	2.82	3.02	0.85
76	LLGRNSFEMRV	1.702	9.32 (9.31)	2.80 (2.79)	3.09	0.85
77	MLDLQPETT	0.633	8.04 (8.02)	0.85	2.72	0.55
78	NHQLLSPAKTGWRI FHP	1.942	12.59	4.81	3.16	1.82

79	NTFRHSVVEPYEPPEVG	1.355	10.97 (10.95)	2.77	2.96	1.01
80	PARR	2.765	6.21	2.68	3.46	0.51
81	SSQYIK	1.671	6.86	1.84	3.08	0.42
82	TYSPALNRMFCQLAKT	1.477	10.53	2.86	3.01	0.90
83	VLTTGLPALISWIK	1.050	10.00	1.90	2.86	0.97
84	VVRRYPHHE	2.738	9.54 (9.47)	4.64 (4.59)	3.44	1.14
85	YAEGDVHATSK	1.740	8.90 (8.86)	2.69 (2.67)	3.10	0.81
86	YAEGDVHATSKPARR	2.138	11.38 (11.33)	4.60 (4.58)	3.23	1.54
87	YKLVVVGANGVGKSALT	1.436	10.77	2.86	2.99	1.18
88	YSPALNKMCCQLAKT	1.490	10.46	2.86	3.01	1.03

Las Tablas 5.2 y 5.3 presentan los 14 péptidos restantes (designados aquí grupo B) para los cuales ambos modelos conducen a hidrataciones bajas con relación al valor aproximado que provee la Ec. (5.3.1), o a hidrataciones que resultan no físicas ( $a_H \leq a_c$ ), cuando se suponen partículas hidrodinámicamente esféricas. Por consiguiente, se espera un cambio de forma del volumen equivalente de la partícula de una esfera a esferoide, y en este sentido es útil la Sección 5.4. En efecto, se encuentra que estos péptidos se pueden representar como esferoides del tipo prolato (Tabla 5.2) o partículas cilíndricas (Tabla 5.3), cuando el valor de la hidratación debe aproximar la predicción de la Ec. (5.3.1). La dimensión aproximada  $c$  y el cociente  $c/a$  también se presentan en estas tablas. Se debe observar que la dimensión  $a$  es irrelevante para cilindros debido a que en este caso se aplica la hipótesis de la teoría de cuerpo delgado (*slender body theory*), aparte de la restricción impuesta por la Ec. (5.4.5). Existe un aspecto que se debe señalar con relación a los péptidos del grupo B: el grado de orientación colineal de la partícula  $\alpha$  es en general mayor que  $1/3$  indicando que tanto el esferoide del tipo prolato cargado como el cilindro están orientados en promedio preferentemente en la dirección del campo eléctrico aplicado, y en consecuencia, no todas las orientaciones de la partícula son igualmente probables para la CZE de los péptidos cargados incluidos en el grupo B. En general, a medida que la hidratación crece la partícula equivalente de los péptidos del grupo B tiende a una forma esférica acercándose así a la forma de aquellos péptidos que pertenecen al grupo A. Por el contrario, a medida que la hidratación decrece dentro del grupo B, se espera encontrar a una partícula hidrodinámica más delgada (ver, por ejemplo, los péptidos N° 90, 91, 92, en la Tabla 5.2).

El análisis mencionado en el párrafo anterior indica que existe un aspecto físico relevante que provee una racionalidad para inferir una forma hidrodinámica de un péptido en la CZE, diferente de la esférica. En efecto, cuando el radio hidrodinámico de la partícula

esférica es menor que el radio compacto del péptido, esto indica que en los cálculos se pierde no solamente la hidratación sino también la conservación de masa del péptido. Este resultado no-físico proviene en parte de suponer una forma hidrodinámica inconsistente de la partícula del péptido para el dato de movilidad experimental que se usa. De acuerdo con los cálculos que se muestran en las Tablas 5.2 y 5.3, se observa que cuando la forma hidrodinámica del péptido se supone un esferoide del tipo prolato o un cilindro delgado, se conserva tanto la masa del péptido, como así también los valores de hidratación del péptido se vuelven físicamente aceptables en el contexto de la Ec. (5.3.1). De esta manera, con la restricción de que el volumen hidrodinámico del péptido es constante, una forma de conservar la masa en los péptidos de las Tablas 5.2 y 5.3 es precisamente descartar la forma esférica.

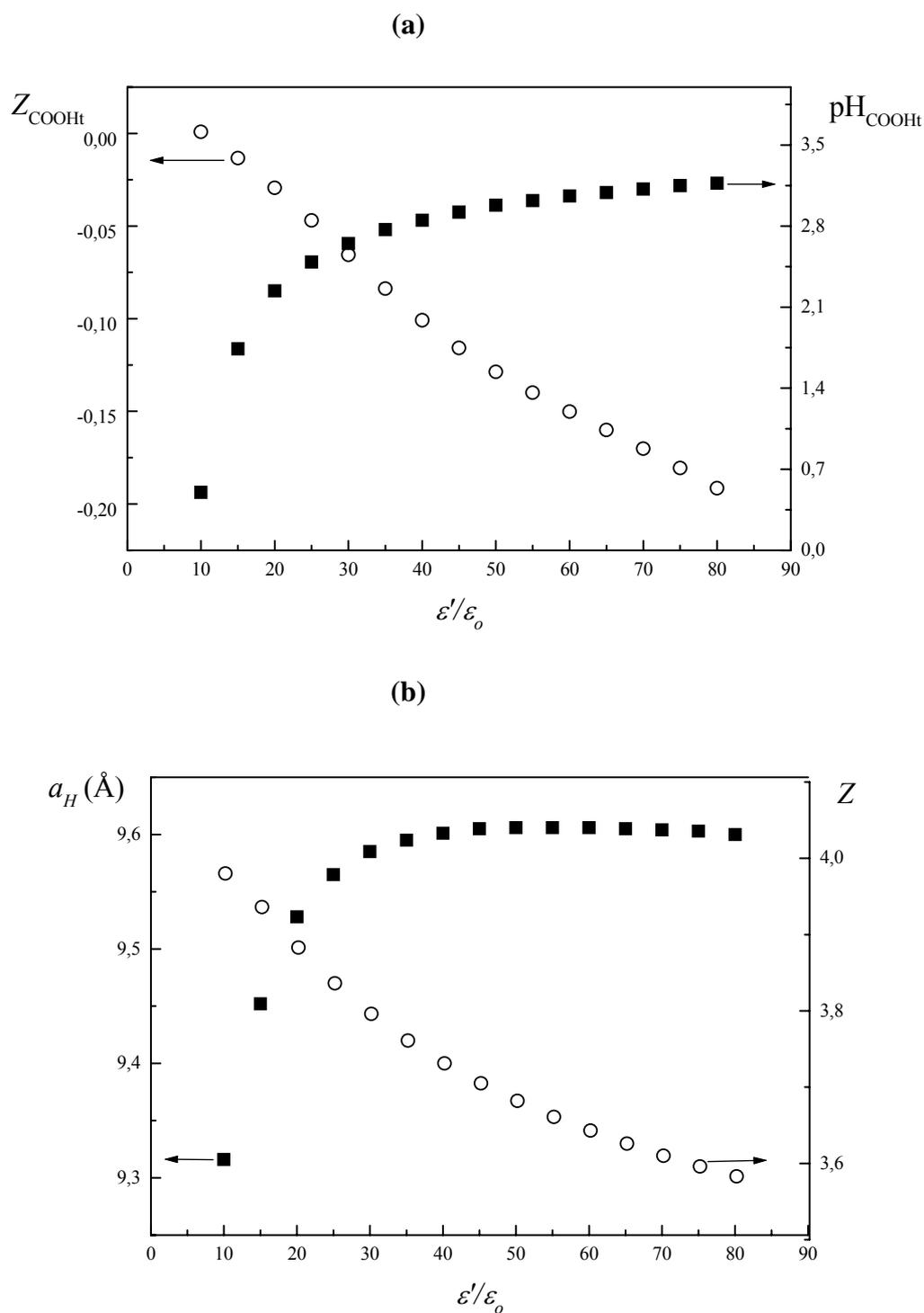
**Tabla 5.2.** Predicciones numéricas del PLLCEM para los 14 péptidos (Grupo B) que se representan como esferoides del tipo prolato. La hidratación aproximada es  $\delta \cong 0.1$  (ver Ec. (5.3.1)). Otros valores de los parámetros son los mismos que en la Tabla 5.1.

Nº	AAS	$\mu_p 10^8$ ( $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$a_H^e$ (Å)	Z	$\langle C \rangle$	c (Å)	c/a	$\alpha$	$C^{\parallel}$	$C^{\perp}$
89	FD	1.300	4.46	0.81	0.69	3.39	0.5	0.58	0.74	0.63
90	GG	2.170	3.47	0.83	0.85	1.62	0.2	1.00	0.81	-
91	AA	1.927	3.70	0.84	0.79	2.18	0.3	1.00	0.80	-
92	PG	1.843	3.79	0.85	0.78	2.23	0.3	0.89	0.80	0.60
93	VV	1.539	4.09	0.86	0.70	3.73	0.6	0.74	0.72	0.64
94	FG	1.516	4.13	0.86	0.70	3.40	0.6	0.69	0.72	0.64
95	FA	1.486	4.22	0.86	0.69	3.47	0.6	0.71	0.72	0.64
96	LL	1.455	4.26	0.86	0.68	3.74	0.7	0.68	0.71	0.65
97	FV	1.390	4.38	0.87	0.68	3.84	0.7	0.48	0.71	0.65
98	MM	1.386	4.46	0.87	0.69	5.60	0.7	1.00	0.69	-
99	AAA	1.543	4.07	0.86	0.70	3.58	0.7	0.81	0.71	0.65
100	AAAA	1.387	4.58	0.87	0.71	4.02	0.7	1.00	0.71	-
101	AAAAA	1.233	4.91	0.88	0.68	4.31	0.7	0.63	0.71	0.63
102	RQQ	2.400	5.15	1.76	0.70	4.52	0.7	0.87	0.71	0.65

**Tabla 5.3** Predicciones numéricas del PLLCEM para los 14 péptidos (Grupo B) representados como cilindros. La hidratación aproximada es  $\delta \cong 0.1$  (ver Ec. (5.3.1)). Otros valores de los parámetros son los mismos que en la Tabla 5.1.

Nº	AAS	$\mu_p 10^8$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$a_H^e$ (Å)	Z	$\langle C \rangle$	c (Å)	c/a	$\alpha$
89	FD	1.300	4.46	0.81	0.69	3.66	0.21	0.49
90	GG	2.170	3.47	0.83	0.85	3.24	0.20	0.60
91	AA	1.927	3.70	0.84	0.79	3.40	0.20	0.58
92	PG	1.843	3.79	0.85	0.78	3.34	0.20	0.55
93	VV	1.539	4.09	0.86	0.70	3.55	0.21	0.39
94	FG	1.516	4.13	0.86	0.70	3.50	0.20	0.38
95	FA	1.486	4.22	0.86	0.69	3.58	0.21	0.38
96	LL	1.455	4.26	0.86	0.68	3.73	0.21	0.37
97	FV	1.390	4.38	0.87	0.68	3.65	0.21	0.34
98	MM	1.386	4.46	0.87	0.69	3.58	0.21	0.37
99	AAA	1.543	4.07	0.86	0.70	3.38	0.20	0.39
100	AAAA	1.387	4.58	0.87	0.71	3.37	0.20	0.41
101	AAAAA	1.233	4.91	0.88	0.68	3.36	0.20	0.35
102	RQQ	2.400	5.15	1.76	0.70	3.72	0.21	0.40

También es posible visualizar el efecto de  $\varepsilon'$  sobre  $a_H$ , Z, y el  $\text{pH}_{\text{COOHt}}$  y  $Z_{\text{COOHt}}$  cuando se usa el PLLCEM, como se ilustra en la Figura 5.1, por ejemplo, para el péptido N° 22, que contiene grupos residuales con cargas negativa y positiva en la AAS. Primero se observa que las predicciones provistas por el PLLCEM y el LLCCEM para este péptido muestran diferencias apreciables (Tabla 5.1) con relación a la carga neta y radio hidrodinámico. Estos resultados son una consecuencia directa que, en la medida que los grupos residuales son neutros, el fenómeno de regulación de cargas se lleva a cabo predominantemente a través de las interacciones electrostáticas entre la carga terminal del péptido y el BGE (este efecto se describe principalmente mediante la solución de campo promedio). Así, en estas condiciones las predicciones de ambos modelos son prácticamente coincidentes como se indica arriba. No obstante para el péptido N° 22 como un ejemplo típico, la Figura 5.1 muestra un acoplamiento bastante complejo entre el tamaño del péptido y la carga neta, y la carga neta y el pH cercano al COOH-terminal.



**Figura 5.1.** Predicciones numéricas (símbolos) del PLLCEM para el péptido N° 22, con diferentes valores de la permitividad eléctrica en el dominio del péptido. **(a)** Efecto de  $\epsilon'$  sobre  $\text{pH}_{\text{COOHt}}$  y  $Z_{\text{COOHt}}$  definiendo el microambiente del grupo carboxilo terminal. **(b)** Efecto de  $\epsilon'$  sobre  $a_H$  y  $Z$  definiendo la solución de campo promedio de este péptido. Otros valores de los parámetros son los mismos que los reportados en la Tabla 5.1.

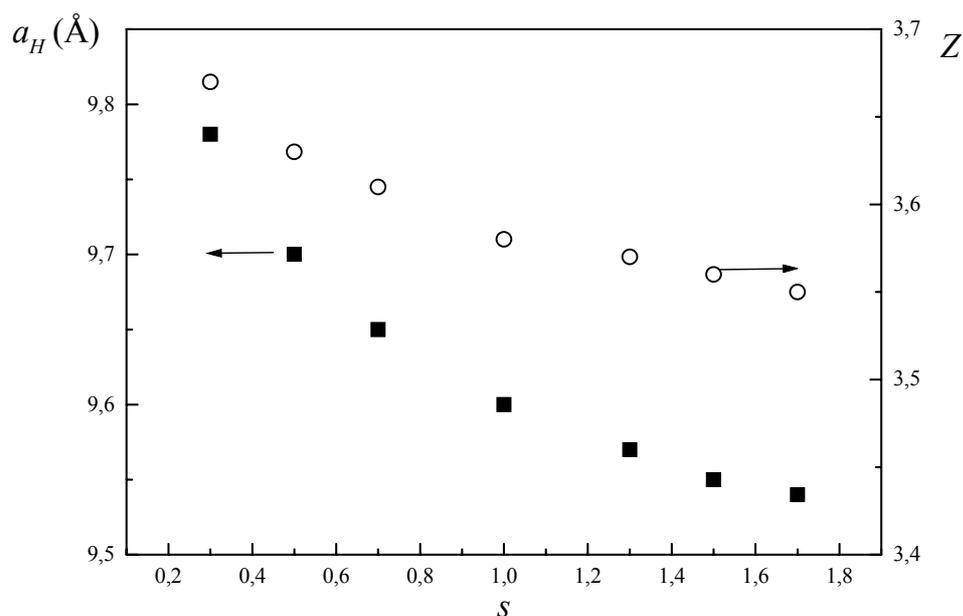
De esta manera  $\text{pH}_{\text{COOHt}}$  decrece con la disminución de los valores de  $\varepsilon'$ , mientras  $Z_{\text{COOHt}}$  muestra la tendencia opuesta hacia la neutralidad. Este resultado es consistente con el aumento de la carga neta del péptido  $Z$  para valores decrecientes de  $\varepsilon'$ . A partir de esta figura se concluye que para permitividades eléctricas bajas en el dominio del péptido, en el rango de  $10 < \varepsilon' / \varepsilon_0 < 40$ , los efectos de la solvatación son importantes. Es notable la tendencia de  $a_H$  a tomar valores pequeños en este rango bajo de  $\varepsilon'$  conduciendo a hidrataciones no esperadas. Este análisis simple sugiere que las conformaciones de los péptidos estudiados aquí son bastante abiertos y que  $\varepsilon' / \varepsilon_0 \approx 80$  es una buena estimación. Además, el enlace peptídico con  $L \approx 3.8 \text{ \AA}$  genera valores relativamente altos de  $r_{ij}$  indicando que la interacción electrostática predominante ocurre a nivel de campo promedio (las diferencias entre el PLLCEM y el LLCCEM son bastante pequeñas como se reporta en la Tabla 5.1). Para visualizar mejor este aspecto físico, la Tabla 5.4 y la Figura 5.2 también ilustran el efecto de  $s$  sobre  $a_H$  y  $Z$  para el péptido N° 22; donde se observa que para conformaciones más compactas ( $s < 1$ ) el número de carga neta de los grupos negativos es menor en valor absoluto (es decir, los valores de  $\text{p}K_i$  aumentan) y el número de carga neta de los grupos positivos no varía de manera apreciable, generando así un péptido con un número de carga neta positivo más alto. Estos resultados son consistentes con los efectos de las interacciones electrostáticas en una representación física donde el campo eléctrico positivo predominante, creado por los grupos cargados positivos totalmente disociados afectan los grupos cargados negativos parcialmente disociados. En esta misma dirección y a pesar de que la conformación del péptido es más compacta, se obtienen valores de radio hidrodinámico mas altos, consistentemente con la hidratación que aumenta, acompañando el aumento del número de carga neta (Ec. (5.3.1)), que se observa en la Tabla 5.4. La situación opuesta también se valida para resultados numéricos de  $s > 1$  con la correspondiente disminución de los valores de hidratación reportados en esta Tabla.

También es importante indicar que las predicciones de  $Z$  con los modelos que se usan aquí están en buena concordancia con los valores reportados por Xin *et al.* (2006) para la mayoría de los 58 péptidos estudiados por estos autores. La misma concordancia se encontró cuando los valores correspondientes de  $a_H$  reportados en la Tabla 5.1 se comparan con aquellos valores que se obtienen a partir de los coeficientes de difusión  $D$

calculados en Xin *et al.* (2006) cuando se considera que  $a_H \approx k_B T / (6\pi\eta D)$ . De esta manera, en general, las diferencias promedios en las predicciones de  $D$  y  $Z$  a partir de los modelos y los valores reportados en Xin *et al.* (2006) no exceden el 5 % (aquellos péptidos reportados en las Tablas 5.2 y 5.3 que tienen forma no-esférica dentro de los 58 péptidos estudiados por estos autores no se comparan aquí). Esta última comparación correspondiente a  $a_H$  también indica que las predicciones de las hidrataciones de los péptidos son comparables a aquellas que corresponden a los cálculos de Xin *et al.* (2006). Sin embargo, en este sentido las principales diferencias se obtienen en las comparaciones con aquellos péptidos bastante pequeños (principalmente péptidos N°: 1, 6, 91, 96, 98), para los que se encontró la necesidad de asignar a algunos de ellos una forma no-esférica para lograr la hidratación esperada y, por consiguiente, se incluyeron en el Grupo B.

**Tabla 5.4.** Predicciones numéricas del radio hidrodinámico  $a_H$ , la carga neta  $Z$ , la hidratación  $\delta$  y el  $pK_i$  del péptido N° 22 (ACLGRDRRTEE), obtenidas con el PLLCEM para diferentes valores de  $s$ . Otros parámetros son los mismos que los reportados en la Tabla 5.1. En el  $pK_i$  se señala el número de residuo de la AAS.

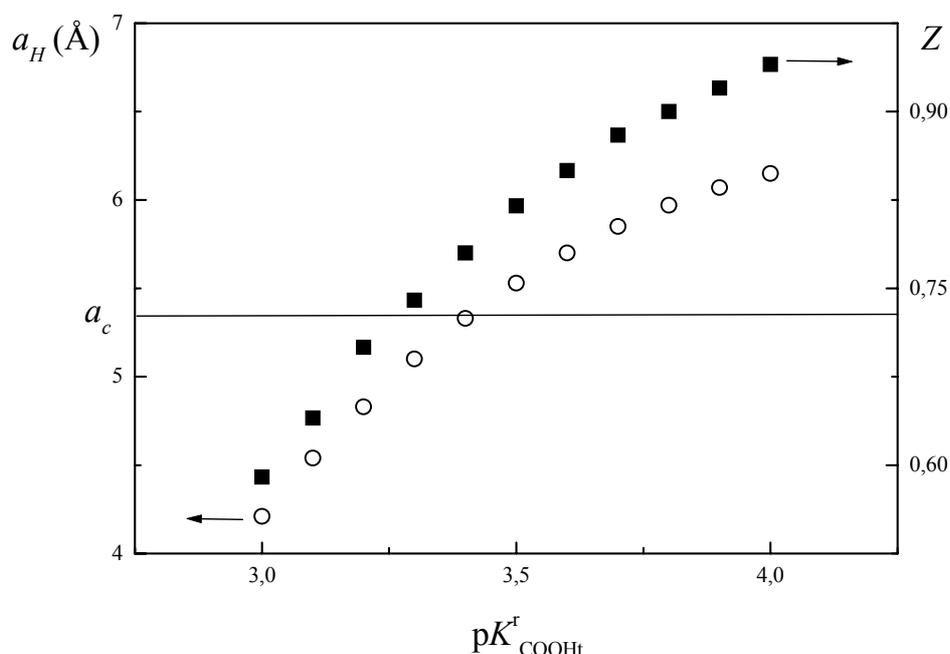
	$s = 0.3$	$s = 0.5$	$s = 0.7$	$s = 1.0$	$s = 1.3$	$s = 1.5$	$s = 1.7$
$a_H$	9.78	9.70	9.65	9.60	9.57	9.55	9.54
$Z$	3.67	3.63	3.61	3.58	3.57	3.56	3.55
$\delta$	1.11	1.06	1.04	1.01	0.99	0.98	0.98
$pK_{\text{NH}_3^+t}$	6.94	6.88	6.84	6.82	6.80	6.80	6.79
$pK_{\text{Cys}2}$	7.77	7.70	7.66	7.63	7.61	7.60	7.60
$pK_{\text{Arg}5}$	11.60	11.48	11.42	11.38	11.35	11.34	11.33
$pK_{\text{Asp}6}$	3.42	3.37	3.34	3.32	3.31	3.30	3.30
$pK_{\text{Arg}7}$	11.63	11.51	11.45	11.39	11.36	11.35	11.33
$pK_{\text{Arg}8}$	11.59	11.49	11.43	11.38	11.35	11.34	11.33
$pK_{\text{Glu}10}$	4.00	3.89	3.83	3.78	3.75	3.74	3.73
$pK_{\text{Glu}11}$	4.09	3.95	3.87	3.81	3.78	3.76	3.75
$pK_{\text{COOHt}}$	3.21	3.18	3.15	3.13	3.12	3.11	3.10



**Figura 5.2.** Predicciones numéricas (símbolos) de  $a_H$  y  $Z$  del péptido N° 22 realizadas con el PLLCEM para diferentes valores del parámetro  $s$ . Otros valores de los parámetros son los mismos que los reportados en la Tabla 5.1.

Aunque los modelos usados en esta Tesis proporcionan una distinción entre los péptidos de acuerdo a su tamaño, forma y carga neta, como se ilustra numéricamente en las Tablas 5.1 a 5.3, es también evidente que varias incertidumbres necesitan ser removidas en futuros estudios con relación a este difícil tema. En efecto, entre ellas la más relevante es la que se asocia con el valor asignado a  $pK_{\text{COOHt}}^{\text{r}}$ , es decir la constante de disociación del grupo terminal  $-\text{COOH}$ . De esta manera, se debe señalar que los valores numéricos estimados con los dos modelos aplicados a los péptidos supuestos como partículas esféricas, indican que aumentando el  $pK_{\text{COOHt}}^{\text{r}}$  desde 3.2 a 3.8, los cuales son valores posibles reportados previamente en la literatura (Xin *et al.*, 2006; Rickard *et al.*, 1991; Castagnola *et al.*, 1994, 1996 y 1998) la hidratación que se espera a partir de la Ec. (5.3.1) es también aproximada con la reversión consecuente de la relación no-física  $a_H < a_c$  que se encuentra en varios péptidos del grupo B. Así, se concluye que la forma de la partícula no es la única consecuencia que emerge de los resultados dando  $a_H < a_c$  sino también aquella relacionada con la incertidumbre en el valor de referencia asignado a  $pK_{\text{COOHt}}^{\text{r}}$ . Esto se ilustra para el péptido N° 9 en la Figura 5.3, donde los valores físicos aceptados

para  $pK_{\text{COOHt}}^{\text{r}}$  son aquellos que satisfacen  $a_H > a_c$ . Estos resultados son relevantes en el sentido que demuestran que es necesario predecir y cuantificar las hidrataciones de los péptidos para obtener un modelado consistente de la CZE, principalmente cuando se consideran estos analitos complejos.



**Figura 5.3.** Predicciones numéricas (símbolos) del LLCEM, con relación al efecto del valor asignado a  $pK_{\text{COOHt}}^{\text{r}}$  sobre el radio hidrodinámico  $a_H$  y la carga neta  $Z$  del péptido N° 9. El valor del radio compacto  $a_c$  del péptido se indica con una línea entera horizontal para mostrar los rangos superiores  $a_H > a_c$  y  $pK_{\text{COOHt}}^{\text{r}} > 3.4$  donde se obtienen hidrataciones físicas. Otros valores de los parámetros son los mismos que los reportados en la Tabla 5.1.

Finalmente, es claro que para los grupos terminales la condición  $pK_i^{\text{r}} \approx pK_i^{\circ}$  no es apropiada dentro del marco de los modelos que se usan aquí, donde los valores de  $\Delta pK_i$  también se presentan como resultados. En general, el carboxilo terminal en el péptido es un ácido más débil que el que corresponde al aminoácido libre:  $pK_{\text{COOHt}}^{\circ}$  cambia de alrededor de 2.2 a un valor comprendido entre 3.3 a 3.5 para el  $pK_{\text{COOHt}}$  de la cadena del péptido de acuerdo a nuestras evaluaciones con los  $\Delta pK_{\text{COOHt}}$  (ver también Tabla 5.1). Por el contrario, el grupo amino terminal se vuelve más ácido como consecuencia del enlace

peptídico y las interacciones electrostáticas:  $pK_{\text{NH}_3^+}^\circ$  cambia de un valor de alrededor de 9.5 a un valor entre 6.8 a 7.3 aproximadamente para el  $pK_{\text{NH}_3^+}$  en la cadena del péptido de acuerdo con nuestros resultados (Tabla 5.1). En este mismo contexto de análisis se observa que los grupos cargados laterales en los péptidos modifican los  $pK_i^\circ$  ligeramente indicando que este cambio se debe principalmente al fenómeno de regulación de cargas. Luego, es claro que a pesar que el análisis de la movilidad electroforética de los péptidos no es necesariamente simple a un pH por debajo de los valores promedio del  $pK_{\text{COOH}}$ , es más fácil que para pH relativamente altos, en el rango, por ejemplo, entre 8 y 9, donde el  $pK_{\text{NH}_3^+}$  provee una carga positiva fraccional, y en consecuencia, los efectos de los otros  $\Delta pK_i$  no se excluyen debido a la disociación completa de los grupos amino protonados, como ocurre a pH bajo. Por lo tanto, en este sentido del fenómeno de regulación de cargas y el efecto del enlace peptídico sobre los  $pK_i$  de los grupos terminales, el análisis de la movilidad electroforética de los péptidos se desarrolla mejor a pH alrededor de 2.5. A pesar de esta clara estrategia usada en trabajos previos, se muestra en la Tabla 5.1 que el efecto del fenómeno de regulación de cargas aún está afectando los cálculos de las cargas netas de los péptidos a pH bajo (se encuentra que  $Z \neq Z^r$ ) y consecuentemente el valor final del radio hidrodinámico equivalente  $a_H$ .

## 5.6 Conclusiones

El aspecto relevante con relación a los dos modelos (LLCEM y PLLCEM) considerados en este capítulo es que los valores de la carga neta, el radio hidrodinámico esférico y la hidratación de 88 péptidos de los 102 reportados por Janini *et al.* (2001) y que se estudian aquí, se estiman usando solamente la movilidad electroforética experimental y la correspondiente secuencia de aminoácidos. Para los restantes 14 péptidos, que requieren ser modelados como partículas no-esféricas, se necesita información adicional como una estimación de la hidratación y una dimensión relacionada con la forma del péptido.

Es importante señalar que el uso del tamaño hidrodinámico y la forma del péptido en lugar de su masa molar para evaluar su coeficiente de fricción, es una alternativa de interés que puede ayudar a interpretar el fenómeno de hidratación a nivel de la información

factible de lograr a partir de experiencias de la CZE. Esta estimación se obtiene fácilmente a partir del PLLCEM y el LLCCEM propuestos en esta Tesis.

Es importante también señalar que las predicciones de la carga neta y el radio hidrodinámico logradas con el PLLCEM y el LLCCEM para la mayoría de los 58 péptidos estudiados por Xin *et al.* (2006) están en buena concordancia con los resultados obtenidos por estos autores, mediante un modelo detallado basado en la estructura. En efecto, las diferencias promedios que se obtienen no son mayores del 5 %.

Más específicamente, el LLCCEM proporciona buenos resultados para aquellos péptidos que tienen principalmente cargas positivas y neutras en la cadena lateral a  $\text{pH} = 2.5$ . Además, las perturbaciones (efectos de solvatación y electrostáticos entre pares de grupos cargados en la cadena) introducidos por el PLLCEM con una estimación de la distancia promedio entre grupos cargados, son más relevantes en aquellos péptidos que tienen al menos dos grupos laterales cargados correspondientes a los residuos Asp y Glu. En general, a partir de los valores del tamaño hidrodinámico, la forma y la carga neta de los péptidos que se obtienen con ambos modelos, se observa que el fenómeno de regulación de cargas en la electroforesis de estos péptidos está presente principalmente al nivel de aproximación del campo promedio, conduciendo a una carga neta  $eZ$  menor que el valor  $eZ^T$  calculado con los  $\text{p}K_i^T$  y sin tener en cuenta el fenómeno de regulación de cargas, a  $\text{pH} = 2.5$ .

Aunque los modelos usados aquí proveen una distinción clara entre los péptidos de acuerdo a su tamaño, forma y carga neta como se ilustró numéricamente en este capítulo, también es evidente que varias incertidumbres asociadas con los valores asignados al  $\text{p}K$  del grupo carboxilo terminal necesitan ser removidas en futuros estudios concernientes a este difícil tema.

Finalmente es evidente que un conocimiento profundo tanto del fenómeno de regulación de cargas como de la hidratación de los péptidos, y también una predicción adecuada del número de carga neta y el tamaño y la forma hidrodinámica, ayudaría al desarrollo de métodos de separaciones multidimensionales (Kašička, 2006), los cuales actualmente reclaman no solamente propuestas experimentales innovativas que ganen en simplicidad, sino también estudios teóricos para comprender mejor el fenómeno a nivel de microescala asociado con la electromigración de los péptidos.

## 5.7 Apéndice 5-A

Valores promedios de las constantes de ionización de los aminoácidos  $pK_i$  y aquellos valores que corresponden a los aminoácidos libres  $pK_i^\circ$  (Rickards *et al.*, 1991).

Aminoácido	$pK_i$ (valores promedios)			$pK_i^\circ$ (en aminoácidos libres)		
	C-terminal	N-terminal	Cadena lateral	C-terminal	N-terminal	Cadena lateral
Ala (A)	3.20	8.20		2.34	9.87	
Arg (R)	3.20	8.20	12.50	1.91	9.02	12.48
Asn (N)	2.75	7.30		2.06	8.82	
Asp (D)	2.75	8.60	3.50	2.02	9.85	3.82
Cys (C)	2.75	7.30	10.30	1.93	10.40	8.26
Gln (Q)	3.20	7.70		2.17	9.13	
Glu (E)	3.20	8.20	4.50	2.15	9.57	4.18
Gly (G)	3.20	8.20		2.35	9.78	
His (H)	3.20	8.20	6.20	1.79	9.18	6.08
Ile (I)	3.20	8.20		2.34	9.72	
Leu (L)	3.20	8.20		2.35	9.67	
Lys (K)	3.20	7.70	10.3	2.17	9.06	10.66
Met (M)	3.20	9.20		2.28	9.24	
Phe (F)	3.20	7.70		2.37	9.21	
Pro (P)	3.20	9.00		1.98	10.62	
Ser (S)	3.20	7.30		2.20	9.18	
Thr (T)	3.20	8.20		2.09	9.10	
Trp (W)	3.20	8.20		2.40	9.42	
Tyr (Y)	3.20	7.70	10.3	2.20	9.11	10.11
Val (V)	3.20	8.20		2.30	9.68	

# Capítulo 6

## Aplicación de la CZE al estudio de los procesos de desnaturalización de proteínas

---

---

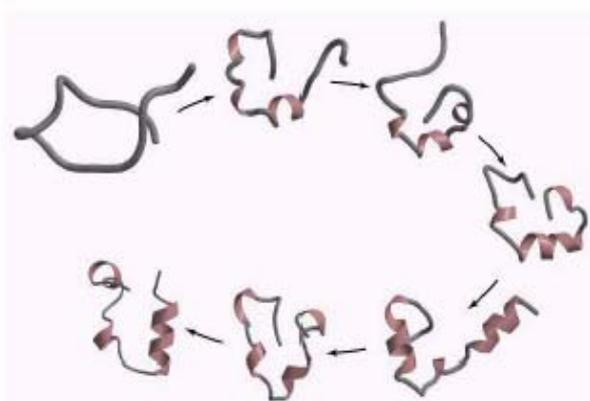
### 6.1 Introducción

Los procesos de plegamiento/desnaturalización (*folding/unfolding*) de proteínas son el centro de intensos estudios desde que Anfinsen (1973) demostró que las proteínas se pliegan espontáneamente a sus conformaciones nativas funcionales. Desde ese tiempo, importantes esfuerzos en las investigaciones se dirigieron hacia la determinación de las fuerzas que estabilizan la estructura nativa de una proteína, así como al estudio de las vías a través de las cuales transcurre el plegamiento de las proteínas. En adición, la caracterización del proceso de plegamiento desde una perspectiva termodinámica, necesita el conocimiento de los estados intermedios y los cambios de energías de las transiciones que gobiernan el proceso.

Sin embargo, la elucidación del mecanismo de plegamiento de proteínas permanece aún como un área principal no resuelta en varios aspectos de la biología estructural y la bioquímica física. Existe evidencia que el plegamiento de la cadena polipeptídica de una proteína globular relativamente grande transcurre vía intermediarios que restringen así el número de caminos y conducen a un estado final plegado en un tiempo razonablemente corto, lo que se conoce como “paradoja de Levinthal” (Levinthal, 1968). Este proceso se representa esquemáticamente en la Figura 6.1. Sin embargo, la caracterización estructural de estos intermediarios es difícil por su naturaleza transiente y en consecuencia es necesario el uso de métodos de reacción rápidos o estimaciones indirectas (ver, por ejemplo Rochu y Masson, 2002).

El conocimiento de los mecanismos de *folding*, *unfolding*, *refolding* y (posiblemente) *misfolding* es de gran interés en el uso de proteínas desde el punto de vista médico, farmacéutico e industrial. También, se sabe que la expresión de proteínas recombinantes a menudo resulta en un plegamiento inadecuado y/o microheterogeneidad. Asimismo, la alteración del plegamiento de proteínas parece ser la causa molecular de una lista creciente de enfermedades (Heegaard *et al.*, 2000; Chiti *et al.*, 2001; De Lorenzi *et al.*,

2002; Sabella *et al.*, 2004). La asociación de los intermediarios del proceso en cuerpos de inclusión, a menudo compite con el plegado productivo para llegar al estado nativo. La generación de *misfolding* y generalmente la formación de cadenas agregadas resulta un problema práctico tanto para la industria biotecnológica como para la investigación médica. Se sabe, que muchas proteínas pueden plegarse completamente *in vitro* hasta el estado nativo, indicando de esta manera que la cadena polipeptídica, en un medio acuoso, contiene toda la información necesaria para el plegamiento (Strege y Lagu, 1993a). Sin embargo, no se comprenden bien las reglas que gobiernan los mecanismos por los cuales la secuencia polipeptídica dicta la conformación tridimensional.



**Figura 6.1.** Representación esquemática del proceso de plegamiento de una proteína.

La desnaturalización de proteínas se logra de varias maneras, por ejemplo mediante el uso de: (a) agentes caotrópicos, tales como urea (ver, Bennion y Daggett, 2003; Liepinsh y Otting, 1994) o hidrocloreuro de guanidinio (Hagihara *et al.*, 1994) (estos agentes son efectivos a altas concentraciones, es decir 4 a 8 M); (b) detergentes, por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (Santos *et al.*, 2003), comúnmente usado en la electroforesis en gel de poliacrilamida; (c) calor (Rush *et al.*, 1991; Jensen *et al.*, 1998); (d) reactivos que rompen puentes disulfuro, por ejemplo, ditiotretitol; (e) ácidos o bases que rompen puentes salinos (Kim y Baum, 1998; Fitch *et al.*, 2006).

Las técnicas modernas para monitorear el proceso de *fold*ing/*un*fold*ing* de proteínas se basan en mediciones ópticas, tales como el dicroísmo circular y la espectroscopia de infrarrojo y de Raman (Panick *et al.*, 1998; Elcock, 1999; Segel *et al.*, 1999). Otras técnicas de monitoreo incluyen la espectroscopia de fluorescencia y los cambios químicos medidos por resonancia magnética nuclear. Entre los métodos electroforéticos que se usan

para estudiar estos problemas, la electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente transversal en presencia de urea se adoptó desde los años 1980 y su uso continúa vigente (ver, por ejemplo, Jørgensen, *et al.*, 2003).

Actualmente, la CZE ofrece todas las ventajas de la electroforesis en gel y aún más, si se considera el uso de una cantidad de muestra mínima, la alta resolución, la velocidad de análisis, y la alta sensibilidad. Asimismo, la CZE puede proveer información sobre los estados moleculares intermedios, debido a que la separación en la CZE es una función de las propiedades moleculares intrínsecas como el tamaño y la carga de las macromoléculas. Sin embargo, los informes sobre su aplicación para monitorear las transiciones del *folding/unfolding* de proteínas, al presente, no son muchos (ver, por ejemplo, Hilser *et al.*, 1993; Stregge y Lagu, 1993a; Hilser y Freire, 1995; Fan *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 1998; Rochu *et al.*, 1999a y b; Stellwagen *et al.*, 1999; Verzola *et al.*, 2000 y 2001; Rochu *et al.*, 2001; Negin y Carbeck, 2002; Stellwagen *et al.*, 2002; Rochu *et al.*, 2002; Verzola *et al.*, 2003; Sharma y Carbeck, 2004; Gudixsen *et al.*, 2006; Rochu *et al.*, 2006).

Desde otra perspectiva, al presente, el estudio de la estabilidad conformacional de proteínas genera un área intensiva de investigación. Estos trabajos están motivados principalmente por los problemas desafiantes situados en el contexto de temas biológicos claves, como por ejemplo, el análisis cuantitativo del *folding*, *unfolding* y *misfolding* de proteínas (ver por ejemplo, Hilser y Freire, 1997; Chiti *et al.*, 1998; Whitten y García Moreno, 2000; Whitten *et al.*, 2005; Hilser *et al.*, 2006; Fitch *et al.*, 2006; Qiao *et al.*, 2006; Latypov *et al.*, 2006).

Como se describió en la literatura (Levinthal, 1968; Anfinsen, 1973; Richards, 1992; Privalov, 1992; Karplus, 1992; Creighton, 1993) el plegado de proteínas se visualiza frecuentemente a través de dos suposiciones básicas: (a) la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica desplegada contiene toda la información requerida para plegarse en una estructura tridimensional única, designada proteína nativa, y (b) el proceso de plegado conduce a la cadena polipeptídica a su conformación nativa con un mínimo de energía libre, indicando así que las consideraciones termodinámicas son relevantes en el análisis del fenómeno completo. En este capítulo, para estudiar la estabilidad de proteínas desde un punto de vista amplio nos referiremos a los estados plegado y desplegado. En este sentido, las conformaciones plegadas de las proteínas pueden ser desorganizadas por un cambio en el medio en el que se encuentran inmersas (Creighton, 1993).

En algunos casos, las transiciones del proceso de desnaturalización se estudian en presencia del agente desnaturalizante clásico de proteínas, urea, hasta concentraciones 8 M; y en otros casos se emplean gradientes de temperatura, que permiten, en adición, la determinación de la temperatura de transición  $T_m$  y el cálculo de los parámetros termodinámicos aparentes como la variación de entalpía,  $\Delta H$  y la variación de entropía,  $\Delta S$  asociados con la transición (Hilser *et al.*, 1993; Rochu *et al.*, 1999a y b).

Es apropiado señalar aquí que pocas técnicas son capaces de medir directamente los cambios de energía asociados con la transición del plegado-desplegado de proteínas bajo diferentes condiciones fisicoquímicas (ver la discusión sobre este aspecto en Rochu y Masson, 2002). En este sentido, la CZE es una técnica útil que reúne dos factores importantes necesarios para un estudio efectivo de la desnaturalización de proteínas en presencia de cantidades variables del agente desnaturalizante, como temperatura  $T$ , pH, fuerza iónica  $I$ , urea, hidrocloreuro de guanidinio, etc. En efecto, en la CZE se usan pequeñas cantidades de muestra y los cambios energéticos termodinámicos se evalúan a través de una metodología cuantitativa apropiada descrita en la literatura (ver, por ejemplo, Hilser y Freire, 1995). Dentro del estado presente del análisis teórico y experimental de la estabilidad de las proteínas vía CZE, en este Capítulo se propone incluir cuantificaciones adicionales como el número de carga neta, el radio hidrodinámico y la hidratación de las proteínas, los cuales son parámetros relevantes que caracterizan los estados conformacionales de las proteínas. Estas consideraciones también permiten evaluar y estudiar el significado del cambio de energía libre electrostática asociado con el proceso de desnaturalización (Tanford, 1961, Tanford, 1970). En efecto, en trabajos previos sobre la estabilidad conformacional de proteínas, la movilidad electroforética de una proteína se encontró que es diferente para los distintos estados que predominan durante el proceso de desnaturalización. A pesar de que en general este aspecto no se cuantifica, estas variaciones en las movilidades se deben en parte a los cambios en el número de carga neta, el tamaño, la forma y la hidratación en los diferentes estados de la proteína. En consecuencia, a través de la estimación de estos parámetros conformacionales, se espera proveer información relevante asociada con el proceso de desnaturalización, aparte del hecho que los perfiles electroforéticos reflejan la cantidad relativa de las especies plegadas (F) y desplegadas (U) (o especies intermedias (I)) bajo la acción específica de un agente desnaturalizante.

## 6.2 Antecedentes bibliográficos

Sobre la base de los fundamentos de la separación en la CZE, Rush *et al.* (1991) observaron un cambio conformacional en la  $\alpha$ -lactalbumina a medida que se incrementaba la temperatura del capilar. El pico agudo inicial se volvió más ancho y asimétrico cuando se aplicaron temperaturas más altas, indicando la presencia de especies plegadas y conformacionalmente alteradas. La desnaturalización dependiente de la temperatura de la lisozima a pH bajo y el proceso de desnaturalización de la transferrina sérica humana en urea fue estudiado por Hilser *et al.* (1993) y Kilár y Hjertén (1993), respectivamente. Asimismo, uno de los primeros trabajos que consideraba a la CE como una herramienta para el análisis del plegamiento de proteínas fue presentado por Strege y Lagu (1993a). Estos autores estudiaron el tripsinógeno bovino como proteína modelo para analizar la formación de los puentes disulfuro hasta llegar a la conformación correspondiente a la proteína nativa y sugirieron que la CE es una técnica efectiva de utilidad para el análisis del *refolding* de proteínas.

Hilser y Freire (1995) presentaron una revisión importante sobre el tema en la cual demuestran la utilidad de la CZE para un análisis cuantitativo del proceso de *fold*ing/*un*fold*ing* de proteínas, a través de la información que contiene el electroferograma, y que provee asimismo información cinética y termodinámica del proceso de *fold*ing/*un*fold*ing*. Estos autores concluyeron teóricamente que el efecto de la velocidad de interconversión del estado plegado al desplegado tiene un impacto relevante en la resolución del electroferograma correspondiente a la desnaturalización de la proteína. Por consiguiente, es posible extraer información a partir del perfil electroforético para el régimen lento, intermedio y rápido de la isomerización de la proteína, el cual muestra picos completamente resueltos, parcialmente resueltos o picos únicos promedios, respectivamente (ver también, Rochu *et al.*, 1999a y b; Righetti y Verzola, 2001). A partir del régimen lento (*slow-time regime*), la cuantificación de las áreas de los picos individuales provee la evaluación de los parámetros termodinámicos verdaderos y es tal vez la aplicación más clara de la CZE al análisis de la desnaturalización de proteínas de los tres tipos de regímenes. El régimen rápido (*fast-time regime*) está restringido al caso que involucra dos estados (plegado y desplegado) reversibles y los valores energéticos que se obtienen a partir de la descomposición de la movilidad de la mezcla en las dos movilidades asintóticas F y U, correspondientes a cada concentración de desnaturalizante, representan parámetros termodinámicos aparentes (Hilser *et al.*, 1995). Es precisamente en este

régimen donde se espera que la estimación de las propiedades conformacionales adicionales de los dos estados de la proteína facilite la interpretación de los electroferogramas de la CZE en la desnaturalización de proteínas. Este aspecto característico del régimen rápido es el principal interés del presente capítulo.

Asimismo, es relevante mencionar los trabajos de Stellwagen *et al.* (1999) y Verzola *et al.* (2000 y 2001) que estudiaron los procesos de *folding/unfolding* con aplicaciones a proteínas particulares como citocromo c y acilfosfatasa de músculo.

Posteriormente, Negin y Carbeck, (2002) y más recientemente, Sharma y Carbeck (2004), usaron las escaleras de carga para inferir, en adición, los valores de la carga neta y el radio hidrodinámico de la proteína nativa y desnaturalizada con un procedimiento similar al descrito en la Sección 4.1 del Capítulo 4, con relación a la estimación de la carga neta de proteínas mediante el uso de CZE y la escalera de cargas.

Más ampliamente, es posible concluir que los trabajos previos, que estudian la transición del *folding/unfolding* de proteínas bajo la acción de agentes desnaturalizantes, realizan el análisis de los datos experimentales “crudos” (es decir, movilidad electroforética en función de la intensidad del agente desnaturalizante) para obtener las principales conclusiones con relación a la estabilidad de proteínas. Por consiguiente, el propósito de este capítulo es primero presentar los conceptos teóricos básicos que permiten el análisis de las movilidades electroforéticas experimentales usando el modelo simple de la CZE (LLCEM), el cual es capaz de proveer información adicional de los estados conformacionales (ver, Capítulo 4 y además, Piaggio *et al.*, 2005a y 2006a). Debido a que este modelo es capaz de estimar los valores del radio hidrodinámico, el número de carga neta y la hidratación, aquí el cambio de energía libre efectiva se redefine teniendo en cuenta también el cambio energético asociado con los estados electrostáticos plegado y desplegado de la proteína. El uso de este modelo comprende, primero la evaluación de los parámetros relevantes de los microestados de la proteína como la energía libre electrostática además de la energía libre conformacional clásica (Tanford, 1970) y segundo la expresión de los datos experimentales “crudos” concernientes a la transición *folding/unfolding* en parámetros conformacionales más específicos como el radio hidrodinámico, el número de carga neta y la hidratación, eliminado así los efectos espurios que son intrínsecos a la evaluación experimental de las movilidades de los estados de la proteína. Estos datos espurios están asociados con la viscosidad del BGE, las variaciones del pH y la fuerza iónica que acompañan los cambios de intensidad del agente que se

introduce para inducir la desnaturalización de proteínas (por ejemplo, barridos en temperatura o en concentración de urea). Con relación a este último aspecto, es importante visualizar las siguientes situaciones típicas: (1) el proceso de desnaturalización que se realiza con un barrido de temperatura causa cambios principalmente en la viscosidad del BGE, también cambios menores, como por ejemplo en los valores de los  $pK$  de los grupos cargados de la proteína y de las especies disociantes del *buffer*, que pueden afectar el pH. (2) el proceso de desnaturalización que se realiza a través de un barrido en la concentración de urea provoca cambios en el pH y la fuerza iónica para concentraciones de urea que pueden ser tan altas como 7 M. Para estas situaciones, se considera necesario en este trabajo corregir la viscosidad, el pH y la fuerza iónica, en situaciones específicas, como se indica más abajo en la Sección 6.4.

Con el fin de ilustrar los propósitos de este capítulo con relación al análisis de los procesos de desnaturalización de proteínas a través de la CZE incluyendo la estimación de varios parámetros conformacionales, se consideran en la Sección 6.4 dos casos de estudio, para los cuales se encuentran en la literatura datos experimentales de las movilidades electroforéticas de las proteínas. El primero se refiere a la desnaturalización térmica y con urea de la citocromo *c* (*Horse Heart Ferricytochrome c*, codificada en el PDB como 1HRC y usualmente designada cyt c), la cual tiene funciones específicas de transporte de electrones en los sistemas biológicos. Esta proteína que tiene un tamaño relativamente pequeño y una buena estabilidad ha sido tema de estudio reiterado en estructura y plegado de proteínas. Una característica distintiva de la 1HRC, es el grupo hemo asociado con cuatro aminoácidos (Cys14, Cys17, His18 y Met80) junto con una extensa ordenación de contactos laterales de la cadena no-covalentes (Atlas y Farber, 1955; Fisher *et al.*, 1972; Das *et al.*, 1998; Sinibaldi *et al.*, 2001). El segundo caso de estudio involucra la desnaturalización térmica de la lisozima (*Hen Egg-White Lysozyme*, codificada 2LYZ en el PDB), la cual es una enzima que destruye las paredes celulares de las bacterias hidrolizando los componentes polisacáridos. Esta proteína incluye en su secuencia 8 Cys que no se consideran en los cálculos de la carga neta de la proteína porque ellas se encuentran formando cuatro puentes disulfuro, los cuales permanecen intactos en el proceso (Williams *et al.*, 1997; Segel *et al.*, 1999).

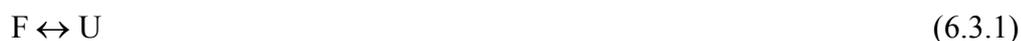
Consecuentemente, este capítulo está organizado como sigue. La Sección 6.3 presenta las consideraciones teóricas termodinámicas relevantes de la transición *folding/unfolding*, donde la energía libre electrostática se incluye explícitamente en la

energía libre efectiva. También el modelo de Linderstrøm-Lang de la Electroforesis Capilar (LLCEM) que se presentó previamente en el Capítulo 4 y en la literatura (ver, Piaggio *et al.*, 2005a y 2006a) se extiende aquí para evaluar las propiedades conformacionales de la mezcla formada por la proteína en los estados plegado y desplegado, los cuales son detectados en el régimen rápido (*fast-time regime*) de una corrida de la CZE. La Sección 6.4 presenta los resultados que se obtienen a partir de los dos casos de estudio de la desnaturalización de proteínas en el régimen rápido de la detección de la CZE para ilustrar el propósito del contexto teórico propuesto en esta Tesis. Aquí se consideran las correcciones de la viscosidad, el pH y la fuerza iónica y se estima la hidratación de la proteína. En esta Sección también se señalan algunas limitaciones que se encuentran para comprender mejor los datos experimentales provistos por la CZE en el régimen rápido, el cual aún requiere futuras investigaciones. Finalmente en la Sección 6.5 se presentan las conclusiones y sugerencias con relación a la importancia de la CZE como una técnica experimental relevante para caracterizar los procesos de desnaturalización y la estabilidad conformacional de proteínas.

### 6.3 Consideraciones teóricas

Como se mencionó antes, la desnaturalización de una proteína se puede inducir a través de un agente desnaturalizante, como temperatura  $T$ , concentración de urea  $C$ , fuerza iónica  $I$ , concentraciones de ácido o álcali medidos a través del pH, etc. Aquí se hará referencia a dos procesos de desnaturalización, uno involucra un barrido en temperatura y el otro se realiza con un barrido en concentraciones de urea.

Para la desnaturalización de las dos proteínas que se estudian aquí (1HRC y 2LYZ), los estados plegado (F) y desplegado (U) se supone que están en equilibrio a cada valor del agente desnaturalizante ( $T$  o  $C$  en este trabajo). En consecuencia, el proceso de isomerización de la proteína se formula como sigue,



para el cual se definen las constantes cinéticas en un sentido y otro  $k_F$  y  $k_U$ , respectivamente, que satisfacen la constante de equilibrio  $K = k_F / k_U$ . A partir de este contexto termodinámico, el potencial químico total  $G_\alpha$  de cada especie  $\alpha = F, U$ , que se consideran como polianfolitos cargados eléctricamente, se expresa (Tanford, 1970) como la suma de las contribuciones químicas conformacionales que se producen en un BGE

particular, y la contribución electrostática debida a las interacciones entre los grupos cargados de la proteína y los iones del BGE, que son responsables del fenómeno de regulación de cargas descrito en la literatura (Linderstrøm-Lang, 1924; Menon y Zydney, 2000; Gitlin *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2003; Allison *et al.*, 2004; Piaggio *et al.*, 2005a y 2006b; Gitlin *et al.*, 2006) y también analizado en el Capítulo 4 de esta Tesis. En efecto, los valores de pH que censa la proteína en sus dos estados no son necesariamente iguales al valor que corresponde a la formulación del BGE. Es también claro que en los dos estados conformacionales promedios, la proteína está rodeada por potenciales eléctricos variables, que son una consecuencia de las interacciones electrostáticas entre los grupos cargados de la proteína y los iones del BGE. Por consiguiente, se expresa el potencial químico de las especies cargadas  $\alpha = F, U$  en el BGE a través de las fracciones molares  $X_\alpha$  como sigue (Castellan, 1983; Levine, 1991),

$$G_\alpha = G_\alpha^* + RT \ln X_\alpha + eN_A Z_\alpha \zeta_\alpha / 2 \quad (6.3.2)$$

donde  $N_A$  es el número de Avogadro,  $G_\alpha^*$  es el potencial químico conformacional de referencia del estado  $\alpha$ , que en general depende de la temperatura  $T$ , del pH cercano a la molécula designado aquí  $\text{pH}_\alpha^*$  (ver también, Ec. (6.3.12) más abajo) y de la concentración del agente desnaturizante, cuando se aplica este aspecto). También,  $e$  es la carga elemental y  $\zeta_\alpha$  es el potencial eléctrico de campo promedio en el dominio de la proteína en el estado  $\alpha$ , que se aproxima al potencial zeta de la partícula (Piaggio *et al.*, 2005a y 2006a). Se observa, también, que desde la superficie de la partícula hacia el seno del BGE, se desarrolla una doble capa eléctrica y en consecuencia la partícula está rodeada por un potencial eléctrico no uniforme. Por consiguiente, a pesar de que se supone que estas partículas están dentro del valor promedio  $\zeta_\alpha$ , es claro que el factor 1/2 en el tercer término del lado derecho de la Ec. (6.3.2) es el resultado de la integración que se requiere para evaluar el trabajo de traer una carga pequeña al dominio de la proteína (Tanford, 1961). En consecuencia para una desnaturalización particular del estado plegado de la proteína, el equilibrio que se alcanza como se indica con la Ec. (6.3.1) comprende el cambio de energía libre efectivo  $\Delta G^{\text{eff}}$  (ver por ejemplo, Privalov, 1992; Tanford, 1970) que implica,

$$\Delta G^{\text{eff}} = \Delta G^* + eN_A (Z_U \zeta_U - Z_F \zeta_F) / 2 \quad (6.3.3)$$

donde  $\Delta G^* = G_U^* - G_F^*$  es el cambio de potencial químico de referencia asociado con los siguientes cambios conformacionales: (a) orden-desorden global, (b) interacciones de corto-alcance dentro de las regiones desordenadas, (c) interacciones de corto-alcance dentro de las regiones ordenadas, (d) interacciones de corto-alcance con el solvente (Tanford, 1970). En adición,

$$K = \frac{X_U}{X_F} = \exp\left(-\frac{\Delta G^{\text{eff}}}{RT}\right) \quad (6.3.4)$$

donde  $X_U$  y  $X_F$  son las fracciones molares de la proteína plegada y desplegada con la imposición  $X_U + X_F = 1$ . Es claro que las interacciones de largo-alcance del cambio de energía libre electrostática asociada con el equilibrio de plegado-desplegado de la proteína indicado por la Ec. (6.3.1) se expresa,

$$\Delta G^{\text{el}} = eN_A(Z_U\zeta_U - Z_F\zeta_F) / 2 \quad (6.3.5)$$

También, se encuentra la condición en la que  $\Delta G^{\text{eff}} = 0$ , que se invoca más abajo en el análisis de las dos proteínas que se estudian aquí. Así, este punto ocurre para  $X_F = X_U = 1/2$ ,  $T = T_m$  (desnaturalización por barrido de temperatura) o  $C = C_m$  (desnaturalización con un barrido en concentraciones de urea). Además, para valores muy altos de  $T$  o  $C$  son evidentes los límites  $X_F \rightarrow 0$  y  $\Delta G^{\text{eff}} \rightarrow -\infty$  a partir de la Ec. (6.3.4). Por otro lado para  $T \rightarrow T_N$  (aquí  $T_N$  es la temperatura del estado plegado que se toma como referencia en un proceso de desnaturalización específico en un barrido de temperatura) o para  $C \rightarrow 0$ , se obtiene  $X_U \rightarrow 0$  y  $\Delta G^{\text{eff}} \rightarrow \infty$ .

En particular, con relación al régimen rápido de la detección de la CZE, se aplican las siguientes ecuaciones en el entorno de  $T_m$  (Hilser y Freire, 1995; Rochu *et al.*, 1999):

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (6.3.6)$$

para la desnaturalización con un barrido en temperatura, donde se usan los cambios en la entalpía  $\Delta H^*$  y en la entropía  $\Delta S^*$ , mientras que para la desnaturalización con un barrido en la concentración de urea (Verzola *et al.*, 2001; Creighton, 1993) se usa,

$$\Delta G^* = \Delta G_0^* - mC \quad (6.3.7)$$

Las Ecs. (6.3.1) a (6.3.7) se aplican dentro del programa experimental de la CZE que considera las medidas de las movilidades electroforéticas de las especies F y U en el equilibrio termodinámico para las diferentes condiciones de desnaturalización, cuando se

considera el régimen rápido de la detección de la CZE. Con este propósito, la movilidad electroforética  $\mu_\alpha$  de cada analito  $\alpha = F, U$ , se combina en un valor de movilidad promedio para el régimen rápido, que se define como,

$$\langle \mu \rangle = \mu_F X_F + \mu_U X_U \quad (6.3.8)$$

A partir de las Ecs. (6.3.4) y (6.3.8), fácilmente se obtiene,

$$X_U = \frac{\mu_F - \langle \mu \rangle}{\mu_F - \mu_U}, \quad X_F = \frac{\langle \mu \rangle - \mu_U}{\mu_F - \mu_U}, \quad K = \frac{\mu_F - \langle \mu \rangle}{\langle \mu \rangle - \mu_U} \quad (6.3.9)$$

Por consiguiente, para los diferentes estados de desnaturalización, con los valores medidos de  $\langle \mu \rangle$  y los valores calculados de  $\mu_F$  y  $\mu_U$  a partir de las líneas asintóticas que se asemejan a los límites de la proteína plegada y desplegada que se obtienen en el régimen rápido (ver, por ejemplo, Hilser y Freire, 1995; Righetti y Verzola, 2001), se evalúa la constante de equilibrio  $K$  y el cambio de energía libre efectivo  $\Delta G^{\text{eff}}$  para el barrido en temperatura o en concentración de urea, en el proceso de desnaturalización de una proteína. Así, a pesar de que es posible calcular las variables termodinámicas relevantes  $K$  y  $\Delta G^{\text{eff}}$ , es también claro que para aplicar las Ecs. (6.3.6) y (6.3.7), que permiten estimar  $\Delta G^*$  y sus parámetros asociados  $\Delta H^*$  y  $\Delta S^*$  o  $\Delta G_o^*$  y  $m$ , se deben conocer primero los valores del cambio de energía libre  $\Delta G^{\text{el}}$  que provienen de las interacciones electrostáticas, a cada condición de desnaturalización. Estos valores se estiman a través del LLCCEM en base a los datos numéricos correspondientes a las movilidades  $\mu_F$  y  $\mu_U$ , que se discuten más arriba. Así, se obtienen el número de carga neta  $Z_\alpha$ , el potencial zeta  $\zeta_\alpha$  y el radio hidrodinámico  $a_\alpha$  de los estados plegado y desplegado de una proteína para evaluar el  $\Delta G^{\text{el}}$ , como se describe en el siguiente párrafo.

El próximo paso en este estudio teórico de la desnaturalización de una proteína se centra brevemente en el LLCCEM, el cual se describió en el Capítulo 4 y 5 de esta Tesis y en la literatura (Piaggio *et al.*, 2005a y b, 2006a y 2007a). Así recordando, este modelo considera proteínas globulares que tienen una estructura definida, que en principio se suponen equivalentes a una esfera de radio hidrodinámico  $a_\alpha$  con un coeficiente de fricción  $f_\alpha = 6\pi\eta a_\alpha$ , donde  $\eta$  es la viscosidad del BGE. Se debe notar que esta hipótesis se puede eliminar para incluir otras formas de las partículas (Yoon y Kim, 1989; Allison *et al.*, 2004; Piaggio *et al.*, 2006a).

La proteína en cualquier estado  $\alpha$  tiene una carga neta  $eZ_\alpha$  para un protocolo de la CZE particular que proviene de sus  $N$  tipos de grupos cargados, que se expresa,

$$eZ_\alpha = \sum_{i=1}^N eZ_{\alpha i} \quad (6.3.10)$$

donde  $Z_{\alpha i}$  es el número de carga de los grupos cargados  $i$  en los estados  $\alpha = F, U$ . El valor de  $Z_{\alpha i}$  se calcula a través de,

$$Z_{\alpha i} = \pm \frac{n_i}{1 + 10^{\pm(pK_i^r - pH_\alpha^*)}} \quad (6.3.11)$$

donde los signos (+) y (-) se definen de acuerdo a las propiedades ácidas o básicas de los grupos cargados,  $n_i$  son los números de cada tipo de grupos cargados en la secuencia de aminoácidos de la proteína con un valor de  $pK_i^r$  de referencia. Aquí,  $pH_\alpha^*$  es el pH cercano a la proteína supuesta como una partícula y se evalúa usando la aproximación de campo promedio que se introduce junto con la inclusión del radio hidrodinámico de la proteína (ver las suposiciones básicas en el Capítulo 4 y en Piaggio *et al.*, 2005a). En efecto, la partícula proteica se supone que tiene un potencial de superficie provisto por la ecuación de Poisson-Boltzmann para un solvente que tiene propiedades de  $pH$ ,  $I$ ,  $T$ ,  $\eta$ ,  $\varepsilon$  particulares ( $\varepsilon$  se refiere a la permitividad eléctrica del BGE). Con el fin de generar un problema sencillo, se usa la solución de Henry para la movilidad electroforética de la partícula, donde se invoca la aproximación de Debye-Hückel. Consecuentemente, se expresa,

$$pH_\alpha^* = pH + \frac{e^2 Z_\alpha}{\ln(10) k_B T 4\pi \varepsilon a_\alpha (1 + \kappa a_\alpha)} \quad (6.3.12)$$

La Ec. (6.3.12) refleja las interacciones electrostáticas e hidrodinámicas entre la proteína y el BGE, e inevitablemente la introducción de  $a_\alpha$  sitúa el problema dentro de la aproximación de campo promedio que se mencionó arriba. En consecuencia, aquí se procede con la conocida partícula de Henry y sus hipótesis asociadas (Russell *et al.*, 1989).

La otra ecuación relevante en el LLCCEM es la expresión de la movilidad electroforética de la proteína en un estado particular  $\alpha$ , que se obtiene experimentalmente y se expresa como sigue (para potenciales de partículas altos, se requiere la ecuación de Poisson-Boltzmann con condiciones de contorno):

$$\mu_{\alpha} = \frac{eZ_{\alpha}}{6\pi\eta a_{\alpha}(1 + \kappa a_{\alpha})} f(\kappa a_{\alpha}) \quad (6.3.13)$$

donde  $f(\kappa a_{\alpha})$  es la función de Henry que se expresa a través de una ecuación de ajuste explícita (Piaggio y Deiber, 2003).

Considerando este modelo, se observa que el radio hidrodinámico de la proteína es una solución directa del LLCCEM, y a partir del valor de este parámetro es posible estimar el número de carga neta y el potencial electrostático. Esta conclusión introduce una diferencia sustancial con algunos trabajos previos donde el modelado de la movilidad de la proteína no es sensible a los cambios conformacionales, como lo discuten claramente Hilser y Freire (1995). En efecto, algunos modelos usan la secuencia de la proteína y los pesos moleculares como parámetros de ingreso y en consecuencia la movilidad estimada es la misma, tanto para el estado plegado como desplegado, porque el peso molecular permanece sin cambio para esta transición de la proteína.

Las Ecs. (6.3.10) a (6.3.13) componen la versión simple del LLCCEM, representado un problema bien establecido que se resuelve para el grupo  $\{a_{\alpha}, Z_{\alpha}, Z_{\alpha i}, \text{pH}_{\alpha}^*\}$  de (N+3) incógnitas para cada estado  $\alpha$ , que se obtiene a través de un algoritmo numérico apropiado descrito previamente en el Capítulo 4 de esta Tesis, cuando se dispone de los valores experimentales para un protocolo definido de la CZE y condiciones de desnaturalización.

En adición, a través de definiciones básicas se obtiene a partir del LLCCEM una estimación de las variaciones en los  $\text{pK}$  ( $\text{pK-shifts}$ ) que sufren los grupos cargados de las proteínas en cualquier estado, porque se cumple la siguiente relación  $\Delta\text{pK}_{\alpha i} = \text{pK}_i^{\text{f}} - \text{pK}_{\alpha i} = \text{pH}_{\alpha}^* - \text{pH} = \Delta\text{pH}_{\alpha}$ . No obstante que esta estimación es una aproximación de los  $\text{pK-shifts}$  en la proteína, se espera visualizar como el proceso de isomerización puede afectar las interacciones electrostáticas entre los grupos cargados, como se discute más abajo. En este sentido, se observa que para las proteínas en el estado nativo los  $\text{pK-shifts}$  se calculan más precisamente con el PLLCEM, usando las distancias relativas entre los pares de grupos cargados que se obtienen a partir de la cristalografía por Rayos X, como se presenta en el Capítulo 4 y se reporta en la literatura (Sharma *et al.*, 2003; Allison *et al.*, 2004; Piaggio *et al.*, 2005a) las cuales no están disponibles para el estado desplegado (ver también, Capítulo 5 de esta Tesis y Piaggio *et al.*, 2006a). El aspecto relevante concerniente al LLCCEM es que los valores  $Z_{\alpha}$  y  $a_{\alpha}$  de los estados de la proteína en un BGE bien definido se obtienen a partir de las movilidades electroforéticas

$\mu_\alpha$  y la secuencia de aminoácidos, los cuales son los datos de ingreso en el código numérico del programa computacional.

La desnaturalización reversible de una proteína globular está acompañada por un cambio sustancial en su volumen hidrodinámico (Foygel *et al.*, 1995); este cambio mide la transición conformacional global que es el evento central en el desplegamiento de una proteína. Por consiguiente, el estado de hidratación de las proteínas durante el proceso de desnaturalización es también de interés y requiere ser estimado a partir de las movilidades de los estados de la proteína en la CZE. Para el propósito de este capítulo se expresa aquí que el uso del radio hidrodinámico en lugar de la masa molar  $M$  para evaluar el coeficiente de fricción de la proteína es una alternativa que puede ayudar para interpretar el fenómeno de hidratación al nivel de información disponible a partir de experimentos de CZE (Piaggio *et al.*, 2006a). La hidratación  $\delta_\alpha$  que se expresa como gramos de agua/gramo de proteína anhidra, se define como el agua unida a la proteína que migra, sin distinción concerniente a la naturaleza del tipo de unión (estructural, atrapada, etc.; ver Fennema, 1977). Por consiguiente, es claro que la CZE es un problema hidrodinámico acoplado con la electrostática de la partícula-solvente. Estas dos consideraciones permiten definir un volumen hidrodinámico  $V_\alpha = 4\pi a_\alpha^3/3$  de la proteína en el estado  $\alpha$ , el cual se descompone en el volumen compacto de la proteína  $V_c = M v_p / N_A = 4\pi a_c^3/3$  ( $a_c$  es el radio equivalente de una esfera compacta,  $v_p$  es el volumen específico de la proteína supuesto alrededor de  $0.73 \text{ cm}^3/\text{g}$ ) y un volumen adicional ( $V_\alpha - V_c$ ) debido a la hidratación indicando que  $a_\alpha > a_c$  (Tanford, 1961). Este cambio de volumen es por supuesto afectado por el impedimento estérico de las cadenas laterales y la repulsión-atracción electrostática debido a las zonas de la cadena cargada hidrofílicas e hidrofóbicas. Por consiguiente, los resultados que emergen del LLCCEM que se usa aquí, deben satisfacer la condición  $a_\alpha > a_c$ . En adición, debido a que la hidratación es el efecto predominante que incrementa  $V_c$  al valor de  $V_\alpha$ , una estimación de  $\delta_\alpha$  se obtiene a partir del conocimiento numérico de  $a_\alpha$  y  $a_c$ , a través de,

$$\delta_\alpha \approx [(a_\alpha / a_c)^3 - 1](v_p / v_w) \quad (6.3.14)$$

donde  $v_w$  es el volumen específico del BGE que se supone alrededor de  $1 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Además se encontró (ver Capítulo 5 y Piaggio *et al.*, 2006a) que el cálculo de un radio

hidrodinámico no físico que satisface la expresión no esperada  $a_\alpha \leq a_c$ , indica que la forma hidrodinámica del analito bajo examen no se puede suponer esférica.

Es importante señalar que los límites de validez para aplicar la aproximación de Debye-Hückel y la solución de Henry en el modelo propuesto se exploran con la ayuda de las soluciones numéricas del problema no-lineal completo de Poisson-Boltzmann llevado a cabo en O' Brien y White (1978). En efecto, se evalúa la ordenada  $Y = \frac{3}{2} \frac{e \mu_\alpha \eta}{\epsilon k_B T}$ , la abscisa

$X = \frac{e \zeta_\alpha}{k_B T}$  y el parámetro  $P = \kappa a_\alpha$  con  $\zeta_\alpha$  y  $a_\alpha$  que se obtienen a partir del LLCCEM, el dato experimental  $\mu_\alpha$  y aquellos valores que corresponden al protocolo de la CZE, para conocer si el punto calculado  $(X, Y)$  está suficientemente cercano a los gráficos generalizados de la curva de movilidad correspondiente, reportados en Russel *et al.* (1989). En general, es simple concluir que para  $Y \approx X$  y ambos  $Y$  y  $X$  menores a 2, los resultados del modelo son compatibles con la hipótesis bajo consideración en la medida que  $P < 3$  (ver Capítulo 4 y Piaggio *et al.*, 2005a). Así, se encuentra que todos los resultados numéricos que se presentan y discuten en la Sección 6.4 más abajo, satisfacen las restricciones mencionadas arriba, validando la hipótesis que se lleva a cabo, como una primera aproximación.

Finalmente, antes de terminar esta Sección, es interesante observar dentro del contexto teórico descrito arriba, el rol importante del pH en la Ec. (6.3.5). En efecto, se evalúa el pH cercano a las proteínas plegada y desplegada a través de la Ec. (6.3.12) y se reemplaza el resultado en la Ec. (6.3.3) para obtener una expresión equivalente para el cambio de energía libre efectivo,

$$\Delta G^{\text{eff}} = \Delta G^* + \ln(10)RT\{(\text{pH}_F^* Z_F - \text{pH}_U^* Z_U) + (Z_U - Z_F)\text{pH}\} / 2 \quad (6.3.15)$$

Así, la Ec. (6.3.15) indica que en el equilibrio del *folding/unfolding* de la proteína, la relación entre las cargas netas y el pH cercano a los dos estados de la proteína están definiendo el cambio de energía libre electrostática en el proceso de desnaturalización. Asimismo, es también evidente que cuando se desprecia el fenómeno de regulación de cargas ( $\text{pH}_F^* \approx \text{pH}_U^* \approx \text{pH}$ ) la Ec. (6.3.15) se reduce a  $\Delta G^{\text{eff}} \approx \Delta G^*$  con  $\Delta G^{\text{el}} \approx 0$ , y en consecuencia se encuentra fácilmente (Tanford, 1970) que,

$$\frac{\partial \Delta G^{\text{eff}}}{\partial \text{pH}} \approx \frac{\partial \Delta G^*}{\partial \text{pH}} \approx \ln(10)RT(Z_U - Z_F) \quad (6.3.16)$$

Esta expresión se usa frecuentemente para estudiar el efecto del pH del BGE sobre la desnaturalización de la proteína, como una primera aproximación (ver, por ejemplo, Fitch *et al.*, 2006; Whitten y García Moreno, 2000; Elcock, 1999; Yang y Honig, 1994 y 1993). Más generalmente, se debe observar que  $\Delta G^{\text{eff}}$  mantiene una relación bastante compleja con el  $\text{pH}_\alpha^*$  y el pH en la medida que el  $\Delta G^{\text{el}}$  es relevante, como se encuentra y expresa a continuación, en la Sección 6.4.

## 6.4 Resultados y discusión

Esta Sección se refiere a la descripción y el análisis de los resultados numéricos que se obtienen en el contexto teórico presentado en la Sección 6.3 para los dos casos de estudio de la desnaturalización de proteínas que se indican en la Sección 6.2 y se desarrollan a continuación.

### Citocromo c (*Horse Heart Ferricytochrome c*, 1HRC)

Primero, la 1HRC se estudia usando los datos de las movilidades electroforéticas experimentales reportados en la literatura (Stellwagen *et al.*, 1999; Verzola *et al.*, 2001), donde el protocolo de la CZE incluye el uso como BGE de *buffers* isoelectrónicos (ácido glutámico, ácido aspártico y ácido iminodiacético) en solución acuosa (ver, Righetti y Nembri, 1997 y Righetti *et al.*, 1999, para una discusión detallada sobre las ventajas del uso de estas soluciones como BGE).

La secuencia de 104 aminoácidos correspondiente a la 1HRC que se obtiene del PDB es:

```
GDVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKGTGPNLHGLFGRKTGQAPGFTYTDANKNKGITWKEETL
MEYLENPKKYIPGTKMIFAGIKKKTEREDLIAYLKKATNE
```

El número de grupos cargados que se calculan a partir del PDB es  $\{n_{\text{Arg}} = 2; n_{\text{Asp}} = 3; n_{\text{Cys}} = 2; n_{\text{Glu}} = 9; n_{\text{His}} = 3; n_{\text{Lys}} = 19; n_{\text{Tyr}} = 4; n_{\text{COOH}_t} = 1\}$ . También se considera en la proteína la presencia del grupo hemo con  $\text{Fe}^{+3}$  y dos  $-\text{COOH}$  adicionales, y  $n_{\text{Cys}} = 0$  y  $n_{\text{NH}_{2t}} = 0$ , teniendo en cuenta que el grupo amino terminal está acetilado. Esta proteína tiene un peso molecular de 12317.46 g/mol y un radio hidrodinámico compacto

$a_c = 15.11 \text{ \AA}$ . Los valores de los  $pK_1^r$  que se usan son:  $\{pK_{\text{Arg}}^r = 12.0; pK_{\text{Asp}}^r = 4.0; pK_{\text{Glu}}^r = 4.4; pK_{\text{His}}^r = 6.3; pK_{\text{Lys}}^r = 10.4; pK_{\text{Tyr}}^r = 9.6; pK_{\text{COOHt}}^r = 3.8; pK_{\text{NH2t}}^r = 7.5\}$  (Antosiewicz, 1996).

Debido a que las concentraciones de urea que se usan en las experiencias son tan altas como 7 M, la viscosidad del BGE se corrige con la ecuación reportada en Kawahara y Tanford (1966), la cual se expresa,  $\eta = \eta_w(T)(1 + 0.0375C + 0.00315C^2 + 0.00031C^3)$ , donde la viscosidad del agua como una función de la temperatura es  $\eta_w(T) = 0.001\{0.25 + 1.53 \exp[(T - 273)/29.32]\}$ . En adición, el pH y la fuerza iónica se corrigen por la presencia de urea resolviendo simultáneamente el sistema acoplado de ecuaciones que incluye las constantes de disociación, siendo una de ellas el valor del  $pK$  de la urea, que se fija en alrededor de 0.1 (como se reporta en Lide, 1991; pero, ver también Hagihara *et al.*, 1994) y las demás que corresponden a los siguientes *buffers*: (a) ácido glutámico con valores de  $pK$  ácidos 2.19, 4.25 y 9.25 (Cheftel, 1977) y (b) ácido iminodiacético con valores de  $pK$  ácidos 1.8, 2.6 y 9.3 (Martell, *et al.*, 1996). Para otros *buffers* que se usan en este trabajo las correcciones de pH y fuerza iónica no son necesarias, como se explica más abajo.

Los resultados numéricos de las variables conformacionales que se obtienen en el contexto de la Sección 6.3 se reportan en la Tabla 6.1, para la desnaturalización con urea de la proteína a un pH nominal igual a 2.2. En efecto, a partir de la Tabla 6.1 se infiere que la 1HRC está completamente desnaturalizada a pH 2 y fuerza iónica baja, de acuerdo con lo que sugieren autores previos (Verzola *et al.*, 2001). En este sentido, es claro que esta conclusión no se obtiene fácilmente a partir del análisis directo de los datos experimentales reportados, como movilidad de la proteína en función de la concentración de urea. Sin embargo, es un resultado que se infiere a partir de la Tabla 6.1 donde se observa que los parámetros conformacionales promedios  $\langle a \rangle$ ,  $\langle Z \rangle$ ,  $\langle pH^* \rangle$  y  $\langle \delta \rangle$  para la movilidad de la mezcla  $\langle \mu \rangle$  (ver también la Ec. (6.3.9)) no cambian apreciablemente en todo el rango de variación de la concentración de urea  $C$ . Los cambios pequeños en los valores se atribuyen a las variaciones de pH y fuerza iónica debido al agregado de urea en la solución *buffer* (ver Tabla 6.1), combinado con la precisión en la convergencia del problema matemático no-lineal que se debe resolver. Este ejemplo específico es, en

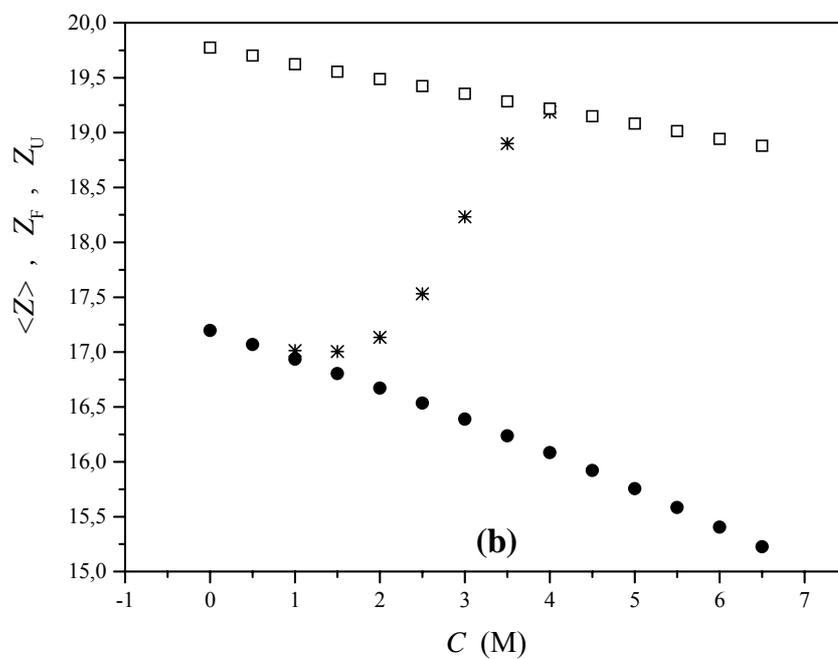
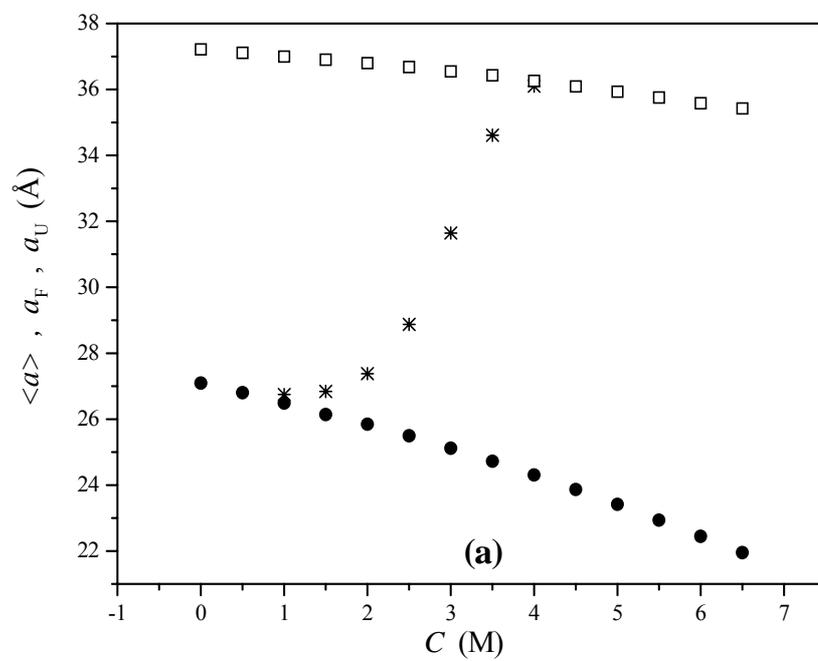
consecuencia, una validación clara de la importancia del análisis de la estabilidad de proteínas a partir de las propiedades conformacionales, como por ejemplo el radio hidrodinámico y el número de carga neta, los cuales están directamente acoplados a través del modelo fisicoquímico no-lineal señalado en la Sección 6.3. En efecto, se sabe que cambios pequeños en el número de carga neta afectan la fricción molecular de la partícula que migra en la CZE como consecuencia del cambio en las interacciones electrostáticas (ver Capítulos 4 y 5 y también Piaggio *et al.*, 2005a y 2006a).

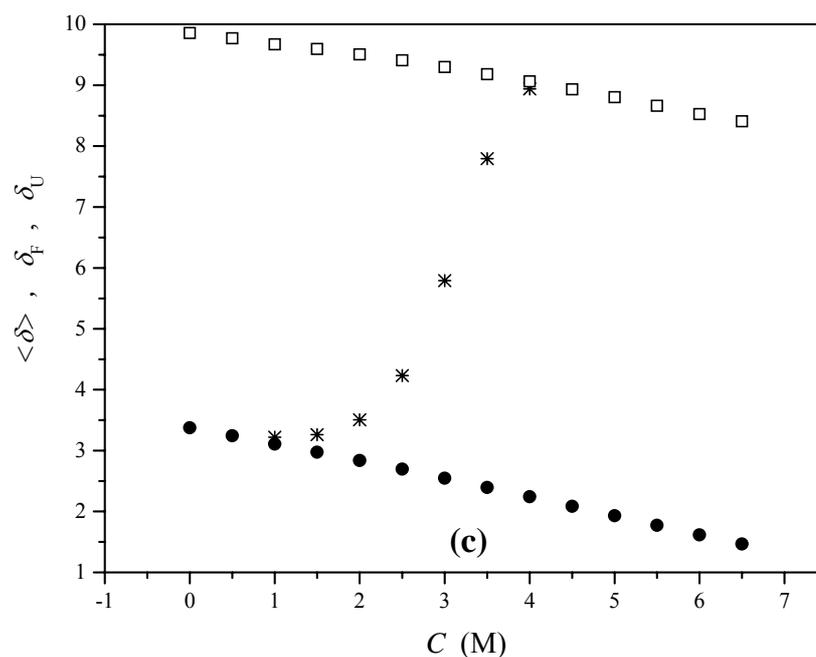
**Tabla 6.1.** Valores promedio de los radios hidrodinámicos  $\langle a \rangle$ , los números de carga neta  $\langle Z \rangle$ , los pH cercanos a la molécula  $\langle \text{pH}^* \rangle$  e hidrataciones  $\langle \delta \rangle$  para la 1HRC en solución *buffer* de ácido iminodiacético 50 mM a diferentes concentraciones de urea (diferentes pH y fuerzas iónicas). Los datos de las movilidades electroforéticas corresponden a Verzola *et al.* (2001) a  $T = 25$  °C y pH nominal 2.2. El radio compacto de la proteína es  $a_c = 15.11$  Å.

Urea $C$ (M)	pH	$I$ (M)	$\mu \cdot 10^9$ ( $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$\langle a \rangle$ (Å)	$\langle Z \rangle$	$\langle \text{pH}^* \rangle$	$\langle \delta \rangle$
0	2.29	0.0138	32.0	33.93	25.15	3.29	7.3
1	2.38	0.0163	30.0	33.33	24.93	3.35	6.9
2	2.45	0.0183	27.5	33.47	24.84	3.37	7.0
3	2.50	0.0200	25.0	33.83	24.79	3.38	7.2
4	2.55	0.0214	23.5	33.31	24.61	3.43	6.9
5	2.59	0.0227	22.0	32.79	24.43	3.46	6.5
6	2.62	0.0238	19.0	34.18	24.57	3.43	7.5

Otro ejemplo relevante en esta dirección del análisis de la estabilidad de proteínas es el caso que considera la desnaturalización de la 1HRC en una solución *buffer* de ácido glutámico (pH nominal 3.2) a diferentes concentraciones de urea. Los resultados numéricos que se obtienen al aplicar el LLCCEM se ilustran en la Figura 6.2, donde los radios hidrodinámicos  $\langle a \rangle$ ,  $a_F$  y  $a_U$ , los números de carga neta  $\langle Z \rangle$ ,  $Z_F$  y  $Z_U$  y las hidrataciones  $\langle \delta \rangle$ ,  $\delta_F$  y  $\delta_U$ , correspondientes a los estados de mezcla, plegado y desplegado, respectivamente, se grafican en función de la concentración de urea  $C$ . Estos parámetros conformacionales indican, en una manera clara, la transición sigmoidea de F a U de esta proteína, libre de otras variaciones espurias de los parámetros, como aquellas que corresponden a la viscosidad del BGE, el pH y la fuerza iónica, debido a la urea que se

agrega en la mezcla. En este procedimiento experimental las variaciones que sufren la viscosidad, el pH y la fuerza iónica correspondientes a cada concentración de urea agregada al BGE, se muestran en la Tabla 6.2.





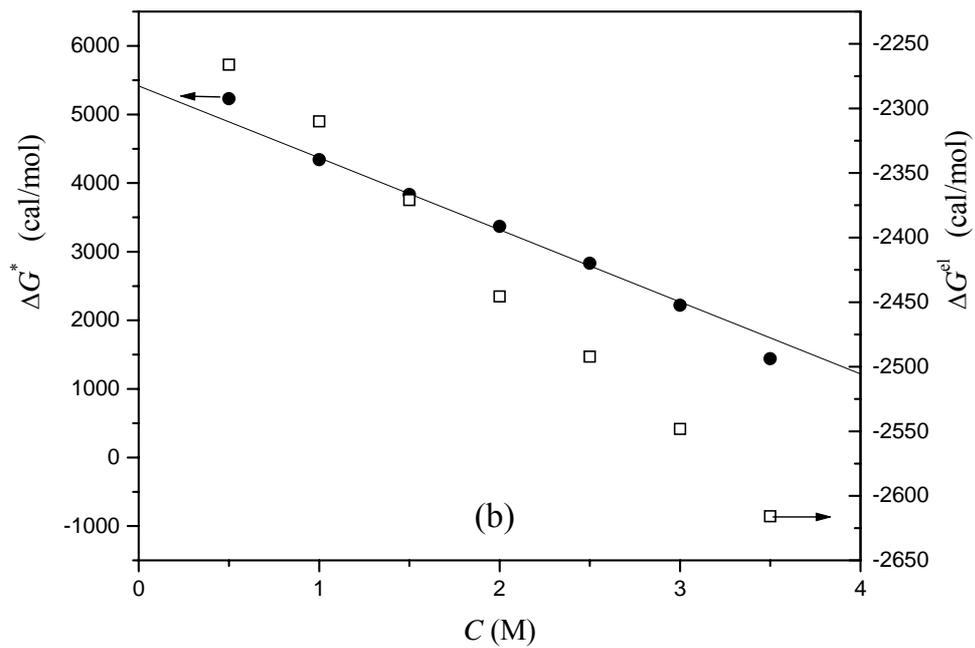
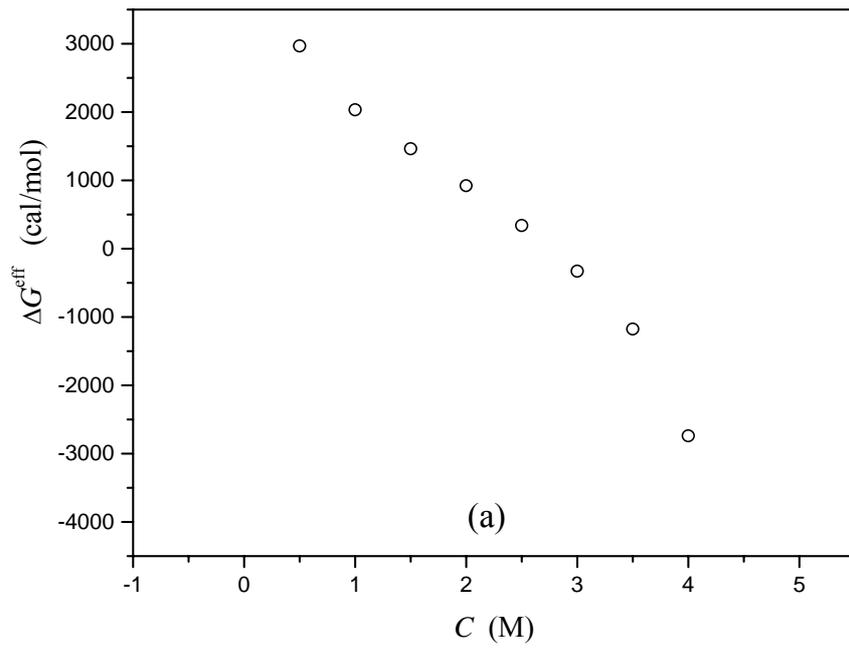
**Figura 6.2.** Radios hidrodinámicos (a), números de carga neta (b) e hidrataciones (c) de los estados plegado, desplegado y promedio de la 1HRC en solución *buffer* de ácido glutámico, a diferentes concentraciones de urea (diferentes pH y fuerzas iónicas). Los datos experimentales de las movi­lidades electroforéticas que se usan en los cálculos corresponden a Verzola *et al.* (2001) a 25 °C. Los símbolos (●) se refieren a los cálculos numéricos que corresponden a las movi­lidades del estado plegado. Los símbolos (\*) se refieren a los cálculos numéricos que corresponden a las movi­lidades de la mezcla. Los símbolos (□) se refieren a los cálculos numéricos que corresponden a las movi­lidades del estado desplegado.

**Tabla 6.2.** Variaciones del pH, la fuerza iónica  $I$  y la viscosidad relativa para las distintas concentraciones de urea agregadas al BGE.

Urea (M)	pH	$I$ (M)	Viscosidad relativa
0	3.251	0.00422	1
0.5	3.268	0.00439	1.019
1	3.285	0.00456	1.041
1.5	3.300	0.00471	1.064
2	3.314	0.00486	1.090
2.5	3.327	0.00501	1.118
3	3.340	0.00515	1.149
3.5	3.352	0.00529	1.183
4	3.363	0.00542	1.220
4.5	3.374	0.00555	1.261
5	3.384	0.00567	1.305
5.5	3.394	0.00580	1.353
6	3.404	0.00592	1.405
6.5	3.413	0.00603	1.462

Asimismo la Figura 6.3 muestra los cálculos termodinámicos asociados con la IHRC al pH nominal 3.2 que involucra la relación entre el cambio de energía libre efectiva  $\Delta G^{\text{eff}}$ , el cambio de energía libre electrostática  $\Delta G^{\text{el}}$  y también el cambio de energía libre conformacional  $\Delta G^*$ , para diferentes concentraciones de urea. En este sentido se observa que el  $\Delta G^{\text{eff}}$  se estima a partir de los valores de  $K$ , los cuales son a su vez determinados a partir de los datos de las movilidades electroforéticas (ver también Ec. (6.3.9)) siguiendo el mismo procedimiento llevado a cabo en Verzola *et al.* (2001). Así se infiere que  $\Delta G^*$  decrece con la concentración de urea con una pendiente  $m = 1050$  cal/(mol M) comenzando con un  $\Delta G_0^* = 5418$  cal/mol a  $C = 0$ . Además, la misma trocha sigue el  $\Delta G^{\text{el}}$ , tomando sin embargo, valores negativos. En efecto, el cambio de energía libre efectiva asociado con la transición  $F \leftrightarrow U$  consigue la minimización a través de efectos cooperativos importantes (Creighton, 1993) descritos por los cambios de energía libre electrostática  $\Delta G^{\text{el}}$  que varía desde  $-2200$  cal/mol a  $C = 0$  hasta  $-3200$  cal/mol a  $C = 6.5$  M (ver Figura 6.3). Para el punto experimental a  $C = 2.5$  M, cercano a la inflexión de la transición sigmoidea, se obtiene un  $\Delta G^{\text{el}} = -2492$  cal/mol, que indica la relevancia de la magnitud de las interacciones electrostáticas en la desnaturalización de proteínas, teniendo en cuenta que en el mismo punto el  $\Delta G^*$  es alrededor de 2831 cal/mol. Así, para el  $\Delta G^{\text{eff}} = 0$ , se encuentra numéricamente que el cambio de energía libre asociado con las interacciones electrostáticas en la proteína en los estados F y U compensa exactamente el valor que proviene de  $\Delta G^* = 2583$  cal/mol a  $C_m = 2.7$  M.

Con relación a la desnaturalización de la IHRC con urea, es relevante indicar que las respuestas asintóticas lineales que se suponen para las movilidades de los estados F y U no son necesariamente la consecuencia de la variación de la viscosidad del BGE, porque como se muestra en la Figura 6.2 a través de estas dos asíntotas los parámetros conformacionales  $\{\alpha_\alpha, Z_\alpha, Z_{\alpha i}, \text{pH}_\alpha^*\}$  para  $\alpha = F, U$  varían con  $C$ , a pesar de que se realizaron las correcciones de viscosidad, pH y fuerza iónica. En efecto, a cada concentración del desnaturalizante se espera una conformación diferente de la proteína en los estados F y U. Consistentemente, se observa que  $\Delta G^*$  no solamente depende de  $T$  como se espera a partir de la expresión termodinámica clásica, sino también de  $C$  en un barrido en la concentración de urea.



**Figure 6.3.** Cambios de energía libre efectiva (a), conformacional (b) y electrostática (b) de la IHRC en solución *buffer* de ácido glutámico, a diferentes concentraciones de urea (diferentes pH y fuerzas iónicas). Los datos de las movibilidades experimentales que se usan en los cálculos corresponden a Verzola *et al.* (2001) a 25 °C. Los símbolos (o) se refieren a los cálculos numéricos del  $\Delta G^{\text{eff}}$ . Los símbolos (●) se refieren a los cálculos numéricos del  $\Delta G^*$ . Los símbolos (□) se refieren a los cálculos numéricos del  $\Delta G^{\text{el}}$ . La línea entera indica el ajuste del  $\Delta G^*$  versus  $C$  con la Ec. (6.3.7) en el entorno de  $C_m = 2.7$  M, dando  $\Delta G_0^* = 5418$  cal/mol y  $m = 1050$  cal/(mol M).

La Tabla 6.3 muestra los valores de  $\langle a \rangle$ ,  $\langle Z \rangle$ ,  $\langle \text{pH}^* \rangle$  y  $\langle \delta \rangle$  para la 1HRC a pH nominal 4.5, donde se usa como BGE una solución *buffer* de acetato 40 mM (Verzola *et al.*, 2001). Para esta solución, el pH y la fuerza iónica no cambian apreciablemente en todo el rango de variación de la concentración de urea  $C$ . Consecuentemente, a partir de las Tablas 6.1 y 6.3 y la Figura 6.2, es claro que si se aumenta el pH desde 2.2 a 3.2 y luego 4.5, hay una progresiva disminución en la hidratación de la proteína, la cual se observa significativamente a baja concentraciones de urea. Por ejemplo, para  $C = 0$  el contenido de solvente de la proteína no excede el 1 % a pH 4.5, mientras que el valor correspondiente a pH 2.2 es tan alto como 7.3 gramos de agua/gramo de proteína anhidra. Cuando se agrega urea para conseguir  $C = 4$  M a pH 4.5 el valor de hidratación que se calcula no es más físicamente admisible ( $\langle a \rangle > a_c$ ) como se observa en la Tabla 6.3. Estos tipos de situaciones se encontraron y analizaron previamente con relación a diferentes péptidos en solución (ver Capítulo 5 y Piaggio *et al.*, 2006a). En efecto, se encuentra que valores de hidrataciones no físicos se interpretan y corrigen eliminando la hipótesis de la forma de la partícula aproximadamente esférica. Así la hidratación que se calcula a partir del dato de movilidad bajo estas situaciones específicas se vuelve más real, en la medida que se consideran formas diferentes a la esférica. Por consiguiente, a partir de los valores numéricos de la Tabla 6.3, es claro que para  $C = 4$ , la proteína puede estar perdiendo estabilidad en promedio cambiando su estructura casi esférica. Además, también se observa en la Tabla 6.3 que los valores de hidratación promedios para la 1HRC a pH 4.5 permanecen bastante bajos, aún a valores relativamente altos de concentración de urea, indicando probablemente que si el contenido de agua de la proteína fuera más alto, se deberían esperar formas no esféricas a altas concentraciones de urea a este nivel de pH, más que cambios importantes en el tamaño. En este aspecto, es relevante señalar el rol importante que juegan las interacciones electrostáticas en los sistemas proteicos (aquí estimadas solamente por un modelado simple, es decir, a través de la aproximación de campo promedio del LLCCEM). En efecto, cuando se disminuye el pH en el proceso de desnaturalización de la 1HRC, esta proteína se vuelve en promedio altamente hidratada (ver Figura 6.2) y el efecto del  $\Delta G^{\text{el}}$  sobre la minimización del cambio de energía libre efectiva  $\Delta G^{\text{eff}}$  que favorece la desnaturalización de la proteína es significativamente marcado a pH nominal 3.2.

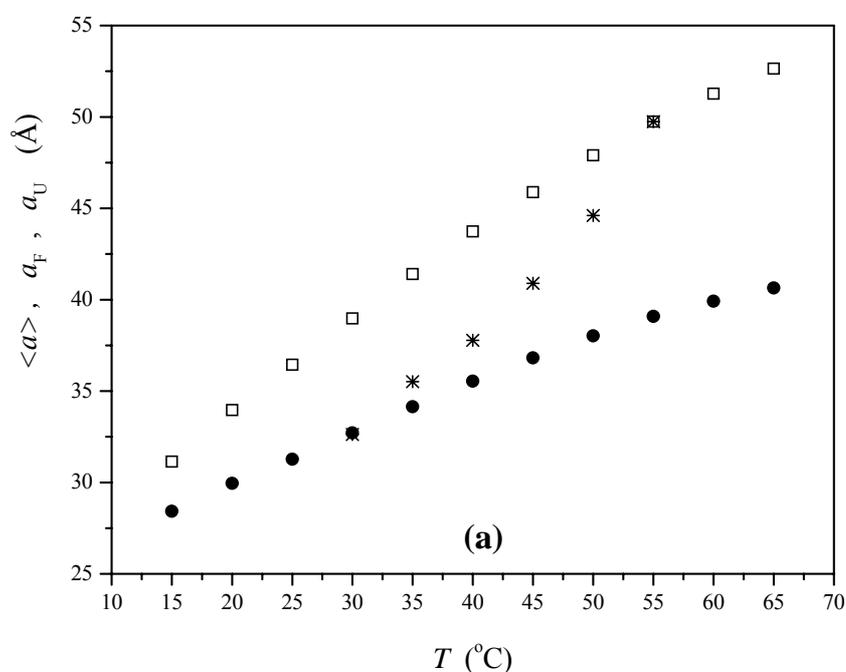
**Tabla 6.3.** Valores promedio del radio hidrodinámico  $\langle a \rangle$ , número de carga neta  $\langle Z \rangle$ , pH cercano a la molécula  $\langle \text{pH}^* \rangle$  e hidratación  $\langle \delta \rangle$  para la 1HRC en *buffer* acetato 40 mM a diferentes concentraciones de urea. Los datos de las movilidades electroforéticas corresponden a Verzola *et al.* (2001) a  $T = 25$  °C y pH nominal 4.5. El radio compacto de la proteína es  $a_c = 15.11$  Å.

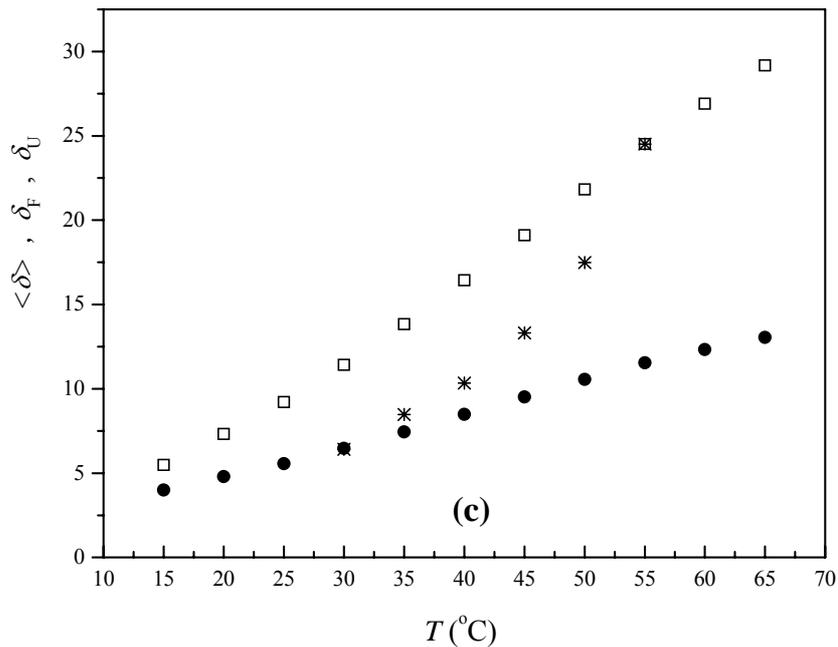
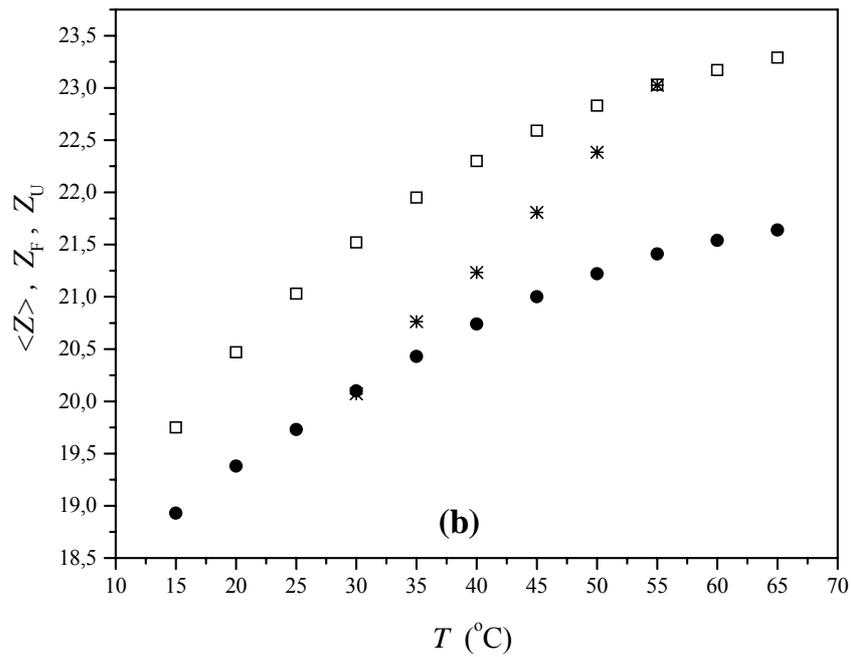
Urea $C$ (M)	$\mu 10^9$ ( $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$\langle a \rangle$ (Å)	$\langle Z \rangle$	$\langle \text{pH}^* \rangle$	$\langle \delta \rangle$
0	38.7	15.12	11.88	5.72	0.002
4	33.5	14.42	11.71	5.79	-0.09
6	25.3	16.26	12.11	5.61	0.17
6.5	21.5	17.95	12.43	5.49	0.48
7	19.5	19.48	12.70	5.39	0.81

Antes de considerar el segundo caso de estudio de la desnaturalización de proteínas en el régimen rápido de la detección de la CZE, es apropiado señalar aquí que solamente de los tres pHs nominales considerados más arriba en la desnaturalización de la 1HRC, solamente a pH 3.2 se pueden analizar completamente los datos experimentales, incluyendo el grupo de movilidades aparentes que pertenecen a las fracciones F y U, que se obtienen extrapolando las líneas en el entorno de los valores de  $C$  bajos y altos (ver, más detalles en Hilser y Freire, 1995; Verzola *et al.*, 2001 para este tipo de cálculos). En efecto, para pH 4.5 los valores asintóticos de las movilidades disponibles a  $C$  altos no son suficientes para definir sin ambigüedad la asíntota de la movilidad desplegada. Sin embargo, esta situación no es un impedimento, en principio, para visualizar que la evaluación del radio hidrodinámico promedio de la mezcla de F y U es aún un indicador claro de la transición sigmoidea. Por otro lado, es también evidente que la desnaturalización de las proteínas en el régimen lento de la detección de la CZE, es una situación ideal en la que se puede usar sin limitaciones todo el potencial del contexto teórico presentado en la Sección 6.3.

Asimismo, es evidente que las interacciones de la urea y la proteína dependen significativamente del pH nominal que se usa en la solución *buffer*, conduciendo así a mecanismos bastante complicados de la desnaturalización de proteínas, donde se esperan cambios drásticos en la forma e hidratación. Por consiguiente, para tener otro punto de vista de la estabilidad de la 1HRC, se estudia su desnaturalización térmica a través de los datos experimentales publicados en Stellwagen *et al.* (1999). Para esta situación, la

proteína está en solución *buffer* de ácido aspártico con pH nominal 3.02 y  $I = 4.63$  mM, y la temperatura se varía entre 15 y 65 °C; en consecuencia, ahora la temperatura actúa como agente desnaturizante. Los resultados numéricos que se obtienen para este estudio particular se ilustran en la Figura 6.4, donde los radios hidrodinámicos  $\langle a \rangle$ ,  $a_F$  y  $a_U$ , los números de carga neta  $\langle Z \rangle$ ,  $Z_F$  y  $Z_U$ , y las hidrataciones  $\langle \delta \rangle$ ,  $\delta_F$  y  $\delta_U$ , se grafican en función de la temperatura. Una vez más estos parámetros conformacionales indican la transición sigmoidea de F a U de esta proteína, libre de las variaciones espurias de parámetros como la viscosidad del BGE, la cual cambia en un factor de 3 en todo el rango de temperatura. En particular para este caso se observa que a este nivel de pH, las constantes de disociación relevantes (aquellas que conciernen a los grupos  $-\text{COOH}$ ) no son bastante sensibles a los cambios de temperatura y en consecuencia no se introducen correcciones por temperatura, como una primera aproximación. A partir de la Figura 6.4, es remarcable la evolución del radio hidrodinámico de la 1 HRC que comienza en un valor de 28.80 Å a 15 °C y termina con un valor de 52.64 Å para 65 °C. Estos resultados son por supuesto compatibles con un valor de hidratación alto que también se reporta en esta figura.





**Figura 6.4.** Radios hidrodinámicos promedio, plegado y desplegado (a), números de carga neta (b) e hidrataciones (c) de la 1HRC en solución *buffer* de ácido aspártico 40 mM (pH nominal 3.02) para diferentes temperaturas. Los datos experimentales de las movilidades electroforéticas corresponden a Stellwagen *et al.* (1999). Los símbolos (●) se refieren a los cálculos numéricos que corresponden a las movilidades de estado plegado. Los símbolos (\*) se refieren a los cálculos numéricos que involucran la movilidad mezcla de la proteína. Los símbolos (□) se refieren a los cálculos numéricos que corresponden a las movilidades del estado desplegado.

Los cálculos termodinámicos que involucran las Ecs. (6.3.3) a (6.3.6), para el barrido en temperatura de la 1HRC también presenta aspectos físicos relevantes relacionados con la estabilidad de la proteína. En efecto, la relación entre  $\Delta G^{\text{eff}}$ ,  $\Delta G^{\text{el}}$  y  $\Delta G^*$  para diferentes temperaturas indican que entre 15 y 40 °C el estado plegado es predominante con una fracción molar  $X_F$  cerca de uno. Para temperaturas más altas que 40 °C, la Tabla 6.4 demuestra que el proceso de desplegamiento se favorece observando que  $\Delta G^{\text{eff}}$  decrece hacia el punto de inflexión donde los valores de  $\Delta G^{\text{el}}$  y  $\Delta G^*$  se compensan uno a otro. Para esta situación particular, se encuentra  $T_m = 44$  °C,  $\Delta H^* = 31135$  cal/mol y  $\Delta S^* = 90.3$  cal/(mol K) como se calcula a partir de la Ec. (6.3.6) en el entorno del punto donde  $\Delta G^{\text{eff}} = 0$ . Estos resultados están en el orden de aquellos reportados en Víglaský *et al.* (2000), donde se usan métodos experimentales y BGEs diferentes.

**Tabla 6.4.** Cambios de la energía libre efectiva  $\Delta G^{\text{eff}}$ , conformacional  $\Delta G^*$  y electrostática  $\Delta G^{\text{el}}$  de la 1HRC en solución *buffer* de ácido aspártico, a diferentes temperaturas. Los datos de las movilidades experimentales que se usan en los cálculos corresponden a Stellwagen *et al.* (1999) a pH 3.02. El ajuste de  $\Delta G^*$  versus  $T$  con la Ec. (6.3.6) en el entorno de  $T_m = 44$  °C, proporciona  $\Delta H^* = 31135$  cal/mol y  $\Delta S^* = 90.3$  cal/(mol K).

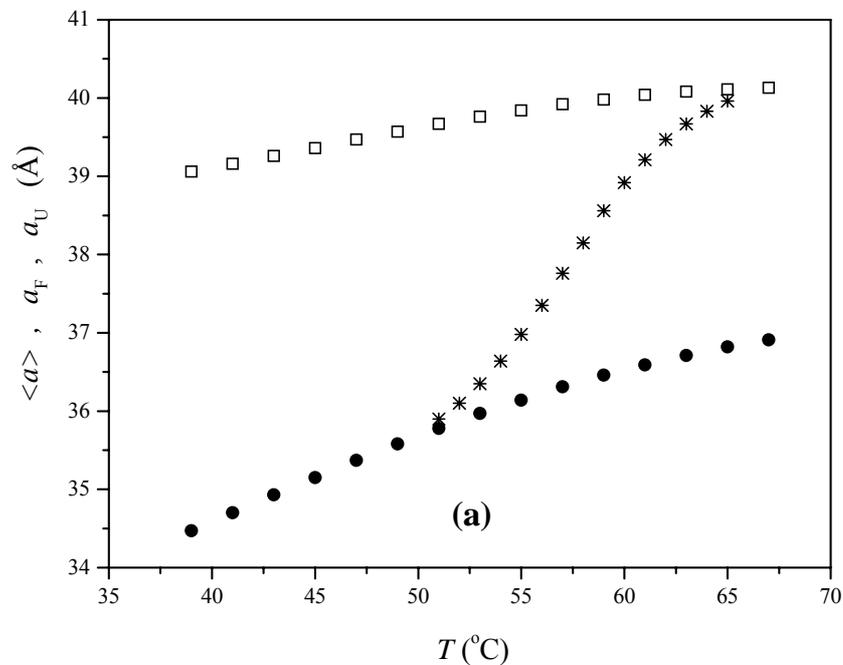
T (°C)	$\Delta G^{\text{eff}}$ (cal/mol)	$\Delta G^{\text{el}}$ (cal/mol)	$\Delta G^*$ (cal/mol)
35	1289	-2150	3439
40	531	-2208	2740
45	-52	-2509	2456
50	-660	-2552	1892
55	-1502	-3108	1606

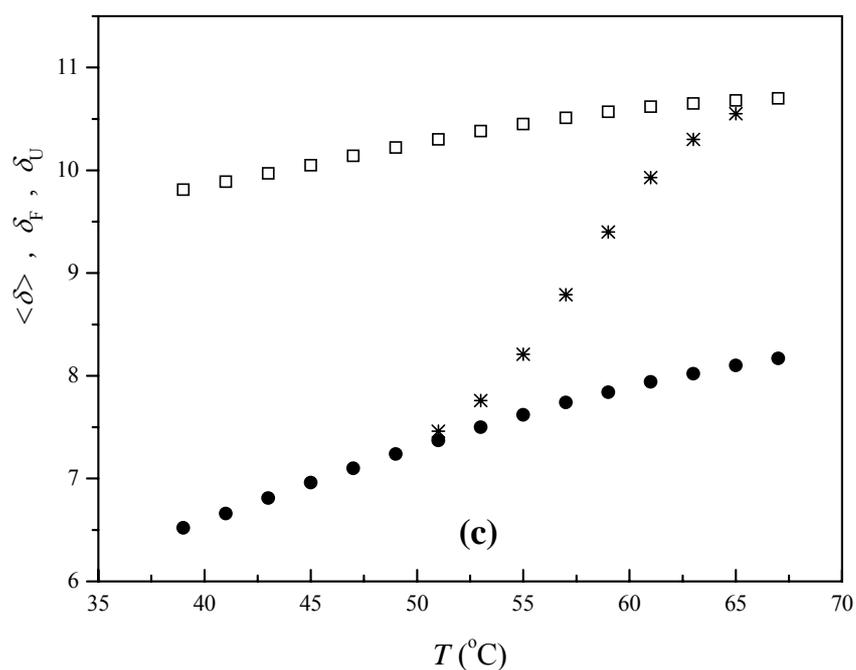
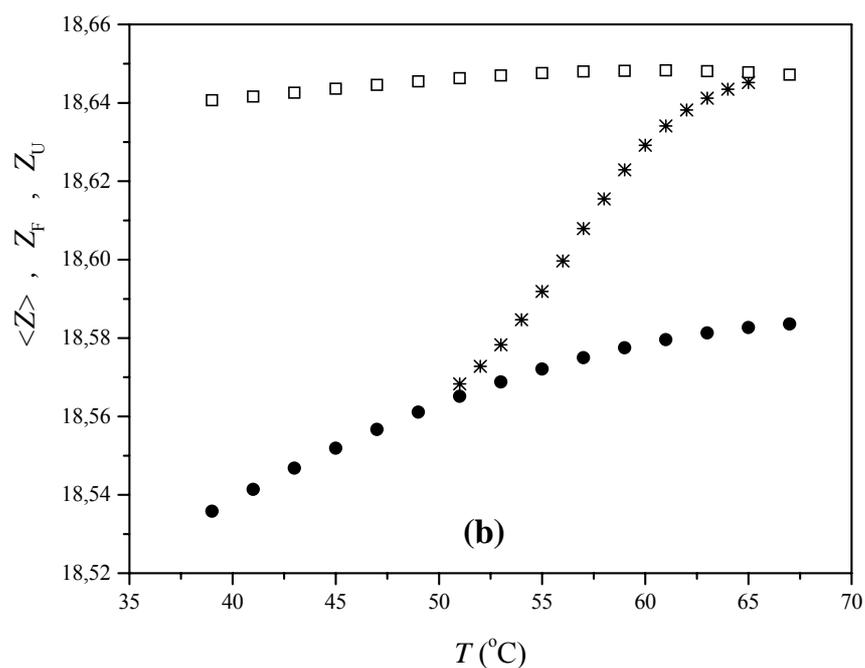
### **Lisozima (*Hen Egg White Lysozyme*, 2LYZ)**

El segundo caso de estudio de la desnaturalización de una proteína corresponde a la 2LYZ en solución *buffer* de citrato de sodio 20 mM con un pH nominal 2.07. La temperatura se varía entre 37 y 67 °C, y se usan los datos de las movilidades electroforéticas reportados en Hilser *et al.* (1993). El número y tipo de aminoácidos

cargados presentes en la molécula de 2LYZ que se obtiene del PDB es  $\{n_{\text{Arg}} = 11; n_{\text{Asp}} = 7; n_{\text{Glu}} = 2; n_{\text{His}} = 1; n_{\text{Lys}} = 6; n_{\text{Tyr}} = 3; n_{\text{Cys}} = 8; n_{\text{COOHt}} = 1; n_{\text{NH}_2\text{t}} = 1\}$ . Los valores de los  $pK_i^f$  que se usan son los mismos que se reportaron para la 1HRC (Antosiewicz, 1996). Asimismo, la 2LYZ tiene una masa molar de 14303.03 g/mol y un radio compacto  $a_c = 15.89 \text{ \AA}$ .

Los resultados numéricos que se obtienen para este estudio particular se ilustran en la Figura 6.5, donde los radios hidrodinámicos  $\langle a \rangle$ ,  $a_F$  y  $a_U$ , los números de carga neta  $\langle Z \rangle$ ,  $Z_F$  y  $Z_U$ , y las hidrataciones  $\langle \delta \rangle$ ,  $\delta_F$  y  $\delta_U$ , se grafican en función de la temperatura. Una vez más estos parámetros conformacionales indican de un modo claro la transición sigmoidea de F a U de esta proteína, similarmente a los resultados que se presentan en la Figura 6.4. Además, a partir de la Figura 6.5 es remarcable la evolución del radio hidrodinámico de la 2LYZ que comienza en un valor de  $34.50 \text{ \AA}$  a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  y termina con un valor de  $40 \text{ \AA}$  a  $67 \text{ }^\circ\text{C}$ . Estos resultados son compatibles con los valores altos de hidratación de 10.5 gramos de agua/gramo de proteína anhidra, que también se reportan en esta figura.





**Figura 6.5.** Radios hidrodinámicos promedio, plegado y desplegado (a), números de carga neta (b) e hidrataciones (c) de la 2LYZ en *buffer* de citrato de sodio 20 mM (pH nominal 2.07) para diferentes temperaturas. Los datos de las movilidades experimentales que se usan en los cálculos pertenecen a Hilser *et al.* (1993). Los símbolos (●) se refieren a los cálculos numéricos que corresponden a las movilidades del estado plegado. Los símbolos (\*) se refieren a los cálculos numéricos que involucran las movilidades de la mezcla. Los símbolos (□) se refieren a los cálculos numéricos que corresponden a las movilidades del estado desplegado.

Los cálculos termodinámicos que involucran las Ecs. (6.3.3) a (6.3.6), para el barrido en temperatura de la 2LYZ presentan aspectos físicos relevantes relacionados con la estabilidad de la proteína. En efecto, la relación entre  $\Delta G^{\text{eff}}$ ,  $\Delta G^{\text{el}}$  y  $\Delta G^*$  para diferentes temperaturas indican que entre 37 y 49 °C el estado plegado es predominante con una fracción molar  $X_F$  cerca de uno. Para temperaturas más altas que 50 °C, la Tabla 6.5 demuestra que el proceso de desplegado se favorece observando que  $\Delta G^{\text{eff}}$  decrece hacia el punto de inflexión donde los valores de  $\Delta G^{\text{el}}$  y  $\Delta G^*$  se compensan uno a otro. Para esta situación particular, se encuentra numéricamente  $T_m = 57.5$  °C,  $\Delta H^* = 100739$  cal/mol y  $\Delta S^* = 301$  cal/(mol K) como se calcula a partir de la Ec. (6.3.6) en el entorno del punto donde  $\Delta G^{\text{eff}} = 0$ . Estos valores son aproximadamente los mismos que aquellos reportados en Hilser *et al* (1993) para la 2LYZ.

**Tabla 6.5.** Cambios de energía libre efectiva  $\Delta G^{\text{eff}}$ , conformacional  $\Delta G^*$  y electrostática  $\Delta G^{\text{el}}$  de la 2LYZ en solución *buffer* de citrato de sodio 20 mM (pH nominal 2.07), a diferentes temperaturas. Los datos de las moviidades experimentales que se usan en los cálculos corresponden a Hilser *et al.* (1993). El ajuste de  $\Delta G^*$  versus  $T$  con la Ec. (6.3.6) en el entorno de  $T_m = 57.5$  °C, proporciona  $\Delta H^* = 100739$  cal/mol y  $\Delta S^* = 301$  cal/(mol K).

T (°C)	$\Delta G^{\text{eff}}$ (cal/mol)	$\Delta G^{\text{el}}$ (cal/mol)	$\Delta G^*$ (cal/mol)
51	2129	-1259	3388
53	1342	-1227	2569
55	730	-1198	1928
57	192	-1170	1362
59	-327	-1145	818
61	-835	-1121	286
63	-1384	-1099	-285
65	-2092	-1079	-1014

Se observa aquí que ambas proteínas, 1HRC y 2LYZ, muestran respuestas disímiles a la desnaturalización térmica con relación al rol que juega el cambio de la energía libre

electrostática. En efecto, el valor absoluto  $|\Delta G^{\text{el}}|$  para la 1HRC aumenta significativamente con  $T$  desde 2150 a 3108 cal/mol, mientras  $|\Delta G^{\text{el}}|$  para la 2LYZ decrece ligeramente con  $T$  desde 1259 a 1079 cal/mol. Por lo tanto el cambio de energía libre electrostática con  $T$  promueve la desnaturalización de la proteína 1HRC en contraposición a lo que ocurre con la 2LYZ. Más generalmente, es claro que el  $\Delta G^{\text{el}}$  tanto en el barrido en temperatura como con urea muestra una tendencia a promover la desnaturalización de la 1HRC estudiada aquí. En efecto, a pesar que toma valores negativos en todo el rango de la concentración de urea, aumenta en valor absoluto para incrementos en  $C$ . Así el  $\Delta G^{\text{el}}$  evoluciona a favor de la minimización del  $\Delta G^{\text{eff}}$  necesario para lograr una desnaturalización importante en  $C_m$  y  $T_m$ . Este estado se logra cooperativamente a partir de la evolución de ambos cambios de energías libre, conformacional y electrostático. Sin embargo, para la 2LYZ el  $\Delta G^{\text{el}}$  en el barrido en temperatura muestra una tendencia a oponerse a la desnaturalización, como se explicó arriba. En efecto, a pesar que toma valores negativos en todo el rango del barrido de temperatura, también decrece en valores absolutos para incrementos de  $T$ . Así, el  $\Delta G^{\text{el}}$  cambia en contra de la minimización del  $\Delta G^{\text{eff}}$  requerido para lograr una desnaturalización importante de la proteína a  $T_m$ . Asimismo este estado se logra como consecuencia de una disminución importante del  $\Delta G^*$  con la temperatura, el cual tiene el efecto opuesto a las interacciones electrostáticas.

Un análisis adicional interesante se realiza comparando la desnaturalización con un barrido en concentración de urea de la 1HRC con aquellos llevados a cabo a través de barridos de temperatura de la 1HRC y 2LYZ. Así, a partir de las Figuras 6.2, 6.4 y 6.5 se observa que  $a_F$ ,  $a_U$ ,  $\delta_F$  y  $\delta_U$  decrecen con  $C$  a pesar que  $\langle a \rangle$  y  $\langle \delta \rangle$  presentan el incremento sigmoideo esperado de la transición de la proteína. Por el contrario,  $a_F$ ,  $a_U$ ,  $\delta_F$ ,  $\delta_U$ ,  $\langle a \rangle$  y  $\langle \delta \rangle$  aumentan con  $T$ , consistentemente con el hecho que las dos proteínas incrementan sus volúmenes a medida que la temperatura se vuelve más alta. Así, se puede concluir aquí, que el proceso de desnaturalización térmica es bastante diferente de aquel que se basa en la adición de urea como agente desnaturalizante. La evolución característica de los parámetros conformacionales con la concentración de urea descrito arriba se explica en parte considerando que la urea tiene dos efectos sobre los estados de la

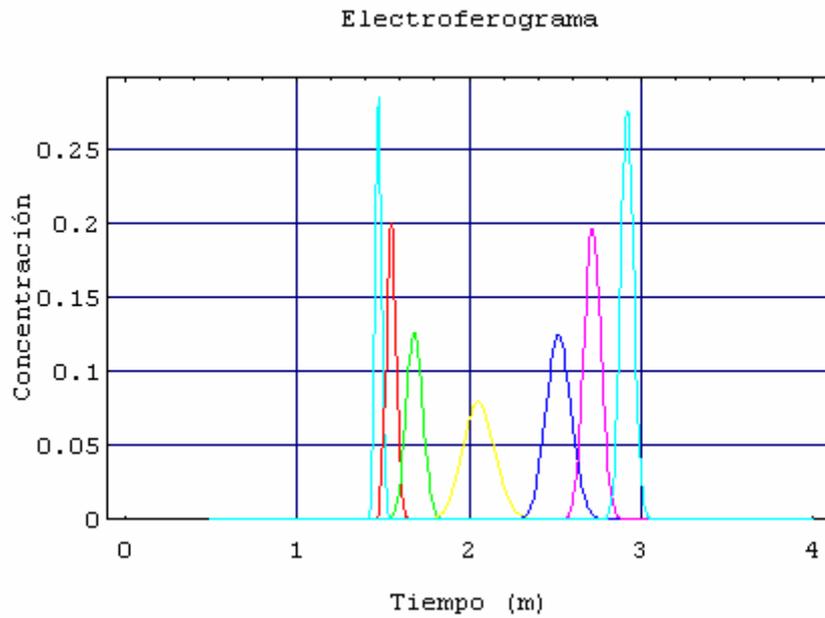
proteína (Creighton, 1993): (1) las moléculas de urea se sitúan en la capa de solvatación de la proteína en una concentración más grande que el seno del solvente (efecto de unión preferencial), afectando así la cantidad de agua estructural importante alrededor de la proteína, la cual es parte de la hidratación de la proteína cuando no está presente este desnaturalizante; este mecanismo aplicaría a ambos estados plegado y desplegado separadamente explicando la disminución del radio hidrodinámico y la hidratación con  $C$  como lo ilustra la Figura 6.2; (2) las moléculas de urea disminuyen la magnitud de las interacciones hidrofóbicas significativamente introduciéndose en el dominio de la proteína a través de áreas superficiales accesibles. Este mecanismo aplicaría a la transición de plegado-desplegado que se observa por un incremento pronunciado del radio promedio y la hidratación de la mezcla compuesta por los dos estados de la proteína en proporciones importantes. (ver, Figura 6.2).

Otra manera de visualizar la magnitud de las interacciones electrostáticas en el dominio de la proteína y en el BGE que la rodea es el análisis de los  $pK$ -shifts. Así, a partir de las evaluaciones numéricas de la Ec. (6.3.12) se encuentra que los valores de  $\Delta pH_\alpha \approx \Delta pK_{ai}$  cambian desde 1.23 a 0.66 para el barrido térmico de la 1HRC en el rango de 15 a 65 °C (dentro de la transición estos  $pK$ -shifts se deben interpretar como valores promedios). Esta variación en los  $pK$ -shifts es significativamente más baja para el barrido térmico de la 2LYZ en el rango de 37 a 67 °C, donde se encuentra  $0.65 < \Delta pH_\alpha < 0.62$ . Los cálculos son consistentes con los cambios grandes de radio hidrodinámico y carga neta que se observa en la 1HRC, principalmente cuando estos parámetros se comparan con aquellos que se encuentran para la 2LYZ (ver Figuras 6.4 y 6.5). Estos resultados se obtienen, por supuesto, fenomenológicamente a partir de los datos experimentales de las movi­lidades electroforéticas usados. En consecuencia, para inferir conclusiones futuras concernientes a los  $pK$ -shifts estimados aquí, se requiere el análisis detallado de las distancias entre grupos cargados y sus evoluciones con los cambios del agente desnaturalizante. Por consiguiente, un aspecto adicional que se debe mejorar en las propuestas de este trabajo es aquel relacionado con el LLCCEM, el cual tiene limitaciones ya mencionadas en los Capítulos 4 y 5 y en la literatura (Piaggio *et al.*, 2005a y 2006a). En efecto, una de las principales dificultades que se encuentran al presente con este modelo es que las distancias entre los grupos cargados en la proteína están disponibles en el PDB solamente para el estado nativo. En consecuencia para péptidos, fracciones de proteínas y

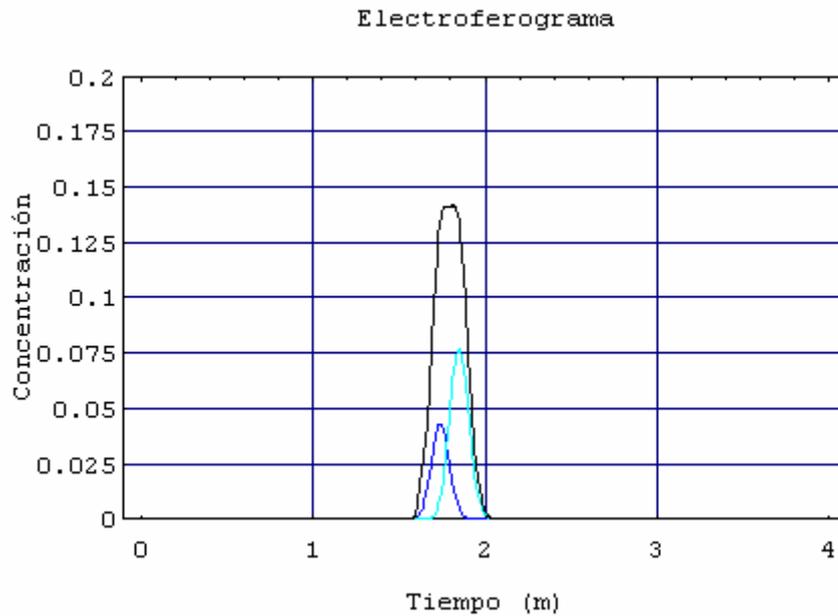
proteínas desnaturalizadas la estimación de estas distancias requiere la introducción de hipótesis adicionales (ver con relación a este aspecto el Capítulo 5 y Piaggio *et al.*, 2006a).

Finalmente, es importante señalar aquí que aunque la estimación de los parámetros conformacionales de la transición del *folding* de la proteína a través del LLCCEM, provee información útil para interpretar los datos de las movilidades de la CZE en el proceso de desnaturalización, también se observa que varios aspectos físicos relevantes aún merecen investigaciones futuras. En este sentido, la detección del proceso de desnaturalización en el régimen rápido de la CZE, requiere una descomposición de la superposición de picos (*deconvolution*) del electroferograma que involucra las movilidades de los estados plegado y desplegado (ver Ec. (6.3.8)). Es claro que aparte de los valores de movilidades  $\mu_F$  y  $\mu_U$  asociados con las líneas rectas asintóticas que se obtienen a partir de los datos de las movilidades experimentales para la acción del agente desnaturalizante en forma nula y casi completa, existen otros pares de valores de movilidades, para cada condición de desnaturalización, los cuales proveen el mismo valor de la constante de equilibrio  $K$  (ver Ec. (6.3.9)). En efecto, se debería encontrar un par de valores de movilidades que descompone exactamente el pico de absorbancia a partir del cual se evalúa la movilidad de la mezcla. Cabe señalar que se agregan los efectos dispersivos en los electroferogramas resultantes (ver, Kenndler, 1998a; Piaggio y Deiber, 2003). Para esta situación específica se pueden calcular los cambios de energía termodinámica verdadera en lugar de los valores aparentes (ver también, Hilser y Freire, 1995), donde se realiza un análisis estocástico para estudiar este efecto). Por supuesto este propósito introduciría un trabajo computacional adicional y más complejo al realizado.

A modo de ejemplo se muestra en la Figura 6.6, los electroferogramas simulados superpuestos realizados con el programa computacional para la desnaturalización de la IHRC a diferentes concentraciones de urea y a pH nominal 3.2. Cada pico corresponde a la mezcla de los estados plegado y desplegado a una concentración de urea particular. En adición, en la Figura 6.7 se presenta el electroferograma simulado correspondiente a la superposición de picos de los estados plegado y desplegado en la transición del proceso de desnaturalización, que surgen de encontrar un par de valores de movilidades que descompone correctamente el pico de la mezcla para un valor de  $C = 3.0$  M.



**Figura 6.6.** Simulación del proceso de desnaturalización de la IHRC en presencia de distintas concentraciones de urea a pH nominal 3.2, en el régimen rápido de detección de la CZE. Los picos representados son picos promedios que se calculan a partir de las movilidades electroforéticas experimentales.



**Figura 6.7.** Simulación de la transición en el proceso de desnaturalización de la IHRC para  $C = 3.0$  M. La fracción de la proteína plegada es  $X_F = 0.36$  (pico color azul) y la fracción de la proteína en el estado desplegado es  $X_U = 0.64$  (pico color turquesa). El pico único es el promedio (pico color negro) que corresponde a la mezcla de los dos estados plegado y desplegado.

## 6.5 Conclusiones

Los dos casos de estudio que se presentan en este capítulo muestran que el uso de los parámetros conformacionales como el radio hidrodinámico, el número de carga neta y la hidratación son útiles para estudiar los procesos de desnaturalización de proteínas bajo la acción de diferentes agentes desnaturalizantes, a partir de mediciones simples de la movilidad electroforética que se obtienen mediante la CZE.

Desde un punto de vista más general es claro que el uso del LLCCEM (o eventualmente un modelo mejorado con capacidades similares) para estudiar la desnaturalización de proteínas vía CZE puede ser útil primero para analizar los datos experimentales eliminando los efectos espurios que introducen variaciones en la viscosidad del BGE y cambios en el pH y la fuerza iónica como consecuencia del agregado del agente desnaturalizante, y segundo, para separar el efecto de la energía libre conformacional y electrostática en el proceso de desnaturalización. Así, se encuentra que el cambio de energía libre electrostática puede ser relevante en determinar la estabilidad conformacional de proteínas.

Sin embargo, se deben dedicar investigaciones adicionales a los tipos de regímenes donde se lleva a cabo la detección de la movilidad electroforética. En este sentido el régimen rápido es por supuesto más delicado para analizar porque requiere la descomposición de la movilidad de la mezcla en las movilidades de F y U de los estados de la proteína que componen la mezcla y necesita un análisis numérico más elaborado. En efecto, se deben equiparar los efectos dispersivos que se encuentran en la detección de la CZE concerniente al pico de la mezcla correspondiente  $\langle \mu \rangle$  con aquellos que pertenecen a los picos de los estados de la proteína relacionados con  $\mu_F$  y  $\mu_U$ . Así sería posible estimar las propiedades termodinámicas verdaderas con cálculos bastante más laboriosos.

# Capítulo 7

## Aminoácidos

---

---

### 7.1. Introducción

Los aminoácidos, como unidades elementales que constituyen péptidos y proteínas para funciones complejas en los sistemas vivos, se estudiaron desde diferentes puntos de vista fisicoquímicos, a partir de una variedad de técnicas y metodologías, para establecer sus características más relevantes, como estructuras configuracionales y conformacionales y propiedades termodinámicas en soluciones acuosas. En los últimos años, la CZE se aplicó a estas moléculas *zwitterionicas*, relativamente pequeñas (masa molar desde 75 a 204 g/mol) para determinar principalmente su estado de carga a diferentes valores de pH, a través de los valores de los  $pK$  de los grupos ionizantes de la cadena lateral y de los grupos  $\alpha$ -amino y  $\alpha$ -carboxilo, que se obtienen de las curvas de titulación. En este contexto de motivación que involucra la migración electroforética de partículas subnanométricas como los aminoácidos, al presente uno de los estudios importantes es aquel específicamente asociado con la formulación apropiada del BGE para una corrida particular de la CZE para lograr la información esperada a partir del electroferograma resultante (ver, por ejemplo, Kenndler, 1998a; Gaš, *et al.*, 2001; Jaroš, *et al.*, 2002). Dentro de este marco relativamente amplio, uno de los requerimientos básicos es conocer como la formulación de la solución, el pH, la fuerza iónica  $I$ , la temperatura  $T$ , la viscosidad  $\eta$  y la permitividad eléctrica  $\varepsilon$  se pueden controlar, como propiedades relevantes del BGE, para conseguir la separación de los aminoácidos a partir de la digestión de péptidos y proteínas. En este capítulo específicamente se refiere al pH -microambiente del solvente en el entorno de las moléculas de aminoácidos teniendo en cuenta que el fenómeno de regulación de cargas siempre está presente alrededor de las partículas que migran electroforéticamente (ver por ejemplo, Menon y Zydney, 2000; Gitlin *et al.*, 2003; Allison *et al.*, 2004; Piaggio *et al.*, 2005a y 2006a; Gitlin *et al.*, 2006). En consecuencia, de un pH a otro, se espera encontrar desviaciones en los valores que toman las constantes de disociación de los grupos ionizantes en aminoácidos, péptidos y proteínas, y en consecuencia se requiere la estimación de las variaciones de los  $pK$  ( $pK$ -shifts) (ver por

ejemplo, Beroza *et al.*, 1991; Antosiewicz *et al.*, 1994; You y Bashford., 1995; Antosiewicz *et al.*, 1996; Beroza y Fredkin, 1996; Schaefer *et al.*, 1997).

En particular, la evaluación y la predicción de los *pK-shifts* de los grupos ionizantes de los residuos de aminoácidos en péptidos y proteínas ha ganado mucha atención para comprender mejor los sistemas biológicos complejos. Sin embargo, esta conclusión no necesariamente aplica al caso de los aminoácidos libres, a pesar de su importancia como parte constitutiva de los primeros. A partir de este aspecto específico de las macromoléculas biológicas, como péptidos y proteínas, es claro que se requiere el estudio de los aminoácidos como entidades individuales incluyendo la evaluación del fenómeno de regulación de cargas y la estimación de la hidratación. Al presente, el cálculo de esta última propiedad es un problema difícil que involucra programas computacionales largos y complejos a través de modelos de dinámica molecular y mecánica estadística, así como también programas experimentales sofisticados (ver por ejemplo, Kuntz, 1971a y b; Hopfinger, 1977; Fennema, 1977; Tschapeck y Wasowski, 1979; Réjou-Michel *et al.*, 1985; Warwicker, 1997; Durchschlag y Zipper, 2002; Liu *et al.*, 2003; Beck *et al.*, 2003; Parsons y Koga, 2005; Shirts y Pande, 2005; Hess y van der Vegt, 2006). Los progresos en esta dirección están aumentando como se infiere a partir de la literatura donde se describen cálculos complejos en detalle. En este sentido, las teorías electrocinéticas y electrostáticas disponibles concernientes a las movilidades electroforéticas de los analitos combinadas con datos experimentales de la CZE, pueden proveer información adicional y relevante para caracterizar los aminoácidos a través de la determinación de la carga neta  $eZ$  ( $e$  es la carga elemental y  $Z$  es el número de carga neta) y la forma y tamaño hidrodinámico (se necesita el coeficiente de fricción hidrodinámico  $f$ ) a diferentes pH. En adición, a partir de estas propiedades se pueden estimar otras cantidades relevantes como el número de hidratación  $H$  (moles de agua por mol de analito) y el *pK* actual o efectivo de los grupos ionizantes, como primera aproximación, antes de realizar cálculos más elaborados. Sin embargo, esta información se debe extraer cuidadosamente a partir de los experimentos de la CZE porque la movilidad electroforética efectiva  $\mu_p$  de cada analito separado es proporcional al cociente  $eZ/f$ . Los valores del numerador y el denominador en este cociente son difíciles de separar a menos que se lleven a cabo experimentos complementarios aparte de la CZE. Una buena alternativa para esta situación es introducir desarrollos teóricos adicionales para modelar estos términos como se describió en los

Capítulos 4 y 5 de esta Tesis y en Piaggio *et al.*, (2005a, 2006a y 2007b). En esta última dirección, es claro que al menos son necesarios el radio hidrodinámico equivalente  $a_H^e$ , también designado radio de Stokes (ver, por ejemplo, Castagnola *et al.*, 1997) y la forma de la partícula que migra para definir adecuadamente el coeficiente de fricción, cuando se invocan las hipótesis del continuo. En estos términos se pueden usar las formas de las partículas como esferoides del tipo prolato u oblato para evitar perder información estructural, como por ejemplo, la hidratación (Piaggio *et al.*, 2006a y 2007b). Esta propuesta se explora más abajo, y se desarrollan y discuten los conceptos teóricos del problema de regulación de cargas asociado con formas esféricas y esferoides.

Por consiguiente, en este capítulo se aplican los modelos fisicoquímicos de la CZE propuestos previamente en esta Tesis (ver Capítulo 4 y 5 y además Piaggio *et al.*, 2005a, 2006a y 2007b), donde ahora, en adición, las concentraciones se corrigen con los coeficientes de actividad termodinámicos de cada grupo ionizante debido al efecto de la fuerza iónica del BGE, para estimar así cada término del cociente  $eZ/f$ , cuando se dispone de los valores experimentales de las movilidades electroforéticas efectivas para un protocolo particular de la CZE, a diferentes valores de pH. Estos datos se obtienen a partir de programas experimentales rigurosos recientemente publicados en la literatura (Coufal *et al.*, 2003; Včeláková *et al.*, 2004) donde se incluyen los protocolos y los datos experimentales se reportan a través de correlaciones apropiadas. El análisis y la evaluación del fenómeno de regulación de carga, también designado cooperatividad en la unión del protón (Menon y Zydney, 2000; Gitlin *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2003; Allison *et al.*, 2004; Piaggio *et al.*, 2005a y 2006a) se incluye y modela con detalles. Es también claro que este fenómeno describe el pH del microambiente que rodea a un analito indicando que el pH cercano a la molécula, designado  $pH^*$ , es diferente de aquel del seno de la solución que se obtiene a partir de la formulación del BGE. En adición, esta diferencia en el pH está directamente asociada con la magnitud del *pK-shift*.

Considerando los aspectos prácticos de los modelos mencionados arriba, un procedimiento conveniente para analizar las movilidades experimentales de los aminoácidos que se obtienen a partir de la CZE es resolver el problema matemático asociado con las ecuaciones básicas propuestas en los Capítulos 4 y 5 de esta Tesis y en Piaggio *et al.* (2005a, 2006a y 2007b), teniendo como dato experimental solamente el valor de la movilidad electroforética efectiva de cada aminoácido bajo estudio con el

correspondiente protocolo. Por simplicidad, aquí estos modelos una vez más se designan LLCCEM y PLLCEM. Por consiguiente, el propósito de este capítulo es precisamente usar los modelos de la CZE propuestos en esta Tesis para analizar las movilidades electroforéticas de aminoácidos. En este contexto de la CZE, parte de los resultados consisten en calcular los tamaños hidrodinámicos y las formas de los aminoácidos a cada pH estudiado asociando el volumen del analito (se incluye la hidratación) con el volumen hidrodinámico equivalente a una partícula esférica. Se establece la relación entre la carga neta, el tamaño y la forma de los aminoácidos.

El presente capítulo está organizado como sigue. En la Sección 7.2 se discuten conceptos relevantes como los  $pK$  de referencia y la hidratación de los analitos para ser usados luego apropiadamente en el desarrollo del marco teórico. En la Sección 7.3 se presentan el LLCCEM y el PLLCEM para partículas esféricas que involucran analitos como aminoácidos, péptidos y proteínas, incluyendo ahora correcciones de las constantes de disociación a través de los coeficientes de actividad formulados para soluciones electrolíticas no-ideales. Estos modelos se resuelven numéricamente considerando los casos-estudio de 20 aminoácidos. En adición, en la Sección 7.3, el LLCCEM y el PLLCEM se reconsideran para incluir consistentemente el número de hidratación estimado a partir de procedimientos disponibles en la literatura. En efecto, se usan valores aproximados de los números de hidratación de los grupos residuales de los aminoácidos que son provistos, por ejemplo, en Kuntz (1971a) y en Hopfinger (1977). Los números de hidratación reportados en Kuntz (1971a) fueron obtenidos a partir de experimentos de resonancia magnética nuclear de polipéptidos (Kuntz, 1971b); mientras que los sugeridos en Hopfinger (1977) fueron determinados a partir de cálculos numéricos. A pesar de que estos grupos de valores de números de hidratación no son idénticos, son bastante similares y permiten la predicción de la hidratación de proteínas en buena concordancia con los experimentos (Durchschlag y Zipper, 2002). Asimismo, el énfasis se basa en la estrategia matemática para resolver los problemas resultantes bien establecidos asociados con ambos modelos (LLCEM y PLLCEM), identificando el número de hidratación estimado a un pH particular y la forma de partícula asociada en un procedimiento computacional consistente y convergente. Por consiguiente, en la Sección 7.4 se describen brevemente los pasos básicos adicionales del algoritmo numérico de estos modelos, incluyendo el criterio de convergencia establecido dentro el proceso iterativo. La Sección 7.5 presenta los trabajos publicados a partir de los cuales se extrajeron los datos de las movilidades electroforéticas experimentales de los

aminoácidos para aplicar los algoritmos de los modelos propuestos aquí. La Sección 7.6 analiza y discute los resultados numéricos correspondientes a los aminoácidos que representan cada grupo, clasificados de acuerdo a las características de la cadena lateral: ionizante y polar (aminoácidos ácidos y básicos), polar y no polar. Así, se encuentra numéricamente, por ejemplo, un aumento importante en la hidratación de los aminoácidos, para valores de  $\text{pH}^*$  que se aproximan al punto isoeléctrico  $\text{pI}$  de los mismos, (ver también Durchschlag y Zipper, 2004); con la caída esperada de los valores de carga neta y el aumento de la carga total, consecuentemente con el aumento en el tamaño debido a las moléculas de agua inmovilizadas, como se explica más abajo. Finalmente, en la Sección 7.7 se establecen las principales conclusiones concernientes al análisis de la CZE de aminoácidos, en el rango de  $\text{pH}$  bajo, a través del PLLCEM y el LLCCEM; y también se señalan las limitaciones asociadas con estos modelos. Estas consideraciones indican requerimientos desafiantes para investigaciones futuras sobre este tema.

## **7.2 Conceptos relevantes asociados con el pH-microambiente en el entorno de los analitos cargados**

Para la interpretación y el modelado la movilidad electroforética de analitos como aminoácidos, péptidos y proteínas, es apropiado analizar brevemente algunos resultados previos mencionados en capítulos anteriores (ver Capítulos 4 y 5 y también Piaggio *et al.*, 2005a y 2006a) para identificar aspectos conceptuales que aún necesitan elucidación posterior, como por ejemplo las definiciones de los diferentes  $\text{pK}$  de los grupos ionizantes y la hidratación que contribuye al volumen hidrodinámico efectivo. En este sentido, es también de interés visualizar otras propuestas que parcialmente triunfaron en sus predicciones de las movilidades electroforéticas debido probablemente a la exclusión de la hidratación de los analitos, que contribuye al tamaño efectivo de la molécula que migra. En efecto, como se mencionó en el Capítulo 5 se debe observar que varias investigaciones previas se basaron principalmente en los trabajos de Offord (1966) y Grossman *et al.*, (1989), los cuales usaron la masa molar y el número de monómeros para definir el tamaño de los analitos, respectivamente. Por ejemplo, una propuesta frecuente usada en estos trabajos para analizar este problema fue considerar que el coeficiente de fricción es proporcional a la masa molar del analito  $M$  elevado a una potencia fraccional. En este sentido, muchos modelos propuestos en la literatura sugirieron una proporcionalidad entre

la movilidad electroforética y  $eZ/M^m$  con  $m \leq 1$  (ver, por ejemplo, Offord, 1966; Rickard *et al.*, 1991; Compton y O'Grady, 1991; Basak y Ladish, 1995; Janini *et al.*, 1999) principalmente en estudios que consideraron diferentes péptidos (ver también, Cifuentes y Poppe, 1997; Adamson y Reynolds, 1997; Kašička, 1999; Šolínová *et al.*, 2004; Kašička, 2006 para revisiones importantes concernientes a la separación de péptidos vía CZE). Así se concluye que la descripción de varios fenómenos, como por ejemplo, los  $pK$ -shifts y las hidrataciones, se requieren en el modelado de la CZE de analitos en general. Además, es relevante señalar que estos fenómenos no se incluyeron previamente con relación a la interpretación de la movilidad electroforética de los aminoácidos libres como partículas individuales. Por consiguiente, el objetivo de este capítulo es precisamente investigar estas moléculas específicas a través de la CZE en el rango de pH bajo. Para este propósito, aquí los subíndices  $i=1, 2, 3$  se usan para indicar los grupos  $\alpha$ -carboxilo,  $\alpha$ -amino y los grupos ionizantes de la cadena lateral de los aminoácidos, respectivamente. Más generalmente, cuando se refiere a péptidos y proteínas  $i=1, \dots, N_c$ , donde  $N_c$  es el número total de grupos ionizantes en estos analitos. Luego, es claro que aquí, la palabra analito se refiere indistintamente a aminoácidos, péptidos y proteínas, no obstante que los primeros son el tema principal bajo consideración en el presente capítulo.

Otra consideración relevante en la CZE es la carga neta del analito como se discutió en la Sección 2.4 del Capítulo 2 y en el Capítulo 4. Una estimación de la carga neta se obtiene frecuentemente a partir de valores promedios de las constantes de disociación de los grupos ionizantes que se suponen como los valores actuales en el analito cargado (ver Apéndice 5-A en el Capítulo 5 y Rickard *et al.*, 1991) o como alternativa, el uso de la carga neta de titulación  $eZ^t$ , calculada con las constantes de disociación de titulación  $pK_i^t$  de los grupos ionizantes de la cadena lateral y grupos terminales que participan en la configuración química de la molécula (Grossman *et al.*, 1989a). Sin embargo, para visualizar el fenómeno de regulación de cargas, es relevante establecer las diferencias entre el número de carga de titulación  $Z^t$  y el número de carga actual  $Z$  de una analito (ver Compton y O'Grady, 1991; Cifuentes y Poppe, 1997; Mosher *et al.*, 1993; Cifuentes y Poppe, 1994 para una discusión sobre este aspecto, donde se presentan otras referencias apropiadas). El hecho es que se requiere la variación  $\Delta pK_i = pK_i^f - pK_i$  de cada grupo ionizante  $i$ , la cual se evalúa como una diferencia entre el  $pK$  de los grupos ionizantes en

una estado de referencia ( $pK_i^r$ ) y en el analito bajo estudio ( $pK_i$ ), respectivamente (ver también, Sección 7.4). Asimismo se encuentra que este fenómeno, el cual está asociado principalmente con el estado electrostático del analito cargado, tiene influencia en el valor de su coeficiente hidrodinámico de fricción (cambios en las interacciones electrostáticas modifican el tamaño hidrodinámico y la forma de los analitos) principalmente para analitos como péptidos y proteínas (ver Capítulos 4 y 5 y Piaggio *et al.*, 2005a y 2006a). Siguiendo estos conceptos, es relevante expresar brevemente el significado de los diferentes valores de  $pK$  que se usan en los modelos teóricos que estudian las movibilidades electroforéticas de analitos en general, y aquí, en particular de aminoácidos. Así, se define el  $pK_i^t$  de titulación, el de referencia (o intrínseco)  $pK_i^r$  y el actual (o efectivo)  $pK_i$ , para diferenciar su uso en distintos tipos de modelos que predicen la carga neta de analitos. Consecuentemente, siguiendo principalmente el trabajo de Schaefer *et al.* (1997) (ver también, Antosiewicz *et al.*, 1994 y 1996; Nozaki y Tanford, 1967) el  $pK_i^r$  de un grupo ionizante en un analito particular se refiere al valor hipotético de  $pK$  de este grupo suponiendo que todos los otros sitios titulables en el analito están fijos en su estado eléctricamente neutro. En particular un analito con un único grupo ionizante tiene el  $pK_i$  actual igual al  $pK_i^r$ . El  $pK_i^t$  de titulación es, sin embargo, aquel valor usualmente reportado en la literatura para un rango de pH que comprende su valor. En estos términos, aquí el  $pK_i^t$  se refiere a un valor de  $pK$  fijo que se obtiene a partir del ajuste de una curva que involucra medidas experimentales apropiadas que dependen de los grupos ionizantes correspondientes en función del pH. El  $pK_i^t$  resultante no depende del pH, es decir, aplica dentro de todo el rango de pH. Al presente, el  $pK_i^t$  es el  $pK$  más frecuentemente reportado en la literatura para los grupos ionizantes de los aminoácidos. Finalmente el  $pK_i$  actual o efectivo es el valor correspondiente a un grupo ionizante  $i$  cuando se consideran las interacciones electrostáticas con otros grupos ionizantes del analito como así también con los iones del BGE, incluyendo también los efectos de solvatación. Estos valores de  $pK$  se necesitan para aplicaciones biológicas más detalladas como la actividad catalítica enzimática, la estabilidad de proteínas, la unión de proteínas-ligando, etc., y sus evaluaciones están bajo investigación al presente. En este sentido, se necesita conocer el  $\Delta pK_i = pK_i^r - pK_i$ , el cual se calcula a través de las diferencias de pH entre los valores en

el microambiente del grupo ionizante  $i$  y aquel del seno del BGE. Esta diferencia es causada por el fenómeno de regulación de cargas como se cuantifica más abajo en la Sección 7.3.

A pesar de que es claro que el problema de regulación de cargas se debe formular usando un estado de referencia asociado con la configuración del analito (estructura química primaria), en las condiciones fisicoquímicas explicadas arriba, una vez más, un aspecto adicional aún requiere análisis. Esto concierne al conjunto de valores  $\{pK_i^f\}$  que se asignan a los grupos ionizantes de referencia. Para los residuos de aminoácidos en las proteínas globulares se encontró apropiado usar valores cercanos a los  $pK_i^f$  de los grupos ionizantes de las cadenas laterales. Por otro lado, se usaron valores promedios reportados en la literatura para los grupos carboxilo y amino terminal (Antosiewicz *et al.*, 1994 y 1996). En aquellos casos particulares el efecto sobre los resultados numéricos de alguna incertidumbre asociada con los valores de los  $pK_i^f$  de los grupos ionizantes terminales fue pequeño, teniendo en cuenta que las proteínas estudiadas tenían un número relativamente alto de residuos de aminoácidos. Sin embargo, el efecto sobre los cálculos concerniente a esta incertidumbre fue más importante para los 102 péptidos estudiados en el Capítulo 5 a pH relativamente bajo, principalmente observado para los péptidos pequeños (ver también Piaggio *et al.*, 2006a). En adición, es claro que la variación de los resultados numéricos de acuerdo a los valores que se asignan a los  $pK_i^f$  terminales se minimizó sustancialmente para analitos con número de residuos de aminoácidos alto. Para el caso particular de la CZE de los aminoácidos libres realizada a pH relativamente bajo, es claro que los grupos  $\alpha$ -carboxilo en general y los grupos ionizantes de la cadena lateral del Asp o Glu son significativamente afectados por el fenómeno de regulación de cargas inducido por cargas positivas de los grupos básicos totalmente ionizados. Se debe observar que para las movilidades electroforéticas experimentales usadas en este trabajo en el rango de  $1.99 \leq \text{pH} \leq 3.2$  (Včeláková *et al.*, 2004) los aminoácidos tienen una carga neta positiva en las corridas de la CZE. Por consiguiente, en el rango de pH bajo, el efecto del  $\Delta pK_i$  sobre los cálculos de la carga neta de aminoácidos pertenecientes al  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> en general y los grupos ionizantes de las cadenas laterales de Lys, Arg e His no son relevantes (a pH bajo  $Z_i \approx 1$  para estos grupos). Consecuentemente en la Sección 7.6, se analiza y discute el

efecto del  $pK_1^r$  de referencia de los grupos  $\alpha$ -carboxilos sobre la carga neta de los aminoácidos en el rango de pH bajo, en estudio.

En esta dirección es relevante indicar que a pesar de que el valor  $pK_1^r \approx 3.8$  para proteínas y péptidos grandes, es una buena aproximación en los cálculos prácticos (Antosiewicz *et al.*, 1994 y 1996), para péptidos pequeños el valor esperado de  $pK_1^r$  podría variar dentro de un rango notable como se discutió y demostró numéricamente en trabajos previos (ver, Kašička y Prusik, 1991; Rauen, 1964) y en la Figura 5.5 del Capítulo 5 de esta Tesis que considera los valores de hidratación que toman estos analitos. Consecuentemente, de acuerdo a los datos de las movilidades electroforéticas experimentales y los valores numéricos de los números de hidratación de aminoácidos, se mostrará el efecto de la variación del  $pK_1^r$  entre 3.2 y 3.8 en la Sección 7.5. Una discusión similar concerniente al fenómeno de regulación de cargas asociado con Lys, Arg, His y el grupo  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> para el rango de pH alto se puede extender fácilmente a partir del análisis arriba mencionado. Es también claro que para esta situación se requeriría una buena estimación de  $pK_2^r$  (para péptidos y proteínas  $pK_2^r \approx 7.5$ ; ver Antosiewicz *et al.*, 1994 y 1996). Así a pH relativamente alto el fenómeno de regulación de cargas está controlado principalmente por el  $\Delta pK_i$  de los grupos básicos ionizantes de los analitos.

Para finalizar con la descripción de los aspectos conceptuales, asociados con el fenómeno de regulación de cargas de analitos, como aminoácidos, péptidos y proteínas, se debe considerar una variable adicional de las partículas que migran electroforéticamente. Esta variable es la hidratación  $\delta$ , o equivalentemente el número de hidratación  $H$ , ambos definidos arriba, los cuales están relacionados uno con otro a través de  $H = M\delta/18$ . El principal asunto con cualquiera de estos parámetros es que la cuantificación del coeficiente de fricción hidrodinámico del analito incluyendo los efectos de hidratación es extremadamente relevante para estimar la carga efectiva de analitos a través de la CZE (Piaggio *et al.*, 2006a; Cross y Garnham, 2001; Cross y Wong, 2001, 2002a y b, 2003a y b). Se observa que no considerar la hidratación del analito en la ecuación de Offord es una de las razones que explican las diferencias frecuentemente encontradas en la literatura entre las predicciones numéricas y el valor experimental correspondiente de la movilidad electroforética del analito. En efecto, el uso de la masa molar  $M$  del analito para modelar el coeficiente de fricción, como una primera aproximación, no está teniendo en cuenta el

volumen hidrodinámico asociado con el agua unida. Se debe observar aquí que este aspecto fue señalado y descrito en algunas referencias indicadas más arriba.

### 7.3 Estimación de la carga neta, el radio hidrodinámico y la forma de aminoácidos a través las movilidades efectivas experimentales

La evaluación de la carga neta de un analito (aminoácidos, péptidos y proteínas) requiere el conocimiento de los valores actuales de los  $pK_i$  de los grupos ionizantes (en general de las cadenas laterales y grupos terminales  $-\text{COOH}$  y  $-\text{NH}_2$ ). Esta dificultad conduce a la necesidad de usar bastante frecuentemente los valores de titulación  $pK_i^t$ , en lugar de los  $pK_i$  actuales, en la mayoría de los cálculos prácticos. Como ya se explicó arriba, los valores de  $pK_i$  son principalmente el resultado de las interacciones electrostáticas entre grupos ionizantes del analito e iones en el BGE, conduciendo a una variación en los  $pK_i^t$  de referencia, designada  $\Delta pK_i$ . Esta diferencia particular es una consecuencia del pH del microambiente en el entorno del grupo ionizante  $i$  en el analito, aquí designado  $\text{pH}_i$  y expresado, como una primera aproximación (ver Capítulo 4 y Piaggio *et al.*, 2005a),

$$\text{pH}_i = \text{pH}^* + \frac{e^2}{\ln(10)k_B T} \left( \frac{\Delta Z_i}{4\pi r_i^0 \varepsilon} \left( \frac{\varepsilon}{\varepsilon'} - 1 \right) + \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{N_c} \frac{\Delta Z_j \exp(-\kappa' r_{ij})}{4\pi \varepsilon' r_{ij}} \right) \quad (7.3.1)$$

donde para los objetivos de este modelo se requiere  $\Delta Z_j = Z_j - Z_j^t$ , siendo  $Z_j^t$  el número de carga neta de referencia del sitio  $j$  calculado con  $pK_j^t$ , y  $r_i^0$  es el radio efectivo del grupo ionizante  $i$ . Recordando, también,

$$\text{pH}^* = \text{pH} + \frac{e^2 Z}{\ln(10)k_B T 4\pi \varepsilon a_H^e (1 + \kappa a_H^e)} \quad (7.3.2)$$

donde  $\text{pH}^*$  es el pH cercano a la molécula de analito supuesto como una partícula hidrodinámica, y se evalúa usando la aproximación de campo promedio, la cual se introduce cuando se consideran la forma del analito y el radio hidrodinámico equivalente  $a_H^e$ . Así la partícula del analito se supone que tiene un potencial de superficie provisto por la ecuación de Poisson Boltzmann para un solvente que tiene propiedades de  $\text{pH}$ ,  $I$ ,  $T$ ,

$\varepsilon$  y  $\eta$  especificadas. Como ya se expresó, para generar un problema simple se usan, la solución de Henry (Henry, 1931) para la movilidad electroforética de una partícula esférica y las soluciones de Yoon y Kim (Yoon y Kim, 1989) para la electroforesis de partículas esferoidales, donde se invoca la aproximación de Debye-Hückel (ver también abajo).

Asimismo en la Ec. (7.3.1),  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $\varepsilon'$  es la permitividad eléctrica en el dominio del analito. Debido a que la inversa de la longitud de *screening* es  $\kappa = \sqrt{2e^2 N_A / 10^3 / \varepsilon k_B T}$ , donde  $N_A$  es la constante de Avogadro, se obtiene  $\kappa' = \kappa \sqrt{\varepsilon' / \varepsilon}$ . También  $r_{ij}$  es la distancia genérica entre pares i-j de grupos ionizantes y  $N_c$  es el número de grupos ionizantes en el analito (así,  $N_c = 3$  para aminoácidos con cadenas laterales polares e ionizantes y  $N_c = 2$  para aminoácidos con cadenas laterales polares o no polares). Los datos de las distancias promedio  $r_{ij}$  se pueden estimar a partir del PDB para el caso específico de proteínas globulares. Al presente, esta posibilidad no existe para péptidos, los cuales tienen un número alto de conformaciones sujetas a movimiento browniano localmente importante dentro de la cadena del péptido. El problema de encontrar valores promedios estadísticos de  $r_{ij}$  para analitos cargados como los péptidos, es bastante complejo. En este sentido se propuso en el Capítulo 5 una estimación de  $r_{ij}$  mediante la expresión  $r_{ij} \approx sL \sqrt{|i-j|}$  (ver también Piaggio *et al.*, 2006; Tanford, 1961). Para el caso particular de aminoácidos se puede estimar una distancia promedio  $r_{12}$  entre los grupos ionizantes  $\alpha$ -amino y  $\alpha$ -carboxilo a partir de la información estructural básica disponible en la literatura (alrededor de 2.45 Å). También, las distancias promedios de la cadena lateral ionizante a estos grupos ionizantes  $\alpha$ -, en un aminoácido particular, se puede estimar aproximadamente usando el radio de giración promedio de la cadena lateral del aminoácido reportado en Levitt (1976).

Para obtener el número de carga neta de un grupo ionizante i, se aplica la siguiente ecuación,

$$Z_i = \pm \frac{1}{1 + 10^{\mp(pK_i^f - pH_i \pm p\gamma_i)}} \quad (7.3.3)$$

donde los signos + y - se definen de acuerdo a las propiedades básicas o ácidas de los grupos ionizantes, respectivamente. Aquí, en la Ec. (7.3.3), se hacen correcciones a través del coeficiente de actividad  $\gamma_i$  para considerar las pequeñas desviaciones del

comportamiento termodinámico ideal de las soluciones electrolíticas (ver también Včeláková *et al.*, 2004 y Survej *et al.*, 1996, para una discusión concerniente a este aspecto). Así, el factor  $p\gamma_i = -\log\gamma_i$  se define con una ecuación matemática similar a la que se usa para la introducción clásica del pH y el pK, como sigue,

$$p\gamma_i \cong \frac{0.508 Z_i^2 \sqrt{I}}{1 + \theta \sqrt{I}} \quad (7.3.4)$$

donde el parámetro  $\theta$  depende de la distancia media de máxima aproximación de los iones involucrados (ver, por ejemplo Li *et al.*, 1999; Koval *et al.*, 2005). Esta ecuación considera cada grupo ionizante como un ácido o base débil dentro del ambiente del BGE, donde la expresión de Debye-Hückel es adecuada para el cálculo de los coeficientes de actividad (Tanford, 1961). Es claro que la Ec. (7.3.4) establece una complejidad numérica adicional dentro de los modelos, anteriormente presentados en la Tesis, porque los valores de  $Z_i$  no se conocen *a priori* como consecuencia del fenómeno de regulación de cargas. Se encuentra numéricamente que los efectos no ideales son bastante pequeños para los sistemas estudiados en este capítulo, donde la fuerza iónica es relativamente baja para todas las corridas electroforéticas consideradas. Así, debido a la  $I$  baja, el efecto del parámetro  $\theta$  sobre los resultados numéricos que se obtiene aquí es despreciable cuando  $0.5 < \theta < 1.5$ , correspondiente a las distancias media de máxima aproximación de iones entre 2 a 5 Å aproximadamente. Consecuentemente, a partir de las Ecs. (7.3.1) y (7.3.4) la carga neta del analito, que resulta de la Ec. (7.3.3) y del proceso numérico iterativo que involucra ecuaciones adicionales que se describen abajo, se calcula a través de,

$$eZ = \sum_{i=1}^{N_c} eZ_i \quad (7.3.5)$$

Es interesante recordar que la Ec. (7.3.1) está asociada con tres cambios de energía libre diferentes descritos con detalles en el Capítulo 4 (ver también Piaggio *et al.*, 2005a y 2006a). Por consiguiente, en este contexto de análisis, para aplicar el PLLCEM y LLCCEM a valores de movilidades efectivas de analitos  $\mu_p$  disponibles en la literatura, las otras ecuaciones relevantes son,

$$\mu_p = \Omega \mu \quad (7.3.6)$$

y,

$$\mu = \frac{eZ}{6\pi\eta a_H^e(1 + \kappa a_H^e)} f(\kappa a_H^e) \quad (7.3.7)$$

donde  $f(\kappa a_H^e)$  es la función de Henry expresada a través de una ecuación de ajuste explícita (Piaggio y Deiber, 2003) y  $\Omega$  (designado aquí factor de forma) debe ser evaluado a través de la teoría apropiada correspondiente a la movilidad electroforética de partículas esferoidales. En efecto, la movilidad efectiva  $\mu_p$  de una partícula no-esférica se puede expresar en términos de la movilidad electroforética  $\mu$  de una partícula esférica equivalente con un volumen equivalente  $4\pi a_H^e{}^3/3$ , donde  $a_H^e$  es el radio esférico equivalente.

Si se usan las soluciones analíticas reportadas en Yoon y Kim (1989), se muestra que (ver Capítulo 5 y Piaggio *et al.*, 2006a),

$$\Omega = \frac{3}{2} C / f(\kappa a_H^e) \quad (7.3.8)$$

donde  $a_H^e = 2aE_x / \ln[(1 + E_x)/(1 - E_x)]$  para esferoide del tipo prolato, y

$a_H^e = aE_x / \text{Cot}^{-1}\left(\frac{\sqrt{1 - E_x^2}}{E_x}\right)$  para esferoide del tipo oblato, ambos con ejes  $a > c$  y

excentricidad  $E_x = \sqrt{1 - (c/a)^2}$  cuando  $\kappa a E_x < 1$  y también  $\frac{aeE}{k_B T} < 1$  (ver Capítulo 5 y

Saville, 1977; Russell *et al.*, 1989). Debido a que los analitos que se consideran aquí son partículas pequeñas, estas restricciones se satisfacen en general, aún para valores altos de campo eléctrico aplicado  $E$  encontrado en las corridas prácticas de la CZE.

El procedimiento del PLLCEM y su versión simplificada el LLCCEM que comprende aquí las Ecs. (7.3.1) a (7.3.8) requiere la introducción del número de hidratación  $H$  del analito que migra, como una propiedad relevante asociada con el coeficiente de fricción y la forma de la partícula. Al presente, la cuantificación precisa de  $H$  es un problema difícil que comprende a las macromoléculas en solución, como se concluye a partir de la revisión de la literatura asociada. Más específicamente, con relación al modelado del coeficiente de difusión y la viscosidad intrínseca correspondiente a las macromoléculas en soluciones, se observa que el uso de los radios de van der Waals de átomos individuales o grupos no es suficiente para considerar el volumen efectivo del analito en los cálculos. En efecto, el volumen actual del analito es mayor que el que se

predice a partir de los radios de van der Waals (ver, por ejemplo, García de la torre *et al.*, 2000 y la literatura allí citada). Esta diferencia puede causar resultados inesperados en algunos modelos de electroforesis y coeficientes de sedimentación, principalmente cuando el radio hidrodinámico de la partícula en movimiento es un parámetro de ingreso en lugar de ser un resultado de la solución del modelo. Es claro que el tamaño de la capa dinámica de hidratación es difícil de estimar principalmente porque depende del tipo de técnica experimental que se usa en su medición, la cual puede diferir del valor que se obtiene bajo condiciones de equilibrio (Fennema, 1977). En general, el modelado y la evaluación experimental del estado de hidratación de aminoácidos, péptidos y proteínas ha sido un tema de importancia en la literatura como se mencionó en la Sección 7.1 y en el Capítulo 5 de esta Tesis.

Es claro a partir de las consideraciones físicas presentadas arriba que el análisis de la movilidad electroforética considerando el número de carga neta de titulación  $Z^t$  y el coeficiente de fricción evaluado a través de la masa molar  $M$  no es suficiente, en principio, para estimar las hidrataciones de los analitos (ver también Capítulo 5 y Piaggio *et al.*, 2006; Cross y Garnham, 2001; Cross y Wong, 2001; 2002a y b y 2003a y b, para una discusión concerniente a este aspecto de la CZE de péptidos), a pesar de que este procedimiento dio correlaciones buenas y resultados relevantes al presente. En esta Tesis se puede expresar que el uso de radio hidrodinámico equivalente  $a_H^e$  en lugar de la masa molar  $M$  para evaluar el coeficiente de fricción del analito es una alternativa que puede ayudar a interpretar el fenómeno de hidratación al nivel de información posible de lograr a partir de experimentos de la CZE. Se mostró antes que este aspecto es relevante también para el procedimiento del PLLCEM y el LLCCEM propuestos en la sección previa, y como se describe en el párrafo siguiente.

Para los fines de esta Tesis, la hidratación del analito  $\delta$  (o el número de hidratación  $H$ ) se usa aquí para referirse al número de moléculas de agua que en promedio migran con el analito sin distinción con relación a la naturaleza del tipo de enlace (ver, por ejemplo, Fennema, 1977 para un análisis detallado sobre estos aspectos). Estas consideraciones permiten definir un volumen hidrodinámico del analito  $V_H = 4\pi a_H^e{}^3 / 3$ , el cual se descompone en el volumen compacto del analito  $V_c = Mv_p / N_A = 4\pi a_c{}^3 / 3$  ( $a_c$  es el radio de la esfera compacta equivalente,  $v_p$  es el volumen específico del analito y se reportan en

la Tabla 7.1 para cada aminoácido) y un volumen adicional ( $V_H - V_c$ ) debido a la hidratación indicando que  $a_H^e > a_c$  (ver Capítulo 5 y Tanford, 1961). Este cambio de volumen es por supuesto afectado por el impedimento estérico de las cadenas laterales, la atracción-repulsión electrostática debido a los grupos hidrofílicos cargados, y las interacciones de las zonas hidrofóbicas de la cadena. Por consiguiente, los resultados que surgen de los dos modelos (PLLCM y LLCM) deben satisfacer la condición  $a_H^e > a_c$ . En adición, debido a que la hidratación es el efecto predominante que incrementa  $V_c$  al valor de  $V_H$  (Tanford, 1961), una estimación de  $\delta$  se obtiene a partir del conocimiento numérico de ambos  $a_H^e$  y  $a_c$  a través de  $\delta \approx [(a_H^e / a_c)^3 - 1](v_p / v_w)$  una vez que los modelos se resuelven, donde  $v_w$  es el volumen específico del BGE supuesto alrededor de  $1 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Los resultados previos (ver Capítulo 5 y Piaggio *et al.*, 2006a) mostraron que a pH constante alrededor de 2.5, las hidrataciones de los péptidos correlacionaron con la carga neta en función de la configuración del péptido (tipo y número de residuos de aminoácidos). Además, se encontró que las proteínas globulares y los péptidos relativamente grandes pueden adoptar la forma esférica, como primera aproximación, dando al PLLCM y al LLCM la capacidad de predecir directamente una estimación de la hidratación del analito. De este modo no fue necesario un ajuste para la hidratación en estos modelos. Las dificultades aparecen, sin embargo, para los péptidos pequeños, los cuales requieren diferentes formas para conseguir una hidratación numérica consistente con la física; es decir, se debe evitar la relación no física  $a_H^e < a_c$ . Una posible razón para explicar estos resultados fue que la forma hidrodinámica de estos péptidos pequeños no se podía suponer esférica (ver Capítulo 5). Ahora, se puede anticipar aquí que esta situación es también cierta para los aminoácidos (este aspecto se analiza en la Sección 7.6 con discusiones adicionales). De acuerdo con los resultados previos y con aquellos que se reportan más abajo, se encuentra que la importancia de la forma del analito en la CZE que afecta el coeficiente de fricción, aumenta significativamente en la medida que el analito tiene un tamaño similar a aquellos de los aminoácidos. Estas conclusiones prohíben imponer arbitrariamente una forma del analito, como la forma esférica (ver, por ejemplo, Jouyban y Kenndler, 2006). Así la forma del analito debe ser consistente con la información provista asignando un valor al número de hidratación  $H$ . A pesar de que esta información no está disponible en una forma precisa en la literatura debido a las razones ya

descriptas arriba, se pueden usar los datos aproximados reportados, por ejemplo, en Kuntz (1971a) y en Hopfinger (1977) donde se estima el número de hidratación  $h_i$  de los residuos de los aminoácidos. Por consiguiente, como una primera aproximación para los cálculos que se realizan en este capítulo, las estimaciones del número de hidratación de los aminoácidos (designado aquí  $H^e$ ) se obtienen sumando los números de hidratación de los grupos ionizantes, polares y no polares como sigue,

$$H^e \approx h_1|Z_1| + h_2|Z_2| + h_3|Z_3| + h_1^p(1-|Z_1|) + h_2^p(1-|Z_2|) + h_3^p(1-|Z_3|) + h_3^{np} \quad (7.3.9)$$

donde  $h_1$  y  $h_2$ , pertenecientes a los grupos polares e ionizantes  $\alpha - \text{COOH}$  y  $\alpha - \text{NH}_2$  se aproximan a los valores de 6 y 4.5, respectivamente. También los números de hidratación de los grupos terminales polares  $h_1^p$  y  $h_2^p$  se toman alrededor de 2, mientras que  $h_3$ ,  $h_3^p$  y  $h_3^{np}$  son los números de hidratación de los grupos ionizantes y polares, polares y no polares, respectivamente. Para la mayoría de los cálculos realizados aquí se usan los valores reportados en Kuntz (1971a):  $h_{\text{Asp}} = 6$ ,  $h_{\text{Glu}} = 7.5$ ,  $h_{\text{Lys}} = 4.5$ ,  $h_{\text{Arg}} = 3$ ,  $h_{\text{His}} = 4$ ,  $h_{\text{Gly}}^p = 1$ ,  $h_{\text{Ser}}^p = 2$ ,  $h_{\text{Thr}}^p = 2$ ,  $h_{\text{Cys}}^p = 1$ ,  $h_{\text{Tyr}}^p = 3$ ,  $h_{\text{Asn}}^p = 2$ ,  $h_{\text{Gln}}^p = 2$ ,  $h_{\text{Ala}}^{np} = 1.5$ ,  $h_{\text{Val}}^{np} = 1$ ,  $h_{\text{Leu}}^{np} = 1$ ,  $h_{\text{Ile}}^{np} = 1$ ,  $h_{\text{Pro}}^{np} = 3$ ,  $h_{\text{Phe}}^{np} = 0$ ,  $h_{\text{Trp}}^{np} = 2$ ,  $h_{\text{Met}}^{np} = 1$ . En adición, en la Sección 7.6, se comparan las predicciones numéricas de  $H$  con el LLCCEM usando los números de hidratación provistos en Kuntz (1971) y en Hopfinger (1977) a pH 1.99. Para este propósito los números de hidratación de los residuos de aminoácidos reportados en Hopfinger (1977) son:  $h_{\text{Asp}} = 6.5$ ,  $h_{\text{Glu}} = 6.2$ ,  $h_{\text{Lys}} = 5.3$ ,  $h_{\text{Arg}} = 2.3$ ,  $h_{\text{His}} = 2.8$ ,  $h_{\text{Gly}}^p = 1.1$ ,  $h_{\text{Ser}}^p = 1.7$ ,  $h_{\text{Thr}}^p = 1.5$ ,  $h_{\text{Cys}}^p = 0.1$ ,  $h_{\text{Tyr}}^p = 2.1$ ,  $h_{\text{Asn}}^p = 2.2$ ,  $h_{\text{Gln}}^p = 2.1$ ,  $h_{\text{Ala}}^{np} = 1$ ,  $h_{\text{Val}}^{np} = 0.9$ ,  $h_{\text{Leu}}^{np} = 0.8$ ,  $h_{\text{Ile}}^{np} = 0.8$ ,  $h_{\text{Pro}}^{np} = 0.9$ ,  $h_{\text{Phe}}^{np} = 1.4$ ,  $h_{\text{Trp}}^{np} = 1.9$ ,  $h_{\text{Met}}^{np} = 0.7$ .

La expresión para  $H^e$  es relevante para los modelos que se estudian aquí en el sentido que para analitos pequeños, la forma hidrodinámica y el tamaño de los mismos, son una consecuencia directa de valor teórico o experimental estimado de la hidratación del analito. Es interesante señalar que dependiendo del valor de  $H^e$  se obtienen formas esferoidales más pronunciadas ( $\Omega$  bastante diferente de uno) a medida que el pH se mueve hacia el valor del punto isoeléctrico, como se describe más abajo.

Antes de terminar esta sección es claro que el procedimiento del PLLCEM y el LLCCEM para analitos pequeños debe ser consistente con el valor del número de hidratación estimado a través de la Ec. (7.3.9) como se describe en la siguiente sección, donde se presentan detalles adicionales con relación al algoritmo numérico y al criterio de convergencia. Es también claro a partir de los capítulos anteriores 4 y 5 de esta Tesis y los trabajos publicados (Piaggio *et al.*, 2005a y 2006a) que las Ecs. (7.3.1) a (7.3.8) representan aquí el PLLCEM para analitos con formas esferoidales (incluyendo también la partícula esférica para  $\Omega=1$ ) en una versión mejorada donde ahora se considera la respuesta no-ideal de soluciones electrolíticas.

#### 7.4 Cálculos numéricos

Los algoritmos numéricos del PLLCEM y el LLCCEM para obtener la carga neta y la forma y el tamaño hidrodinámico para un analito particular a partir de su movilidad electroforética a un protocolo bien definido ha sido explicado con detalles en los Capítulos 4 y 5 y reportado en la literatura (Piaggio *et al.*, 2005a y 2006a). Para los objetivos del presente capítulo, estos algoritmos numéricos incluyen dos *loops* de iteraciones adicionales: (a) un *loop* de iteración interior (aparte de aquel concerniente a la evaluación del radio hidrodinámico equivalente) que permite la convergencia de  $Z_i$  a través de la Ec. (7.3.4), el cual involucra la evaluación de los coeficientes de actividad de los grupos ionizantes; (b) un *loop* de iteración externo para obtener  $\Omega$  dentro de los valores permitidos (desde 0.5 a 1.5; ver Ec. (7.3.8) y Yoon y Kim, 1989) donde la forma hidrodinámica del analito es compatible con el número de hidratación  $H^e$  estimado con la Ec. (7.3.9). De este modo, resolviendo cualquiera de los dos modelos para un dato experimental  $\mu_p$ , se encuentra  $a_H^e$  y  $Z$  para un valor inicial de  $\Omega=1$ . Luego los procesos de iteración interno y externo, descritos arriba, continúan hasta que un valor de  $\Omega$  es bien definido porque, primero el  $Z_i$  calculado toma valores estables después de un número determinado de iteraciones, y segundo, el número de hidratación  $H = M\delta/18$  calculado con el modelo converge al valor del número de hidratación  $H^e$  a través del siguiente criterio de convergencia,

$$\left| \frac{Z_i(k+1) - Z_i(k)}{Z_i(k)} \right| \leq 10^{-6} \quad , \quad \left| \frac{H(k) - H^e(k)}{H^e(k)} \right| \leq 10^{-3} \quad (7.4.1)$$

donde  $k$  se refiere al número de iteraciones. Esta última condición, aparte de su significado físico, permite eliminar partículas esféricas que satisfacen la movilidad efectiva establecida por la Ec. (7.3.6) dando un número de hidratación arbitrario. Luego, con los valores de  $\Omega$  y  $a_H^e$ , la forma hidrodinámica resultante se fija considerando que la partícula esférica migra con un valor promedio  $\langle C \rangle = \alpha C^{\parallel} + C^{\perp}(1-\alpha)$  (los coeficientes  $C^{\parallel}$  y  $C^{\perp}$  son provistos en Yoon y Kim, 1989), donde  $0 < \alpha < 1$  indica el grado de colinealidad en la orientación de la partícula con la dirección del campo eléctrico aplicado (axialmente a lo largo del tubo) como se describe en el Capítulo 5. Suponiendo que todas las orientaciones de las partículas son igualmente probables se encuentra  $\alpha = 1/3$  (ver, por ejemplo, Happel y Brenner, 1965). Asimismo, se encuentra para analitos pequeños cargados con forma esférica (ver Capítulo 5), que como consecuencia del campo eléctrico aplicado en la corrida de la CZE, se puede considerar que el analito tiene un momento dipolar global, debido a la distancia entre las posiciones de los centros de carga positivo y negativo; los cuales deberían tener así una tendencia a estar alineados con el campo eléctrico aplicado. Estos resultados se verificaron en Piaggio *et al.* (2006a) donde  $\alpha \neq 1/3$  para la mayoría de los péptidos no-esféricos estudiados. Para valores relativamente altos  $\kappa a E_x$  se encuentra que aplica la aproximación de cuerpo delgado, indicando así que la forma del analito es cercana a un cilindro o a un disco. Además, cálculos adicionales concernientes a las dimensiones aproximadas  $a$  y  $c$  del esferoide resultante se pueden realizar como se indica en el Capítulo 5, a pesar de que ellas no se requieren aquí para la discusión de los resultados en la Sección 7.6 porque la partícula hidrodinámica esférica se determina completamente a través de los parámetros  $a_H^e$  y  $\Omega$ .

Finalmente para los fines de los cálculos de este capítulo, las siguientes expresiones son aún válidas (ver Capítulo 4 y Piaggio *et al.*, 2005),  $pK_i^r - pH_i \equiv pK_i - pH$  y  $\Delta pK_i = pK_i^r - pK_i = pH_i - pH = \Delta pH_i$ . Esta última expresión indica que los  $\Delta pK_i$  de los grupos ionizantes de los analitos son una consecuencia directa de las variaciones de  $pH$ , designadas aquí  $\Delta pH_i$ , la cual es la diferencia entre el  $pH$  cercano al grupo ionizante en el analito y el  $pH$  del seno de la solución, es decir, del BGE. En adición, es directo obtener el LLCCEM en su correspondiente forma mejorada considerando  $\Delta Z_j = Z_j - Z_j^r = 0$  en las Ecs. (7.3.1) a (7.3.8) descriptas arriba. Este modelo más simple no distingue posiciones de

los grupos cargados en el analito porque la condición  $\text{pH}_i \approx \text{pH}^*$  se impone en la Ec. (7.3.2). De este modo, a partir de la Ec. (7.3.5), se encuentra que  $\Delta\text{p}K_i = \text{p}K_i^f - \text{p}K_i = \text{pH}^* - \text{pH} = \Delta\text{pH}$  indicando esta relación que se obtienen los mismos  $\Delta\text{p}K_i$  para los grupos ionizantes  $i$  como una primera aproximación, en el contexto de este modelo simple, independientemente de la posición de estos grupos en el analito. Este resultado es una consecuencia de que el  $\text{pH}^*$  es el valor de  $\text{pH}$  del campo promedio para el BGE que rodea al analito como así también en el dominio del analito. Por otro lado, a través del PLLCEM la estimación del  $\text{pH}$  del microambiente de cada grupo ionizante permite obtener las variaciones en sus constantes de disociación, y en consecuencia ellas difieren una de otra, principalmente en péptidos y proteínas (ver Capítulos 4 y 5 y Piaggio *et al.*, 2005a y 2006a). En efecto, el valor del  $\text{pH}_i$  es el  $\text{pH}$  estimado para cada grupo ionizante  $i$  debido a las interacciones electrostáticas descritas por el último término en el lado derecho de la Ec. (7.3.1), el cual es una perturbación del valor del  $\text{pH}^*$ . El aspecto relevante concerniente a los dos modelos considerados en esta Tesis es que  $eZ$  y  $a_{\text{H}}^e$  para una analito particular en un BGE bien definido se estiman midiendo solamente la movilidad efectiva  $\mu_p$  en la CZE. Por consiguiente, no hay necesidad de obtener  $a_{\text{H}}^e$  a partir de una fuente experimental adicional. En efecto, el radio hidrodinámico del analito es una solución directa que surge del uso de estos modelos. En aplicaciones prácticas de estos modelos (ver Capítulo 6 y Piaggio *et al.*, 2007a), algunas veces se prefiere el LLCCEM porque el PLLCEM introduce cierta incertidumbre sobre el conocimiento del valor verdadero de la permitividad eléctrica dentro del dominio del analito (ver también al final de la Sección 7.6), como ya se discutió extensamente en la literatura con relación aún a los modelos más complejos (Antosiewicz *et al.*, 1994 y 1996; Fitch *et al.*, 2002).

### **7.5 Datos experimentales de las movilidades efectivas de aminoácidos y los protocolos usados que se obtienen a partir de la literatura**

Al presente, se encuentran en la literatura correlaciones consistentes que proveen las movilidades efectivas  $\mu_p$  de diferentes aminoácidos en función del  $\text{pH}$  y a una fuerza iónica bien definida (Coufal *et al.*, 2003; Včeláková *et al.*, 2004). Entre las conclusiones relevantes reportadas en estos trabajos, es claro que el cálculo de  $\mu_p$  a partir de estas

correlaciones requiere los valores de titulación  $pK_i^t$  que son constantes en el rango de variación de pH, donde se realizan usualmente los experimentos de la CZE.

Por consiguiente, en esta Sección, se usan los datos experimentales de las movilidades efectivas reportados en Včeláková *et al.* (2004) para el rango de pH ácido, donde los valores numéricos se obtienen a partir de las correlaciones de ajuste disponibles en este trabajo (ver Tablas 7.1 a 7.3).

**Tabla 7.1.** Movilidades efectivas  $\mu_p$  de la CZE de aminoácidos que tienen cadenas laterales polares e ionizantes obtenidas a partir de Včeláková *et al.* (2004) para  $1.99 < \text{pH} < 3.2$  y fuerza iónica nominal  $I=10$  mM. Debajo de la designación de cada aminoácido con el código de tres letras se reportan el volumen específico parcial  $v_p$  ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ ) y el radio compacto  $a_c$  (Å).

$\mu_p \cdot 10^9 \text{ (m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$							
	Arg	Asp	Cys	Glu	His	Lys	Tyr
pH	$v_p=0.756$ $a_c=3.74$	$v_p=0.573$ $a_c=3.12$	$v_p=0.630$ $a_c=3.12$	$v_p=0.605$ $a_c=3.28$	$v_p=0.659$ $a_c=3.44$	$v_p=0.775$ $a_c=3.55$	$v_p=0.703$ $a_c=3.70$
1.99	33.68	15.81	12.80	14.85	32.51	35.42	14.05
2.05	32.93	15.08	11.91	14.04	32.10	34.53	13.36
2.10	32.31	14.45	11.17	13.34	31.75	33.80	12.77
2.20	31.13	13.12	9.74	11.93	31.05	32.43	11.54
2.40	29.03	10.34	7.13	9.11	29.72	30.07	9.07
2.60	27.36	7.59	5.01	6.49	28.55	28.25	6.78
2.80	26.13	5.08	3.40	4.23	27.61	26.93	4.84
3.03	25.17	2.55	2.12	2.07	26.82	25.91	3.14
3.20	24.68	0.88	1.47	0.68	26.41	25.41	2.22

**Tabla 7.2.** Movilidades efectivas  $\mu_p$  de la CZE de aminoácidos que tienen cadenas laterales polares obtenidas a partir de Včeláková *et al.* (2004) para  $1.99 < \text{pH} < 3.2$  y fuerza iónica nominal  $I=10$  mM. Debajo de la designación de cada aminoácido con el código de tres letras se reportan el volumen específico parcial  $v_p$  ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ ) y el radio compacto  $a_c$  (Å).

$\mu_p \cdot 10^9 \text{ (m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$					
	Asn	Gln	Gly	Ser	Thr
pH	$v_p=0.610$ $a_c=3.17$	$v_p=0.667$ $a_c=3.38$	$v_p=0.610$ $a_c=2.63$	$v_p=0.596$ $a_c=2.92$	$v_p=0.676$ $a_c=3.17$
1.99	16.29	15.27	25.24	17.91	16.13
2.05	15.37	14.44	24.16	16.96	15.25
2.10	14.59	13.74	23.23	16.16	14.51
2.20	13.02	12.31	21.28	14.52	13.00
2.40	9.97	9.50	17.17	11.26	10.03
2.60	7.27	6.97	13.15	8.31	7.37
2.80	5.09	4.91	9.59	5.87	5.18
3.03	3.24	3.14	6.34	3.77	3.32
3.20	2.28	2.22	4.55	2.66	2.34

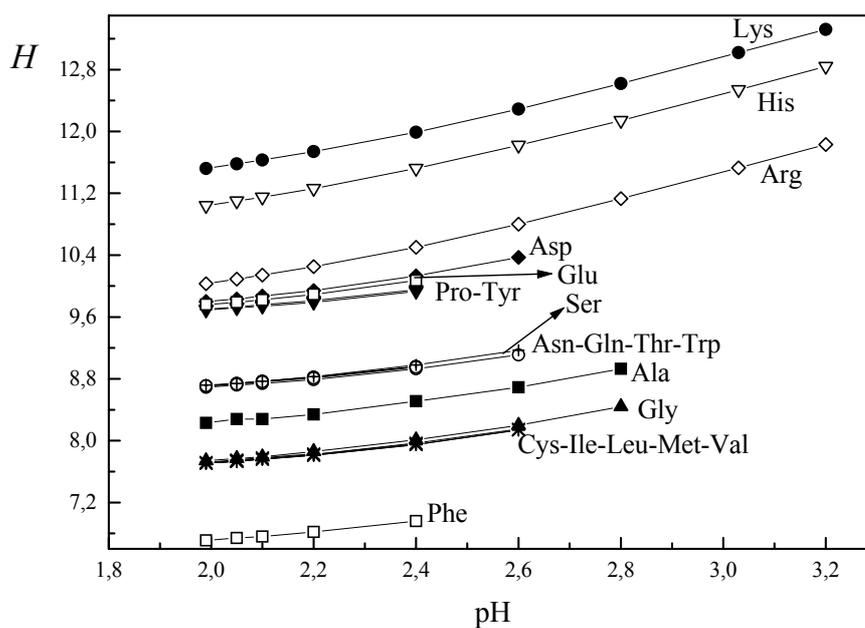
**Tabla 7.3.** Movilidades efectivas  $\mu_p$  de la CZE de aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares obtenidas a partir de Včeláková *et al.* (2004) para  $1.99 < \text{pH} < 3.2$  y fuerza iónica nominal  $I=10$  mM. Debajo de la designación de cada aminoácido con el código de tres letras se reportan el volumen específico parcial  $v_p$  ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ ) y el radio compacto  $a_c$  (Å).

		$\mu_p \cdot 10^9 \text{ (m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$						
	Ala	Ile	Leu	Met	Phe	Pro	Trp	Val
pH	$v_p=0.732$	$v_p=0.876$	$v_p=0.876$	$v_p=0.739$	$v_p=0.766$	$v_p=0.748$	$v_p=0.728$	$v_p=0.831$
	$a_c=2.96$	$a_c=3.57$	$a_c=3.57$	$a_c=3.52$	$a_c=3.69$	$a_c=3.24$	$a_c=3.89$	$a_c=3.38$
1.99	21.67	17.35	16.99	15.23	14.41	14.06	15.21	17.65
2.05	20.76	16.59	16.25	14.42	13.66	13.10	14.57	16.83
2.10	19.97	15.93	15.62	13.74	13.02	12.31	14.00	16.13
2.20	18.32	14.56	14.29	12.34	11.71	10.75	12.83	14.66
2.40	14.82	11.68	11.50	9.57	9.11	7.92	10.35	11.64
2.60	11.38	8.90	8.78	7.06	6.74	5.58	7.93	8.78
2.80	8.32	6.46	6.39	4.99	4.77	3.80	5.78	6.32
3.03	5.51	4.26	4.22	3.21	3.07	2.37	3.82	4.13
3.20	3.96	3.04	3.02	2.27	2.17	1.65	2.74	2.94

## 7.6 Resultados y discusión

Siguiendo las propuestas de la sección previa, se estudian aquí los 20 aminoácidos en el rango ácido  $1.99 \leq \text{pH} \leq 3.2$  para una fuerza iónica nominal  $I=10$  mM, a  $25$  °C (Včeláková *et al.*, 2004). Los resultados que se obtienen con el LLCCEM para este conjunto de datos experimentales cuando el  $\text{pH}=2.10$  se compararon con aquellos que resultan de usar los datos experimentales reportados en Coufal *et al.*, (2003) a  $I=7$  mM. La consistencia física entre estos dos grupos de datos de movilidades efectivas, que se observa a través de los valores numéricos que se obtienen para el radio hidrodinámico y la carga neta de aminoácidos (no reportados aquí), fue remarcable, validando a través de este chequeo cruzado ambos grupos de datos experimentales y también los códigos numéricos del modelo usado.

Varios resultados interesantes se encuentran con relación a los valores numéricos de  $a_H^e$  y  $\Omega$  dentro del rango experimental de  $\text{pH}$ . Así a medida que el  $\text{pH}$  aumenta todos los aminoácidos adquieren valores más altos del número de hidratación  $H = M\delta/18$ , o equivalentemente de hidratación  $\delta$  como se ilustra en la Figura 7.1 para los 20 aminoácidos.

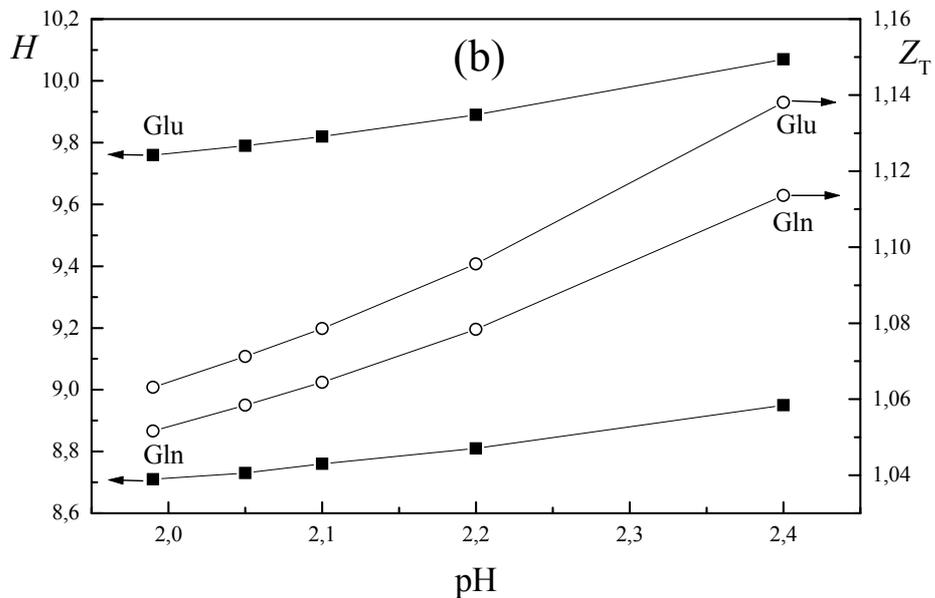
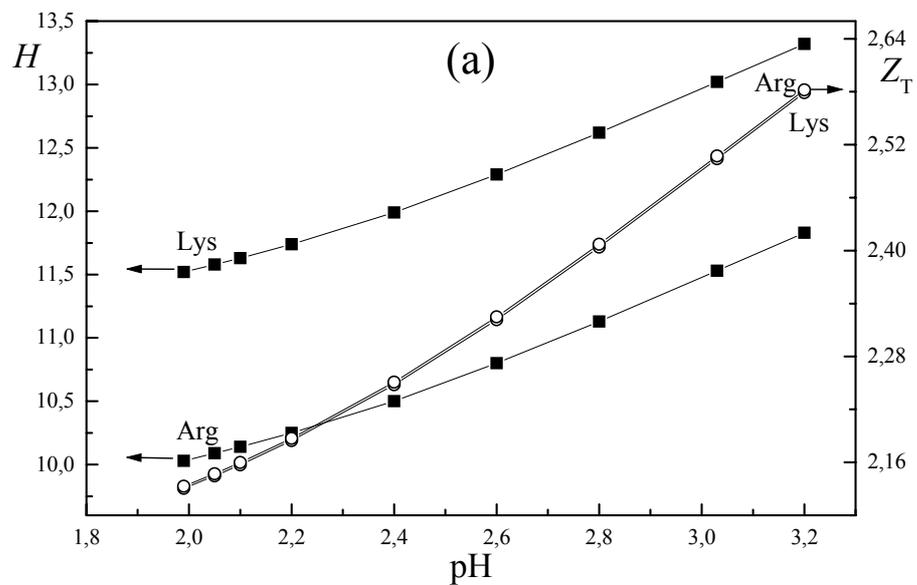


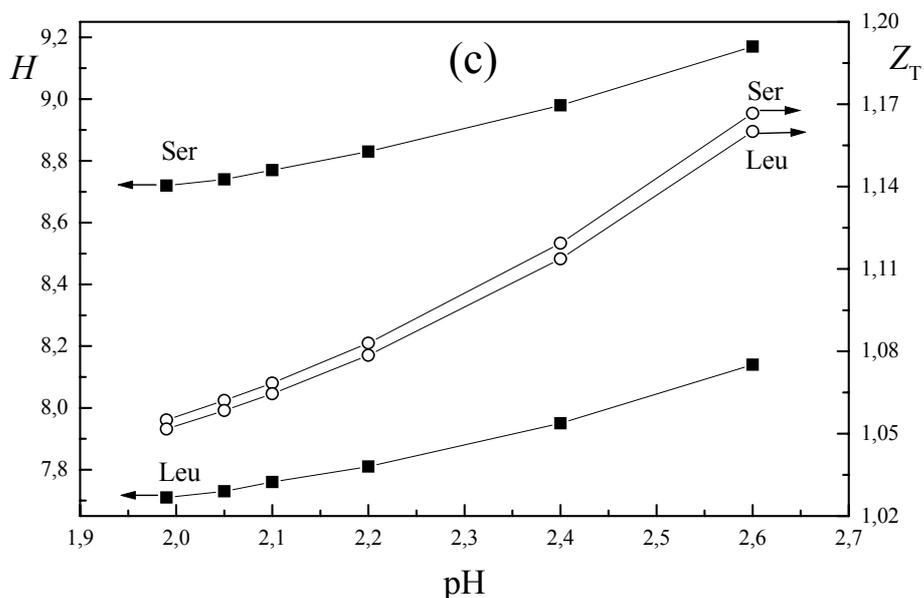
**Figura 7.1.** Valores numéricos del número de hidratación  $H$  para los 20 aminoácidos, a diferentes valores de pH ( $I=10$  mM), calculados con el LLCCEM. (●) Lys, (▽) His, (◇) Arg, (◆) Asp, (◻) Glu, (▼) Pro, Tyr y Ser, (○) Asn, Gln, Thr y Trp, (■) Ala, (▲) Gly, (\*) Cys, Ile, Leu, Met y Val, (□) Phe. Se usan en los cálculos numéricos los números de hidratación de los residuos de aminoácidos reportados en Kuntz (1971a).

Este resultado es una consecuencia del hecho que la carga total  $Z_T = Z_+ + |Z_-|$  de cada aminoácido también aumenta con el pH. Aquí,  $Z_+$  y  $Z_-$  son los números de carga neta positivo y negativo, respectivamente. La Figura 7.2 ilustra la relación entre  $H$  y  $Z_T$  en función del pH, en particular para algunos aminoácidos con cadenas laterales ionizantes y polares (Lys, Arg, Glu), polares (Gln, Ser) y no polares (Leu). El incremento que se observa en el número de hidratación es consistente con el aumento monotonóico del radio hidrodinámico que se observa en la Figura 7.3 para los mismos aminoácidos de la Figura 7.2, el cual considera tanto el analito como las moléculas de agua inmovilizadas que definen la unidad cinemática electroforética.

Por otro lado, se encuentran comportamientos más complejos con relación a la forma de estos analitos como se muestra en la Figura 7.3. En efecto, los valores numéricos de  $\Omega$  pueden aumentar o disminuir a medida que el pH cambia desde valores bajos a valores altos dentro del rango experimental, indicando claramente que la forma del aminoácido no es necesariamente esférica y también que hay un relación compleja entre  $H$  y la forma hidrodinámica evaluada a través de  $\Omega$ , la cual también depende de la

microestructura del aminoácido y de la carga total. En este sentido, se encuentra que Arg, His y Lys requieren  $\Omega > 1$  (ver Tabla 7.4, en la cual se reportan en forma completa los cálculos numéricos realizados con el LLCEM) indicando que la forma esférica no sería compatible con sus movibilidades electroforéticas efectivas y con los números de hidratación estimados.

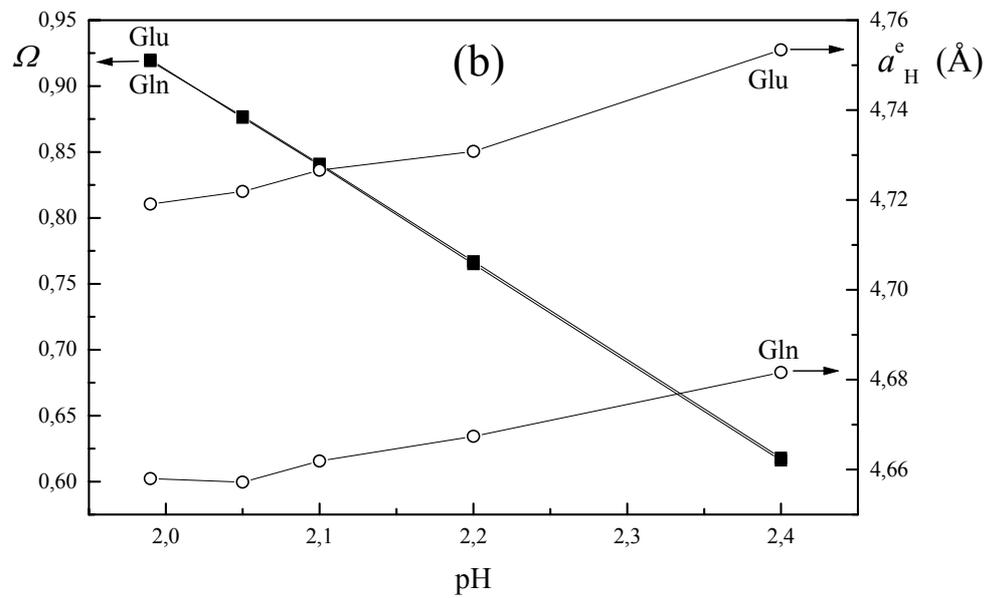
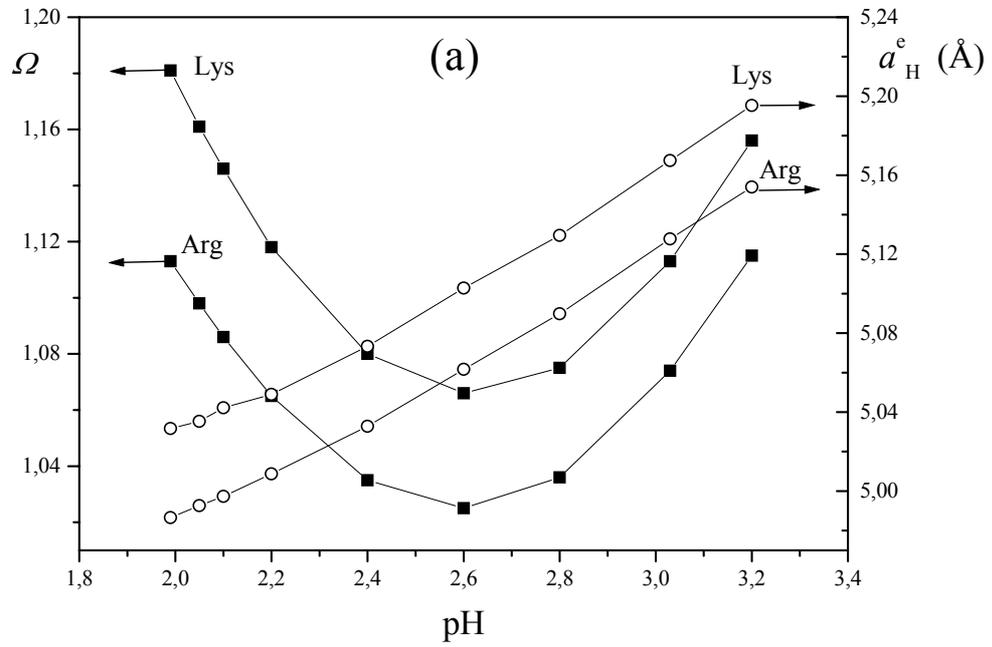


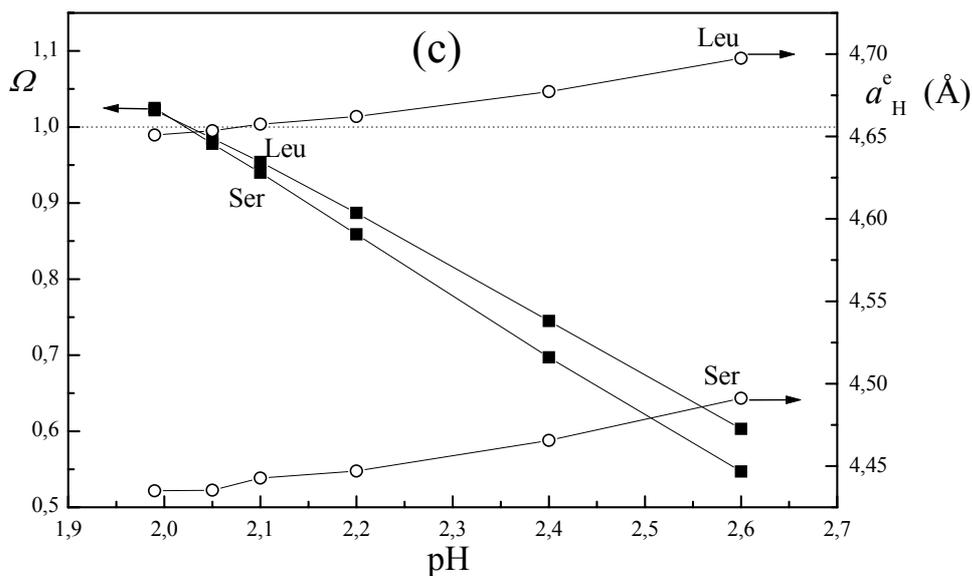


**Figura 7.2.** Número de hidratación  $H$  y carga neta total  $Z_T$  del analito, a diferentes valores de pH ( $I=10$  mM), calculados con el LLCCEM. Los símbolos (■) y (○) se refieren a los valores numéricos que se obtienen para  $H$  y  $Z_T$ , respectivamente. (a) Lys y Arg, (b) Gln y Glu, (c) Leu y Ser. Se usan en los cálculos numéricos los números de hidratación de los residuos de aminoácidos reportados en Kuntz (1971a).

Es también relevante observar que para estos aminoácidos  $\Omega$  toma un valor mínimo (1.025 a pH 2.6; 1.048 a pH 2.4 y 1.066 a pH 2.6, respectivamente) bastante cercano al límite esférico  $\Omega=1$  (ver Figura 7.3 (a) para Lys y Arg). No obstante, dentro del rango de variación del pH, los valores de  $\Omega$  no exceden 1.184, indicando que estos analitos son cercanos a la forma hidrodinámica esférica principalmente a pH alrededor de 2.4 a 2.6. Es posible que el valor mínimo de  $\Omega$  se asocie con efectos estéricos (ver también Liu *et al.*, 2003) entre las capas de hidratación de dos cargas positivas presentes en el pH bajo y la hidratación creciente debido a la carga titulante negativa del  $\alpha$ -COOH, a medida que el pH aumenta. Esta situación es posible solamente para los tres aminoácidos bajo consideración considerando que ellos están relativamente muy cargados a pH 1.99 (casi dos cargas netas positivas). Este aspecto se ilustra en la Figura 7.3, donde se confronta con aquellos resultados que corresponden a los aminoácidos que a pH bajo tienen solamente una carga positiva (como, por ejemplo, Glu, Gln, Ser y Leu presentados

en esta figura) con espacio suficiente para la hidratación posterior de los grupos ionizantes negativos a un pH más alto.





**Figura 7.3.** Factor de forma  $\Omega$  y radio hidrodinámico equivalente  $a_H^e$ , a diferentes valores de pH ( $I=10$  mM), calculados con el LLCCEM. Los símbolos (■) y (○) se refieren a los valores numéricos obtenidos para  $\Omega$  y  $a_H^e$ , respectivamente. (a) Lys y Arg, (b) Gln y Glu, (c) Leu y Ser (la línea de puntos indica la forma esférica). Se usan en los cálculos numéricos los números de hidratación de los residuos de aminoácidos reportados en Kuntz (1971a).

En la Tabla 7.4 también se observa que el  $\text{pH}^*$  es bastante diferente del pH del BGE principalmente en el rango de valores bajo, donde los  $\Delta\text{p}K_i$  más altos se calculan como consecuencia del fenómeno de regulación de cargas (los analitos altamente positivos tienen concentraciones deficientes de protones en su BGE-microambiente). Este fenómeno indica claramente que el  $\text{p}K_1$  actual aumenta con el pH en un rango de valores por encima del  $\text{p}K_1^t$  constante (alrededor de 1.8 a 2.4 para diferentes aminoácidos y distintas fuentes bibliográficas). Se encuentra que esta relación aplica para los 20 aminoácidos que se estudian aquí cuando el  $1.99 \leq \text{pH} \leq 3.2$  y la  $I=10$  mM (ver, por ejemplo, los valores de  $\text{p}K_i$  de Arg, His y Lys en la Tabla 7.4; Asp, Ser y Leu en la Tabla 7.5 y Glu y Gln en la Figura 7.4) y se puede explicar termodinámicamente considerando que los analitos tienen un potencial de superficie positivo en la medida que el  $\text{pH} < \text{p}I$ . Así, la concentración de protones que interviene en las constantes de disociación depende principalmente de la variación del potencial eléctrico positivo, alrededor de estos analitos a través de la distribución de Boltzmann de las concentraciones iónicas, la cual es dependiente del pH. En este sentido, se debe observar que la constante de disociación actual de  $\alpha - \text{COOH}$  se

define  $K_1 = a_{\text{COO}^-} a_{\text{H}^+} / a_{\text{COOH}}$ , donde  $a_{\text{COO}^-}$ ,  $a_{\text{COOH}}$  y  $a_{\text{H}^+}$  son las actividades de las especies químicas  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{COOH}$  y  $\text{H}^+$ , respectivamente. Luego es claro que  $a_{\text{H}^+}$  se relaciona con el  $\text{pH}^*$  (ver también Ec. (7.3.2)) indicando la diferencia entre  $\text{p}K_1^t$  y  $\text{p}K_1$ .

**Tabla 7.4.** Resultados numéricos para Arg, His y Lys, a diferentes valores de pH y fuerza iónica constante  $I=10$  mM, obtenidos con el LLCCEM. Los valores de las movilidades efectivas, volumen específico parcial y radio compacto se reportan en la Tabla 7.1. Las convergencias de  $a_{\text{H}}^e$  (Å),  $Z_i$  y  $H$  se logran en el programa numérico iterativo.

	pH	1.99	2.05	2.10	2.20	2.40	2.60	2.80	3.03	3.20
Arg	$\Omega$	1.113	1.098	1.086	1.065	1.035	1.025	1.036	1.074	1.115
	$H$	10.0	10.1	10.1	10.2	10.5	10.8	11.1	11.5	11.8
	$\text{p}K_1$	2.80	2.81	2.82	2.84	2.88	2.92	2.97	3.03	3.07
	$\text{pH}^*$	2.98	3.04	3.08	3.16	3.32	3.48	3.63	3.80	3.93
	$\Delta\text{p}K$	0.99	0.99	0.98	0.96	0.92	0.88	0.83	0.77	0.73
	$a_{\text{H}}^e$	4.99	4.99	5.00	5.01	5.03	5.06	5.09	5.13	5.15
	$Z$	1.87	1.85	1.84	1.81	1.75	1.67	1.59	1.49	1.42
	$Z_1$	-0.13	-0.15	-0.16	-0.19	-0.25	-0.32	-0.41	-0.51	-0.58
His	$\Omega$	1.062	1.058	1.055	1.050	1.048	1.059	1.085	1.135	1.184
	$H$	11.0	11.1	11.2	11.3	11.5	11.8	12.1	12.5	12.8
	$\text{p}K_1$	2.79	2.80	2.81	2.83	2.87	2.91	2.96	3.02	3.07
	$\text{pH}^*$	3.00	3.05	3.09	3.17	3.33	3.49	3.64	3.81	3.93
	$\Delta\text{p}K$	1.01	1.00	0.99	0.97	0.93	0.89	0.84	0.78	0.73
	$a_{\text{H}}^e$	4.93	4.93	4.94	4.95	4.97	5.00	5.03	5.07	5.10
	$Z$	1.86	1.85	1.84	1.81	1.74	1.67	1.59	1.48	1.41
	$Z_1$	-0.14	-0.15	-0.16	-0.19	-0.25	-0.33	-0.41	-0.51	-0.58
Lys	$\Omega$	1.181	1.161	1.146	1.118	1.080	1.066	1.075	1.113	1.156
	$H$	11.5	11.6	11.6	11.7	12.0	12.3	12.6	13.0	13.3
	$\text{p}K_1$	2.81	2.82	2.83	2.85	2.88	2.93	2.98	3.03	3.08
	$\text{pH}^*$	2.98	3.03	3.07	3.15	3.31	3.47	3.62	3.79	3.92
	$\Delta\text{p}K$	0.99	0.98	0.97	0.95	0.91	0.87	0.82	0.76	0.72
	$a_{\text{H}}^e$	5.03	5.03	5.04	5.05	5.07	5.10	5.13	5.17	5.19
	$Z$	1.87	1.85	1.84	1.81	1.75	1.68	1.60	1.50	1.42
	$Z_1$	-0.13	-0.14	-0.16	-0.18	-0.25	-0.32	-0.40	-0.50	-0.58

**Tabla 7.5.** Resultados numéricos para Asp, Leu y Ser, a diferentes valores de pH y fuerza iónica constante  $I=10$  mM, obtenidos con el LLCCEM. Los valores de movilidad efectiva, volumen específico parcial y radio compacto se reportan en las Tablas 7.1 a 7.3 Las convergencias de  $a_H^e$  (Å),  $Z_i$  y  $H$  se logran en el programa numérico iterativo.

	pH	1.99	2.05	2.10	2.20	2.40	2.60
Asp	$\Omega$	0.981	0.947	0.918	0.855	0.721	0.580
	$H$	9.8	9.8	9.9	9.9	10.1	10.4
	$pK_1$	3.27	3.28	3.28	3.30	3.33	3.37
	$pH^*$	2.52	2.57	2.62	2.70	2.87	3.03
	$\Delta pK$	0.53	0.52	0.528	0.50	0.47	0.43
	$a_H^e$	4.65	4.65	4.65	4.66	4.69	4.71
	$Z$	0.92	0.91	0.90	0.88	0.82	0.76
	$Z_1$	-0.05	-0.06	-0.06	-0.07	-0.11	-0.15
	$Z_3$	-0.03	-0.04	-0.04	-0.05	-0.07	-0.10
Leu	$\Omega$	1.022	0.985	0.954	0.887	0.745	0.603
	$H$	7.7	7.7	7.8	7.8	7.9	8.1
	$pK_1$	3.25	3.26	3.26	3.27	3.29	3.32
	$pH^*$	2.54	2.59	2.64	2.73	2.91	3.08
	$\Delta pK$	0.55	0.54	0.54	0.53	0.51	0.48
	$a_H^e$	4.65	4.65	4.66	4.66	4.68	4.70
	$Z$	0.95	0.94	0.93	0.92	0.89	0.84
	$Z_1$	-0.05	-0.06	-0.06	-0.08	-0.11	-0.16
Ser	$\Omega$	1.025	0.978	0.940	0.859	0.697	0.547
	$H$	8.7	8.7	8.8	8.8	9.0	9.2
	$pK_1$	3.22	3.23	3.23	3.24	3.27	3.30
	$pH^*$	2.56	2.62	2.67	2.76	2.93	3.10
	$\Delta pK$	0.57	0.57	0.57	0.56	0.53	0.50
	$a_H^e$	4.43	4.43	4.44	4.45	4.47	4.49
	$Z$	0.94	0.94	0.93	0.92	0.88	0.83
	$Z_1$	-0.05	-0.06	-0.07	-0.08	-0.12	-0.17

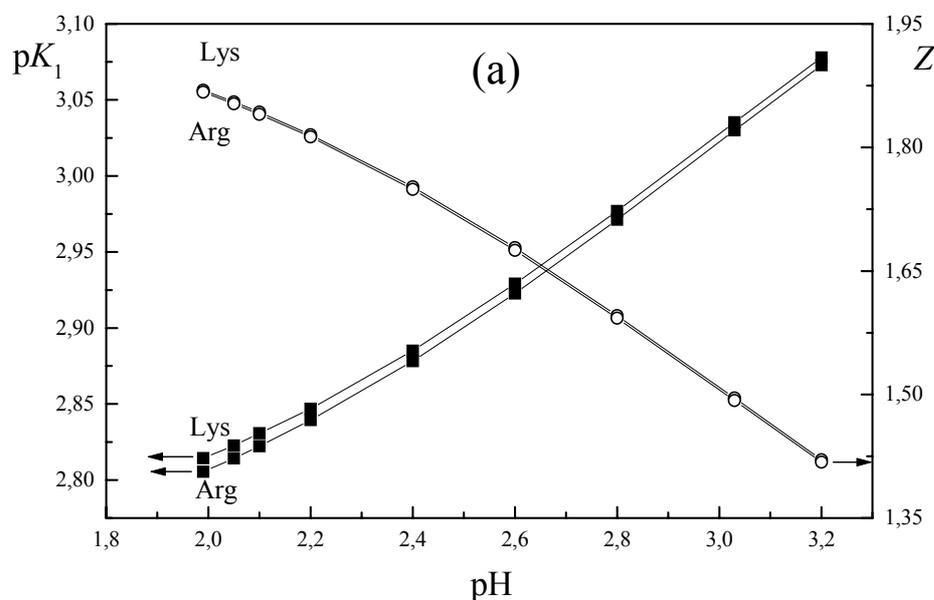
Siguiendo con este análisis, es importante mencionar que como una consecuencia del fenómeno de regulación de cargas, la aplicación del LLCCEM a Glu y Asp, a los valores

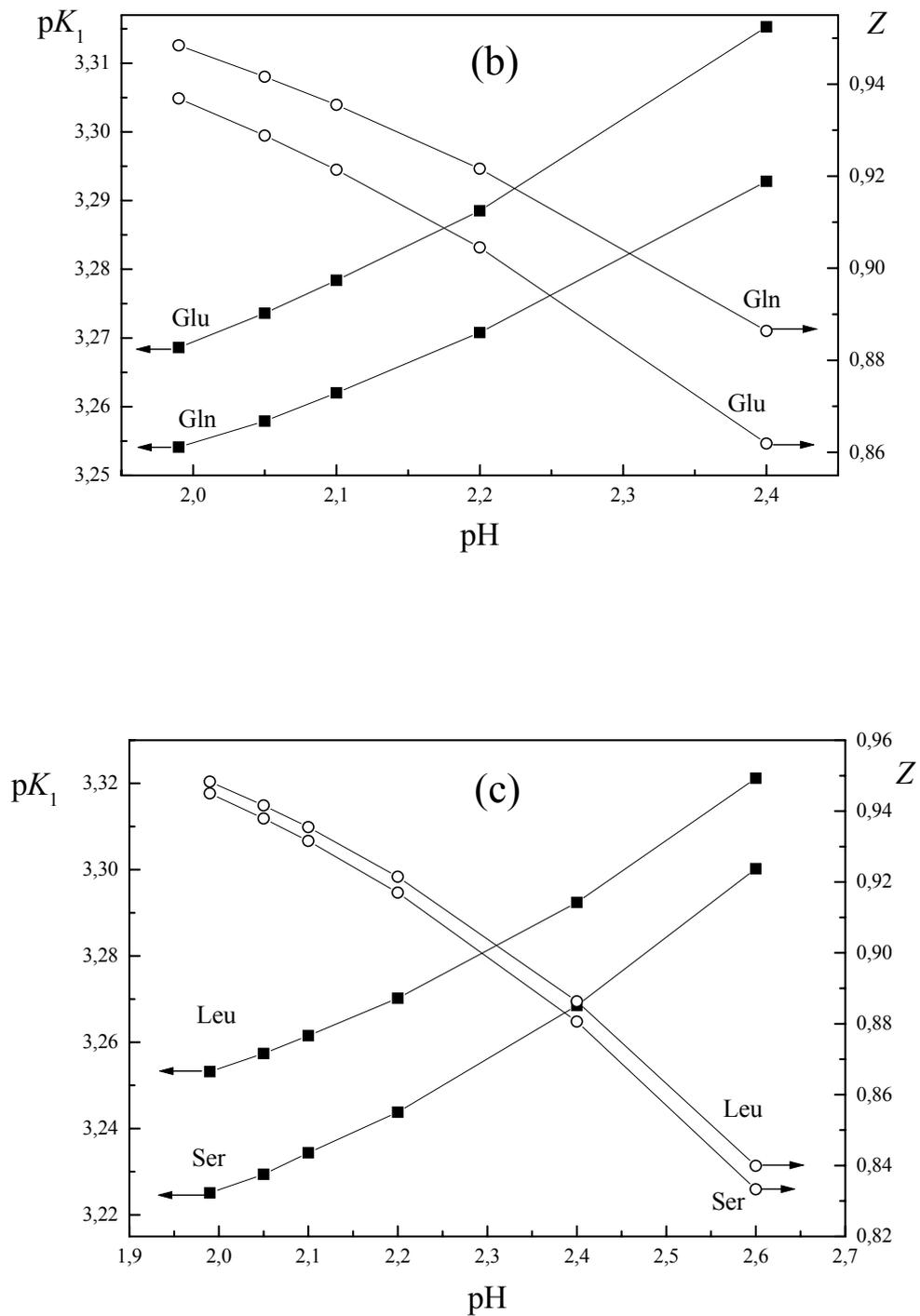
de pH más altos del rango experimental, es bastante difícil. De este modo, teniendo en cuenta que  $pH^*$  se aproxima al  $pI$  antes que el pH, y también considerando los valores de  $pI$  bajos de estos dos aminoácidos, se espera que se alcancen las hidrataciones máximas de estos aminoácidos a los valores de pH más altos, que corresponde aproximadamente a la  $Z_T$  máxima (Durchschlag y Zipper, 2004). Así se encontró que cambiando el pH hacia este punto, la forma hidrodinámica que se requiere puede ser diferente de las partículas esféricas simples (el factor de forma toma valores fuera del rango permitido) y en consecuencia se deben formular algoritmos numéricos más robustos con relación a la descripción de otras formas de los analitos. Es también claro que el análisis realizado arriba para los aminoácidos básicos (Arg, His, Lys) se puede extender a los aminoácidos ácidos (Asp, Glu). Para estos dos analitos particulares, sin embargo, se encontró que  $\Omega < 1$ , disminuyendo monótonicamente desde valores cercanos a uno (forma cercana a la esférica a pH 1.99) a medida que el pH aumenta (ver por ejemplo Asp en la Tabla 7.5). La velocidad de variación de  $\Omega$  es más pronunciada para estos dos aminoácidos que para los tres básicos; este resultado es consistente con el hecho que para los aminoácidos ácidos hay dos grupos ionizantes  $-COOH$  titulando dentro del rango experimental de pH. Como consecuencia de este efecto particular, a pH relativamente alto (es decir,  $pH > 2.6$ ) se observa que para la mayoría de los aminoácidos ionizantes y polares, polares y no polares los valores de  $\Omega$  pueden estar afuera del rango permitido ( $0.5 < \Omega < 1.5$ ) para que sea posible aplicar las soluciones disponibles de la movilidad electroforética correspondiente a partículas esféricas (Yoon y Kim, 1979) (ver también, por ejemplo, Ser (polar) y Leu (no polar) en la Tabla 7.5). Como se indicó arriba, una vez más la consideración de la forma hidrodinámica en los aminoácidos, péptidos pequeños (Piaggio *et al.*, 2006a) y analitos en general, parece ser más importante que en aquellos casos concernientes a péptidos grandes y proteínas globulares. No obstante, basados en la experiencia previa sobre el tema y después de estas conclusiones, se encontró que el modelado de la movilidad electroforética de analitos en general puede requerir la consideración cuidadosa de la forma hidrodinámica. Más aún, imponiendo el valor de un radio hidrodinámico esférico en los algoritmos numéricos, calculados a partir de los radios de van der Waals, puede conducir a algunas inconsistencias con los valores físicos de los números de hidratación y tal vez a una sobre simplificación de la forma hidrodinámica de los analitos. Otro grupo interesante de aminoácidos para ser analizados aquí está formado

por los aminoácidos polares Asn, Gln, Cys, Tyr y Thr y también los no polares Pro, Phe, Trp y Met, los cuales presentan formas hidrodinámicas diferentes de la esférica, comenzando con  $\Omega < 1$  a pH 1.99 y disminuyendo monotónicamente con los valores más altos de pH. Estos aminoácidos claramente excluyen la forma esférica (ver también abajo la discusión concerniente a la forma de los analitos en general).

El grupo final de aminoácidos que se consideran aquí es aquel compuesto por los aminoácidos polares Ser y Gly y los no polares Ala, Leu, Ile y Val, todos ellos comenzando con  $\Omega > 1$  (es posible la forma esferoidal del tipo prolato) a pH 1.99. Aumentando los valores de pH las formas hidrodinámicas correspondientes se vuelven esféricas ( $\Omega \approx 1$ ) para finalizar con valores de  $\Omega < 1$  (es posible la forma esferoidal del tipo oblato). Por supuesto, con relación a la asignación de las formas prolato u oblato para estos aminoácidos a medida que el pH aumenta, merece explicaciones adicionales. En efecto, para  $\Omega > 1$  es posible elegir ya sea las formas hidrodinámicas del tipo prolato u oblato para una analito particular, pero es también evidente a partir de las soluciones reportadas en Yoon y Kim (1989) que para estos valores de  $\Omega$ , la orientación predominante de la constante promedio  $\langle C \rangle$  es en la dirección paralela al campo eléctrico aplicado para el esferoide del tipo prolato y perpendicular para el esferoide del tipo oblato, correspondiente a los más altos y más bajos valores de  $\alpha$ , respectivamente. Como se discutió previamente en el Capítulo 5 (ver también, Piaggio *et al.*, 2006a) se considera que en la medida que el eje principal mayor  $a$  de los esferoides se toma como la línea que une los centros de carga neta positivo y negativo, este eje tiende a estar alineado, en promedio de todas las posibles orientaciones, con la dirección del campo eléctrico aplicado, como consecuencia de la presencia de un momento dipolar efectivo bajo formación en el analito para pH en aumento (en el pI este momento dipolar tiene las cargas positiva y negativa balanceadas y en consecuencia se vuelve bien definido). En este sentido se concluye que para  $\Omega > 1$  se debería asignar la forma del tipo prolato al analito que migra electroforéticamente. La situación contraria es también verdadera, y se puede fácilmente inferir a partir de la previa; así para  $\Omega < 1$  el analito debería tener forma del tipo oblato. Estos dos últimos resultados se aplican en la medida que las partículas esferoidales son descriptores buenos de la forma hidrodinámica del analito, es decir, para  $0.5 < \Omega < 1.5$ . Es también claro a partir de la discusión mencionada arriba que las predicciones a partir de los modelos electroforéticos continuos, como el LLCCEM y el PLLCEM (ver más abajo), dependen significativamente

de los parámetros microestructurales que se ingresan en el correspondiente algoritmo numérico. Para visualizar este aspecto mejor, en la Tabla 7.6 se presenta  $H$  calculado con el LLCCEM cuando se usan los números de hidratación de los aminoácidos residuales reportados en Kuntz (1971a) y en Hopfinger (1977) (ver Ecs. (7.3.9) y (7.4.1) para visualizar la incidencia de estos datos sobre las convergencias del algoritmo). A pesar de que los resultados obtenidos y presentados en esta tabla son bastante similares y aceptables teniendo en cuenta el conocimiento presente con relación a la hidratación de la microestructura, se observa que algunos datos sugeridos en la literatura son bastante diferentes; por ejemplo, el número de hidratación del residuo Cys puede ser 0.1 o 1, aquellos para la Phe 0 o 1.4, mientras para el residuo de Pro estos números son 0.9 o 3; todos los otros valores son bastante próximos. Así, los resultados presentados en este capítulo para la interpretación de la movilidad electroforética de aminoácidos (cálculos a través de modelos continuos) son aproximaciones cuantitativas porque los datos de la microestructura disponibles con respecto a la hidratación podrían mejorarse en un futuro cercano a través de simulaciones por dinámica molecular más eficientes. No obstante, se espera mientras tanto que estas conclusiones cuantitativas ayuden a elucidar y comprender mejor este difícil tema.





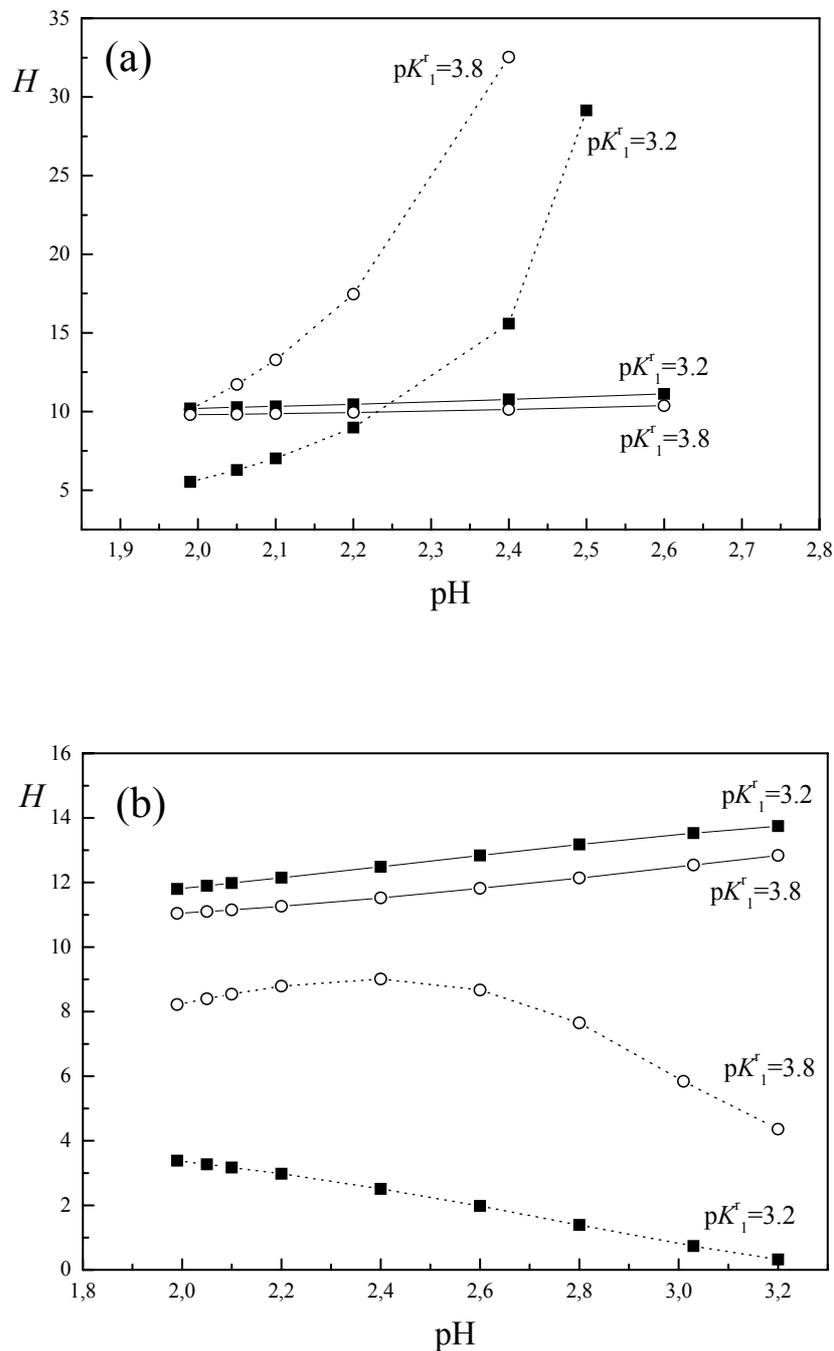
**Figura 7.4.**  $pK_1$  y carga neta  $Z$ , a diferentes valores de pH ( $I=10$  mM), calculados con el LLCCEM. Los símbolos (■) y (○) se refieren a los valores numéricos que se obtienen para  $pK_1$  y  $Z$ , respectivamente. (a) Lys y Arg, (b) Gln y Glu, (c) Leu y Ser. Se usan en los cálculos numéricos los números de hidratación de los residuos de aminoácidos reportados en Kuntz (1971a).

**Tabla 7.6.** Valores numéricos del número de hidratación  $H$  para los 20 aminoácidos, a pH 1.99 ( $I=10$  mM), calculados con el LLCCEM. Las columnas (A) y (B) son los valores de  $H$  cuando se usan los números de hidratación de los residuos de aminoácidos reportados en Kuntz (1971a) y en Hopfinger (1977), respectivamente, en la Ec. (7.3.9) y el criterio de convergencia (Ec. (7.4.1)). Los aminoácidos están ordenados de acuerdo a la disminución de los números de hidratación presentados en la columna A.

Aminoácidos	$H$	
	A	B
Lys	11.5	12.3
His	11.0	9.9
Arg	10.0	9.3
Asp	9.8	9.8
Glu	9.8	9.7
Pro	9.7	7.6
Tyr	9.7	8.8
Ser	8.7	8.4
Thr	8.7	8.2
Asn	8.7	8.9
Gln	8.7	8.8
Trp	8.7	8.6
Ala	8.2	7.7
Gly	7.7	7.8
Cys	7.7	6.8
Val	7.7	7.6
Met	7.7	7.4
Leu	7.7	7.5
Ile	7.7	7.5
Phe	6.7	8.1

Es también interesante, en esta etapa del estudio concerniente a la interpretación de las movilidades electroforéticas de aminoácidos, realizar dos tipos de corridas numéricas con el LLCCEM, por ejemplo, correspondiente a Asp e His (con cadenas laterales polares ionizantes, ácida y básica, respectivamente). Una corrida consiste en variar el  $pK_1^T$  del valor sugerido 3.8 a uno más bajo, por ejemplo 3.2, para visualizar los efectos numéricos sobre el número de hidratación  $H$ . La otra corrida se lleva a cabo imponiendo una forma

hidrodinámica esférica fija para cualquier pH del programa experimental bajo análisis. La Figura 7.5 ilustra los resultados correspondientes.



**Figura 7.5.** Número de hidratación  $H$ , a diferentes valores de pH ( $I=10$  mM), calculados con el LLCCEM. La línea entera se refiere a  $\Omega \neq 1$  (ver valores de  $\Omega$  en las Tablas 7.4 y 7.5, donde se usan en los cálculos numéricos los números de hidratación de los residuos de aminoácidos reportados en Kuntz (1971a) y la línea de puntos se refiere a  $\Omega = 1$  (no se impone la convergencia de hidratación  $H$ ). Los símbolos ( $\circ$ ) y ( $\blacksquare$ ) indican los valores numéricos para  $pK_1^r = 3.8$  y  $pK_1^r = 3.2$ , respectivamente. (a) Asp, (b) His.

Así los cálculos para el Asp muestran en la Figura 7.5 (a) que la hidratación resultante no es significativamente afectada por cambios en el  $pK_1^r$ , mientras que esta propiedad toma valores no esperados a medida que el pH aumenta cuando se impone una forma esférica fija. De esta manera a través de la Figura 7.5 (a) se observa una vez más la importancia de la forma hidrodinámica del analito sobre la hidratación. También, a pesar de que los cambios del  $pK_1^r$  introducen variaciones en los resultados numéricos en general, ellos no son importantes para cambiar el significado físico, el cual se preserva para el rango de diferentes  $pK_1^r$  bajo análisis. La Figura 7.5 (b) presenta las dos corridas numéricas propuestas arriba para la His. Una vez más se visualiza el efecto del  $pK_1^r$  y se obtiene una conclusión similar a la del Asp con relación a este tema específico. En adición, es interesante observar que fijando la forma hidrodinámica de la His en una esfera, con un radio equivalente  $a_H^e$  y  $\Omega = 1$ , se obtiene una evolución decreciente no física de  $H$  con el pH para  $pK_1^r=3.2$ , indicando probablemente que este valor es demasiado bajo para ser la referencia apropiada. Para  $pK_1^r=3.8$  y  $\Omega = 1$ , también se visualiza que  $H$  comienza aumentando con el pH y luego de alcanzar un valor máximo decrece para valores de pH más altos. A pesar de que esta última curva se puede interpretar considerando efectos estéricos (un argumento ya usado para Lys y Arg en la Figura 7.3 (a)), sin embargo, no se espera que se encuentren valores tan bajos para el  $H$  de la His, a medida que el pH aumenta. Este resultado indica que la forma hidrodinámica del analito cambia significativamente con el pH, como ya se concluyó con los resultados previos arriba, eliminando la condición  $\Omega = 1$ .

Finalmente también se aplica el PLLCEM a la mayoría de los aminoácidos estudiados arriba (resultados no reportados aquí). Estos resultados indican para estos analitos relativamente pequeños, comparándolos con péptidos grandes y proteínas globulares, que las perturbaciones asociadas con las interacciones electrostáticas entre grupos ionizantes son insignificantes, como se observa numéricamente cambiando la permitividad eléctrica en el dominio de los aminoácidos (para estas partículas pequeñas se sugiere  $\epsilon' \approx 80$ ) y también, las distancias promedios posibles entre pares de cargas interactuantes. Se supone que estos resultados son una consecuencia de que el número máximo de grupos ionizantes que intervienen en el fenómeno de regulación de cargas de

aminoácidos no es mayor de tres. No obstante, se observa que este fenómeno está aún presente para estos analitos al nivel de campo promedio de las interacciones electrostáticas correspondiente a las Ecs. (7.3.2) a (7.3.8).

## 7.7 Conclusiones

Los aminoácidos que se estudian en este capítulo de la Tesis se modelan hidrodinámicamente como esferoides del tipo prolato y oblato y en unos pocos casos como esferas, en el rango de pH bajo, principalmente para  $1.99 < \text{pH} < 2.6$ , cuando la fuerza iónica es alrededor de 10 mM. Las formas hidrodinámicas de los aminoácidos y en consecuencia sus radios equivalentes son muy sensibles a la hidratación del analito. Así, se encuentra que se obtiene una forma bien definida para cada aminoácido solamente cuando se introduce un criterio de convergencia adicional en el algoritmo numérico de los modelos fisicoquímicos (LLCEM y PLLCEM) que se usan para interpretar las movilidades electroforéticas; los cuales involucran el número de hidratación del analito, estimado a través de la suma de las hidrataciones individuales de las zonas del analito, correspondiendo principalmente a las cargas totales y parciales de los grupos ionizantes y dipolos moleculares. Por consiguiente, bajo estas condiciones, el LLCEM y el PLLCEM son capaces de proveer estimaciones de cantidades acopladas como: el factor de forma hidrodinámica, el radio hidrodinámico equivalente (tamaño), la carga neta, el  $\text{p}K_i$  actual de los grupos ionizantes dentro del rango de pH de los experimentos, las cargas parciales de los grupos ionizantes, un número de hidratación consistente  $H$ , el pH cercano a la molécula del analito (pH -microambiente del BGE) y otros cálculos adicionales a partir de estos.

Para hidrataciones de los aminoácidos más drásticas, se requiere la consideración de otras formas hidrodinámicas diferentes de los esferoides, en la medida que los valores de los pH se aproximan al punto isoeléctrico del aminoácido. Sin embargo, estas formas hidrodinámicas deberían ser compatibles con los ejes geométricos conteniendo el dipolo efectivo del analito que se forma en la medida que el pH se aproxima al punto isoeléctrico. En competición con el movimiento browniano, se espera que este eje tienda a estar alineado, o predominantemente paralelo, al campo eléctrico aplicado en las corridas de la CZE como una consecuencia del momento dipolar efectivo así generado.

A partir de los estudios de la CZE de aminoácidos en el rango de pH bajo se encuentran comportamientos hidrodinámicos distintivos correspondientes a diferentes grupos de ellos. Así en el rango  $1.99 < \text{pH} < 2.6$ , los aminoácidos con cadenas laterales polares ácidas e ionizantes, y algunas polares se representan por esferoides del tipo oblato, mientras que los aminoácidos no polares pueden ser esferoides del tipo prolato u oblato. Los aminoácidos con cadenas laterales polares básicas e ionizantes permanecen prolato en todo el rango, y también muestran probables efectos estéricos entre las capas de hidratación de los grupos ionizantes.

Las propuestas para futuras investigaciones deben estar dirigidas a algoritmos numéricos más robustos para predecir formas hidrodinámicas diferentes de los esferoides, así como la expresión y datos experimentales más reales concernientes a los números de hidratación de las zonas ionizantes, polares y no polares de los analitos en general.

# Conclusiones Generales

---

---

## Resultados principales de la Tesis

- ◆ Se presenta un modelo fisicoquímico-matemático que describe fenómenos y procesos relevantes de la separación de analitos mediante CZE. El sistema de ecuaciones resultantes se traduce a un esquema computacional que se programa y ejecuta en lenguaje FORTRAN y en la plantilla MATHEMATICA. Este modelo básico de la CZE (no-ideal y lineal) que involucra moléculas cargadas pequeñas se valida con datos experimentales propios y de la bibliografía.
- ◆ El modelo está construido a partir de las ecuaciones fundamentales que describen los balances de materia, carga eléctrica, cantidad de movimiento, energía y especies iónicas (electrolitos y analitos) incluyendo ecuaciones constitutivas apropiadas. Se evita de esta manera suposiciones muy restrictivas inherentes a otros modelos o simulaciones presentadas en la literatura donde se usan preferentemente parámetros y correlaciones empíricas.
- ◆ Este modelo provee predicciones cualitativas y cuantitativas de interés práctico para la interpretación del electroferograma de un analito o de una mezcla de analitos.
- ◆ El esquema computacional es capaz de simular los electroferogramas de la CZE y permite el cálculo simultáneo de propiedades fisicoquímicas relevantes tales como carga neta, radio hidrodinámico, potencial de partícula, forma hidrodinámica de partícula, coeficiente de difusión y otras también relevantes para la interpretación funcional de analitos en sistemas biológicamente complejos.
- ◆ La simulación puede facilitar también el desarrollo y optimización de nuevas técnicas separativas con aplicación clínica y biotecnológica.
- ◆ La variación de los parámetros de separación a través del modelo, principalmente en lo que concierne a la composición del BGE, permite encontrar una propuesta de protocolo favorable para un problema separativo específico. El estudio del sistema real mediante la experimentación, lo cual es la rutina práctica que generalmente involucra “prueba y error”, se puede reemplazar por una simulación computacional preliminar (relativamente rápida) con la aplicación de modelos del tipo propuesto en esta Tesis.

- ◆ El modelo básico en sus versiones expandidas origina los modelos extendidos (LLCEM y PLLCEM), los cuales incluyen el inevitable fenómeno de regulación de cargas asociado a las interacciones entre grupos cargados, y de estos con el BGE. Los modelos extendidos tienen aplicación directa en el análisis de la CZE de analitos más complejos como péptidos y proteínas y pueden ser extendidos a otros analitos de interés biotecnológico.
- ◆ Partiendo del dato experimental de la movilidad electroforética del analito, los modelos extendidos proporcionan resultados rigurosos (propiedades fisicoquímicas verdaderas) provistos por el algoritmo numérico y las subrutinas iterativas que incluye. Así se obtienen estimaciones de propiedades que matemáticamente están acopladas en los modelos, tales como: radio hidrodinámico, carga neta, potencial zeta, variaciones en los  $pK$  de los grupos cargados en el BGE específico, etc.
- ◆ La incorporación en los modelos del cálculo simultáneo (es decir, en forma acoplada) de la hidratación y la forma de los analitos permite estimar correctamente el tamaño efectivo de estas partículas que en general son diferentes a la forma esférica desde el punto de vista hidrodinámico y en el contexto de la CZE.
- ◆ La aplicación de modelos como los propuestos en esta Tesis permite la caracterización de diferentes analitos (proteínas, péptidos, aminoácidos, drogas) a través del conocimiento de parámetros fisicoquímicos relevantes en las condiciones específicas del medio (BGE), los cuales no son fácilmente accesibles por otras técnicas experimentales sencillas como la CZE.
- ◆ El uso de los parámetros conformacionales como el radio hidrodinámico, la carga neta y la hidratación son útiles para estudiar el proceso de desnaturalización de proteínas bajo la acción de diferentes agentes desnaturalizantes. En efecto, a partir de medidas de la movilidad electroforética vía CZE y la aplicación del modelo LLCEM se obtienen resultados relevantes que describen el estado termodinámico (como por ejemplo, conformación y energía libre electrostática) de la proteína a diferentes niveles de desnaturalización.
- ◆ Las formas hidrodinámicas de los analitos y en consecuencia sus radios equivalentes son muy sensibles a la hidratación. En general, se obtiene un tamaño hidrodinámico de “esfera equivalente” bien definido para cada analito; de donde se puede a su vez estimar una forma hidrodinámica que es compatible solamente cuando se introduce un criterio de convergencia que involucra el radio hidrodinámico, la hidratación y la carga

en el algoritmo numérico de los modelos fisicoquímicos (LLCEM y PLLCEM) propuestos en esta Tesis que se usan para interpretar las movilidades electroforéticas.

- ◆ El agua asociada a los analitos se describe a través del número de hidratación, el cual se calcula iterativamente en el código numérico sumando las hidrataciones individuales de los grupos ionizantes del analito en sus diferentes estados de disociación al pH,  $I$  y  $T$  del BGE.

En consecuencia, los modelos propuestos en esta Tesis se pueden usar en dos formas diferentes: A) Cuando el electroferograma experimental está disponible (es decir, el tiempo de migración o la movilidad electroforética del analito se conoce) es posible estimar propiedades fisicoquímicas tales como: radio hidrodinámico, difusividad molecular, carga efectiva, potencial de superficie, hidratación, forma hidrodinámica y  $pK$  efectivos de los grupos ionizantes de cada analito, entre otros cálculos adicionales y relevantes para diversos objetivos. B) Con los resultados de una corrida inicial de la CZE es posible perturbar la predicción de la velocidad electroforética de cada analito (variando, por ejemplo, el pH y/o la fuerza iónica) para adoptar así el protocolo de trabajo más conveniente según las necesidades separativas que se desea lograr.

Por consiguiente, el uso combinado de experiencias prácticas y modelos fisicoquímicos de la CZE, como los que se presentan aquí, ayudan a ampliar la información que es capaz de brindar esta técnica separativa aplicable a diferentes tipos de analitos en un espectro amplio de formulaciones del BGE.

## **Conclusiones más destacadas de esta Tesis**

Por lo expuesto en esta Tesis se sugiere enfáticamente que la CZE, además de ser una herramienta analítica ampliamente usada en la práctica, tiene, además, aplicación para la estimación de propiedades fisicoquímicas relevantes; cuando el electroferograma se modela e interpreta a través de las ecuaciones de los fenómenos de transporte acopladas a los efectos electrocinéticos.

Como aportes destacados de esta Tesis se puede mencionar que los modelos extendidos de la CZE incluyen el fenómeno de regulación de cargas generalmente no considerado en los modelos reportados en la literatura al presente. Es posible así determinar el pH cercano a la molécula que resulta ser diferente de aquel del seno de la solución correspondiente a la formulación del BGE. Este aspecto es muy relevante en el análisis del comportamiento bioquímico de analitos en general.

También es importante la consideración, a través de los modelos propuestos, de las formas hidrodinámicas de partículas diferentes a la esférica y las estimaciones del radio hidrodinámico equivalente y de la carga neta, que surgen como resultados del algoritmo numérico propuesto. Esta alternativa supera la propuesta de estudios previos presentados en la literatura, los cuales utilizan la masa molar del analito solamente (la hidratación no se tiene en cuenta, introduciendo así un error significativo en la masa de la unidad cinemática) con correlaciones empíricas para predecir las movilidades electroforéticas de analitos en la CZE. Ciertamente, el carácter de predicción de esos modelos es muy aproximado y también pueden generar inconsistencias físicas principalmente asociadas con el estado de hidratación de los analitos.

Finalmente es evidente que la evaluación cuantitativa del fenómeno de regulación de carga, de la hidratación, la carga neta, la forma hidrodinámica y el tamaño de los analitos, ayudaría al desarrollo de métodos de separación multidimensionales; los cuales al presente demandan no sólo propuestas experimentales innovativas, sino también estudios teóricos para comprender mejor el fenómeno de micro-escala asociado con la electromigración.

### **Propuestas para futuras investigaciones**

- ◆ Considerar la asignación del valor adecuado de la permitividad eléctrica en el interior de la proteína, y su importancia en los cálculos que surgen del PLLCEM.
- ◆ Realizar estudios acerca de la incidencia de los  $\Delta pK_i$  en las estimaciones de los parámetros fisicoquímicos (radio hidrodinámico y carga efectiva) y su directa relación con el comportamiento bioquímico de proteínas y péptidos.
- ◆ Proponer algoritmos numéricos más robustos para predecir formas hidrodinámicas diferentes de los esferoides, así como generar datos experimentales más precisos con relación a los números de hidratación de los grupos ionizantes, polares y no polares de los analitos en general.
- ◆ Reconsiderar la evaluación del estado de hidratación de péptidos y proteínas, a partir de datos de movilidades electroforéticas de la CZE, incluyendo en los modelos los números de hidratación de los aminoácidos residuales y grupos terminales y la convergencia con el parámetro de forma, el cual permite describir el comportamiento hidrodinámico de partículas no esféricas.

# Referencias Bibliográficas

---

---

- Abramson, H. A.; Gorin, M. H. y Moyer, L. S. (1939). The polar groups of protein and amino acids surfaces in liquids. *Chemical Rev.* 24: 345-366.
- Adam, T.; Friedecký, D.; Fairbanks, L. D.; Sevcík, J. y Barták, P. (1999). Capillary Electrophoresis for Detection of Inherited Disorders of Purine and Pyrimidine Metabolism. *Clin. Chem.* 45: 2086-2093.
- Adamson, N. J. y Reynolds, E. C. (1995). High performance capillary electrophoresis of casein phosphopeptides containing 2-5 phosphoserine residues: Relationship between absolute electrophoretic mobility and peptide charge and size. *Electrophoresis* 16: 525-528.
- Adamson, N. J. y Reynolds, E. C. (1997). Rules relating electrophoretic mobility, charge and molecular size of peptides and proteins. *J. Chromatogr. B* 699: 133-147.
- Allen, D. y El Rassi, Z. (2003). Silica-based monoliths for capillary electrochromatography: methods of fabrication and their applications in analytical separations. *Electrophoresis* 24: 3962-3976.
- Allison, S. A.; Carbeck, J. D.; Chen, C. y Burkes, F. (2004). Electrophoresis of Protein Charge Ladders: A Comparison of Experiment with Various Continuum Primitive Models. *J. Phys. Chem. B* 108: 4516-4524.
- Altria, K. D. y Rogan, M. M. (1994). Introduction to Quantitative Applications of Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis. Beckman Instruments, Inc. USA. Volume VI, pp. 1-55.
- Altria, K. D. (1999). Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* 856: 443-463.
- Altria, K. D.; Chen, A. B. y Clohs, L. (2001). Capillary Electrophoresis as a Routine Analytical Tool in Pharmaceutical Analysis. *LC-GC* 19 (9).
- Amoresano, A.; Andolfo, A.; Siciliano, R. A.; Cozzolino, R.; Minchiotti, L.; Galliano, M. y Pucci, P. (1998). Analysis of human serum albumin variants by mass spectrometric procedures. *Biochim. Biophys. Acta* 1384: 79-92.
- Andreev, V. P. y Lisin, E. E. (1992). Investigation of the electroosmotic flow effect on the efficiency of capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 13: 832-837.
- Andreev, V. P. y Lisin, E. E. (1993). On the mathematical model of capillary electrophoresis. *Chromatographia* 37: 202-210.
- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that Govern the Folding of Proteins Chains. *Science* 181: 223-230.

- Antosiewicz, J.; McCammon, J. A. y Gilson, M. K. (1994). Prediction of pH-Dependent Properties of Proteins. *J. Mol. Biol.* 238: 415-436.
- Antosiewicz, J.; McCammon, J. A. y Gilson, M. K. (1996). The Determinants of  $pK_a$ s in Proteins. *Biochemistry* 35: 7819-7833.
- Arai, K.; Madison, J.; Huss, K.; Ishioka, N.; Satoh, C.; Fujita, M.; Neel, J. V.; Sakurabayashi, I. y Putnam, F. W. (1989). Point substitutions in Japanese alloalbumins. *Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6092-6096.
- Arai, K.; Madison, J.; Shimizu, A. y Putnam, F. W. (1990). Point substitutions in albumin genetic variants from Asia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 497-501.
- Arvan, D. A.; Blumberg, B. S.; Melartin, L. (1968). Transient "bisalbuminemia" induced by drugs. *Clin Chim. Acta* 22: 211-218.
- Assunção, N. A.; Grange Deziderio, L. A.; Paulino, L. G.; Lupetti, K. O. y Carrilho E. (2005). Nonaqueous capillary electrophoresis in coated capillaries: An interesting alternative for proteomic applications. *Electrophoresis* 26: 3292-3299.
- Atkins, P. W. (1995). *Physical Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, pp. 316-317.
- Atlas, S. y Farber, E. (1955). On the molecular weight of cytochrome c from mammalian heart muscle. *J. Biol. Chem.* 31-36.
- Attard, P.; Antelmi, D. y Larson, I. (2000). Comparison of the Zeta Potential with the Diffuse Layer Potential from Charge Titration. *Langmuir* 16: 1542-1552.
- Babay, P. A.; Gettar, R. T.; Silva, M. F.; Thiele, B. y Batistoni, D. A. (2006). Separation of nonylphenol ethoxylates and nonylphenol by non-aqueous capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1116: 277-285.
- Barbas, C.; Adeva, N.; Aguilar, R.; Rosillo, M.; Rubio, T. y Castro, M. (1998). Quantitative Determination of Short-Chain Organic Acids in Urine by Capillary Electrophoresis. *Clin. Chem.* 44: 1340-1342.
- Basak, S. K. y Ladisch, M. R. (1995). Correlation of Electrophoretic Mobilities of Proteins and Peptides with Their Physicochemical Properties. *Anal. Biochem.* 226: 51-58.
- Beck, D. A. C.; Alonso, D. O. V. y Daggett, V. (2003). A microscopic view of peptide and protein solvation. *Biophys. Chem.* 100: 221-237.
- Beckers, J. L. y Boček, P. (2000). Sample stacking in capillary zone electrophoresis: principles, advantages and limitations. *Electrophoresis* 21: 2747-2767.
- Beckers, J. L., Gebauer, P. y Boček, P. (2001). System zones in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 22: 3648-3658.

- Beckers, J. L.; Ackermans, M. T. y Boček, P. (2003). Capillary zone electrophoresis in methanol: Migration behavior and background electrolytes. *Electrophoresis* 24: 1544-1552.
- Beckers, J. L. y Boček, P. (2003). The preparation of background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Golden rules and pitfalls. *Electrophoresis* 24: 518-535.
- Benavente, F.; Balaguer, E.; Barbosa, J. y Sanz-Nebot, V. (2006). Modelling migration behavior of peptide hormones in capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1117: 94-102.
- Bennion, B. J. y Daggett, V. (2003). The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 5142-5147.
- Berli, C. L. A.; Piaggio, M. V. y Deiber, J. A. (2003). Modeling the zeta potential of silica capillaries in relation to the background electrolyte composition. *Electrophoresis* 24: 1587-1595.
- Berli, C. L. A.; Piaggio, M. V. y Deiber, J. A. (2004). Theoretical relation between the tube zeta potential and the background electrolyte composition in capillary electrophoresis. *Progr. Colloid Polym. Sci.* 128: 21-24.
- Beroza, P.; Fredkin, D. R.; Okamura, M. Y. y Feher, G. (1991). Protonation of interacting residues in a protein by a Monte Carlo method: Application to lysozyme and the photosynthetic reaction center of *Rhodobacter Sphaeroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5804-5808.
- Beroza, P. y Case, D. A. (1996). Including Side Chain Flexibility in Continuum Electrostatic Calculations of Protein Titration. *J. Phys. Chem.* 100: 20156-20163.
- Beroza, P. y Fredkin, D. R. (1996). Calculation of Amino Acid pKas in a Protein from a Continuum Electrostatic Model: Method and Sensitivity Analysis. *J. Comp. Chem.* 17: 1229-1243.
- Bier, M.; Palusinski, O. A.; Mosher, R. A. y Saville, D. A. (1983). Electrophoresis: Mathematical Modeling and Computer Simulation. *Science* 219: 1281-1287.
- Blanc, T.; Schaufelberger, D. E. y Guzman, N. A. (1997). *Analytical Instrumentation Handbook: Capillary Electrophoresis*. Ed. Galen Wood Ewing. Marcel Dekker. N. Y., USA. Cap. 25, pp. 1351-1431.
- Boone, C. M.; Jonkers, E. Z.; Franke, J. P.; Zeeuw, R. A. y Ensing, K. (2001). Dynamically coated capillaries improve the identification power of capillary zone electrophoresis for basic drugs in toxicological analysis. *J Chromatogr. A.* 927: 203-210.
- Bossuyt, X.; Schiettekatte, G.; Bogaerts, A. y Blanckaert, N. (1998). Serum protein electrophoresis by CZE 2000 clinical capillary electrophoresis system. *Clin. Chem.* 44: 749-759.

- Boušková, E.; Presutti, G.; Gebauer, P.; Fanali, S.; Beckers, J. L. y Boček, P. (2004). Experimental assessment of electromigration properties of background electrolytes in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 25: 355-359.
- Breadmore, M. C.; Hilder, E. F.; Macka, M.; Avdalovic, N. y Haddad P. R. (2001). Modelling of migration behaviour of inorganic anions in ion-exchange capillary electrochromatography. *Electrophoresis* 22: 503-510.
- Brennan, S. O.; Arai, K.; Madison, J.; Laurell, C. B.; Galliano, M.; Watkins, S.; Peach, R.; Myles, T.; George, P. y Putnam, F.W. (1990). Hypermutability of CpG dinucleotides in the propeptide-encoding sequence of the human albumin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3909-3913.
- Brennan, S. O. (1985). The molecular abnormality of albumin Parklands: 365 Asp → His. *Biochim. Biophys. Acta* 830: 320-324.
- Brennan, S. O.; Bezerra, M. Z. P. J.; Franco, M. H. L. P. y Salzano, F. M.. Resultados no publicados.
- Brennan, S. O. (1998). Electrospray ionization mass analysis of normal and genetic variants of human serum albumin. *Clin. Chem.* 44: 2264-2269.
- Britz-McKibbin, P. y Chen, D. D. Y. (1997). Prediction of the migration behavior of analytes in capillary electrophoresis based on three fundamental parameters. *J. Chromatogr. A* 781: 23-34.
- Brunner, L. J. y DiPiro, J. T. (1998). Capillary electrophoresis for the therapeutic drug monitoring. *Electrophoresis* 19: 2848-2855.
- Burgi, D. S.; Salomon, K. y Chien, R. L. (1991). Methods for Calculating the Internal Temperature of Capillary Columns during Capillary Electrophoresis. *J. Liq. Chromatogr.* 14: 847-867.
- Busnel, J. M.; Varenne, A.; Descroix, S.; Peltre, G.; Gohon, Y. y Gareil, P. (2005). Evaluation of capillary isoelectric focusing in glycerol-water media with a view to hydrophobic protein applications. *Electrophoresis* 26: 3369-3379.
- Byron Bird, R; Stewart W. E. y Lightfoot, E. N. (1960). *Transport Phenomena*. Ed. John Wiley & Sons, New York, USA, pp. 42-48.
- Caravella, J. A.; Carbeck, J. D.; Duffy, D. C.; Whitesides, G. M. y Tidor, B. (1999). Long-Range Electrostatic Contributions to Protein-Ligand Binding Estimated Using Protein Charge Ladders, Affinity Capillary Electrophoresis, and Continuum Electrostatic Theory. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 4340-4347.
- Carbeck, J. D.; Colton, I. J.; Anderson, J. R.; Deutch, J. M. y Whitesides, G. M. (1999). Correlations Between the Charge of Proteins and the Number of Ionizable Groups They Incorporate: Studies Using Protein Charge Ladders, Capillary Electrophoresis, and Debye-Hückel Theory. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 10671-10679.

- Carbeck, J. D. y Negin, R. S. (2001). Measuring the Size and Charge of Proteins Using Protein Charge Ladders, Capillary Electrophoresis, and Electrokinetic Models of Colloids. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 1252-1253.
- Carlson, J.; Sakamoto, Y.; Laurell, C. B.; Madison, J.; Watkins, S. y Putnam, F.W. (1992). Alloalbuminemia in Sweden: Structural study and phenotypic distribution of nine albumin variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8225-8829.
- Caslavská, J.; Lienhard, S. y Thormann, W. (1993). Comparative use of three electrokinetic capillary methods for the determination of drugs in body fluids. Prospects for rapid determination of intoxications. *J. Chromatogr.* 638: 335-342.
- Castagnino, J. M. (1999). Electroforesis capilar. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 23: 297-329.
- Castagnola, M.; Cassiano, L.; Messana, I.; Nocca, G.; Rabino, R.; Rossetti, D. V. y Giardina, B. (1994). Capillary zone electrophoresis of peptides: prediction of the electrophoretic mobility and resolution. *J. Chromatogr. B* 656: 87-97.
- Castagnola, M.; Messana, I.; Cassiano, L.; Rabino, R.; Rossetti, D. V. y Giardina, B. (1995). The use of capillary electrophoresis for the determination of hemoglobin variants. *Electrophoresis* 16: 1492-1498.
- Castagnola, M.; Rossetti, D.; Cassiano, L.; Misiti, F.; Pennacchietti, L.; Giardina, B. y Messana, I. (1996). Determination of peptide dissociation constants and Stokes radius at different protonation stages by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 17: 1925-1930.
- Castagnola, M.; Rossetti, D. V.; Misiti, F.; Cassiano, L.; Giardina, B. y Messana, I. (1997). Modification of capillary electrophoresis selectivity in hydro-organic solutions. Dissociation constants and Stokes radius measurements of peptides in water-2,2,2-trifluoroethanol mixtures. *J. Chromatogr. A* 792: 57-65.
- Castagnola, M.; Rossetti, D.; Corda, M.; Pellegrini, M.; Misiti, F.; Olianias, A.; Giardina, B. y Messana, I. (1998). The pH dependence of predictive models relating electrophoretic mobility to peptide chemico-physical properties in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 19: 2273-2277.
- Castañón, M. M; Castagnino, P. A.; Castagnino, M. C. y Castagnino, J. M. (1999). Análisis de aminoácidos por electroforesis capilar. *Cubra V - Congreso Nacional de Bioquímicos*. Córdoba, Argentina.
- Catellan, G. W. (1983). *Physical Chemistry*, Addison-Wesley Publishing Company Inc., Massachusetts, pp. 394-395.
- Cerutti, S.; Silva, M. F.; Gásquez, J. A.; Olsina, R. A. y Martínez, L. D. (2005). Cloud point preconcentration prior to capillary zone electrophoresis: Simultaneous determination of platinum and palladium at trace levels. *Electrophoresis* 26: 3500-3506.

- Chae, K. S. y Lenhoff, A. M. (1995). Computation of the Electrophoretic Mobility of Proteins. *Biophys. J.* 68: 1120-1127.
- Chang, P.; Kuan, S.; Eberlein, G. Burke, D. y Jones, R. (2000). Characterization of bovine collagens using capillary electrophoresis-an alternative to slab gel electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22: 957-966.
- Chapman, J. y Hobbs, J. (1999). Putting Capillary Electrophoresis to Work. Reprinted from *LC-GC*, 17: 86-99.
- Chatterjee, A. y Jafri, I. H. (2003). Fully Coupled Computational Modeling of Transport Phenomena in Microfluidics Applications. 2<sup>nd</sup> International Bhurban Conference on Applied Sciences and Technology, Bhurban, Pakistan. June 16-21.
- Chatterjee, A. y Keating, D. (2003). A generalized computational formulation and model for transport and stoichiometry of multivalent weak analytes in capillary electrophoresis techniques. Symposium on Design, Test, Integration and Packaging of MEMS/MOMS.
- Cheftel, J. C.; Cuq, J. L. y Lorient, D., in: Fennema, O. R. (Ed), *Química de los alimentos*, ACRIBIA S. A., Zaragoza 1977, pp. 280-283.
- Chen, F. T. A. (1991). Rapid protein analysis by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* 559: 445-453.
- Chen, F. T. A.; Liu, C. M.; Hsieh, Y. Z. y Sternberg, J. S. (1991). Capillary Electrophoresis—A New Clinical Tool. *Chem.* 37: 14-19.
- Chen, N.; Wang, L.; Zhang, Y. K. (1993). Correlation Free-Solution Capillary Electrophoresis Migration Times of Small Peptides with Physicochemical Properties. *Chromatographia* 37: 429-432.
- Chen, L.; Chen, L.; Yan, X. y Wan, Q. H. (2002). Measurement of packing tortuosity and porosity in capillary electrochromatography. *Anal Chem.* 74: 5157-5159.
- Chien, R. L. (1991). Mathematical modeling of field-amplified sample injection in high-performance capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 63: 2866-2869.
- Chien, R. L. y Burgi, D. S. (1992). Sample Stacking of an Extremely Large Injection Volume in High-Performance Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 64: 1046-1050.
- Chiti, F.; Taddei, N. J.; van Nuland, N. A.; Magherini, F.; Stefani, M.; Ramponi, G. y Dobson, C. M. (1998). Structural Characterization of the Transition State for Folding of Muscle Acylphosphatase. *J. Mol. Biol.* 283: 893-903.
- Chiti, F.; De Lorenzi, E.; Grossi, S.; Mangione, P.; Giorgetti, S.; Caccialanza, G.; Dobson, C. M.; Merlini, G.; Ramponi, G. y Bellotti, V. (2001). A Partially Structures Species of  $\beta_2$ -Microglobulin Is Significantly Populated under Physiological Conditions and Involved in Fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 276: 46714-46721.

- Choi, O. K y Jo, J. S. (1997). Determination of L-ascorbic acid in foods by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 781: 435-443.
- Chua, E. K. M; Brennan, S. O. y George, P. M. (1998). Albumin Church Bay: 560Lys-Glu: a new mutation detected by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* 1382: 305-310.
- Cifuentes, A. y Poppe, H. (1994). Simulation and optimization of peptide separation by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 680:321-340
- Cifuentes, A. y Poppe, J. (1995). Effect of pH and ionic strength of running buffer on peptide behavior in capillary electrophoresis: Theoretical calculation and experimental evaluation. *Electrophoresis* 16: 516-524.
- Cifuentes, A. y Poppe, H. (1997). Behavior of peptides in capillary electrophoresis: Effect of peptide charge, mass and structure. *Electrophoresis*, 18: 2362-2376.
- Cobb, K. A.; Dolnik, V. y Novotny, M. (1990). Electrophoretic Separations of Proteins in Capillaries with Hydrolytically Stable Surface Structures. *Anal. Chem.* 62: 2478-2483.
- Colton, I. J.; Anderson, J. R.; Gao, J.; Chapman, R. G.; Isaacs, L. y Whitesides, G. M. (1997). Formation of Protein Charge Ladders by Acylation of Amino Grpoups on Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 12701-12709.
- Compton, B. J. (1991). Electrophoretic mobility modeling of proteins in free zone electrophoresis and its application to monoclonal antibody microheterogeneity analysis. *J. Chromatogr.* 559: 357-366.
- Compton, B. J. y O'Grady, E. A. (1991). Role of Charge Suppression and Ionic Strength in Free Zone Electrophoresis of Proteins. *Anal. Chem.* 63: 2597-2602.
- Conradi, S.; Vogt, C. y Rohde, E. (1997). Separation of Enantiomeric Barbiturates by Capillary Electrophoresis Using a Cyclodextrin-Containing Run Buffer. *Journal of Chemical Education*, 74: 1122-1125.
- Copper, C. L.; Davis, J. B.; Cole, R. O. y Sepaniak, M. J. (1994). Separations of derivatized amino acid enantiomers by cyclodextrin modified capillary electrophoresis: mechanistic and molecular modeling studies. *Electrophoresis* 15: 785-792.
- Corradini, D.; Cogliandro, E.; D'Alessandro, L. y Nicoletti, I. (2003). Influence of electrolyte composition on the electroosmotic flow and electrophoretic mobility of proteins and peptides. *J. Chromatogr. A.* 1013: 212-232.
- Córdoba, E.; Gao, J. y Whitesides, G. M. (1997). Noncovalent Polycationic Coatings for Capillaries in Capillary Electrophoresis of Proteins. *Anal. Chem.*, 69: 1370-1379.
- Cottet, H. y Gareil, P. (2000). From small charged molecules to oligomers: A semiempirical approach to the modeling of actual mobility in free solution. *Electrophoresis* 21: 1493-1504.

- Cotton, F.; Lin, Ch.; Fontaine, B.; Gulbis, B.; Janssens, J.; y Vertongen, F. (1999). Evaluation of a Capillary Electrophoresis Method for Routine Determination of Hemoglobins A<sub>2</sub> and F. *Clin. Chem.* 45: 237-243.
- Coufal, P.; Zuska, J.; van de Goor, T.; Smith, V. y Gaš, B. (2003). Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* 24: 671-677.
- Crank, J. (1976). *The Mathematics of Difusión*. Claredon Press, Oxford.
- Creighton, T. E. (1992). *Protein Folding*, W. H. Freeman and Company, New York.
- Creighton, T. E. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W. H. Freeman and Company, New York.
- Cross, R. F. y Cao J. (1997). Salt effects in capillary zone electrophoresis I. Dependence of electrophoretic mobilities upon the hydrodynamic radius. *J. Chromatogr. A* 786: 171-180.
- Cross, R. F. y Garnham, N. F. (2001). The Problem with the Offord Equation: Hydration –a Statistical Investigation of the Effect of Charge Size and Confirmation of the Effect of Charge Distribution upon Electrophoretic Mobilities. *Chromatographia*, 54: 639-646.
- Cross, R. F. y Wong, M. G. (2001). Objective Testing for the Dependence of Electrophoretic Mobilities Upon Size in Capillary Zone Electrophoresis. *Chromatographia* 53: 431-436.
- Cross, R. F. y Wong, M. G. (2002a). Electrophoretic mobilities and migrating analytes: Part 1: Relationships. *J. Cap. Elec. and Microchip Tech.* 7: 119-124.
- Cross, R. F. y Wong, M. G. (2002b). Electrophoretic mobilities and migrating analytes: Part 2: Hydration. *J. Cap. Elec. and Microchip Tech.* 7: 125-128.
- Cross, R. F. y Wong, M. G. (2003a). Aqueous Capillary Electrophoresis of Peptides. Part 1: Conformational States, Volumes and Estimates of the Extent of Hydration. *Chromatographia* 58: 427-437.
- Cross, R. F. y Wong, M. G. (2003b). Aqueous Capillary Electrophoresis of Peptides. Part 2: An Investigation of Quantitative Determinants of Hydration and Solvation Relationships. *Chromatographia* 58: 439-447.
- Das, T. K.; Mazumdar, S. y Mitra, S. (1998) Characterization of a partially unfolded structure of cytochrome c induced by sodium dodecyl sulphate and the kinetics of its refolding. *Eur. J. Biochem.* 254: 662-670.
- Delinger, S. L. y Davis, J. M. (1992). Influence of Analyte Plug Width on Plate Number in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 64: 1947-1959.

- De Lorenzi, E.; Grossi, S.; Massolini, G.; Giorgetti, S.; Mangione, P., Andreola, A., Chiti, F., Bellotti, V., Caccialanza, G. (2002). Capillary electrophoresis investigation of a partially unfolded conformation of  $\beta_2$ - microglobulin. *Electrophoresis* 23: 918-925.
- Demchuck, E. y Wade, R. C. (1996). Improving the Continuum Dielectric Approach to Calculating  $pK_{as}$  of Ionizable Groups in Proteins. *J. Phys. Chem.* 100: 17373-17387.
- Deyl, Z. y Rohlicek, V. (1989). Separation of Collagens by Capillary Zone Electrophoresis. *J. Chromatogr.* 480: 371-378.
- Dias, L. G.; Florenzano, F. H.; Reed, W. F.; Baptista, M. S.; Souza, S. M. B.; Alvarez, E. B.; Chaimovich, H.; Cuccovia, I. M.; Amaral, C. L. C.; Brasil, C. R.; Romsted, L. S. y Politi, M. J. (2002). Effect of Urea on Biomimetic Systems: Neither Water 3-D Structure Rupture nor Direct Mechanism, Simply a More "Polar Water". *Langmuir* 18: 319-324.
- Dobrynin, A. V.; Colby, R. H.; Rubinstein, M. (2004). Polyampholytes. *J. Polym. Sci. Part B, Polym. Phys.* 42: 3513-3538.
- Doelman, C. J. A.; Siebelder, C. W. M.; Nijhof, W. A.; Weykamp, C. W.; Janssens, J. y Penders, T. J. (1997). Capillary electrophoresis system for hemoglobin A<sub>1c</sub> determinations evaluated. *Clin. Chem.* 43: 644-648.
- Dolník, V. y Dolníková, J. (1995). Capillary zone electrophoresis of organic acids in serum of critically ill children. *J. Chromatogr. A* 716: 269-277.
- Dolník, V. (1999). Recent developments in capillary zone electrophoresis of proteins. *Electrophoresis* 20: 3106-3115.
- Dose, E. V. y Giochon, G. A. (1991). High-Resolution Modeling of Capillary Zone Electrophoresis and Isotacophoresis. *Anal. Chem.* 63: 1063-1072.
- Durchschlag, H. y Zipper, P. (2002). Modeling of protein hydration. *J. Phys. Condens. Matter* 14: 2439-2452.
- Durchschlag, H. y Zipper, P. (2004). Modeling the hydration of proteins at different pH values. *Progr. Colloid Polym. Sci.* 127: 98-112.
- Edinger, S. R.; Cortis, C.; Shekin, P. S. y Friesner, R. A. (1997). Solvation Free Energies of Peptides: Comparison of Approximate Continuum Solvation Models with Accurate Solution of the Poisson-Boltzmann Equation. *J. Phys. Chem. B* 101: 1190-1197.
- Elcock, A. H. (1999). Realistic Modeling of the Denatured States of Proteins Allows Accurate Calculations of the pH Dependence of Protein Stability. *J. Mol. Biol.* 294: 1051-1062.
- El Rassi, Z. (1996). High Performance Capillary Electrophoresis of Carbohydrates. Beckman Instruments, Inc. USA. Volume VIII, pp. 1-102.

- Engelhardt, H. y Grosche, O. (2000). Capillary Electrophoresis in Polymer Analysis. *Adv. Polym. Sci.* 150: 189-217.
- Ermakov, S. V. y Righetti, P. G. (1994). Computer simulation for capillary zone electrophoresis. A quantitative approach. *J. Chromatogr. A* 667: 257-270.
- Ermakov, S. V.; Jacobson, S. C. y Ramsey, J. M. (1998). Computer Simulations of Electrokinetic Transport in Microfabricated Channel Structures. *Anal. Chem.* 70: 4494-4504.
- Erny, G. L.; Bergström, E. T.; y Goodall, D. M. (2001). Predicting Peak Shape in Capillary Zone Electrophoresis: a Generic Approach to Parametrizing Peaks Using the Haarhoff-Van der Linde (HVL) Function. *Anal. Chem.* 73: 4862-4872.
- Evans, F. F. y Wennerström, H. (1999). *The Colloidal Domain*, Wiley-VCH, New York, pp. 127-130.
- Everaerts, F. M. , Beckers, J. L. y Verheggen, Th. P. E. M. (Eds.). 1976. *Isotachopheresis-Theory, Instrumentation and Applications*. J. Chromatogr. Library, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York. USA.
- Fabre, H. y Altria, K. D. (2001). *Validating CE methods for Pharmaceutical Analysis*. Reprinted from LC-GC Europe - May 2001.
- Fan, Z. H.; Jensen, P. K.; Lee, C. S.; King, J. (1997). Monitoring the refolding pathway for a large multimeric protein using capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 769: 315-323.
- Farkova, M.; Pena.-Mendez, E. M. y Havel, J. (1999). Use of artificial neural networks in capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.* 848: 365-374.
- Fennema, O. (1977). In: Whitaker J. R., Tannenbaum S. R. (Eds.). *Food Proteins*, AVI Publishing Co., Inc., Connecticut, pp. 50-90.
- Fisher, W. R.; Taniuchi, H. y Anfinsen, C. B. (1972). On the Role of Heme in the Formation of the Structure of Cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 248: 3188-3195.
- Fitch, C. A.; Karp, D. A.; Lee, K. K.; Stites, W. E.; Lattman, E. E. y García- Moreno E., B. (2002). Experimental pK<sub>a</sub> Values of Buried Residues: Analysis with Continuum Methods and Role of Water Penetration. *Biophys. J.* 82: 3289-3304.
- Fitch, C. A.; Whitten, S. T.; Hilser, V. J. y García-Moreno E., B. (2006). Molecular Mechanisms of pH-Driven Conformational Transitions of Proteins: Insights from Continuum Electrostatics Calculations of Acid Unfolding. *Proteins* 63: 113-126.
- Flory, P. J. (1969). *Statistical Mechanics of Chain Molecules*, Interscience Publishers, a division of John Wiley & Sons, New York, pp 248-255.

- Foret, F.; Deml, M. y Bocek, P. (1988). Capillary Zone Electrophoresis-Quantitative Study of the Effects of Some Dispersive Processes on the Separation Efficiency. *J. Chromatogr.* 452: 601-613.
- Foygel, K.; Spector, Y.; Chatterjee, S. y Kahn, P. (1995). Volume changes of the molten globule transitions of horse heart ferricytochrome *c*: A thermodynamic cycle. *Protein Science* 4: 1426-1429.
- Friedberg, M. A.; Hinsdale, M y Shigabi, Z. K. (1997). Effect of pH and ions in the sample on stacking in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 781: 35-42.
- Friedl, W. y Kenndler, E. (1993). Resolution as a Function of the pH of the Buffer Based on the Analyte Charge Number for Multivalent Ions in Capillary Zone Electrophoresis without Electroosmotic Flow: Theoretical Prediction and Experimental Evaluation. *Anal. Chem.* 65: 2003-2009.
- Friedl, W. y Kenndler, E. (1994). Limitations of the optimization of the resolution by the buffer pH in capillary zone electrophoresis. *Fresenius J. Anal. Chem.* 348: 576-582.
- Friedl, W.; Reijenga, J. C. y Kenndler, E. (1995). Ionic strength and charge number correction for mobilities of multivalent organic anions in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 709: 163-170.
- Galliano, M.; Minchiotti, L.; Iadarola, P.; Ferri, G.; Zapponi, M. C. y Castellani, A. A., (1988). *FEBS Lett.* 233: 100-104.
- Galliano, M.; Minchiotti, L.; Porta, F.; Rossi, A.; Ferri, G.; Madison, J.; Watkins, S. y Putnam, F.W. (1990). Mutations in genetic variants of human serum albumin found in Italy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8721-8725.
- Galliano, M.; Minchiotti, L.; Iadarola, P.; Stoppini, M.; Giagnoni, P.; Watkins, S.; Madison, J. y Putnam, F. W. (1993). *Biochim. Biophys. Acta* 1225: 27-32.
- Galliano, M.; Watkins, S.; Madison, J.; Putnam F. W.; Kragh-Hansen, U.; Cesati, R. y Minchiotti, L. (1998). Structural characterization of three genetic variants of human serum albumin modified in subdomains IIB and IIIA. *Eur. J. Biochem.* 251: 329-334.
- Galliano, M.; Kragh-Hansen, U.; Tarnoky, A. L.; Chapman, J. C.; Campagnoli, M. y Minchiotti, L. (1999). Genetic variants showing apparent hot-spots in the human serum albumin gene. *Clin. Chim. Acta* 289: 45-55.
- Gao, J.; Gomez, F. A.; Härter, R.; y Whitesides G. M. (1994). Determination of the effective charge of a protein in solution by capillary electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12027-12030.
- Gao, J. y Whitesides, G. M. (1997). Using Protein Charge Ladders To Estimate the Effective Charges and Molecular Weights of Proteins in Solution. *Anal. Chem.* 69: 575-580.

- García de la Torre, J.; Huertas, M. L. y Carrasco, B. (2000). Calculation of Hydrodynamic Properties of Globular Proteins from Their Atomic-Level Structure. *Biophys. J.* 78: 719-730.
- Gaš, B.; Stedry, M. y Kenndler, E. (1995). Contribution of the electroosmotic flow to peak broadening in capillary zone electrophoresis with uniform zeta potential. *J. Chromatogr. A* 709: 63-68.
- Gaš, B.; Stedry, M. y Kenndler, E. (1997). Peak broadening in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 18: 2123-2133.
- Gaš, B.; Coufal, P.; Jaroš, M.; Muzikář, J.; y Jelínek; I. (2001). Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis I. Mathematical and computational model. *J. Chromatogr. A* 905: 269-279.
- Gaš, B.; Jaroš, M.; Hruška, V.; Zuskova, I. y Stedry, M. (2005). Peak-Master –A Freeware Simulator of Capillary Zone Electrophoresis. *LC·GC Europe* 18: 282-288.
- Gassner, B.; Friedl, W. y Kenndler, E. (1994). Wall adsorption of small anions in capillary zone electrophoresis induced by cationic trace constituents of the buffer. *J. Chromatogr. A* 680: 25-31.
- Gaus, H. J.; Beck-Sickinger, A. G. y Bayer, E. (1993). Optimization of Capillary Electrophoresis of Mixtures of Basic peptides and Comparison with HPLC. *Anal. Chem.* 65: 1399-1405.
- Gebauer, P. y Boček, P. (1997). System peaks in capillary zone electrophoresis. I. Simple model of vacancy electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 772: 73-79.
- Gelfi, C.; Righetti, P. G.; Magnani, C.; Cremonesi, L. y Ferrari, M. (1994). Simultaneous detection of  $\Delta F508$ , G542X, N1303K and 1717.1G---A mutations in cystic fibrosis by capillary electrophoresis in polymer networks. *Clin. Chim. Acta* 229: 181-189.
- Ghosal, S. (2006). Electrokinetic Flow and Dispersion in Capillary Electrophoresis. *Annu. Rev. Fluid Mech.* 38: 309-338.
- Gisler, T.; Schultz, S. F.; Borkovec, M.; Sticher, H.; Schurtenberger, P.; D'Aguanno, B. y Klein, R. (1994). Understanding Colloidal Charge Renormalization from Surface Chemistry: Experiment and Theory. *J. Chem. Phys.* 101: 9924-9936.
- Gitlin, I., Mayer, M. y Whitesides, G. M. (2003). Significance of Charge Regulation in the Analysis of Protein Charge Ladders. *J. Phys. Chem. B* 107: 1466-1472.
- Gitlin, I.; Carbeck, J. D. y Whitesides, G. M. (2006). Why Are Proteins Charged? Networks of Charge-Charge Interactions in Proteins Measured by Charge Ladders and Capillary Electrophoresis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45: 3022-3060.

- Green, J. S. y Jorgenson, J. W. (1989). Minimizing Adsorption of Proteins on Fused Silica in Capillary Zone Electrophoresis by the Addition of Alkali Metal Salts to the Buffer. *J. Chromatogr.* 478: 63-70.
- Griffiths, S. K. y Nilson, R. H. (2000). Electroosmotic Fluid Motion and Late-Time Solute transport for Large Zeta Potentials. *Anal. Chem.* 72: 4767-4777.
- Grigsby, J. J.; Blanch, H. W. y Prausnitz, J. M. (2000). Diffusivities of Lysozyme in Aqueous MgCl<sub>2</sub> Solutions from Dynamic Light-Scattering Data: Effect of Protein and Salt Concentrations. *J. Phys. Chem.* 104: 3645-3650.
- Gross, R. J. y Osterle, J. F. (1968). Membrane Transport Characteristics of Ultrafine Capillaries. *J. Chem. Phys.* 49: 228-234.
- Grossman, P. D.; Colburn, J. C. y Lauer, H. H. (1989a). A Semiempirical Model for the Electrophoretic Mobilities of Peptides in Free-Solution Capillary Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 179: 28-33.
- Grossman, P. D.; Colburn, J. C.; Lauer, H. H.; Nielsen, R. G.; Riggin, R. M.; Sittampalam, G. S. y Rickard, E. C. (1989b). Application of Free-Solution Capillary Electrophoresis to the Analytical Scale Separation of Proteins and Peptides. *Anal. Chem.* 61: 1186-1194.
- Grossman, P. D.; Colburn, J. C. (Eds.) (1992). *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Grushka, E.; McCormick, R. M. y Kirkland, J. J. (1989). Effect of Temperature Gradients on the Efficiency of Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Chem.* 61: 241-246.
- Gudiksen, K. L.; Gitlin, I.; Moustakas, D. T. y Whitesides, G. M. (2006). Increasing the net Charge and Decreasing the Hydrophobicity of Bovine Carbonic Anhydrase Decreases the Rate of Denaturation with Sodium Dodecyl Sulfate. *Biophys. J.* 91: 298-310.
- Guttman, A.; Cohen, A. S.; Heiger, D. N. y Karger, B. L. (1990). Analytical and Micropreparative Ultrahigh Resolution of Oligonucleotides by Polyacrylamide Gel High-Performance Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 62: 137-141.
- Guzman, N. A.; Trebilcock, M. A. y Advis, J. P. (1991). The use of a concentration step to collect urinary components separated by capillary electrophoresis and further characterization of collected analytes by mass spectrometry. *J. Liq. Chromatogr.* 14: 997-1015.
- Guzman, N. A. (Ed.) (1993). *Capillary Electrophoresis Technology*, Marcel Dekker, New York.
- Guzman, N. A.; Park, S. S.; Schaufelberger, D.; Hernandez, L.; Paez, X.; Rada, P.; Tomlinson, A. J.; y Naylor, S. (1997). New approaches in clinical chemistry: on-line analyte concentration and microreaction capillary electrophoresis for the determination of

drugs, metabolic intermediates, and biopolymers in biological fluids. *J. Chromatogr. B* 697: 37-66.

- Guzman, N. A. y Stubbs, R. J. (2001). The use of selective adsorbents in capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyte preconcentration and microreactions: A powerful three-dimensional tool for multiple chemical and biological applications. *Review. Electrophoresis* 22: 3602-3628.

- Hage, D. S.; Chattopadhyay, A.; Wolfe, C. A. C.; Gundman, J. y Kelter, P. B. (1998). Determination of Nitrate and Nitrite in Water by capillary Electrophoresis. An Undergraduate Laboratory Experiment. *J. Chem. Educ.* 75: 1588-1594.

- Hagihara, Y.; Tan, Y. y Goto, Y. (1994). Comparison of the Conformational Stability of the Molten Globule and Native States of Horse Cytochrome c. *J. Mol. Biol.* 237: 336-348.

- Happel, J. y Brenner, H. (1965). *Low Reynolds number hydrodynamics*, Printice Hall, Inc, Englewood Cliffs, New Jersey, pp. 205-207.

- Haque, A. y Stewart, J. T. (1999). Simultaneous determination of codeine, caffeine, butalbital, and aspirin by free solution capillary electrophoresis. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 22: 1193-1204.

- Healy T. W. y White, L. R. (1978). Ionizable Surface Group Models of Aqueous Interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* 9: 303-345.

- Hearn, M. T. W.; Keah, H. H.; Boysen, R. I.; Messana, I.; Misiti, F.; Rosetti, D. V.; Giardina, B. y Castagnola, M. (2000). Determination of Biophysical Parameters of Polypeptide Retro- Inverso Isomers and Their Analogues by Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 72: 1964-1972.

- Heegaard, N.; Nilsson, S. y Guzman, N. (1998). Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments. *J. Chromatogr. B* 715: 29-54.

- Heegaard, N. H. H.; Sen, J. W. y Nissen, M. H. (2000). Congophilicity (Congo red affinity) of different  $\beta_2$ -microglobulin conformations characterized by dye affinity capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 894: 319-327.

- Heiger, D. N. (1992). *High Performance Capillary Electrophoresis- An Introduction*. Hewlett-Packard Company (Germany). Publication Number 12-5091-6199E, pp. 1-137.

- Hempel, G. (2000). Strategies to improve the sensitivity in capillary electrophoresis for the analysis of drugs in biological fluids. *Electrophoresis* 21: 691-698.

- Hempel, G. (2003). Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41: 720-723.

- Henry, D. C. (1931). The cataphoresis of suspended particles. Part I . The equation of cataphoresis. *Proc. Roy. Soc. A* 133: 106-129.

- Henskens, Y.; de Winter, J.; Pekelharing, M. y Ponjee, G. Detection and identification of monoclonal gammopathies by capillary electrophoresis. (1998). *Clin. Chem.* 44: 1184-1190.
- Hernandez, L.; Escalona, J.; Verdeguer, P. y Guzman, N. A. (1993a). In vivo monitoring of brain glutamate by microdialysis coupled to capillary electrophoresis and laser induced fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography* 16: 2149-2160.
- Hernandez, L.; Joshi, N.; Murzi, E.; Verdeguer, P.; Mifsud, J. C. y Guzman, N. (1993b). Collinear laser-induced fluorescence detector for capillary electrophoresis. Analysis of glutamic acid in brain dialysates. *J. Chromatogr. A* 652: 399-405.
- Hernandez, L.; Tucci, S.; Guzman, N. y Paez, X. (1993c). In vivo monitoring of glutamate in the brain by microdialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 652: 393-398.
- Hess, B. y van der Vegt, N. F. A. (2006). Hydration Thermodynamic Properties of Amino Acid Analogues. A Systematic Comparison of Biomolecular Force Fields and Water Models. *J. Phys. Chem. B* 110: 17616-17626.
- Hewlett-Packard Instrument Guide (CD-ROM, Plate 010-023: CE Basics, Fundamental Expressions), 2000.
- Hilser, V. J.; Worosila, G. D. y Freire, E. (1993). Analysis of Thermally Induced Protein Folding/Unfolding Transitions Using Free Solution Capillary Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 208: 125-131.
- Hilser, V. J. y Freire, E. (1995). Quantitative Analysis of Conformational Equilibrium Using Capillary Electrophoresis: Applications to Protein Folding. *Anal. Biochem.* 224: 465-485.
- Hilser, V. J. y Freire, E. (1997). Predicting the Equilibrium Protein Folding Pathway: Structure-Based Analysis of Staphylococcal Nuclease. *Proteins* 27: 171-183.
- Hilser, V. J.; García-Moreno E., B.; Oas, T. G.; Kapp, G. y Whitten, S. T. (2006) A Statistical Thermodynamic Model of the Protein Ensemble. *Chem. Rev.* 106: 1545-1558.
- Hjertén, S. (1967). Free Zone Electrophoresis. *J. Chromatogr.* 9: 122-239.
- Hjertén, S. (1985). High-Performance Electrophoresis-Elimination of Electroendosmosis and Solute Adsorption. *J. Chromatogr.* 347: 189-198.
- Kobold, U.; Jeppsson, J-O; Dülffer, T.; Finke, A.; Hoelzel, W. y Miedema; K. (1997). Candidate reference methods for hemoglobin A<sub>1c</sub> based on peptide mapping. *Clin. Chem.* 43: 1944-1951.
- Hoang, M. P.; Baskin, L. B. y Wians F. H. Jr. (1999). Bisalbuminuria in an adult with bisalbuminemia and nephrotic syndrome. *Clin. Chim. Acta* 284: 101-107.

- Hopfinger, A. J. (1977). *Intermolecular Interactions and Biomolecular Organization*, Wiley, New York.
- Hopkins, D. L. y McGuffin, V. L. (1998). Three -Dimensional Molecular Simulation of Electrophoretic Separations. *Anal. Chem.* 70: 1066-1075.
- Hu, S. (2001). Capillary sodium dodecyl sulfate-DALT electrophoresis of proteins in a single human cancer cell. *Electrophoresis* 22: 3677-3682.
- Hu, S. (2002). Capillary sodium dodecyl sulfate-DALT electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for size-based analysis of proteins in human colon cancer cells. *Electrophoresis* 23: 3136-3142.
- Hu, S. y Dovichi, N. J. (2002). Capillary Electrophoresis for the Analysis of Biopolymers. *Anal. Chem.* 74: 2833-2850.
- Hu, S.; Zhang, L.; Newitt, R.; Aebersold, R.; Kraly, J. R.; Jones, M.; y Dovichi, N. J. (2003). Identification of Proteins in Single-Cell Capillary Electrophoresis Fingerprints Based on Comigration with Standard Proteins. *Anal. Chem.* 75: 3502-3505.
- Huang, X.; Coleman, W. F. y Zare, R. (1989). Analysis of Factors Causing Peak Broadening in Capillary Zone Electrophoresis. *J. Chromatogr.* 480: 95-110.
- Hudson, J. C.; Malcolm, M. J. y Golin, M. (1999). Advancements in Forensic Toxicology: CZE replaces GC/NPD as the screen of choice for basic drugs. *Application Information*, Beckman Coulter, USA.
- Hunter, R. J. (1992). *Foundations of Colloids Science, Vol II*, Claredon Press, Oxford, pp. 720-756.
- Idei, M.; Kiss, E.; Dobos, Z.; Haligas, B.; Mészáros, G.; Hollósy, F. y Kéri, G. (2003). Separation of anti-tumor peptides by capillary electrophoresis in organic solvent containing background electrolytes. *Electrophoresis* 24: 829-833.
- Issaq, H. J.; Delviks, K.; Janini, G. M. y Muschik, G. M. (1992). Capillary Zone Electrophoretic Separation of Homovanillic and Vanillylmandelic Acids. *J. Liq. Chromatogr.* 15: 3193-3201.
- Issaq, H. J. y Chang, K. C. (1995). Separation and detection of amino acids and their enantiomers by capillary electrophoresis: A review. *Electrophoresis* 16: 467-480.
- Jaeggi-Groisman, S. E.; Byland C. y Gerber, H. (2000). Improved Sensitivity of Capillary Electrophoresis for Detection of Bisalbuminemia. *Clin. Chem.* 46: 882-883.
- Jalali-Heravi, M.; Shen, Y.; Hassanisadi, M. y Khaledi, M. G. (2005a). Artificial neural network modeling of peptide mobility and peptide mapping in capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1096: 58-68.

- Jalali-Heravi, M.; Shen, Y.; Hassanisadi, M. y Khaledi, M. G. (2005b). Prediction of electrophoretic mobilities of peptides in capillary zone electrophoresis by quantitative structure-mobility relationships using the Offord model and artificial neural networks. *Electrophoresis* 26: 1874-1885.
- Jandik, P. y Bonn, G. (1993). *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions*. VCH Publishers. New York, US.
- Janini, G. M.; Metral, C. J.; Isaaq, H. J.; y Muschik, G. M. (1999). Peptide mobility and peptide mapping in capillary zone electrophoresis. Experimental determination and theoretical simulation. *J. Chromatogr. A* 848: 417-433.
- Janini, G. M.; Metral, C. J.; Isaaq, H. J. (2001). Peptide mapping by capillary zone electrophoresis: How close is theoretical simulation to experimental determination. *J. Chromatogr. A* 924: 291-306.
- Jaroš, M.; Včeláková, K.; Zusková, I. y Gaš, B. (2002). Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis: II. Computer simulation and comparison with experiments. *Electrophoresis* 23: 2667-2677.
- Jaroš, M.; Hruška, V.; Štědrý, M.; Zusková, I. y Gaš, B. (2004). Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: IV. Computer program PeakMaster. *Electrophoresis* 25: 3080-3085.
- Jellum, E. (1994). Capillary Electrophoresis for medical diagnosis. *J. Cap. Elect.* 001:2, 97-105.
- Jenkins, M. A. y Guerin, M. D. (1995). Quantification of serum proteins using capillary electrophoresis. *Ann. Clin. Biochem.* 32: 493-497.
- Jenkins, M. A.; Kullinskaya, E.; Martin, H. D. y Guerin, M. D. (1995). Evaluation of serum protein separation by capillary electrophoresis: a prospective analysis of 1000 specimens. *J. Chromatogr.* 672: 241-251.
- Jensen, P. K.; Lee, C. S. y King, J. A. (1998). Temperature Effects on Refolding and Aggregation of a Large Multimeric Protein Using Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Chem.* 70: 730-736.
- Jia, Z. (2005). Physicochemical Profiling by Capillary Electrophoresis. *Current Pharmaceutical Analysis* 1: 41-56.
- Johansson, I. M.; Grön-Rydberg, M. B. y Schmekel, B. (1993). Determination of theophylline in plasma using different capillary electrophoretic systems. *J. Chromatogr. A* 52: 487-493.
- Jones, A. y Grushka, E. (1989). Nature of temperature gradients in capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.* 466: 219-225.

- Jonsson, M.; Carlson, J.; Jeppsson, J. O. y Simonsson, P. (2001). Computer-supported Detection of M-Components and Evaluation of Immunoglobulins after Capillary Electrophoresis. *Clin. Chem.* 47: 110-117.
- Jørgensen, C.; Ryder, R.; Steinø, A.; Højrup, P.; Hansen, J.; Beyer, H.; Heegaard, N. H. H. y Houen, G. (2003). Dimerization and oligomerization of the chaperone calreticulin. *Eur. J. Biochem.* 270: 4140-4148.
- Jorgenson, J. W. y Lukacs, K. D. (1981a). High Resolution Separations Based on Electrophoresis and Electroosmosis. *J. Chromatogr.* 218: 209-216.
- Jorgenson, J. W. y Lukacs, K. D. (1981b). Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries. *Anal. Chem.* 53: 1298-1302.
- Jorgenson, J. W. y Lukacs, K. D. (1983). Capillary Zone Electrophoresis. *Science* 222: 266-272.
- Jouyban, A.; Chan, H-K; Clark, B. J. y Kenndler, E. (2003). Comparison of different algorithms to calculate electrophoretic mobility of analytes as a function of binary solvent composition. *Electrophoresis* 24: 1596-1602.
- Jouyban, A. y Kenndler, E. (2006). Theoretical and empirical approaches to express the mobility of small ions in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 27: 992-1005.
- Kalambokis, G.; Kitsanou, M.; Kalogera, C.; Kolios, G.; Seferiadis, K. y Tsianos, E. (2002). Inherited Bisalbuminemia with Benign Monoclonal Gammopathy Detected by Capillary but not Agarose Gel electrophoresis. *Clin. Chem.* 48: 2076-2077.
- Kálmán, F.; Ma, S.; Hodel, A.; Fox, R. O. y Horváth, C. (1995a). Charge and size effects in the capillary zone electrophoresis of nuclease A and its variants. *Electrophoresis* 16: 595-603.
- Kálmán, F.; Ma, S.; Fox, R. O. y Horváth, C. (1995b). Capillary electrophoresis of S. nuclease mutants. *J. Chromatogr. A* 705: 135-154.
- Kao, Y. H.; Fitch, C. A.; Vhattacharya, S.; Sarkisian, C. J., Lecomte, J. T. J. y Garcia-Moreno E., B. (2000). Salt Effects on Ionization Equilibria of Histidines in Myoglobin. *Biophys. J.* 79: 1637-1654.
- Karplus, M. y Shakhnovich, E., in: Creighton, T. E. (Ed.), *Protein Folding*, W. H. Freeman and Company, New York, 1992, pp. 127-194.
- Kašička, V. y Prusik, Z. (1999). Application of capillary isotachopheresis in peptide analysis. *J. Chromatogr.* 569: 123-174.
- Kašička, V. (1999). Capillary electrophoresis of peptides. *Electrophoresis* 20: 3084-3105.
- Kašička, V. (2001). Recent advances in capillary electrophoresis of peptides. *Electrophoresis* 22: 4139-4162.

- Kašička, V. (2006). Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides. *Electrophoresis* 27: 142-175.
- Kataoka, Y.; Makino, K. y Oishi, R. (1998). Capillary electrophoresis for therapeutic drug monitoring of antiepileptics. *Electrophoresis* 19: 2856-2860.
- Kawahara, K. y Tanford, C. (1966). Viscosity and Density of Aqueous Solutions of Urea and Guanidine Hydrochloride. *J. Biol. Chem.* 241: 3228-3232.
- Kenndler, E. y Gassner, B. (1990). Cluster analysis applied to the selection and combination of buffering electrolyte systems used for capillary electrophoresis of anions with water or methanol as solvents. *Anal. Chem.* 62: 431-436.
- Kenndler, E. y Friedl, W. (1992). Adjustment of resolution and analysis time in capillary zone electrophoresis by varying the pH of the buffer. *J. Chromatogr.* 608: 161-170.
- Kenndler, E. (1996). Effect of electroosmotic flow on selectivity, efficiency, and resolution in capillary zone electrophoresis expressed by the dimensionless reduced mobility. *J. Cap. Elec.* 003:4, 191-198.
- Kenndler, E. (1998a). Theory of Capillary Zone Electrophoresis, in "High Performance Capillary Electrophoresis", Khaledi, M. G (Ed.). Chemical Analysis Series, 146, John Wiley & Sons, Inc. N. Y., USA, Cap. 2, pp. 25-76.
- Kenndler, E. (1998b). Dependence of Analyte Separation on Electroosmotic Flow in Capillary Zone Electrophoresis: Quantitative Description by the Reduced Mobility. *J. Microcolumn Separations* 10: 273-279.
- Kenndler-Blachkolm, K.; Popelka, S.; Gaš, B. y Kenndler, E. (1996). Apparent baseline irregularities for neutral markers in capillary zone electrophoresis with electroosmotic flow. *J. Chromatogr. A* 734: 351-356.
- Khun, R. y Hoffstetter-Khun, S. (1993). *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, Germany.
- Kilár, F. y Hjertén, S. (1993). Unfolding of human serum transferrin in urea studied by high-performance capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* 638: 269-276.
- Kim, S.; Yoo, H. J. y Hahn, J. H. (1996). Postelectrophoresis Capillary Scanning Method for DNA Sequencing. *Anal. Chem.* 68, 936-939.
- Kim, S. y Baum, J. (1998). Electrostatic interactions in the acid denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin determined by NMR. *Protein Sci.* 7: 1930-1938.
- Kim, J.; Zand, R. y Lubman, D. M. (2002). Electroporetic mobility for peptides with post-translational modifications in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 23: 782-793.
- Kleparniak, K. y Boček, P. (1991). Theoretical Background for Clinical and Biomedical Applications of Electromigration Techniques. *J. Chromatogr.* 569: 3-42.

- Knox, J. (1988). Thermal Effects and Band Spreading in Capillary Electro-Separation. *Chromatographia* 26: 329-337.
- Kobayashi S.; Okamura N.; Kamoi K. y Sugita O. (1995). Bisalbumin (fast and slow type) induced by human pancreatic juice. *Ann. Clin. Biochem.* 32: 63-67.
- Kohlrausch, F. (1897). Ueber Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen. *Ann. Phys. Chem.* 62: 209-239.
- Koval, D.; Kašička, V.; Jiráček, J. y Collinsová, M. (2003). Physicochemical characterization of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis in highly acidic background electrolytes. *Electrophoresis* 24: 774-781.
- Koval, D.; Kašička, V. y Zusková, I. (2005). Investigation of the effect of ionic strength of Tris-acetate background electrolyte on electrophoretic mobilities of mono-, di-, and trivalent organic anions by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 26: 3221-3231.
- Kragh-Hansen, U.; Minchiotti, L.; Brennan, S. O. y Sugita, O. (1990). Hormone binding to natural mutants of human serum albumin. *Eur. J. Biochem.* 193: 169-174.
- Kragh-Hansen, U.; Brennan, S. O.; Galliano, M. y Sugita, O. (1990). Binding of warfarin, salicylate, and diazepam to genetic variants of human serum albumin with known mutations. *Mol. Pharmacol.* 37: 238-242.
- Kraly, J.; Fazal, M. A.; Schoenherr, R. M.; Bonn, R.; Harwood M. M.; Turner, E.; Jones, M. y Dovichi, N. J. (2006). Bioanalytical applications of capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 78: 4097-4110.
- Kuehner, D. E., Engmann, J., Fergg, F., Wernick, M., Blanch, H. W. y Prausnitz, J. M. (1999). Lysozyme Net Charge and ion Binding in Concentrated Aqueous Electrolyte Solutions. *J. Phys. Chem. B* 103: 1368-1374.
- Kunkel, A.; Günter, S.; Dette, C. y Wätzig, H. (1997). Quantitation of insulin by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. Method comparison and validation. *J. Chromatogr. A* 781: 445-455.
- Kuntz, I. D. (1971a) Hydration of Macromolecules. III. Hydration of Polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.* 93: 514-516.
- Kuntz, I. D. (1971b). Hydration of Macromolecules. IV. Polypeptide Conformation in Frozen Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 93: 516-518.
- Lambert, W. J. y Middleton, D. L. (1990). pH Hysteresis Effect with Silica Capillaries in Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Chem.* 62: 1585-1587.
- Latypov, R. F.; Cheng, H.; Roder, N. A.; Zhang, J. y Roder, H., (2006). Structural Characterization of an Equilibrium Unfolding Intermediate in Cytochrome c. *J. Mol. Biol.* 357: 1009-1025.

- Lee, K. J.; Heo, G. S.; Kim, N. J. y Moon, D. C. (1992a). Separation of theophylline and its analogues by micellar electrokinetic chromatography: application to the determination of theophylline in human plasma. *J. Chromatogr.* 577: 135-141.
- Lee, K. J.; Heo, G. S.; Kim, N. J. y Moon, D. C. (1992b). Analysis of antiepileptic drugs in human plasma using micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr.* 608: 243-250.
- Lee, T. T. y Yeung, E. S. (1992). Quantitative Determination of Native Proteins in Individual Human Erythrocytes by Capillary Zone Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. *Anal. Chem.* 64: 3045-3051.
- Lee, K. J.; Lee, J. J. y Moon, D. C. (1994). Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for monitoring of hippuric and methylhippuric acid in human urine. *Electrophoresis*, 15: 98-102.
- Lee, K. K.; Fitch, C. A. y García-Moreno, E. B. (2002a). Distance dependence and salt sensitivity of pairwise, coulombic interactions in a protein. *Protein Science*, 11: 1004-1016.
- Lee, K. K.; Fitch, C. A.; Lecomte, J. T. J. y García-Moreno E., B. (2002b). Electrostatic Effects in Highly Charged Proteins: Salt Sensitivity of  $pK_a$  Values of Histidines in Staphylococcal Nuclease. *Biochemistry* 41: 5656-5667.
- Lehmann, R.; Liebich, H. M. y Voelter, W. (1996). Application of capillary electrophoresis in clinical chemistry - Developments from preliminary trials to routine analysis. *J. Cap. Elec.* 003: 2, 89-110.
- Lehninger, A. L. (1978). *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.* Ed. Omega, Barcelona, España.
- Levine, I. N. (1991). *Physical Chemistry*, Mc-Graw-Hill/ Interamericana S. A., Madrid, pp. 458-460.
- Levinthal, C. (1968). Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.* 65: 44-45.
- Levitt, M. (1976). A Simplified Representation of Protein Conformations for Rapid Simulation on Protein Folding. *J. Mol. Biol.* 104: 59-107.
- Li, D.; Fu, S. y Lucy, C. A. (1999). Prediction of Electrophoretic Mobilities. 3. Effect of Ionic Strength in Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Chem.* 71: 687-699.
- Lide, D. R., in: Lide, D. R. (Ed.), *CRC Handbook Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton 1991, p. 39.
- Liepinsh E. y Otting, G. (1994). Specificity of Urea Binding to Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 9670-9674.

- Lin, C. E; Liao, W. S; Chen, K. H y Lin, W. Y. (2003). Influence of pH on electrophoretic behavior of phenothiazines and determination of pKa values by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 24: 3154-3159.
- Linderstrøm-Lang, K. C. (1924). The ionization of proteins. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* 15: 1-29.
- Liu, J.; Dolnik, V.; Hsieh, Y. Z. y Novotny, M. (1992). Experimental Evaluation of the Separation Efficiency in Capillary Electrophoresis Using Open Tubular and Gel-Filled Columns. *Anal. Chem.* 64: 1328-1336.
- Liu, B. F; Zhang, J. F y Lu, Y. T. (2002). Predicting and evaluating separation quality of micellar electrokinetic capillary chromatography by artificial neural networks. *Electrophoresis*, 23: 1279-1284.
- Liu, D.; Wyttenbach, T.; Barran, P. E. y Bowers, M. T. (2003). Sequential Hydration of Small Protonated Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 8458-8464.
- Lucangioli, S. E.; Rodríguez, V. G.; Fernández Otero, G. C.; Vizioli, N. M. y Carducci, C. N. (1997). Development and validation of capillary electrophoresis methods for pharmaceutical dissolution assays. *J.Cap. Elec.* 004:1 27-31.
- Lucangioli, S. E.; Carducci, C.; Scioscia, S.; Carlucci, A.; Bregni, C. y Kenndler, E. (2003). Comparison of the retention characteristics of different pseudostationary phases for microemulsion and micellar electrokinetic chromatography of betamethasone and derivatives. *Electrophoresis* 24: 984-991.
- Luconi, M. O.; Olsina, R. A.; Fernández, L. P. y Silva, M. F. (2006). Determination of lead in human saliva by combined cloud point extraction-capillary zone electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Hazardous Materials* 128: 240-246.
- MacInnes, J. M. (2002). Computation of reacting electrokinetic flow in microchannels geometries. *Chem. Eng. Sci.* 57: 4539-4558.
- Madison, J.; Arai, K. Sakamoto, Y.; Feld, R. D.; Kyle, R. A.; Watkins, S.; Davis, E.; Matsuda, Y-I; Amaki, I. y Putnam, F. W. (1991). Genetic variants of serum albumin in Americans and Japanese. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9853-9857.
- Madison, J.; Galliano, M.; Watkins, S.; Minchiotti, L.; Porta, F.; Rossi, A. y Putnam, F. W. (1994). Genetic variants of human serum albumin in Italy: Points mutants and carboxyl-terminal variant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6476-6480.
- Malecek, J.; Hadasove, E. y Havel J. (1999). Capillary zone electrophoresis determination of perphenazine in pharmaceutical preparations and in human serum. *J. Cap. Elec.* 6: 151-155.
- Manabe, T. (1999). Capillary electrophoresis of proteins for proteomic studies. *Electrophoresis* 20: 3116-3121.

- Margni R. A.; Heer, E.; Acerbo, E.; Hajos, S.; Beliveau, M. y Bobbi, M. (1970). Immunochemical and genetic studies on two bisalbumenic families. *Clin. Chim. Acta* 29: 219-225.
- Mario, N.; Baudin, B.; Bruneel, A.; Janssens, J. y Vaubourddolle, M. (1999). Capillary Zone Electrophoresis for the Diagnosis of Congenital Hemoglobinopathies. *Clin. Chem.* 45: 285-288.
- Martell, A. E.; Smith, R. M. y Motekaitis, R. J., Update critical stability constant database, Chemical Engineering Department, Texas A&M University, College Station, Texas 1996.
- Martin, M. y Guiochon, G. (1984). Axial Dispersion in Open-Tubular Capillary Liquid Chromatography with Electroosmotic Flow. *Anal. Chem.* 56: 614-620.
- Martin, M., Guiochon, G., Walbroehl, Y. y Jorgenson, J. W. (1985). Peak Broadening in Open-Tubular Capillary Liquid Chromatography with Electroosmotic Flow. *Anal. Chem.* 57: 559-561.
- McGuffin, V. L. y Tavares, M. F. M. (1997). Computer-Assisted Optimization of Separations in Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Chem.* 69: 152-164.
- McKillop, A. G.; Smith, R. M.; Rowe, R. C. y Wren, S. A. C. (1999). Modeling and Prediction of Electrophoretic Mobilities in Capillary Electrophoresis: Separation of Alkylpyridines. *Anal. Chem.* 71: 497-503.
- Meagher, J. R.; Won, J. I.; McCormick, L. C.; Nedelcu, S.; Bertrand, M. M.; Bertram, J. L.; Drouin, G.; Barron, A. E. y Slater, G. W. (2005). End-labeled free solution electrophoresis of DNA. *Electrophoresis* 26: 331-350.
- Menon, M. K. y Zydney, A L. (1998). Measurement of Protein Charge and Ion Binding Using Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 70: 1581-1584.
- Menon, M. K. y Zydney, A L. (2000). Determination of Effective Protein Charge by Capillary Electrophoresis: Effects of Charge Regulation in the Analysis of Charge Ladders. *Anal. Chem.* 72: 5714-5717.
- Messana, I.; Rosetti, D. V.; Cassiano, L.; Misiti, F.; Giardina, B. y Castagnola, M. (1997). Peptide analysis by capillary (zone ) electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 699: 149-171.
- Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M. y Verheggen, Th. P. E. M. (1979a). Concentration Distributions in Free Zone Electrophoresis. *J. Chromatogr.* 169: 1-10.
- Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M. y Verheggen, Th. P. E. M. (1979b). High-Performance Zone Electrophoresis. *J. Chromatogr.* 169: 11-20.
- Miller, J. M.; Blackburn, A C.; Shi, Y.; Melzak A. J. y Ando, H. Y. (2002). Semi-empirical relationships between effective mobility, charge, and molecular weight of

pharmaceuticals by pressure-assisted capillary electrophoresis: Applications in drug discovery. *Electrophoresis*, 23: 2833-2841.

- Minárik, M.; Gas, B.; Rizzi, A. y Kenndler, E. (1995). Plate height contribution from wall adsorption in capillary zone electrophoresis of proteins. *J. Cap. Elec.* 002: 2, 89-97.

- Minchiotti, L.; Galliano, M.; Iadarola, P.; Stoppini, M.; Ferri, G. y Castellani, A. A. (1987). *Biochim. Biophys. Acta* 916: 411-418.

- Minchiotti, L.; Galliano, M.; Iadarola, P.; Zepponi, E. y Ferri, G. (1990). The molecular defect of albumin Castel di Sangro: 536 Lys ---- Glu. *Biochim. Biophys. Acta* 1039: 204-208.

- Minchiotti, L.; Galliano, M.; Stoppini, M.; Ferri, G.; Crespeau, H.; Rochu, D. y Porta, F. (1992). Two alloalbumins with identical electrophoretic mobility are produced by differently charged amino acid substitutions. *Biochim. Biophys. Acta* 1119: 232-238.

- Minchiotti, L.; Galliano, M.; Zapponi, M. C. y Tenni, R. (1993). *Eur. J. Biochem.* 214: 437-444.

- Minchiotti, L.; Galliano, M.; Kragh-Hansen, U.; Watkins, S.; Madison, J. y Putnam, F. W. (1995). A genetic variant of albumin (albumin Asola; Tyr140---Cys) no free -SH group but with an additional disulfide bridge. *Eur. J. Biochem.* Feb 15; 228: 155-159.

- Minchiotti, L.; Watkins, S.; Madison, J.; Putnam, F.; Kragh-Hansen, U.; Amoresano, A.; Pucci, P.; Cesati, R. y Galliano, M. (1997). Structural characterization of four genetic variants of human serum albumin associated with alloalbuminemia in Italy. *Eur. J. Biochem.* 247: 476-482.

- Minchiotti, L.; Kragh-Hansen, U.; Nielsen, H.; Hardy, E.; Mercier, A. Y. y Galliano, M. (1999). Structural characterization, stability and fatty acid-binding properties of two French genetic variants of human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* 1431: 223-231.

- Monnig, C. A. y Kennedy, R. T. (1994). Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 66: 280R-314R.

- Morales, F. J. (2002). Application of capillary zone electrophoresis to the study of food and food-model melanoidins. *Food Chemistry* 76: 363-369.

- Mosher, R. A.; Dewey, D.; Thormann, W.; Saville, D. A. y Bier, M. (1989). Computer Simulation and Experimental Validation of the Electrophoretic Behavior of Proteins. *Anal. Chem.* 61: 362-366.

- Mosher, R. A.; Gebauer, P.; Caslavská, J.; Thormann, W. (1992). Computer Simulation and Experimental Validation of the Electrophoretic Behavior of Proteins. 2. Model Improvement and Application to Isotachopheresis. *Anal. Chem.* 64: 2991-2997.

- Mosher, R. A.; Saville, D. A. y Thormann, W. (1992). *The Dynamics of Electrophoresis*, VCH Publishers: Weinheim, Germany.

- Mosher, R. A.; Gebauer, P. y Thormann, W. (1993). Computer simulation and experimental validation of the electrophoretic behavior of proteins. III. Use of titration data predicted by protein's amino acid composition. *J. Chromatogr.* 638: 155-164.
- Neel, J. V.; Satoh, C.; Goriki, K.; Fujita, M.; Takahashi, N.; Asakawa, J. I. y Hazama, R. (1986). The rate with which spontaneous mutation alters the electrophoretic mobility of polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 389-393.
- Negin, R. S. y Carbeck, J. D. (2002). Measurement of electrostatic interactions in protein folding with the use of protein charge ladders. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 2911-2916.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2001). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega S. A. Barcelona, p. 118.
- Nielsen, H.; Kragh-Hansen, U.; Minchiotti, L.; Galliano, M.; Brennan, S. O.; Tárnoky, A. L.; Franco, M. H. L. P.; Salzano, F. M. y Sugita, O. (1997). Effect of genetic variation on the fatty acid-binding properties of human serum albumin and proalbumin. *Biochim. Biophys. Acta* 1342: 191-204.
- Novotny, M. V.; Cobb, K. A. y Liu, J. (1990). Recent Advances in Capillary Electrophoresis of Proteins, Peptides and Amino Acids. *Electrophoresis* 11: 735-749.
- Novotny, M. V. (1996). Capillary electrophoresis. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 29-34.
- Nozaki, Y. y Tanford, C. (1967). Intrinsic Dissociation Constants of Aspartyl and Glutamyl Carboxyl Groups. *J. Biol. Chem.* 242: 4731-4735.
- Nuñez, M.; Ferguson, J. E.; Machacek, D.; Jacob, G.; Oda, R. P.; Lawson, G. M. y Landers, J. P. (1995). Detection of Hypoglucemic Drugs in Human Urine Using Micellar Electrokinetic Chromatography. *Anal. Chem.* 67: 3668-3675.
- O'Brien, R. W. y White, L. R. (1978). Electrophoretic Mobility of a Spherical Colloidal Particle. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 74: 1607-1626.
- Oefner, P. J. (1995). Surface-charge reversed capillary zone electrophoresis of inorganic and organic anions. *Electrophoresis* 16: 46-56.
- Offord, R. E. (1966). Electrophoretic mobilities of peptides on paper and their use in the determination of amide group. *Nature*: 211: 591-593.
- Otevre, M. y Klepárnik, K. (2002). Electroosmotic flow in capillary channels filled with nonconstant viscosity electrolytes: Exact solution of the Navier-Stokes equation. *Electrophoresis* 23: 3574-3582.
- Otsuka, K. y Terabe, S. (1989). Extra-column effects in high-performance capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* 480: 91-94.

- Palusinski, O. A.; Graham, A.; Mosher, R. A.; Bier, M. y Saville, D. A. (1986). Theory of Electrophoretic Separations. Part II: Construction of a Numerical Simulation Scheme and Its Applications. *AIChE J.* 32: 215-223.
- Panick, G.; Malessa, R.; Winter, R.; Rapp, G. Frye, K. J. y Royer, C. A. (1998). Structural Characterization of the Pressure-denatured State and Unfolding/Refolding Kinetics of Staphylococcal Nuclease by Synchrotron Small-angle X-ray Scattering and Fourier-transform Infrared Spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 275: 389-402.
- Park, H. J.; Choi, Y.; Lee, W. y Kim, K. R. (2004). Enantioseparation of aromatic amino acids and amino acids esters by capillary electrophoresis with crown ether and prediction of enantiomer migration orders by a three dimensional quantitative structure-property relationship/comparative field analysis model. *Electrophoresis* 25: 2755-2760.
- Parsons, M. T. y Koga, Y. (2005). Hydration number of glycine in aqueous solution: An experimental estimate. *J. Chem. Phys.* 123: 234504-1-6.
- Patankar, N. A. y Hu, H. H. (1998). Numerical Simulation of Electroosmotic Flow. *Anal. Chem.* 70: 1870-1881.
- Peach, R. J. y Brennan, S. O. (1991). Structural characterization of a glycoprotein variant of human serum albumin: Albumin Casebrook (494Asp---Asn). *Biochim. Biophys. Acta* 1097, 49-54.
- Peng, Z. L.; Qu, F.; Song, G. y Lin, J. M. (2005). Simultaneous separation of organomercury species by nonaqueous capillary electrophoresis using methanol containing acetic acid and imidazole. *Electrophoresis* 26: 3333-3340.
- Penn, S. G.; Bergström, E. T.; Goodall, D. M. y Loran J. S. (1994). Capillary electrophoresis with chiral selectors: optimization of separation and determination of thermodynamic parameters for binding of tioconazole enantiomers to cyclodextrins. *Anal. Chem.* 66: 2866-2873
- Perrett, D. (1999). Capillary electrophoresis in clinical chemistry. *Ann. Clin. Biochem.* 36: 133-150.
- Pesek, J. J. y Matyska, M. T. (1997). Determination of aspartame by high-performance capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 781: 423-428.
- Pesek, J. J.; Matyska, M. T.; Dawson, G. B.; Chen, J. I.; Boysen, R. I. y Hearn, M. T. (2004). Open tubular capillary electrochromatography of synthetic peptides on etched chemically modified columns. *Anal. Chem.* 76: 23-30.
- Petersen, C. E.; Scottolini, A. G.; Cody, L. R.; Mandel, M.; Reimer, N.; Bhagavan, N. V. (1994). *J. Med. Genet.* 31: 355-359.
- Petrini, C.; Alessio, M. G.; Scapellato, L.; Brambilla, S. y Franzini, C. (1999). Serum Proteins by Capillary Zone Electrophoresis: Approaches to the Definition of Reference Values. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37: 975-980.

- Piaggio, M. V. y Deiber, J. A. (2001). Modeling the electropherogram of capillary zone electrophoresis. Proceedings of the Third Mercosur Congress on Process Systems Engineering and First Mercosur Congress on Chemical Engineering (ENPROMER), Vol. III, 1333-1339.
- Piaggio, M. V. y Deiber, J. A. (2003). Modeling the Electropherogram of Small Charged Molecules in Capillary Zone Electrophoresis. *Lat. Am. Appl. Res.* 33: 261-268.
- Piaggio, M. V. y Deiber, J. A. (2004). Estimación de la carga efectiva de proteínas mediante electroforesis capilar por zona. Análisis de la teoría de regulación de cargas. Acta de Congreso. XXV Congreso Argentino de Química, pp. 535-538.
- Piaggio, M. V.; Peirotti, M. B. y Deiber, J. A. (2005a). Effect of background electrolyte on the estimation of protein hydrodynamic radius and net charge through capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 26: 3232-3246.
- Piaggio, M. V. y Deiber, J. A. (2005b). Analysis of globular protein denaturation through capillary zone electrophoresis. Proceedings of ARCHIPOL'2005: III Argentine-Chilean Polymer Symposium, VII Argentine Polymer Symposium y VII Chilean Symposium of Polymer Chemistry and Physical-Chemistry, pp. 351-352.
- Piaggio, M. V.; Peirotti, M. B. y Deiber, J. A. (2006a). Exploring the evaluation of net charge and hydrodynamic size and shape of peptides through experimental mobilities obtained from capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 27: 4631-4347.
- Piaggio, M. V. y Deiber, J. A. (2006b). Analysis and Stability of the Electroosmotic Flow in Capillary Zone Electrophoresis. Proceedings of International Symposium on Electrohydrodynamics, pp. 165-168.
- Piaggio, M. V.; Peirotti, M. B. y Deiber, J. A. (2007a). On the application of CZE to the study of protein denaturation. *Electrophoresis* 28: 2223-2234.
- Piaggio, M. V.; Peirotti, M. B. y Deiber, J. A. (2007b). Determination of the microenvironment-pH and charge and size characteristics of amino acids through their electrophoretic mobilities determined by CZE. *Electrophoresis* (en prensa).
- Picó, Y.; Rodríguez, R. y Mañes, J. (2003). Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. *Trends Anal. Chem.* 22: 133-151.
- Plasson, R. y Cottet, H. (2006). Determination and Modeling of Peptide  $pK_a$  by Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Chem.* 78: 5394-5402.
- Pola, V. y Tichý, M. (1985). Bisalbuminemia. Critical review and report of a case of an acquired form in a myeloma patient. *Folia. Haematol. Int. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch.* 112: 208-218.
- Poppe, H. (1990). Secondary equilibria and their interaction with chromatographic transport. *J. Chromatogr.* 506: 45-60.

- Poppe, H. (1992). Overloading and Interaction Phenomena in Electrophoretic Separations. *Anal. Chem.* 64: 1908-1919.
- Poppe, H., (1998). Theory of Capillary Zone Electrophoresis. *Adv. Chromatogr.* 38: 233-300.
- Porras, S. P.; Riekkola, M-L y Kenndler, E. (2001). Resolution in capillary electrophoresis with nonaqueous methanol as solvent: Theoretical prediction and experimental confirmation. *Electrophoresis* 22: 3798-3804.
- Porras, S. P.; Marziali, E.; Gas, B. Kenndler, E. (2003a). Influence of solvent on temperature and thermal peak broadening in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 24: 1553-1564.
- Porras, S. P.; Riekkola, M. L y Kenndler, E. (2003b). The Principles of Migration and Dispersion in Capillary Zone Electrophoresis in Nonaqueous Solvents. *Electrophoresis* 24: 1485-1498.
- Porras, S. P. y Kenndler, E. (2005a). Capillary electrophoresis in *N,N*-dimethylformamide. *Electrophoresis* 26: 3279-3291.
- Porras, S. P. y Kenndler, E. (2005b). Are the asserted advantages of organic solvents in capillary electrophoresis real? A critical discussion. *Electrophoresis* 26: 3203-3220.
- Potocek, B.; Gaš, B.; Kenndler, E. y Stedry, M. (1995). Electroosmosis in capillary zone electrophoresis with non-uniform zeta potential. *J. Chromatogr. A* 709: 51-62.
- Privalov, P. L., in: Creighton, T. E. (Ed.), *Protein Folding*, W. H. Freeman and Company, New York, 1992, pp. 83-125.
- Probstein, R. F. (1989). *Physicochemical Hydrodynamics. An Introduction*. Butterworths. New York, US. pp. 185-198.
- Purcell, A. W.; Aguilar, M-I y Hearn, M. T. W. (1993). High-Performance Liquid Chromatography of Amino Acids, Peptides, and Proteins. 123. Dynamics of Peptides in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 65: 3038-3047.
- Quang, C. y Khaledi, M. G. (1994). Prediction and optimization of the separation of metal cations by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *J. Chromatogr. A* 659: 459-466.
- Qiao, Z. S.; Guo, Z. Y. y Feng, Y. M. (2006). In vitro folding/unfolding of insulin/single-chain insulin. *Protein & Peptide Letters* 13: 423-429.
- Quigley W. W. y Dovichi, N. J. (2004). Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers. *Anal. Chem.* 76: 4645-4658.
- Rabiller-Baudry, M.; Bouguen, A.; Lucas, D. y Chaufer, B. (1998). Physico-chemical characterization of proteins by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 706: 23-32.

- Radko, S. P.; Weiss, G. H. y Chrambach, A. (1997). Protein band spreading in capillary zone electrophoresis. Effects of sample zone length and presence of polymer. *J. Chromatogr. A* 781: 277-286.
- Radko, S. P.; Stastna, M. y Chrambach, A. (2000). Size-Dependent Electrophoretic Migration and Separation of Liposomes by Capillary Zone Electrophoresis in Electrolyte Solutions of Various Ionic Strengths. *Anal. Chem.* 72: 5955-5960
- Rauen, H. M. (1964). *Biochemisches Taschenbuch*. (Ed.). Springer-Verlag. Berlin, pp. 78-80.
- Reijenga, J. C. y Kenddler, E. (1994a). Computational simulation of migration and dispersion in free capillary zone electrophoresis. I. Description of the theoretical model. *J. Chromatogr. A* 659: 403-415.
- Reijenga, J. C. y Kenddler, E. (1994b). Computational simulation of migration and dispersion in free capillary zone electrophoresis. II. Results of simulation and comparison with measurements. *J. Chromatogr. A* 659: 417-426.
- Reijenga, J. C. y Kašička, V. (1999). Dynamic computer simulations of the influence of injection conditions on capillary zone electrophoretic stacking of preparative free-flow zone electrophoresis fractions of peptides. *J. Chromatogr. A* 836: 129-136.
- Réjou-Michel A. ; Henry, F. ; de Villardi, M. y Delmotte, M. (1985). Protein and ion hydration variation in mixed aqueous solution: measurement by dielectric decrement. *Phys. Med. Biol.* 30: 831-837.
- Rice, C. L. y Whitehead, R. (1965). Electrokinetic Flow in a Narrow Cylindrical Capillary. *J. Phys. Chem.* 69: 4017-4024.
- Richards, F. M., in: Creighton, T. E. (Ed.), *Protein Folding*, W. H. Freeman and Company, New York, 1992, pp.1-81.
- Rickard, E. C.; Strohl, M. M. y Nielsen, R. G. (1991). Correlation of Electrophoretic Mobilities from Capillary Electrophoresis with Physicochemical Properties of Proteins and Peptides. *Anal. Biochem.* 197: 197-207.
- Riekkola, M-L.; Jönsson, J. A. y Smith, R. M. (2004). Terminology for Analytical Capillary Electromigration Techniques (IUPAC Recommendations 2003). *Pure Appl. Chem.* 76: 443-451.
- Righetti, P. G. y Nembri, F. (1997). Capillary electrophoresis of peptides in isoelectric buffers. *J. Chromatogr. A* 772: 203-211.
- Righetti, P. G.; Bossi, A.; Olivieri, E. y Gelfi, C. (1999). Capillary electrophoresis of peptides and proteins in acidic isoelectric buffers: recent developments. *J. Biochem. Biophys.* 40: 1-15.

- Righetti, P.G. (2001). Capillary Electrophoretic Analysis of Proteins and Peptides of Biomedical and Pharmacological Interest. *Biopharm. Drug Dispos.* 22: 337-351.
- Righetti, P. G. y Verzola, B. (2001). Folding/unfolding/refolding of proteins: Present methodologies in comparison with capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 22: 2359-2374.
- Righetti, P. G.; Gelfi, C. y D'Acunto, M. R. (2002). Recent progress in DNA analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 23: 1361-1374.
- Ro, K. W.; Chang, W. J.; Kim, H.; Koo, Y. M. y Hahn, J. H. (2003). Capillary electrochromatography and preconcentration of neutral compounds on poly(dimethylsiloxane) microchips. *Electrophoresis* 24: 3253-3259.
- Roberts, G. O.; Rhodes, P. H. y Snyder, R. S. (1989). Dispersion Effects in Capillary Zone Electrophoresis. *J. Chromatogr.* 480: 35-67.
- Rochu, D.; Ducret, G. y Masson, P. (1999a). Measuring conformational stability of proteins using an optimized temperature-controlled capillary electrophoresis approach. *J. Chromatogr. A* 838: 157-165.
- Rochu, D.; Ducret, G.; Ribes, F.; Vanin, S. y Masson, P. (1999b). Capillary zone electrophoresis with optimized temperature control for studying thermal denaturation of protein at various pH. *Electrophoresis* 20: 1586-1594.
- Rochu, D.; Pernet, T.; Renault, F.; Bon, C. y Masson, P. (2001). Dual effect of high electric field in capillary electrophoresis study of the conformational stability of Bungarus fasciatus. *J. Chromatogr. A*: 910, 347-357.
- Rochu, D. y Masson, P. (2002). Multiple advantages of capillary zone electrophoresis for exploring protein conformational stability. *Electrophoresis* 23: 189-202.
- Rochu, D.; Renault, F. y Masson, P. (2002). Detection of unwanted protein-bound ligands by capillary zone electrophoresis: The case of hidden ligands that stabilize cholinesterase conformation. *Electrophoresis* 23: 930-937.
- Rochu, D.; Cléry-Barraud, C.; Renault, F.; Chevalier, A.; Bon, C. y Masson, P. (2006). Capillary electrophoresis versus differential scanning calorimetry for the analysis of free enzyme versus enzyme-ligand complexes: In the search of the ligand free status of cholinesterases. *Electrophoresis* 27: 442-451.
- Rogan, M. M. y Altria, K. D. (1995). Introduction to the Theory and Applications of Chiral Capillary Electrophoresis. Beckman Instruments, Inc. Volume IV, pp. 1-38.
- Roy, K. y Lucy, C. (2001). Dielectric Friction in Capillary Electrophoresis: Mobility of Organic Anions in Mixed Methanol-Water Media. *Anal. Chem.* 73: 3854-3861.

- Rush, R. S.; Cohen, A. S. y Karger, B. L. (1991). Influence of Column Temperature on the Electrophoretic Behavior of Myoglobin and  $\alpha$ -Lactalbumin in High-Performance Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 63: 1346-1350.
- Russell, W. B.; Saville, D. A. y Schowalter, W. R. (1989). *Colloidal Dispersions*. Cambridge University Press. Cambridge, UK, pp. 96-108.
- Sabella, S.; Quaglia, M.; Lanni, C.; Racchi, M.; Govoni, S.; Caccialanza, G.; Calligaro, A.; Bellotti, V. y De Lorenzi, E. (2004). Capillary electrophoresis studies on the aggregation process of  $\beta$ -amyloid 1-42 and 1-40 peptides. *Electrophoresis* 25: 3186-3194.
- Salomon, K., Burgi, D. S. y Helmur, J. C. (1991). Evaluation of fundamental properties of a silica capillary used for capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* 559: 69-80.
- Sahin, A.; Laleli, Y. R. y Ortancil, R. (1995). Haemoglobin analysis by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 709: 121-125.
- Sakamoto, Y.; Kitamura, K.; Madison, J.; Watkins, S.; Laurell, C. B.; Nomura, M.; Higashiyama, T. y Putnam, F. W. (1995). Structural study of the glycosylated and unglycosylated forms of a genetic variant of human serum albumin (63 Asp  $\rightarrow$  Asn). *Biochim. Biophys. Acta* 1252: 209-216.
- Santos, S. F.; Zanette, D.; Fischer, H. y Itri, R. (2003). A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. *J. Colloid Interface Sci.* 262: 400-408.
- Sanz-Nebot, V.; Benavente, F.; Toro, I. y Barbosa, J. (2001a). Electrophoretic behavior of peptides in capillary electrophoresis. Influence of ionic strength and pH in aqueous-organic media. *J. Chromatogr. A* 921: 69-79.
- Sanz-Nebot, V.; Benavente, F.; Toro, I. y Barbosa, J. (2001b). Migration behavior of therapeutic peptide hormones: Prediction of optimal separation by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 22: 4333-4340.
- Sanz-Nebot, V.; Toro, I.; Benavente, F. y Barbosa, J. (2002).  $pK_a$  values of peptides in aqueous and aqueous-organic media. Prediction of chromatographic and electrophoretic behaviour. *J. Chromatogr. A* 942: 145-156.
- Sarmini, K. y Kenndler, R. (1998a). Capillary zone electrophoresis in mixed aqueous-organic media: effect of organic solvents on actual ionic mobilities, acidity constants and separation selectivity of substituted aromatic acids. I. Methanol. *J. Chromatogr. A* 806: 325-335.
- Sarmini, K. y Kenndler, R. (1998b). Capillary zone electrophoresis in mixed aqueous-organic media: effect of organic solvents on actual ionic mobilities, acidity constants and separation selectivity of substituted aromatic acids-II. Ethanol. *J. Chromatogr. A* 811: 201-209.

- Savva, D.; Tárnoky, A. L. y Vickers, M. F. (1990). Genetic characterization of an alloalbumin, albumin Kashmir, using gene amplification and allele-specific oligonucleotides. *Biochem. J.* 266: 615-617.
- Savva, D.; Li, B.; Kragh-Hansen, U.; Galliano, M.; Minchiotti, L. y Tarnoky A.L. (1998). Genetic variation in human serum albumin: a 313 Lys → Asn mutation in albumin reading identified by PCR analysis. *Clin. Chim. Acta* 270: 195-201.
- Saville, D. A. (1977). Electrokinetic effects with small particles. *Ann. Rev. Fluid Mech.* 9: 321-337.
- Saville, D. A. (1979). Electrical conductivity of charged spheres in ionic solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 71: 477-490.
- Saville, D. A. y Palusinski, O. A. (1986). Theory of Electrophoretic Separations. Part I: Formulation of a Mathematical Model. *AIChE J.* 32: 207-214.
- Schaefer, M.; Sommer, M y Karplus, M. (1997). pH-Dependence of Protein Stability: Absolute Electrostatic free Energy Differences between Conformations. *J. Phys. Chem. B* 101: 1663-1683.
- Scheurlen, P. G. (1955) Uber serumeiweissveränderungen beim diabetes mellitus. *Klin Wochschr* 33: 198-205.
- Schmutz, A. y Thormann, W. (1993). Determination of Phenobarbital, Ethosuximide, and Primidone in Human Serum by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography with Direct Sample Injection. *Ther. Drug Monit.* 15: 310-316.
- Schure, M. R. y Lenhoff, A. M. (1993). Consequences of Wall Adsorption in Capillary Electrophoresis: Theory and Simulation. *Anal. Chem.* 65: 3024-3037.
- Schutzner, W. y Kenndler, E. (1992). Electrophoresis in Synthetic Organic Polymer Capillaries: Variation of Electroosmotic Velocity and Zeta Potential with pH and solvent composition. *Anal. Chem.* 64: 1991-1995.
- Schwartz, H. E.; Palmieri, R. H.; Nolan, J. A. y Brown, R. Introduction to Capillary Electrophoresis of proteins and Peptides. (1993). Beckman Instruments, Inc. USA. Volume II, pp. 1-69.
- Schwartz, H. y Pritchett, T. (1994). Separation of Proteins and Peptides by Capillary Electrophoresis: Application to Analytical Biotechnology. Beckman Instruments, Inc. USA. Volume V, pp. Part 1: 1-66, Part 2: 1-42.
- Schwartz, H. y Guttman, A. (1995). Separation of DNA by Capillary Electrophoresis. Beckman Instruments, Inc. USA. Volume VII, pp. 1-95.
- Schwer, C. y Kenndler, E. (1991). Electrophoresis in Fused-Silica Capillaries: The Influence of Organic Solvents on the Electroosmotic Velocity and the  $\zeta$  Potential. *Anal. Chem.* 63: 1801-1807.

- Schwer, C.; Gaš, B.; Lottspeich, F. y Kenndler, E. (1993). Computer Simulation and Experimental Evaluation of On-Column Sample Preconcentration in Capillary Zone Electrophoresis by Discontinuous Buffer Systems. *Anal. Chem.* 65: 2108-2115.
- Segel, D. J.; Bachmann, A.; Hofrichter, J.; Hodgson, K.; Doniach, S. y Kiefhaber, T. (1999). Characterization of Transient Intermediates in Lysozyme Folding with Time-resolved Small-angle X-ray Scattering. *J. Mol. Biol.* 288: 489-499.
- Sharma, U.; Negin, R. S. y Carbeck, J. D. (2003). Effects of Cooperativity in Proton Binding on the Net Charge of Proteins in Charge Ladders. *J. Phys. Chem. B* 107: 4653-4666.
- Sharma, U. y Carbeck, J. D. (2004). Using Charge Ladders and Capillary Electrophoresis to Measure the Charge, Size, and Electrostatic Interactions of Proteins. *Methods in Molecular Biology*, vol. 276: *Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptides*. M. A. Strege y A. L. Lagu (Eds.). Humana Press Inc., Totowa, N. J., pp. 189-216.
- Sharma, U. y Carbeck, J. D. (2005). Hydrodynamic radius ladders of proteins. *Electrophoresis* 26: 2086-2091.
- Shaw, Ch. J. y Guzman, N. A. (2002). Applications of Capillary Electrophoresis Technology in the Pharmaceutical Industry. Reprinted from *Handbook of Pharmaceutical Analysis*. Edited by Ohannesian and Streeter. Cap. 7, pp. 313-386.
- Shi, H.; Ma, Y.; Humphrey, J. H. y Craft, N. E. (1995). Determination of vitamin A in dried human blood spots by high-performance capillary electrophoresis with laser-excited fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 665: 89-96.
- Shirts, M. R. y Pande, V. S. (2005). Solvation free energies of amino acid side chain analogs for common molecular mechanics water models. *J. Chem Phys.* 122: 134508-134521.
- Shihabi, Z. K. (2000). Review of applications of capillary electrophoresis for clinical analysis. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 23: 79-95.
- Shimizu, T. y Kenndler, E. (1999). Capillary electrophoresis of small solutes in linear polymer solutions: Relation between ionic mobility, diffusion coefficient and viscosity. *Electrophoresis* 20: 3364-3372.
- Simó, C.; López-Soto Yarritu, P. y Cifuentes, A. (2002). Simulation and optimization of peptide separation by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* 23: 2288-2295.
- Simó, C. y Cifuentes, A. (2003). Capillary electrophoresis-mass spectrometry of peptides from enzymatic protein hydrolysis: Simulation and optimization. *Electrophoresis* 24: 834-842.
- Simó, C.; González R.; Barbas, C. y Cifuentes, A. (2005). Combining Peptide Modeling and Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Characterization of Enzymes

Cleavage Patterns: Recombinant versus Natural Bovine Pepsin A. *Anal. Chem.* 77: 7709-7716.

- Sinibaldi, F.; Fiorucci, L.; Mei, G.; Ferri, T.; Desideri, A.; Ascoli, F. y Santucci, R. (2001). Cytochrome c reconstituted from two peptides fragments displays native-like redox properties. *Eur. J. Biochem.* 268: 4537-4543.

- Smith, S. C. y Khaledi, M. G. (1993). Prediction of the migration behavior of organic acids in micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr.* 632: 177-184.

- Schmutz, A. y Thormann, W. (1993). Determination of phenobarbital, ethosuximide, and primidone in human serum by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection. *Ther. Drug Monit.* 15: 310-316.

- Soga T.; Kakazu, Y.; Robert, M.; Tomita, M. y Nishioka, T. (2004). Qualitative and quantitative analysis of amino acids by capillary electrophoresis-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* 25: 1964-1992.

- Šolínová, V.; Kašička, V.; Koval, D. y Hlaváček, J. (2004). Separation and investigation of structure-mobility relationships of insect oostatic peptides by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 25: 2299-2308.

- Šolínová, V.; Kašička, V.; Koval, D.; Česnek, M. y Holý, A. (2006). Determination of acid-base dissociation constants of amino and guanidinopurine nucleotide analogs and related compounds by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 27: 1006-1019.

- Souaïd, E. y Cottet, H. (2005). Separation of living and dead polymers in synthetic polypeptide mixtures by nonaqueous capillary electrophoresis using differences in ionization states. *Electrophoresis* 26: 3300-3306.

- Spegel, P.; Schweitz, L. y Nilsson, S. (2003). Molecularly imprinted polymers in capillary electrochromatography: recent developments and future trends. *Electrophoresis* 24: 3892-3899.

- Štědrý, M.; Gaš, B. y Kenndler, E. (1995). Dynamics of peak dispersion in capillary zone electrophoresis including wall adsorption: II. Exact analysis of unsteady linear adsorptive dispersion. *Electrophoresis* 16: 2027-2033.

- Štědrý, M.; Popelka, S.; Gaš, B. y Kenndler, E. (1996). Influence of transference number on migration and deformation of concentration boundaries in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 17: 1121-1125.

- Štědrý, M.; Jaroš, M.; Včeláková, K. y Gaš, B. (2003). Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: II. Eigenpeaks in univalent weak electrolytes. *Electrophoresis* 24: 536-547.

- Štědrý, M.; Jaroš, M.; Hruška, V. y Gaš, B. (2004). Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: III. Linear theory of electromigration. *Electrophoresis* 25: 3071-3079.

- Stellwagen, E.; Gelfi, C. y Righetti, P. G. (1999). Protein folding observed by capillary electrophoresis in isoelectric buffers. *J. Chromatogr. A* 838: 131-138.
- Stellwagen, E.; Olivieri, E. y Righetti, P. G. (2002). Salt promoted protein folding, preferential binding or electrostatic screening? *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 49: 147-153.
- Stellwagen, E. y Stellwagen, N. C. (2002). Determining the electrophoretic mobility and translational diffusion coefficients of DNA molecules in free solution. *Electrophoresis* 23: 2794-2803.
- Strege, M. A. y Lagu, A. L. (1993a). Capillary electrophoresis as a tool for the analysis of protein folding. *J. Chromatogr. A* 652: 179-188.
- Strege, M. A. y Lagu, A. L. (1993b). Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography of Proteins. *Anal. Biochem.* 210: 402-410.
- Subirats, X.; Reinstadler, S.; Porras, S. P.; Raggi, M. A. y Kenndler, E. (2005). Comparison of methanol and acetonitrile as solvents for the separation of sertindole and its major metabolites by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 26: 3315-3324.
- Sugita, O.; Endo, N.; Yamada, T.; Yakata, M. y Odani, S. (1987). The molecular abnormality of albumin Niigata: 269Asp---Gly. *Clin. Chim. Acta* 164: 251-259.
- Surway, M. A.; Goodall, D. M.; Wren, S. A. C. y Rowe, R. C. (1993). Oligoglycines and oligoalanines as tests for modelling mobility of peptides in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* 636: 81-86.
- Surway, M. A.; Goodall, D. M.; Wren, S. A. C. y Rowe, R. C. (1996). Self-consistent framework for standardising mobilities in free solution capillary electrophoresis: applications to oligoglycines and oligoalanines. *J. Chromatogr. A.* 741: 99-113.
- Tagliaro, F.; Moretto, S.; Valentini, R.; Gambaro, G.; Antonioli, C.; Moffa, M. y Tatò, L. (1994). Capillary zone electrophoresis determination of phenylalanine in serum: A rapid, inexpensive and simple method for the diagnosis of phenylketonuria. *Electrophoresis* 15: 94-97.
- Tanford, C. (1961). *Physical Chemistry of Macromolecules*. Ed. John Wiley & Sons (USA), pp. 457-488.
- Tanford, C. (1970). Protein Denaturation. Part C. *Advan. Protein Chem.* 25: 1-95.
- Tang, G. Y.; Yang, C.; Chai, J. C. y Gong, H. Q. (2004). Joule heating effect on electroosmotic flow and mass species transport in a microcapillary. *Int. J. Heat and Mass Transfer* 47: 215-227.
- Tárnoky A. L. (1980). Genetic and drug induced variation in serum albumin. *Adv Clin. Chem.* 21: 101-146.
- Tavares, M. F. M. y McGuffin, V. L. (1995). Theoretical Model of Electroosmotic Flow for Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Chem.* 67: 3687-3696.

- Tavares, M. F. M.; Jager, A. V.; da Silva, C. L.; Moraes, E. P.; Pereira, E. A.; de Lima, E. C.; Fonseca, F. N.; Tonin, F. G.; Micke, G. A.; Santos, M. R.; de Oliveira, M. A. L.; de Moraes, M. L.; van Kampen, M. H. y Fuiya, N. M. (2003). Applications of Capillary Electrophoresis to the Análisis of Compounds of Clinical, Forensic, Cosmetological, Environmental, Nutritional and Pharmaceutical Importance. *J. Braz. Chem. Soc.* 14: 281-290.
- Thakar, Y. S.; Chhaya Chande; Dhanvijay, A. G.; Shrikhande, A. V. y Saoji, A. M. (1997). Bisalbuminemia: An Interesting Electrophoretic Abnormality - A Report of Two Cases. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 40: 559-561.
- Thompson, L.; Veening, H. y Strein, T. G. (1997). Capillary Electrophoresis in the Undergraduate Instrumental Analysis Laboratory: Determination of Common Analgesic Formulations. *J. Chem. Educ.* 74: 1117-1121.
- Thormann, W.; Meier, P.; Marcolli, C. y Binder, F. (1991). Analysis of barbiturates in human serum and urine by high-performance capillary electrophoresis-micellar electrokinetic capillary chromatography with on-column multi-wavelength detection. *J. Chromatogr.* 545: 445-460.
- Thormann, W.; Minger, A.; Molteni, S.; Caslavská, J. y Gebauer, P. (1992). Determination of substituted purines in body fluids by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection. *J. Chromatogr.* 593: 275-288.
- Thormann, W. Lienhard, S. y Wernly, P. (1993). Strategies for the monitoring of drugs in body fluids by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr.* 636: 137-148.
- Thormann, W.; Zhang, Ch-X. y Schmutz, A. (1996). Capillary Electrophoresis for Drugs Analysis in Body Fluids. *Ther. Drug. Monit.* 18: 506-520.
- Timerbaev, A. R. (2004). Capillary electrophoresis of inorganic ions: An update. *Electrophoresis* 25: 4008-4031.
- Tiselius, A. (1930). The Moving Boundary Method of Studying the Electrophoresis of Proteins. *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Ups. Ser. IV* N° 4, 1.
- Tiselius, A. (1937). A new apparatus for electrophoresis analysis of colloidal mixtures. *Trans of the Faraday Soc.* 33: 524-531.
- Towns, J. K. y Regnier, F. R. (1991). Capillary Electrophoresis Separations of Proteins Using Nonionic Surfact Coatings. *Anal. Chem.* 63: 1126-1132.
- Towns, J. K.; Bao, J. y Regnier, F. R. (1992). Synthesis and Evaluation of Epoxi Polymer Coatings for the Analysis of Proteins by Capillary Zone Electrophoresis, *J. Chromatogr.* 599: 227-237.
- Tschapeck, M. y Wasowski, C. (1979). The hydration of a zwitterion, glycine, as a function of pH. *Biochim. Biophys. Acta* 582: 548-550.

- Včeláková, K.; Zusková, I.; Kenndler, E. y Gaš, B. (2004). Determination of cationic mobilities and  $pK_a$  values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 25: 309-317.
- Verzola, B.; Chiti, F.; Manao, G. y Righetti, P. G. (2000). Monitoring Equilibria and Kinetics of Protein Folding/Unfolding Reactions by Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 282: 239-244.
- Verzola, B.; Fogolari, F. y Righetti, P. G. (2001). Monitoring folding/unfolding transitions of proteins by capillary zone electrophoresis: Measurement of  $\Delta G$  and its variation along de pH scale. *Electrophoresis* 22: 3728-3735.
- Verzola, B.; Perduca, M.; Mezô, G.; Hudecz, F. y Righetti, P. G. (2003). Monitoring folding transitions of synthetic, branched-chain polypeptides by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 24: 794-800.
- Vesterberg, O. (1989). History of Electrophoresis Methods. *J. Chromatogr.* 480: 3-19.
- Víglaský, V.; Antalík, M.; Bagel'ová, J.; Tomori, Z. y Podhradský, S. (2000). Heat-induced conformational transition of cytochrome c observed by temperature gradient gel electrophoresis at acidic pH. *Electrophoresis* 21: 850-858.
- Vinther, A. y Sørensen, H. (1991). Mathematical Model Describing Dispersion in Free Solution Capillary Electrophoresis Under Stacking Conditions. *J. Chromatogr.* 559: 3-26.
- Virtanen, R. (1974). Zone Electrophoresis in a Narrow-Bore Tube Employing Potentiometric Detection. *Acta Polytechnica Scand.* 123: 1-67.
- Vizioli, N. M.; Rusell, M. L. y Carducci, C. N. (2004). On-line preconcentration capillary electrophoresis for purity profiling of synthetic peptides. *Anal. Chim. Acta* 514: 167-177.
- Vizioli, N. M.; Rusell, M. L.; Carbajal, M. L.; Carducci, C. N. y Grasselli, M. (2005). On-line affinity selection of histidine-containing peptides using a polymeric monolithic support for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 26: 2942-2948.
- Vogt, C.; Conradi, S. y Rohde, E. (1997). Determination of Caffeine and Other Purine Compounds in Food and Pharmaceutical by Micellar Electrokinetic Chromatography. *J. Chem. Educ.* 74: 1126-1130.
- Walker, J. C.; Zaugg, S. E. y Walker, E. B. (1997). Analysis of beverages by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 781: 481-485.
- Warwicker, J. (1997). Improving  $pK_a$  calculations with consideration of hydration entropy. *Prot. Eng.* 10: 809-814.
- Welder, F. y Colyer C. (2001). Using Capillary Electrophoresis to Determine the Purity of Acetylsalicylic Acid Synthesized in the Undergraduate Laboratory. *J. Chem. Educ.* 78: 1525-1527.

- Whitten, S. T. y García-Moreno E., B. (2000). pH Dependence of Stability of Staphylococcal Nuclease: Evidence of Substantial Electrostatic Interactions in the Denatured State. *Biochemistry* 39: 14292-14304.
- Whitten, S. T.; García-Moreno E., B. y Hilser, V. J. (2005). Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins. *PNAS* 102: 4282-4287.
- Wiese, G. R.; James, R. O. y Healy, T. W. (1971). Discreteness of Charge and Solvation Effects in Cation Adsorption at the Oxide/Water Interface. *Discuss. Faraday Soc.* 52: 302-311.
- Wiley, V. (2002). Quantitating Phenylalanine and Tyrosine from Dried Blood Spots. *P/ACE Setter*, Vol. 6, Issue I, pp.1-3.
- Williams, M. A.; Thornton, J. M. y Goodfellow, J. M. (1997). Modelling protein unfolding: hen egg-white lysozyme. *Protein Engin.* 10: 895-903.
- Winzor, D. J. (2003). Classical approach to interpretation of charge-dependence of peptide mobilities obtained by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1015: 199-204.
- Winzor, D. J. (2004). Determination of the net charge (valence) of a protein: a fundamental but elusive parameter. *Anal. Biochem.* 325: 1-20.
- Winzor, D. J.; Jones, S. y Harding, S. (2004). Determination of protein charge by capillary zone electrophoresis. *Anal. Biochem.* 333: 225-229.
- Withana, R. J. (1995). Bisalbuminaemia -a biochemical curiosity. *Ceylon Medical Journal* 40: 161-162.
- Wren, S. A. C. y Rowe, R. C. (1992). Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis. I. Initial evaluation of a model. *J. Chromatogr.* 603: 235-241.
- Yang, A. S. y Honig, B. (1993). On the pH Dependence of Protein Stability. *J. Mol. Biol.* 213: 459-474.
- Yang, A. S. y Honig, B. (1994). Structural Origins of pH and Ionic Strength Effects on Protein Stability. *J. Mol. Biol.* 237: 602-614.
- Yang, Y.; Boysen, R. I.; Chen, J. I. C.; Keah, H. H. y Hearn, M. T. W. (2003). Separation of structurally related synthetic peptides by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1009: 3-14.
- Yang, L. y Yuan, Z. (1999). Determination of dissociation constants of amino acids by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 20: 2877-2883.
- Yeh, I. C. y Hummer, G. (2004). Diffusion and Electrophoretic Mobility of Single-Stranded RNA from Molecular Dynamics Simulations. *Biophys. J.* 86: 681-689.

- Yoon, B. J. y Kim, S. (1989). Electrophoresis of Spheroidal Particles. *J. Colloid Interface Sci.* 128: 275-288.
- You, T. y Bashford, D. (1995). Conformation and hydrogen ion titration of proteins: a continuum electrostatic model with conformational flexibility. *Biophys. J.* 69: 1721-1733.
- Xiang, R. y Horvath, C. (2002). Fundamentals of capillary electrochromatography migration behavior of ionized sample components. *Anal. Chem.* 74: 762-770.
- Xin, Y.; Mitchell, H.; Cameron, H.; Allison, S. A. (2006). Modeling the Electrophoretic Mobility and Diffusion of Weakly Charged Peptides. *J. Phys. Chem. B* 110: 1038-1045.
- Xu, Y. (1995). Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 67: 463R-473R.
- Xuan, X.; Sinton, D. y Li, D. (2004). Thermal end effects on electroosmotic flow in a capillary. *Int. J. Heat Mass Transfer* 47: 3145-3157.
- Xuan, X. y Li, D. (2004). Joule heating effects on peak broadening in capillary zone electrophoresis. *J. Micromech. Microeng.* 14: 1171-1180.
- Zhang, Y.; Li, H.; Hou, A. y Havel J. (2005). Artificial neural networks based on genetic input selection for quantification in overlapped capillary electrophoresis peaks. *Talanta* 65: 118-128.
- Zusková, I.; Novotná, A.; Včeláková, K. y Gaš, B. (2006). Determination of limiting mobilities and dissociation constants of 21 amino acids by capillary zone electrophoresis at very low pH. *J. Chromatogr. B.* 841: 129-134.



## LISTA DE ABREVIATURAS \*

ACE	Electroforesis en acetato de celulosa
ANNs	Redes neuronales artificiales
1AO6	Albúmina sérica humana
ASS	Secuencia de aminoácidos
BEM	Método de Elementos finitos de Frontera
BGE	Solución electrolítica o <i>buffer</i>
1CA2	Anhidrasa carbónica humana
CCC	Cromatografía capilar quiral
CE	Electroforesis capilar
CEC	Electrocromatografía capilar
CGE	Electroforesis capilar en gel
CIEF	Isoelectroenfoque capilar
CITP	Isotacoforesis capilar
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio
CZE	Electroforesis capilar por zona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DLS	Técnica de <i>light scattering</i>
EDL	Doble capa eléctrica
EOF	Flujo electroosmótico
F	Especies plegadas en el proceso de <i>foldings/unfolding</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HM	Modelo de Hückel
1HRC	Citocromo c
HSA	Albúmina sérica humana
I	Especies intermedias en el proceso de <i>foldings/unfolding</i>
LLM	Modelo de Linderstrøm Lang
LLCEM	Modelo de Linderstrøm Lang de la Electroforesis Capilar
LRCLM	Modelo de Regresión Lineal de la escalera de carga
2LYZ	Lisozima
MECC	Cromatografía capilar electrocinética micelar

NMR	Resonancia Magnética Nuclear
PBMCM	Modelo de Poisson-Boltzmann- Montecarlo
PDB	Base de Datos de Proteínas
PE	Polietileno
PFC	Polifluorocarbono
pI	Punto Isoeléctrico
PKU	Fenilcetonuria
PLLCEM	Modelo de Linderstrøm Lang de la Electroforesis Capilar Perturbado
PVC	Polivinilcloruro
RLM	Modelo de Regresión Lineal
RSD	Desviación estándar relativa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
1STN	Nucleasa estafilocócica
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
TLC	Cromatografía en capa delgada
U	Especies desplegadas en el proceso de <i>folding/unfolding</i>
UV	Ultravioleta
1V9E	Anhidrasa carbónica bovina

---

\* Abreviaturas traducidas del inglés

## LISTA DE SÍMBOLOS

Se emplean unidades SI, excepto que se indique lo contrario. En general, se sigue la terminología recomendada para las técnicas analíticas por electromigración en capilares de acuerdo a IUPAC-2003 (Riekkola *et al.*, 2004).

$a$	eje mayor de la particular esferoidal
$a_c$	radio de la esfera compacta equivalente
$a_H$	radio hidrodinámico
$a_i$	radio del analito $i$
$a_\alpha$	radio hidrodinámico de la proteína en el estado $\alpha = F, U$
$a_H^e$	radio hidrodinámico equivalente o radio de Stokes
$A_p$	apertura del detector UV
$b$	radio $c/a$ para una partícula cilíndrica
$c$	eje menor de la particular esferoidal
$C$	concentración de urea genérica
$C_m$	concentración de urea en el punto medio de la curva de transición $F \leftrightarrow U$
$C^{\parallel}$	movilidad de la partícula paralela a la dirección del campo eléctrico aplicado normalizada con la movilidad asintótica de Smoluchowski
$C^\perp$	movilidad de la partícula perpendicular a la dirección del campo eléctrico aplicado normalizada con la movilidad asintótica de Smoluchowski
$\langle C \rangle$	movilidad promedio de la partícula normalizada con la movilidad asintótica de Smoluchowski
$c_o$	concentración molar del BGE
$c_{co}$	parámetro empírico de sobrecarga de muestra ( <i>concentration overload</i> )
$C_i$	concentración molar del analito $i$
$C_{in}$	capacitancia eléctrica de la capa compacta
$\langle C_i \rangle$	concentración radial promedio
$C_v$	capacidad calorífica del BGE

$d$	espesor de la capa compacta
$d_i$	diámetro interno del tubo capilar
$D$	coeficiente de difusión de Stokes-Einstein
$D_{ief}$	coeficiente de difusión efectiva de Taylor-Aris
$D_{ief}^T$	coeficiente de dispersión efectiva total
$e$	carga elemental
$\underline{E}$	vector intensidad de campo eléctrico
$E$	intensidad de campo eléctrico aplicado en la dirección axial del tubo
$E_x$	excentricidad de la partícula esférica
$f$	coeficiente de fricción hidrodinámico
$f_\alpha$	coeficiente de fricción de Stokes en el estado $\alpha = F, U$
$f(\kappa a_H)$	función de Henry
$\underline{g}$	vector gravedad
$g$	aceleración gravitacional
$G_\alpha$	potencial químico total de la proteína en el estado $\alpha = F, U$
$G_\alpha^*$	potencial químico de referencia de la proteína en el estado $\alpha = F, U$
$h$	media distancia del pistón de muestra introducido inicialmente en la entrada del capilar
$h_i$	número de hidratación de los residuos de aminoácidos. El subíndice $i$ indica el tipo de aminoácido
$h_i^p$	número de hidratación de los residuos polares de aminoácidos. El subíndice $i$ indica el tipo de aminoácido
$h_i^{np}$	número de hidratación de los residuos no polares de aminoácidos. El subíndice $i$ indica el tipo de aminoácido
$H$	número de hidratación del analito
$H^e$	número de hidratación estimado del analito
$H_j$	altura del plato teórico
$I$	fuerza iónica
$I_e$	Corriente eléctrica
$\underline{J}$	vector corriente eléctrica

$J_i^{\#}$	flujo difusivo del ión $i$
$k$	conductividad térmica del BGE
$k_B$	constante de Boltzmann
$k_d$	constante de velocidad de desorción
$k_e$	conductividad eléctrica
$k_F$	constante cinética en el proceso de isomerización $U \rightarrow F$ de la proteína
$k_U$	constante cinética en el proceso de isomerización $F \rightarrow U$ de la proteína
$K$	constante de equilibrio termodinámica del proceso de <i>folding/unfolding</i>
$K_D$	coeficiente de distribución de adsorción en la pared
$K_S$	constante de equilibrio de disociación de los grupos silanoles
$K_n(\kappa c)$	función de Bessel de segundo orden modificada para $n = 0, 1$
$l_D$	espesor de la doble capa eléctrica (longitud de Debye)
$L$	longitud del enlace peptídico
$L_d$	distancia de detección
$L_t$	longitud total del tubo capilar
$m$	pendiente de la recta de disminución de la energía libre de referencia, con la concentración de urea
$m_i$	cantidad de muestra introducida inicialmente en la entrada del capilar
$m_p$	masa de la partícula
$M$	masa molar
$\underline{n}$	vector unitario
$n_i$	concentración numérica del ión
$n_i$	número de cada tipo de grupos cargados en la secuencia de aminoácidos de la proteína
$n_s$	número de grupos silanoles ácidos por unidad de área
$n_w$	número de moléculas de agua por unidad de carga
$N$	número de especies o número de residuos de aminoácidos en el péptido o en la proteína (según corresponda)

$N_c$	número de grupos cargados en el analito
$N_{ca}$	número de conformaciones alternativas
$N_A$	constante de Avogadro
$N_{Gr}$	número de Grashof
$P$	presión
$Pe_i$	número de Peclet de especies $i$
pH	pH del BGE
pH <sub><math>i</math></sub>	pH cercano al grupo cargado $i$ en el dominio del analito
pH <sub><math>i</math></sub> <sup>∞</sup>	pH alejado del grupo cargado $i$ pero aún en el dominio del analito
pH*	pH cercano a la molécula
pH <sub><math>\alpha</math></sub> *	pH cercano a la molécula de proteína en el estado $\alpha = F, U$
pK <sub><math>i</math></sub>	valor de pK actual del grupo cargado $i$
pK <sub><math>\alpha i</math></sub>	valor de pK actual del grupo cargado $i$ en el estado $\alpha = F, U$
pK <sub><math>i</math></sub> <sup>o</sup>	valor de pK de los grupos cargados laterales y terminales de la cadena como aminoácidos libres
pK <sub><math>i</math></sub> <sup>r</sup>	valor de pK de los grupos cargados laterales y terminales de la cadena en un estado de referencia
pK <sub>COOHt</sub> <sup>r</sup>	valor del pK del grupo COOH-terminal en un estado de referencia
pK <sub>NH<sub>3</sub>t</sub> <sup>r</sup>	valor del pK del grupo NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -terminal en un estado de referencia
$q_i$	carga específica de la partícula $i$
$q_t$	carga específica de la superficie del capilar
$Q_i$	carga neta o efectiva del analito $i$
$r$	coordenada radial (en coordenadas cilíndricas)
$r_c$	radio del helicoide del capilar en el cartucho
$r_{ij}$	distancia genérica promedio entre pares $i$ - $j$ de grupos cargados
$r_i^o$	radio efectivo de un grupo cargado $i$
$r_{ij}^{\#}$	velocidad cinética de asociación-disociación del analito

$R$	radio del tubo capilar
$R_e$	número de Reynolds
$s$	factor de corrección por la atracción-repulsión en la cadena Gaussiana básica
$t$	tiempo
$t_{eff}$	tiempo efectivo de inyección
$t_{mi}$	tiempo de migración del analito $i$
$t_{mo}$	tiempo de migración del marcador de EOF
$T$	temperatura absoluta
$T_m$	temperatura en el punto medio de la curva de transición F $\leftrightarrow$ U
$T_N$	temperatura en el estado plegado de referencia en un proceso de desnaturalización térmica
$u_i^{\#}$	velocidad de difusión
$\underline{v}$	vector velocidad de mezcla
$\langle v \rangle$	velocidad hidrodinámica promedio debido a la aplicación de una diferencia de presión
$v_{eo}$	velocidad del flujo electroosmótico
$\underline{v}_i$	velocidad del ión
$\underline{v}_i^e$	vector velocidad electroforética del ión
$v_i^e$	velocidad electroforética del ión en la dirección axial del tubo
$v_p$	volumen específico del analito
$v_w$	volumen específico del BGE
$V$	voltaje aplicado
$V_H$	volumen hidrodinámico del analito
$V_c$	volumen compacto del analito
$V_i$	volumen de muestra introducido en la entrada del capilar
$V_\alpha$	volumen hidrodinámico de la proteína en el estado $\alpha = F, U$
$X_\alpha$	fracción molar de la proteína en el estado $\alpha = F, U$
$z_i$	valencia del ión
$Z$	número de carga neta (o efectiva) de un analito

$Z_i$	número de carga neta del grupo cargado $i$ en el analito
$Z^o$	número de carga neta del analito calculada con los $pK_i^o$
$Z^c$	número de carga neta del analito calculada partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach sin considerar el fenómeno de regulación de cargas
$Z_i^r$	número de carga de referencia del sitio $i$
$Z^r$	número de carga neta de referencia del analito
$Z^t$	número de carga neta del analito obtenida por titulación
$Z_T$	número de carga total del aminoácido
$Z_+$	número de carga positiva del aminoácido
$Z_-$	número de carga negativa del aminoácido
$z_f(r)$	perfil del frente de muestra introducida en la entrada del capilar
$Z_\alpha$	número de carga neta de la proteína en el estado $\alpha = F, U$
$Z_{\alpha i}$	número de carga neta del grupo cargado $i$ en la proteína en el estado $\alpha = F, U$
$\Delta h$	diferencia de altura
$\Delta p$	caída de presión ( $\Delta p = 0,5$ psi y $1$ psi = 6894,76 Pa)
$\Delta G^{\text{eff}}$	cambio de energía libre efectiva
$\Delta G^{\text{el}}$	cambio de energía libre electrostática
$\Delta G^*$	cambio de potencial químico de referencia
$\Delta G_o^*$	cambio de energía libre de referencia para concentración de urea nula
$\Delta H^*$	cambio de entalpía de referencia
$\Delta pH$	diferencia entre $pH$ y $pH^*$
$\Delta pH_i$	diferencia entre $pH_i$ y $pH$
$\Delta pH_\alpha$	diferencia entre $pH$ y $pH_\alpha^*$ en el estado $F$ o $U$
$\Delta pK_i$	diferencia entre $pK_i^r$ de referencia y $pK_i$ actual, evaluado con el PLLCEM o LLCCEM
$\Delta pK_{\alpha i}$	diferencia entre $pK_i^r$ de referencia y $pK_{\alpha i}$ actual en el estado $F$ o $U$
$\Delta S^*$	cambio de entropía de referencia

$\Delta Z_j$	diferencia entre el número de carga $Z_j$ y el número de carga de referencia $Z_j^r$
$\alpha$	grado de colinealidad en la orientación de la partícula
$\alpha(+)$	fracción de carga positiva
$\alpha(-)$	fracción de carga negativa
$\beta$	coeficiente de expansión térmica
$\delta$	parámetro de hidratación del analito
$\delta_\alpha$	parámetro de hidratación de la proteína en el estado $\alpha = F, U$
$\varepsilon$	permitividad eléctrica del BGE
$\varepsilon_o$	permitividad eléctrica en el vacío
$\varepsilon'$	permitividad eléctrica dentro del dominio del analito
$\kappa$	inversa de la longitud de Debye ( $\kappa = 1/l_D$ )
$\kappa'$	inversa de la longitud de Debye dentro del dominio del analito
$\rho$	densidad de mezcla del BGE
$\rho_e$	distribución de carga eléctrica por unidad de volumen
$\rho_i$	densidad de la especie $i$
$\rho_p$	densidad de la partícula
$\dot{\gamma}$	tensor-velocidad de deformación
$\eta$	viscosidad del BGE
$\eta_w$	viscosidad del agua en función de la temperatura
$\mathcal{G}_i$	parámetro de dispersión del analito
$\psi$	potencial eléctrico en el BGE
$\psi_0$	potencial de superficie
$\psi_d$	potencial en la capa externa de Helmholtz ( $\psi_d \approx \zeta_t$ )
$\omega_i$	movilidad hidrodinámica del ión $i$
$\mu$	movilidad electroforética de una partícula esférica
$\mu_{ap}$	movilidad aparente del analito
$\mu_i$	movilidad electroforética del ión $i$
$\mu_{eo}$	movilidad del flujo electroosmótico

$\mu_p$	movilidad electroforética efectiva de una partícula no-esférica
$\mu_\alpha$	movilidad electroforética de la proteína en el estado $\alpha = F, U$
$\Omega$	cociente entre las movilidades de la partícula no-esférica y la partícula esférica equivalente (factor de forma)
$\sigma$	conductividad eléctrica del BGE
$\sigma_0$	densidad de carga por unidad de área
$\sigma_d$	densidad de carga total en la capa difusa de iones
$\theta$	constante de ajuste en la Ec. (7.3.4)
$\chi$	parámetro de difusión efectiva de Taylor-Aris
$\zeta_i$	potencial eléctrico de la partícula
$\zeta_\alpha$	potencial eléctrico de la proteína en el estado $\alpha = F, U$
$\zeta_t$	potencial eléctrico del tubo capilar
$\xi = r / R$	radio adimensional
$\langle \bullet \rangle$	indica valores promedio

Subíndices:

$i = 1 \dots N$  indica especies del analito

$w$  indica evaluación en la pared del capilar

$\alpha$  igual a F y U para los estados plegado y desplegado de la proteína

Supraíndice:

$\infty$  indica alejado de la pared del tubo

*“Vivir no es solo existir, sino existir y crear, saber gozar y sufrir y no dormir sin soñar. Descansar, es empezar a morir.....”*

*Gregorio Marañon (1887-1960)*