

**El potencial zeta es un parámetro físico clave que describe la carga superficial de las proteínas. Aunque ha habido interés en medir el potencial zeta de las proteínas durante muchos años, las mediciones a menudo eran difíciles debido a una variedad de razones, incluida la «cocción» de las proteínas en los electrodos de las células cuando se usaban técnicas de dispersión de luz. Esta nota de aplicación presenta datos del SZ-100V2 utilizando células con electrodos de carbono exclusivos y patentados que facilitan las mediciones del potencial zeta de proteínas.**

#### Introducción

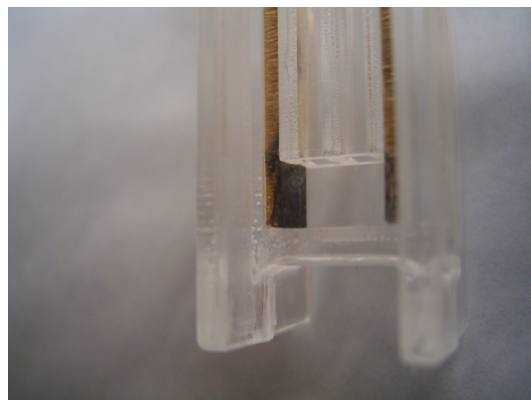
La carga superficial de las proteínas es una propiedad física importante que puede afectar su estado de agregación y su comportamiento durante el procesamiento. El potencial zeta de una proteína es una medida eficaz de la carga superficial que puede utilizarse como indicador de estabilidad. Los cambios en el potencial zeta de una proteína pueden implicar:

- Agregación
- Cambios conformacionales en la estructura de las proteínas.
- Modificaciones de superficie
- Despliegue/desnaturalización de la proteína.

El potencial zeta indica el grado de repulsión entre proteínas adyacentes con carga similar en una dispersión. Según los principios generales de la química coloidal, un sistema disperso normalmente pierde estabilidad cuando la magnitud del potencial zeta disminuye a menos de aproximadamente 30 mV (independientemente de si la carga es positiva o negativa). Como resultado, habrá alguna región alrededor de la condición de potencial zeta cero (el punto isoeléctrico o IEP) para la cual el sistema no será particularmente estable. Dentro de esta región inestable, las proteínas pueden aglomerarse, aumentando así el tamaño medido. Por lo tanto, determinar el IEP de un lote de muestra de proteína es una aplicación común del análisis de potencial zeta.

Las mediciones del potencial zeta son una forma preferida de caracterizar la carga en la superficie de las proteínas,

aunque consideraciones prácticas con el análisis han dificultado la adopción generalizada de esta técnica. Los electrodos clásicos chapados en oro utilizados en celdas de potencial zeta desechables generaban un calentamiento Joule que provocaba el ennegrecimiento de la superficie del electrodo, inutilizando la celda, a menudo después de una sola medición. Este calentamiento no solo daña la muestra y la celda, sino que también degrada la calidad de los datos, ya que el campo eléctrico inducido cambia cuando la proteína se «cocina» en los electrodos, como se muestra en la Figura 1.



**Figura 1: Superficie del electrodo recubierta de oro ennegrecido que indica una celda arruinada**

HORIBA ha sido pionero en el uso de electrodos de carbono (consulte la Figura 2) utilizados en células de potencial zeta desechables para abordar los desafíos de medición de muestras difíciles como las proteínas. Todos los experimentos descritos en esta nota de aplicación se realizaron utilizando celdas de potencial zeta desechables con electrodos de carbono.



**Figura 2: Una celda de potencial zeta con electrodo de carbono, utilizable después de varios cientos de mediciones**

## Experimento

Las proteínas utilizadas para este estudio incluyeron albúmina sérica bovina (BSA) y lisozima.

Se prepararon polvo de BSA liofilizado adquirido de Fisher Scientific (CAS: 9048-46-8) y polvo de lisozima liofilizado adquirido de Sigma Aldrich (L6876) disolviéndolos en agua DI ultrapura a una concentración de 100 mg/ml. La concentración fue intencionalmente mucho más alta que el límite de sensibilidad del instrumento ya que la valoración del pH diluye la muestra durante el transcurso del experimento.

Las valoraciones de pH se realizaron manualmente en lugar de utilizar el valorador automático LY-701 debido a los pequeños volúmenes de muestra asociados con el trabajo con proteínas. Los productos químicos utilizados para las valoraciones de pH fueron HCl 0.1 N y NaOH 0.1 N. Las mediciones de pH se realizaron utilizando un medidor de

pH compacto HORIBA TwinpH.

Las mediciones del análisis del potencial zeta y del tamaño de partículas se realizaron utilizando el analizador de nanopartículas HORIBA SZ-100V2Z, ver Figura 3.



Figura 3: El analizador de nanopartículas SZ-100V2Z

Las mediciones del tamaño de las partículas se realizaron antes de las valoraciones de pH utilizando una celda de vidrio a 90°. Todas las mediciones del potencial Zeta se realizaron utilizando la misma celda desechable con electrodos de carbono. Esta misma celda ya se había utilizado para más de 800 mediciones de potencial zeta en una muestra de emulsión; consulte TN167 Vida útil de las células de potencial zeta.

Para la lisozima, el pH se redujo a 4 y luego se aumentó en incrementos de 1 unidad de pH hasta pH 13. Para BSA, el pH se redujo a 3 y luego se elevó hasta pH 9.5. Se realizaron tres mediciones de potencial zeta en cada punto de pH y el valor promedio se registró y se mostró en los resultados que se muestran en las Figuras 4 y 5.

## Resultados

Se determinó que el tamaño de partícula de la muestra de lisozima era 4.2 nm antes de comenzar la valoración del pH.

Los resultados del potencial zeta frente a los valores de pH se muestran en la Figura 4. El valor de IEP de 11.5 es similar a otros resultados publicados.

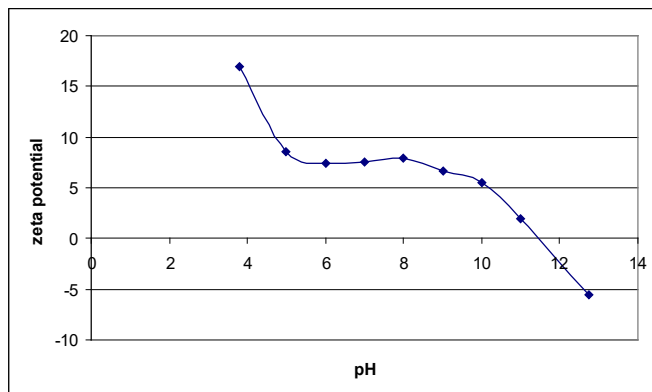


Figura 4: IEP de la proteína lisozima

Se determinó que el tamaño de partícula de las muestras de BSA era 8.4 nm antes de comenzar la valoración del pH. Los resultados del potencial zeta frente a los valores de pH se muestran en la Figura 5. El valor de IEP de 4.6 es similar a otros resultados publicados.

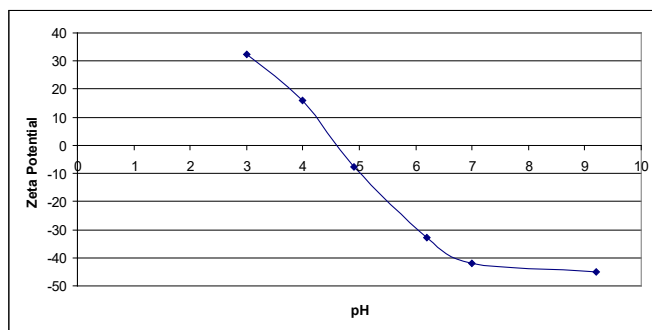


Figura 5: IEP de la proteína BSA

## Conclusión

El potencial zeta de las muestras de lisozima y BSA varió en función del pH como se esperaba. Las valoraciones del punto isoeléctrico (IEP) se realizaron fácil y automáticamente en aproximadamente una hora cada una. La celda de potencial zeta desechable con electrodos de carbono utilizada para las mediciones no mostró signos de degradación y luego se usó para muchas más mediciones sin fallar.

El uso innovador de electrodos de carbono parece haber transformado el análisis del potencial zeta de proteínas en una técnica experimental sencilla que puede realizar cualquier usuario. Una advertencia: la concentración de sal u otras propiedades de la muestra pueden reducir la vida útil de la celda de potencial zeta por debajo de los valores informados en esta nota de aplicación. Dicho esto, muchas aplicaciones se simplifican y la vida útil de la celda se extiende con este diseño de carbono exclusivo.