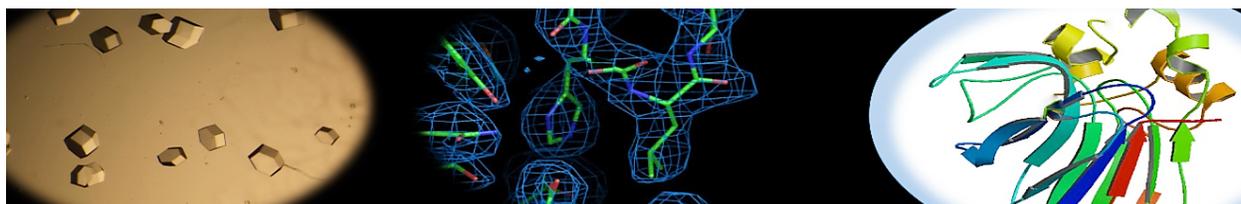


Centro Educativo Ciencias sobre Ruedas
Departamento de Química
Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez

Guía del Maestro

Quinta competencia nacional de cristalización de Puerto Rico



www.facebook.com/competenciacristalizacionPR

Preparado por: Josiris Rodríguez, Darya Marchany y Juan López Garriga
2016, 2018



Tabla de Contenido

Objetivos	1
Visión	2
Reglas	3
Criterios de evaluación:	4
cristalización	
cristalografía	
Parte 1: Conceptos básicos de cristalización:	
Introducción	
Niveles estructurales en proteínas	
Sistemas cristalinos	
Pasos para la formación de un cristal	
Introducción a la curva de solubilidad	
Crecimiento cristalino: parte practica con la técnica de difusión de vapor en gota colgante	
Introducción	
Gota colgante: parte práctica y cálculos	
Definición de conceptos usados en cristalización y cristalografía	
Referencias	
Anejo	

Objetivos

La Competencia Nacional de Cristalización en Escuelas Superiores tiene como objetivo principal: integrar el conocimiento científico que los estudiantes han obtenido en el transcurso de sus estudios con técnicas utilizadas en la investigación hoy día. Por medio del uso del método científico se les presenta a los estudiantes una manera divertida de ver las ciencias, mientras que a su vez refuerzan el uso de términos científicos apropiados, desarrollan planes sistemáticos de trabajo y el pensamiento crítico.

Ésta competencia amistosa les brinda a los estudiantes la oportunidad de conocer los medios para transmitir resultados de una investigación, ya que tendrán la oportunidad de presentar su investigación en un congreso de ciencias en forma de afiche.

Diseminar el conocimiento de la formación de cristales, de las técnicas de cristalización y *la Cristalografía de rayos-X* brinda a los estudiantes una visión de las aplicaciones científicas que pueden utilizar. Además, brinda novedad a su curso de ciencias y fomenta la búsqueda de estudios universitarios en carreras relacionadas al ámbito científico.

Visión

Introducir a los estudiantes en el área de la cristalografía para expresar la relación que existe entre estructura química y función biológica en áreas relacionadas a la Biomedicina y sus ventajas en el estudio de tratamientos y/o entendimiento de enfermedades. Desarrollar al maestro y al estudiante las habilidades de pensamiento crítico y experimental en las técnicas de formación de un cristal de proteína para que, en un futuro, tengan la oportunidad de difractar y resolver estructuras.

Reglas de la competencia

Como parte de la competencia de cristalización de proteínas representada por lisozima mediante la técnica de “gota colgante” se entregara por escuela los siguientes materiales: (a) 1 gramo de lisozima, (b) soluciones buffers, (c) solución agentes precipitante, (d) cubre objetos, y (e) tres cajas de cristalización para de gota colgante. Estos materiales serán distribuidos a las escuelas a través del maestro participante en el taller de cristalización. Asi mismo se incluye la parte dos de la guía al maestro para la cristalización de sulfato de cobre, donde hay los detalles de como cristalizar el mismo a través de técnicas de sobresaturación.

Por ello hay dos actividades y métodos en la competencia de cristalización: proteínas, representada por lisozima y la técnica de gota colgante y la de compuestos inorgánicos representada por sulfato de cobre y la técnica de sobre saturación.

Hay que hacer ambas técnicas pues son mutuamente exclusivas. Pero se sugiere que los maestros decidan cual será su cristalización primaria y cual será su cristalización secundaria que participaran en la competencia con sus estudiantes. De forma que los estudiantes de una escuela en particular como mínimo puedan presentar un achiche en la competencia.

Toda escuela tiene la misma cantidad de reactivos y ello define el número de participantes por escuelas así como las reglas de la competencia como sigue:

1. Cada grupos participantes por escuela estarán compuestos de por un mínimo tres o un máximo de cuatro estudiantes y los maestros participantes del taller.
2. El maestro seleccionara el grupo o grupos de su escuela que participará en la competencia recordando que el máximo de cajas de cristalización por escuela es 3 y que hay 24 hoyos de prueba en cada caja. Es aconsejable que cada estudiante tenga menos tenga 6 hoyos para las posible condiciones de experimentación, lo que lleva a un máximo de 3 o 4 grupos de estudiantes por escuela.
3. Los maestros brindarán por escrito los nombres y apellidos de los participantes que representarán su escuela en la competencia de afiches.
4. Los estudiantes deberán presentar un comportamiento adecuado siguiendo las normas de ética y el buen trato hacia sus compañeros y miembros de la organización. El comportamiento no ético podría resultar en descualificación.
5. Durante el proceso de experimentación, cada escuela se hará responsable de la seguridad de sus estudiantes mientras manejan los reactivos.
6. **Los maestros tendrán que asistir a los talleres de formación en cristalización los días acordados en el primer taller de la competencia.**
7. Es obligatorio que los estudiantes en la competencia final de cristalización presenten afiche (“poster”) con las medidas 56” x 36” en orientación horizontal junto con su trabajo experimental. El afiche debe incluir lo siguiente:

- a. título del trabajo, miembros del equipo y nombre de su escuela
 - b. introducción, descripción de la metodología, objetivos, materiales utilizados (incluyendo las sustancias químicas y el equipo), fotos de los resultados obtenidos, discusión de resultados, conclusión y referencias.
8. El experimento y el plan de trabajo debe ser realizado por los estudiantes. El rol del maestro será guiar y orientar al estudiante.
 9. Durante la presentación de afiche los finalistas deben utilizar vestimenta profesional y deben estar acompañados de su maestro, quien en todo momento será responsable por la seguridad de sus estudiantes.
 10. Un jurado será el encargado de la evaluación de los afiches.
 11. En la competencia final de cristalización se evaluarán y premiarán los proyectos destacados en el área de cristalización, según los criterios de Mejor mono-cristal, Cristal de mayor tamaño, Mejor plan de trabajo y Mejor exposición oral del afiche.
 12. El afiche debe ser enviado para impresión en formato PDF. La fecha límite será anunciada próximamente. No se aceptarán afiches posteriores a esta fecha.

Criterios de Evaluación

I. Cristalización

Se evaluarán los trabajos presentados en términos de:

- ✓ Mejor mono-cristal (30%)
- ✓ Cristal de mayor tamaño (25%)
- ✓ Mejor plan de trabajo (20%)
- ✓ Mejor afiche escrito (10%)
- ✓ Mejor exposición oral del afiche (15%)

En la evaluación, nuestro jurado considerará detalles como:

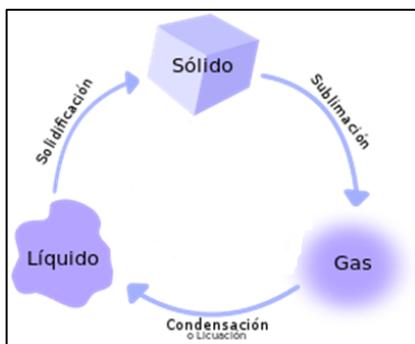
- i. **Creatividad:** al presentar y desarrollar los trabajos.
- ii. **Plan de trabajo:** Aplicación del método científico, claridad, pensamiento crítico, uso adecuado de figuras, tablas, gráficas y/o fotografías. Así como la coherencia y organización de cada afiche.
- iii. **Exposición oral:** Conocimiento y dominio del tema, así como el uso de términos y lenguaje científico apropiado. Seguridad al expresarse, así como la coherencia y claridad.

Conceptos básicos de cristalización

Guía práctica para el maestro

Introducción

En física y química se observa que, para cualquier sustancia o mezcla, modificando sus condiciones de temperatura o presión, pueden obtenerse distintos estados o fases, denominados estados de agregación de la materia¹. El estado de la materia va a depender de las fuerzas de unión entre las partículas, moléculas, átomos o iones que la constituyan. Cada estado impartirá unas características físicas al componente. El ejemplo clásico es agua en sus distintos estados: sólido, líquido y gas, según se representan en la figura 1.



Los objetos en **estado sólido** se presentan como cuerpos de forma definida; sus átomos a menudo se entrelazan formando estructuras estrechas, lo que les confiere la capacidad de soportar fuerzas sin deformación aparente. Son catalogados generalmente como duros, así como resistentes, y en ellos las fuerzas

de atracción son mayores que

En los **sólidos cristalinos**, la intermoleculares pequeños da las fuerzas de enlace, que en formas geométricas, ordenadas y periódicas. En los amorfos, por el contrario, las partículas que los constituyen carecen de una estructura ordenada. Existen varios tipos de sólidos cristalinos:

Iónicos – Son formado por iones positivos y negativos unidos entre sí mediante fuerzas de naturaleza electrostática

Covalentes - Los átomos se mantienen unidos en una red tridimensional únicamente por enlaces covalentes haciéndolos extremadamente duros y difíciles de deformar

Metálicos - Cristal homogéneo que se caracterizan por tener pocos electrones débilmente ligados a las capas más externas del metal.

Moleculares – Las moléculas están unidas por las denominadas fuerzas de Van der Waals; estas fuerzas son muy débiles y correspondes a fuerzas de dipolos eléctricos. Son fácil de deformar.

Figura 1: Representación de los estados de la materia para agua. Modificación de la imagen original

las de repulsión.

presencia de espacios paso a la intervención de ubican a la celda unidad

Los sólidos cristalinos moleculares son los que representan a la mayoría de los cristales de proteína. Hoy en día, la cristalización y el estudio estructural de los cristales se consideran una ciencia y un arte. Esta premisa parte de la poca predictibilidad de las condiciones de cristalización de una molécula o proteína³.

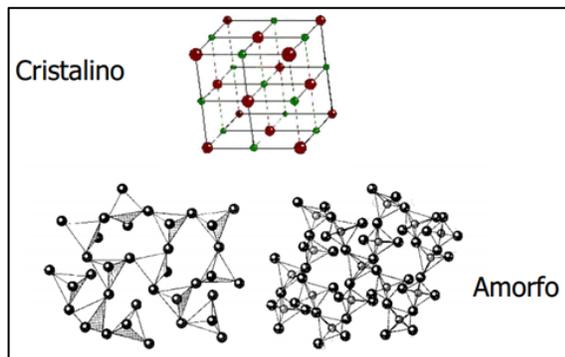


Figura 2: Representación de sólido cristalino versus sólido amorfo; imagen de: <http://liquidossolidos607.blogspot.com/2014/01/redes-cristalinas.html>

No obstante, hay que resaltar que la formación de cristales y el uso de técnicas de cristalografía permiten estudios de estructura atómica. Se llama cristalización al proceso de formación de un cristal y cristalografía el estudio de la estructura cristalina por medio de rayos X.

La combinación de ambos, cristalización y cristalografía permiten establecer conexiones directas entre la estructura de una proteína y su función. Además, promueven avances en: diseño de drogas farmacéuticas, diseño de

proteínas (biotecnología) y prevención y tratamiento de enfermedades.

Niveles estructurales de las proteínas

Las proteínas son macro-moléculas orgánicas de alto peso molecular. Están constituidas por carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N). Además, pueden contener también azufre (S) y fósforo (P) y, en menor proporción, hierro (Fe), cobre (Cu), magnesio (Mg), yodo (Y), entre otros elementos combinados para formar los aminoácidos.

Los aminoácidos son las unidades que componen una cadena de proteína. Se caracterizan por contener un lado con un grupo amino (-NH₂) y otro con un grupo carboxilo (-COOH). Por convención el orden de escritura de los aminoácidos es siempre desde el grupo amino-terminal hasta el carboxilo final. La **estructura primaria** está determinada por la secuencia de aminoácidos en la cadena proteica. El número de aminoácidos presentes y el orden en que están enlazados determinará la estructura secundaria de la proteína. La **estructura secundaria** de una proteína es la que adopta espacialmente, compuesta principalmente por hélice alfa y lámina beta. La **estructura terciaria** es la estructura plegada y completa en tres dimensiones de la cadena polipeptídica y solo está presente si hay más de una cadena polipeptídica. Con varias

cadena polipeptídica, la **estructura cuaternaria** representa su interconexión y organización.

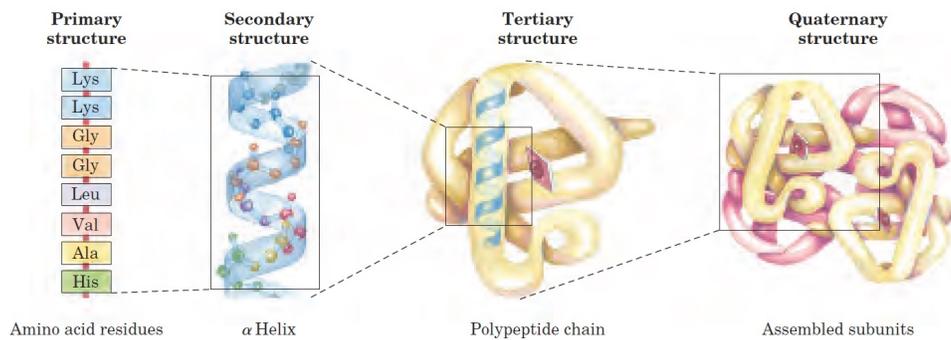


Figura 3: Ilustración de los componentes estructurales de las proteínas. Lehninger 2005, Biochemistry

Sólidos cristalinos: ¿Qué es un cristal?

Un sólido cristalino contiene átomos, iones, o moléculas empacadas en una formación geométrica regular con una unidad estructural llamada celda unidad, según ilustra la figura 4. Se caracterizan por poseer un orden en su estructura, periódico y ordenado, como consecuencia tienen una forma que no cambia, salvo por la acción de fuerzas externas. A su vez la celda unidad se encuentra ordenadas en las tres dimensiones. Esto se traduce en siete parámetros de red, que son los módulos, a , b y c , de los tres vectores, y los ángulos α , β y γ que forman entre sí. Estos tres vectores forman una base del espacio tridimensional, de tal manera que las coordenadas de cada uno de los puntos de la red se pueden obtener a partir de ellos por combinación lineal con los coeficientes enteros.

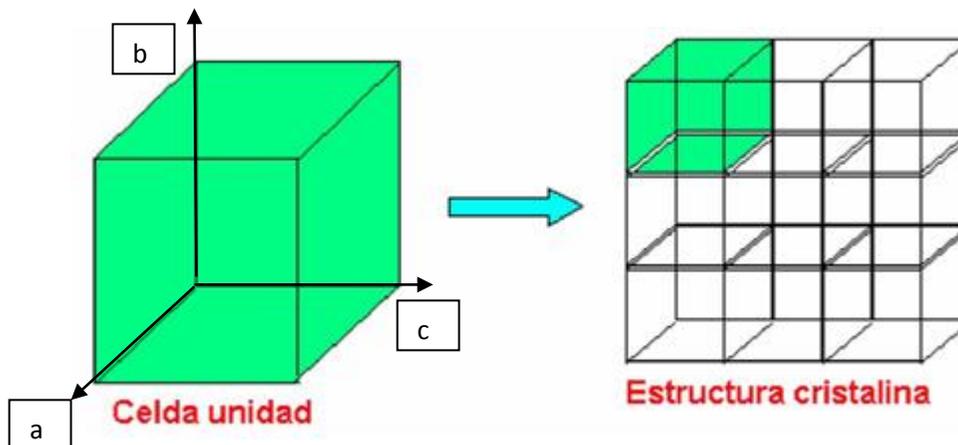


Figura 4: Representación de la celda unidad en una estructura cristalina, modificada para ilustrar los vectores a , b , y c . Imagen original: <http://blog.utp.edu.co/metalografia/3-cristalografia/>

La estructura cristalina de un sólido depende del tipo de enlace atómico, del tamaño de los átomos (o iones), y la carga eléctrica de los iones en su caso.

Existen siete sistemas cristalinos los cuales se distinguen entre sí por la longitud de sus aristas de la celda (parámetros a , b , y c de la celda) y los ángulos α , β y γ entre los bordes de ésta. Estos **sistemas o hábitos** son: cúbico, tetragonal, ortorrómbico, romboédrica (o trigonal), hexagonal, monoclinico y triclinico. Los diferentes sistemas cristalinos se forman por el apilamiento de capas de átomos siguiendo un patrón particular. En función de las posibles localizaciones de los átomos en la celda unitaria se establecen 14 estructuras cristalinas básicas, las denominadas redes de Bravais, según ilustra la figura 5.

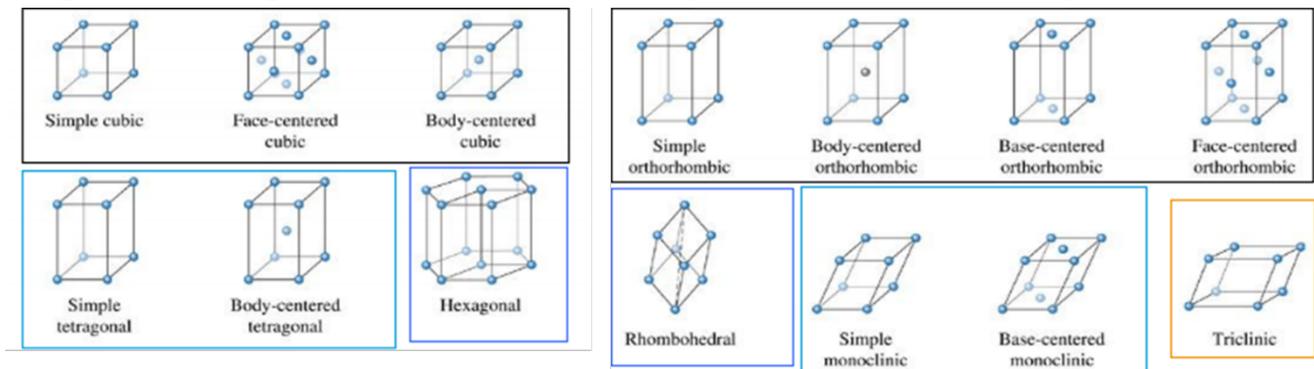


Figura 5: Representación de las estructuras cristalinas básicas o redes de Bravais.

Pasos para la formación de un cristal

La formación de un cristal comienza con la **nucleación**, formación de un núcleo o partícula inicial con las propiedades de un cristal, a partir de la cual éste ya puede crecer. Existen dos modalidades de nucleación:

- **Nucleación homogénea:** Cuando la partícula es de la misma composición y estructura del cristal que se va a formar.
- **Nucleación heterogénea:** Cuando el núcleo es una sustancia diferente y preexistente que favorece su cristalización. Las partículas extrañas quedan incluidas dentro del nuevo cristal como impurezas o inclusiones.

Una vez que el primero de cristal pequeño, el núcleo, forma que actúa como un punto de convergencia (si inestable debido a la sobresaturación) para las moléculas de soluto tocar - o adyacente a - el cristal de modo que aumenta su propia dimensión en capas sucesivas.

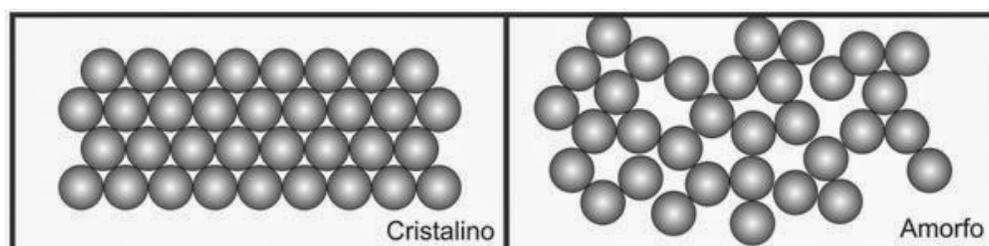


Figura 6: Representación de una capa cristalina versus una capa amorfa. Imagen de: <http://materialesti2.blogspot.com/p/estructura.html>

Introducción a la curva de solubilidad

Las curvas de solubilidad son la representación gráfica del coeficiente de solubilidad. En la **curva de solubilidad** el coeficiente de solubilidad representado depende de la temperatura, de la naturaleza del soluto, de la naturaleza del disolvente y de la presión. Para el caso de un sólido disuelto, la influencia de la presión es muy pequeña. Al elevar la temperatura, el coeficiente de solubilidad aumenta, si el fenómeno de disolución a temperatura constante es endotérmico (es el caso más frecuente), y disminuye en caso contrario. Por tanto, cada soluto disuelto en solución tendrá un coeficiente de solubilidad a ciertos parámetros experimentales.

En cristalización, los experimentos se trabajan a presión y temperatura constante. Así que la solubilidad dependerá de la naturaleza del soluto, en este caso proteína, y la naturaleza del disolvente: agua con amortiguador para mantener el pH constante. En esta curva el **eje de x** representa la concentración de agente precipitante y el **eje de y** representa la concentración de proteína. En la figura se muestra un ejemplo clásico de curva de solubilidad, donde se reconocen tres zonas principales: insaturada, saturada, y sobresaturada. La zona **insaturada** se caracteriza por la baja concentración de proteína y de agente precipitante. La zona **saturada** se caracteriza por unas concentraciones intermedias, tanto para agente precipitante como para proteína. La zona **sobresaturada** se caracteriza por altas concentraciones.

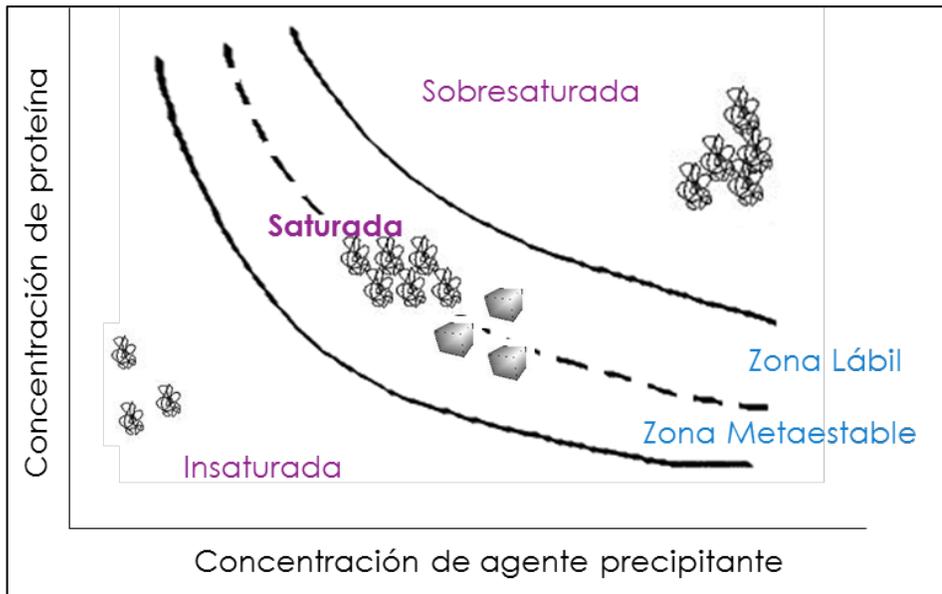


Figura 7: Representación de la curva general de solubilidad. Imagen: Darya Marchany

La formación de cristales está dominada por elementos de naturaleza cinética (velocidad de formación de núcleos) y dependerá de cuán rápido el sistema experimental se mueve hacia la región sobresaturada. También la formación de

crisales estará controlada por elementos termodinámicos (proceso espontaneo versus no espontaneo).

Crecimiento cristalino: técnica de difusión de vapor en gota colgante

Difusión de vapor es el método más común y más utilizado para encontrar las condiciones de crecimiento de un cristal⁴. En ésta técnica, una gota que contiene la proteína y el agente precipitante se equilibra sobre una **solución de reserva**, según ilustra la figura 8. La solución de reserva típicamente contiene el doble de la concentración de sal, en comparación con la gota. Por lo tanto, la solución de reserva atrae las moléculas de agua de la gota. Las moléculas de agua viajan el espacio de separación, hasta que eventualmente la gota entra en la región de sobresaturación de la curva de solubilidad.

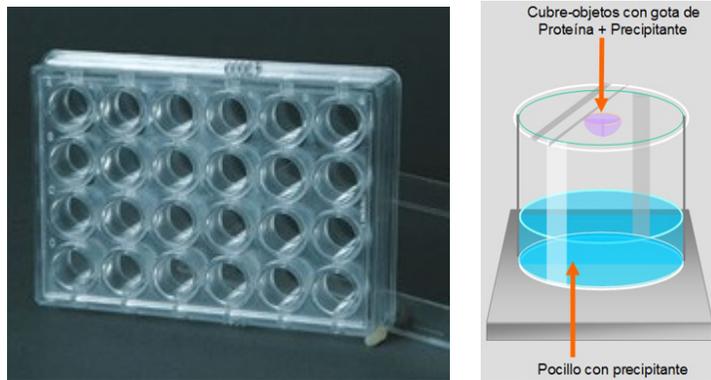


Figura 8: Caja de cristalización. También conocida como caja linbro (a la izquierda). A la derecha, esquema de gota colgante Imagen http://www.xtal.iqfr.csic.es/cristalografia/archivos_07/gota-colgante-en

En ésta zona, la proteína pierde solubilidad y gracias a la falta de las moléculas de agua, se aumentan las interacciones proteína-proteína necesarias para la formación de los núcleos.

En la técnica de gota colgante, se usa una **caja de cristalización**. La misma se caracteriza por 24 pocillos individuales. Cada pocillo potencialmente puede ser un experimento individual. En el pocillo, se contiene la solución de reserva que por lo general tiene tres componentes principales: un agente precipitante, un amortiguador y agua destilada.

Procedimiento general para preparar una solución madre o stock:

1. La solución madre por lo general se prepara a saturación.
2. Decidir el volumen y la concentración a preparar del soluto. El soluto en este caso puede ser: una sal o una proteína
3. Calcular los gramos necesarios a pesar del soluto para preparar la solución, teniendo en cuenta las unidades.
4. Pesé la cantidad de gramos calculadas del soluto
5. Transfiera el soluto sólido pesado al tubo *falcon* o envase que contendrá la solución.
6. Añada una pequeña porción de agua destilada
7. Disolver el soluto sólido poco a poco (sin llenar hasta el volumen deseado), añadiendo porciones pequeñas de agua destilada.
8. Cuando el soluto sólido se disuelva, completar el volumen deseado, añadiendo agua hasta la marca de calibración del envase (*falcon*)
- 9.

Ejemplo 1: Preparemos una solución al 20% w/v de cloruro de sodio (NaCl)

Por definición, 20% w/v (weight per volume, por sus siglas en inglés) se representa como:

$$[1] \quad 20 \% w/v = \frac{20 \text{ gramos de soluto}}{100 \text{ mL de solución}}$$

Si deseamos preparar una solución, usaremos esa definición [1] y la multiplicaremos por el volumen a prepararse. En este ejemplo, prepararemos 5 mL de solución.

$$[2] \quad \frac{20 \text{ gramos NaCl}}{100 \text{ mL de solución}} (5 \text{ mL de solución})$$

El resultado de la ecuación [2] representa los gramos de cloruro de sodio a pesarse para preparar una solución de 5 mL de cloruro de sodio.

Ejemplo 2: Prepararemos 5mL de una solución 3.0M de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄)

Para preparar una solución usando el concepto de Molaridad (M) debemos recordar que por definición:

$$[3] \quad M = \frac{\text{moles de soluto}}{\text{Litros de solución}}$$

Si usamos la definición [3], partiendo de una concentración de 3M, la ecuación se representa como sigue:

$$[4] \quad \frac{3 \text{ mol}}{\text{Litro}} (0.005 \text{ Litros}) \frac{132.14 \text{ gramos de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}{1 \text{ mol de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$$

En la ecuación [4], se multiplico por el volumen de solución a preparar en litros. Además, se usó la masa molecular del soluto, en este caso sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) para cancelar los moles y obtener los gramos a pesarse.

Ejemplo 3: Preparemos 5mL de una solución de lisozima a 100 mg/mL:

Por definición, 100 mg/mL (miligramos sobre mililitros) se representan como:

$$[5] \quad \frac{100 \text{ mg}}{\text{mL de solución}}$$

Si se multiplica la ecuación [5] por el volumen de solución a prepararse, el resultado será los miligramos (mg) de soluto a pesarse:

$$[6] \quad \left(\frac{100 \text{ mg}}{\text{mL de solución}} \right) (5 \text{ mL de solución})$$

Esos miligramos (mg), se pueden convertir en gramos usando el factor de conversión de 1000 mg= 1g

Procedimiento general para preparar la caja de cristalización:

1. Engrasar cada pocillo usando una jeringuilla con grasa de vacío
2. Colocar la solución de reserva en el pocillo, con mucha precaución y sin tocar la grasa
3. Colocar una pequeña gota de proteína en el centro del cubre objeto usando el gotero más pequeño.
4. Una vez la gota de proteína esté en el cubre objeto, añadir sobre la misma una gota de la solución de reserva. Usando un gotero pequeño limpio.
5. Cerrar el pocillo colocando el cubre objeto al que previamente se le colocó la gota de proteína + la solución de reserva, sobre la grasa.
6. Repetir los pasos 3-5 con cada pocillo de forma individual.

Para llevar a cabo el montaje y preparación de una caja de cristalización es necesario calcular el volumen de solución que añadiremos a cada pocillo. Este volumen de solución formará la **solución de reserva**. La misma está compuesta generalmente de una mezcla homogénea de: agente precipitante, amortiguador (buffer) y agua.

Se debe antes de comenzar a trabajar seleccionar el volumen total de solución que llevará cada pocillo en nuestro experimento. El volumen máximo recomendado por cada pocillo es 1mL ó 1000 μ L. Para llevar a cabo los cálculos de volumen a añadir en cada pocillo se usará la siguiente ecuación:

$$[7] \quad (C_1V_1) = (C_2V_2)$$

Dónde:

C_1 representa la concentración inicial de soluto en la solución madre o stock;

C_2 representa la concentración experimental de soluto que llevará el pocillo;

V_1 representa el volumen a añadir de la solución madre al pocillo;

V_2 representa el volumen total experimental del pocillo.

Usando el volumen total se calculará el volumen necesario a añadir de cada componente de la solución de reserva (V_1). Como hay tres componentes, se requiere hacer varios cálculos matemáticos. Los detalles serán cubiertos en el próximo ejemplo.

Ejemplo 1: Usaremos un volumen total de pocillo de 500 μL . Nuestras soluciones madres de agente precipitante y amortiguador están en una concentración de: 20% w/v para el agente precipitante cloruro de sodio y 1M para el amortiguador acetato de sodio.

- a. Haremos primero el cálculo considerando la solución de **cloruro de sodio**:

En este caso: C_1 representa la concentración inicial de cloruro de sodio que es 20% w/v. V_2 representa el volumen total del pocillo: 500 μL .

C_2 representa la concentración experimental de soluto que llevará el pocillo. Por lo tanto, se decide teniendo en cuenta el diseño experimental. Para este ejemplo C_2 será 10% w/v de cloruro de sodio.

V_1 representa la concentración experimental de soluto que llevará el pocillo. Es la cantidad que quiero encontrar con el cálculo. Por lo tanto, despejaremos la ecuación [7] para V_1 y sustituimos valores:

$$[8] \quad V_1 = \frac{(C_2)(V_2)}{(C_1)}$$

$$V_1 = \frac{\left(10\% \frac{w}{v} \text{cloruro de sodio}\right)(500\mu\text{L})}{\left(20\% \frac{w}{v} \text{cloruro de sodio}\right)}$$

$$V_1 = 250 \mu\text{L}$$

- b. Haremos ahora el cálculo considerando la solución de **acetato de sodio** pH 4.6:

En este caso: C_1 representa la concentración inicial de acetato de sodio que es 1M. V_2 representa el volumen total del pocillo: 500 μL .

C_2 representa la concentración experimental de soluto que llevará el pocillo. Por lo tanto, se decide teniendo en cuenta el diseño experimental. Para este ejemplo C_2 será 500 mM de acetato de sodio, o su equivalente en unidades M, que es $5 \times 10^{-3} \text{ M}$.

V_1 representa la concentración experimental de soluto que llevará el pocillo. Es la cantidad que quiero encontrar con el cálculo. Por lo tanto, nuevamente, despejaremos la ecuación [7] para V_1 :

[9]
$$V_1 = \frac{(C_2)(V_2)}{(C_1)}$$

$$V_1 = \frac{(5 \times 10^{-3} M)(500 \mu L)}{(1M)}$$

$$V_1 = 25 \mu L$$

- c. Ahora calcularemos la cantidad de agua a añadir al pocillo para completar el volumen total experimental:

[10]

volumen de agua =

(volumen total experimental) –

(volumen amortiguador + volumen de agente precipitante)

Sustituyendo en la ecuación 10;

$$\text{Volumen de agua} = 500\mu L - (25\mu L + 250\mu L)$$

$$\text{Volumen de agua} = 500\mu L - (275\mu L)$$

$$\text{Volumen de agua} = 225 \mu L$$

Finalmente, al completar cada cálculo nuestro pocillo llevará:

Solución	Volumen	Conversion a gotas
Cloruro de Sodio (Agente Precipitante)	250 uL	15 gotas
Acetato de sodio (amortiguador)	25 uL	1 gota
Agua	225 uL	14 gotas

Referencias:

[1] Estados de la materia

https://es.wikipedia.org/wiki/Estado_de_agregaci%C3%B3n_de_la_materia

[2] Sólidos cristalinos

http://educativa.catedu.es/44700165/aula/archivos/repositorio/4750/4910/html/1_slidos_cristalinos_tipos_de_cristales.html

[3] Curva de solubilidad https://www.ecured.cu/Curva_de_solubilidad

[4] J.A. Gavira, Current trends in protein crystallization, Archives of Biochemistry and Biophysics (2016), doi: 10.1016/j.abb.2015.12.010.

[5] Estado sólido: <http://quimicadelamateria.blogspot.com/2009/10/un-solido-cristalino-es-aquel-que-tiene.html>

Anejo

I. Tabla de conversión de volumen para el uso del gotero calibrado

Volumen	Conversion a gotas
25 μ L	1
50 μ L	3
100 μ L	6
200 μ L	9
250 μ L	15
500 μ L	30
750 μ L	45
1000 μ L	60

II. Material Suplementario

- An Overview of Biological Macromolecule Crystallization:
<http://www.mdpi.com/1422-0067/14/6/11643/htm>
- <http://xray.bmc.uu.se/terese/tutorials.html>
- Protein Crystallization for X-ray Crystallography:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3182643/>

III. Conversion de unidades de mg/mL a M:

Nota:

mg/mL es una unidad de concentración que comúnmente se utiliza en experimentos de cristalización. Si quisiéramos transformar esta unidad a Molaridad solo necesitamos el peso molecular de nuestra proteína. Lisozima tiene un peso molecular de 14,300 g/mol

Si queremos calcular la concentración de la solución stock en unidades de Molaridad

$$100 \frac{mg}{mL} \times \frac{1000 mL}{1L} \times \frac{1g}{1000mg} \times \frac{1 mol}{14300g} = 0.00699 M$$

($M = \frac{mol}{L}$):