

República Bolivariana de Venezuela

Universidad del Zulia

Facultad Experimental de Ciencias

Departamento de Biología

Laboratorio de Bioquímica

Practica No. 6

Cromatografía por exclusión molecular.

Resultados y Discusión

Grafico #1. Curva de absorción del Azul dextrano

Grafica #2. Curva de absorción de la Riboflavina.

Se determinó la longitud de onda donde el Azul dextrano y la Riboflavina tuvieran una absorbancia mayor; para esto fue necesario comenzar las mediciones a 400 nm y variando la longitud de onda en 50 nm hasta alcanzar una longitud de onda igual a 700 nm, se obtuvo que el Azul dextrano obtuvo una máxima absorbancia a una longitud de onda de 650 nm, con un valor de 0.318. Para la Riboflavina; el resultado fue una máxima absorbancia de 1.09, a los 450 nm de longitud de onda. La prueba de estos valores se pueden apreciar en la grafica 1 y 2, donde los picos mas altos reflejan la longitud de onda ala cual se registro la máxima absorvancia.

Gráfica #4. Perfil de elusión del Azul dextrano.

Gráfica #3. Perfil de elusión de la Riboflavina.

En una cromatografía en columna lo habitual es recoger **fracciones** del líquido que sale (o **eluye**), para analizarlas individualmente y así trazar el **perfil de elución** de la cromatografía.

Para la determinación del perfil de elusión, se recurrió entonces a medir la absorbancia de cada una de las fracciones recogidas, una vez que estas eran eluidas de la columna de separación, el perfil se determina por la presencia de un gran pico en la gráfica, indicando un alto porcentaje de la muestra que se aplicó en la columna. Las longitudes de onda a la cual se les midió la absorbancia fueron a 450 y a 650 nm; longitudes de ondas donde inicialmente se determinó que la Riboflavina y el Azul dextrano; respectivamente, obtenían su máxima absorbancia. El resultado obtenido era el esperado, pues en la fracción Nro 3 se obtuvo la mayor absorbancia a los 650 nm (0.24 Abs); y a los 450 nm se percibió en la fracción Nro 7 (0.67 Abs). Estos resultados arrojan que el Azul dextrano fue el primero en eluir de la columna, cumpliéndose el principio de la **cromatografía por exclusión molecular**: El material que llena la columna (fase estacionaria, gel o resina) está formado por partículas con poros de un cierto intervalo de tamaños. Las moléculas mayores que los poros (Azul dextrano) no pueden entrar en ellos, por lo que "pasan de largo" y avanzan por la columna (**eluyen**) con mayor rapidez que las de tamaño menor, que pueden entrar en los poros y así realizan un recorrido mayor, progresando más lentamente a lo largo de la columna; en este caso la molécula que entró dentro del Sephadex fue la Riboflavina, en consecuencia fue la última en eluir.

Conclusión:

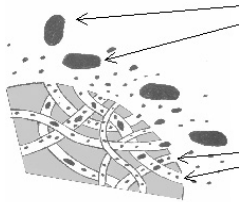
Los picos del perfil cromatográfico representaron zonas individuales del Azul dextrano y de la Riboflavina, que al compararlas se pudo observar que hay diferencias en sus dimensiones moleculares. Por lo cual la técnica de separación por medio de la Cromatografía por exclusión molecular fue conveniente.

Autoevaluación:

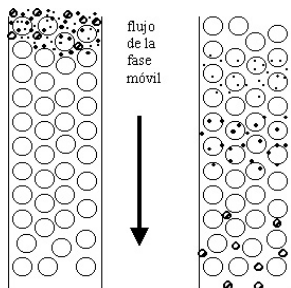
1.- Explique el fundamento de la Cromatografía de exclusión molecular.

La cromatografía de filtración molecular es un método de cromatografía en columna por el cual las moléculas se separan en solución según su peso molecular, o más precisamente, según su radio de Stokes.

En esta cromatografía, la fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa. A los fines prácticos, la columna se empaqueta con pequeñas partículas esféricas formadas por esos polímeros entrecruzados. En consecuencia, estas partículas son porosas, y el tamaño de los poros es tal que algunas moléculas (las demasiado grandes) no podrán ingresar a esos poros, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán pasar libremente. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de esta.



Los poros de la matriz deben ser de tamaño comparable al tamaño de las moléculas que se desea separar. Las moléculas de mayor tamaño que los poros harán el camino más corto, ya que nunca entran a la malla de la fase estacionaria. Se dice que estas moléculas son excluidas. Las moléculas pequeñas pueden difundir dentro de la matriz. Cuanto menor es su tamaño, mayor es la probabilidad de que entren a un poro. Así, a menor tamaño de la molécula, más largo el camino que seguirá dentro de la malla de la fase estacionaria.



En una columna de filtración molecular, las partículas que forman la fase estacionaria están empaquetadas dentro de una columna cilíndrica por donde fluye la fase móvil (el eluyente). Es frecuente que estas columnas estén en posición vertical y que el pasaje de la fase móvil sea impulsado por la fuerza de gravedad.

Las moléculas excluidas se mueven continuamente junto con el eluyente, en tanto que aquellas que por su tamaño pueden ingresar a la fase estacionaria son retardadas en función de sus tamaños. Por lo tanto, las

primeras moléculas que eluyen son las excluidas, y luego, en orden de tamaño decreciente, las moléculas no excluidas.

2.- Cómo se detecta la presencia del azul dextrano y de la riboflavina en las fracciones recogidas ?.

Se determina mediante la técnica de espectrofotometría. Ya que a 650 y a 450 nm de longitud de onda se puede determinar la máxima absorbancia de Riboflavina y el Azul dextrano, respectivamente, presente en las fracciones.

3.- En qué fracción o fracciones se detectó el mayor contenido de cada una de estas dos moléculas?

En la fracción Nro 3 se detectó el mayor contenido de azul dextrano y en el Nro 7 la de Riboflavina.

4. A qué se denomina volumen de exclusión?.

Se denomina así al volumen del efluente que corresponde al pico de la curva trazada para determinar el perfil de exclusión.

5.- Qué diferencia existe entre el Sephadex G-25 y G-100, y para qué se utiliza?

La diferencia marcada entre ambos Sephadex; persiste en que sus tamaños de la partícula seca, para el G-25 es de 100 -300 para el tipo Coarse, para el médium 50-150 μm , para la fine 20-80 μm y la superfine 10-40 μm ; mientras que para la G-100 es de 40-120 μm . Otra diferencia es; que el rango fraccionamiento: para G-25 es de: 1.000-5.000 Dalton; y para la G-100 es de 4000-150.000 Dalton se emplea para desalar muestras porque el diámetro de sus poros solo permite el paso de moléculas pequeñas (no más de 150.000 Dalton).

Bibliografía:

- Albert L. Lehninger. " Bioquímica " Segunda edición Ediciones Omega, S.A. Barcelona 1978.
- David T. Plummer . " Bioquímica Práctica " Editorial McGraw-Hill latinoamericana, S.A. Colombia 1981.