

# 5

## Tres prácticas de laboratorio para Biología de COU

Por Juan SANCHEZ BALLESTEROS (\*)

### OBJETIVO

El objetivo de estas prácticas de laboratorio es la introducción en Biología de COU de uno de los métodos de separación de los componentes de una mezcla más utilizado en investigación en el campo de la Biología, de la Bioquímica o de los productos naturales, con el deseo de una modernización constante de las experiencias de laboratorio del Curso de Orientación Universitaria en concordancia con lo que el alumno verá, posteriormente, en la Universidad. Se propone la realización de estas tres prácticas de separaciones cromatográficas en la que se utilizan los materiales y operaciones más empleadas en estas técnicas.

### TEORIA

Se denomina cromatografía a la técnica de separación de los componentes de una mezcla de sustancias en función de las diferentes velocidades con que se mueven cada uno de los componentes a través de un medio poroso arrastrado por un disolvente en movimiento. Atendiendo al tipo de proceso que se lleva a cabo, podemos clasificar las técnicas cromatográficas en cinco grupos: cromatografías de adsorción, de reparto, de filtración sobre gel, de intercambio iónico y de gases, de las cuales utilizaremos en las prácticas las dos primeras. En la cromatografía de adsorción la separación se lleva a cabo atendiendo a la diferente afinidad de adsorción de cada uno de los componentes de la mezcla hacia el medio poroso entre el que es arrastrado, de forma que aquellos componentes que se adsorban más débilmente avanzan con más rapidez que los que lo hacen con mayor fuerza. En la cromatografía de reparto el medio poroso usado lleva absorbida una cierta cantidad de agua por lo que las separaciones se llevan a cabo en función de la distribución continua (coeficiente de reparto) de los componentes de la mezcla a separar entre el agua del medio y el disolvente (eluyente) que se desplaza a través del medio.

En las separaciones que vamos a realizar como experiencias de laboratorio se dan fenómenos de adsorción y de reparto. En ellas vamos a utilizar separaciones en columna cerrada y en columna abierta. Las primeras se realizan en columnas de relleno, que son columnas largas de vidrio de varios centímetros de diámetro provisto de una llave en el extremo inferior (se puede utilizar como tal una bureta de 100 ml. de capacidad) rellena de un medio poroso (sulfato cálcico finamente dividido, alúmina, celulosa, almidón, gel de sílice, magnesia, etcétera) mojado continuamente por un disolvente y a través de ella se pasa la mezcla a separar arrastrada por el eluyente.

En las separaciones de columna abierta tenemos dos tipos de cromatografía, las denominadas de papel y en capa

fina. La primera se lleva a cabo sobre tiras de papel (celulosa), generalmente por reparto, y tiene la ventaja de que en esta técnica se puede detectar e identificar cantidades de sustancias del orden de los microgramos. La segunda se lleva a cabo en un material soportado sobre placas de vidrio y en ella las separaciones se realizan atendiendo a fenómenos de adsorción y reparto, respectivamente. Estas dos últimas separaciones tiene la ventaja sobre la de columna cerrada que en ellas se pueden separar cantidades pequeñas de sustancias, con la que sería imposible trabajar en columna.

### EXPERIENCIA N.º 1.—SEPARACIONES DE AMINOACIDOS POR CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA

#### 1.1. Material necesario:

Solución acuosa concentrada de glicina, ácido aspártico, ácido glutámico y tiroxina, alcohol etílico, agua destilada, ninhidrina, gel de sílice G, portaobjetos de microscopio, vaso de precipitado de 250 mls. de capacidad, vidrio de reloj y capilar.

#### 1.2. Preparación de placas:

Se toman 30 gr. de gel de sílice y se mezclan con 60 mls. de agua destilada formando una papilla completamente homogénea. Se preparan varios portaobjetos limpios y se introducen en el interior de la papilla sacándolos rápidamente y se dejan reposar en un papel de filtro toda la noche. An-

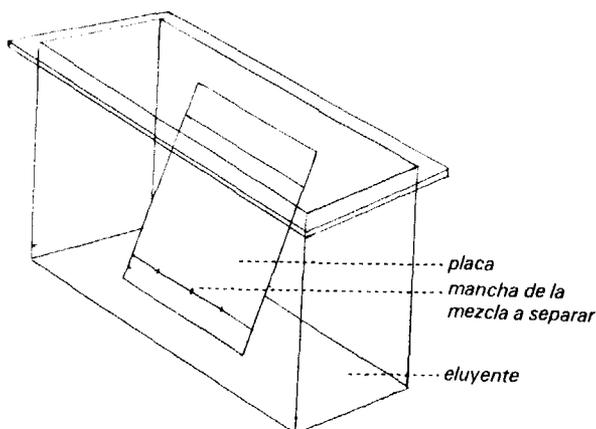


FIGURA N.º 1

(\*) Profesor Agregado de Física y Química. I.B. «La Isleta» (Las Palmas).

tes de aplicar la muestra a separar en la cara que no he estado en contacto con el papel de filtro, se quita con las uñas una línea muy fina de adsorbente por los lados de la placa, y ya está lista para su empleo.

### 1.3. Método:

En un vaso de precipitado de 250 mls. se introduce una pequeña tira de papel de filtro ligeramente inferior a la altura del vaso y lo suficientemente largo para cubrir las dos terceras partes de la superficie interior. Se añade hasta una altura de 1 cm. una disolución de etanol acuoso al 50 por 100.

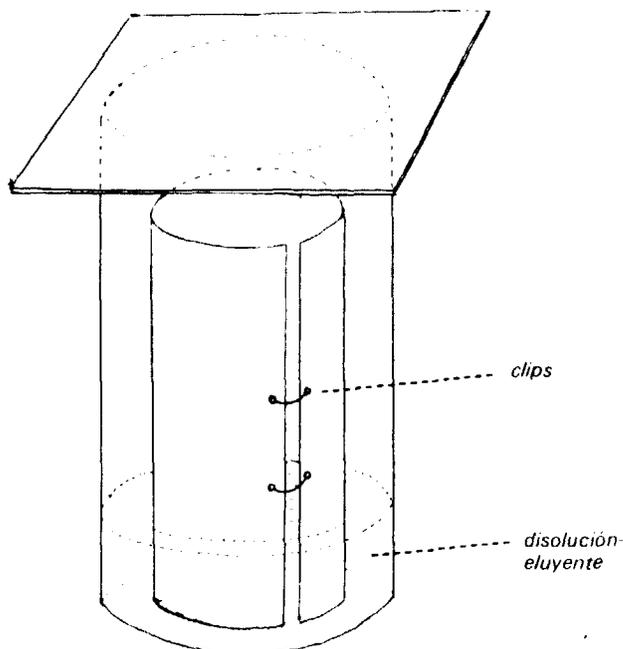


FIGURA N.º 2

Antes de introducir la placa en el vaso conviene asegurarse de que el papel está saturado de disolvente. En la placa anteriormente preparada, se coloca a 1,5 cm. del borde inferior, con un capilar, varias gotas de la disolución de aminoácidos y se introduce la placa en el vaso de precipitado, cerrando éste con un vidrio de reloj. Se deja que suba el disolvente a través de la placa por capilaridad arrastrado en su ascensión a los componentes de la mancha. Una vez que el frente líquido ha llegado arriba de la placa, se saca ésta del vaso y se seca. Una vez seca, se pulveriza toda ella con ninhidrina, observándose distintas manchas, de color parduzco, en la placa a diferentes alturas, (figura núm. 1), correspondiendo cada una de ellas a los distintos aminoácidos existentes en la mezcla.

### 1.4. Resultados:

Si se dispone de una lámpara ultravioleta se verá el cromatograma o las distintas manchas en la placa desarrollada y seca sin necesidad de revelado con ninhidrina.

Se puede determinar el valor del Rf de cada aminoácido (que es igual al cociente entre la distancia recorrida por la sustancia y la distancia recorrida por el disolvente) que es un valor constante para cada aminoácido en unas idénticas condiciones de revelado y desarrollo cromatográfico.

Otra forma de revelado consiste en introducir la placa, una vez desarrollada y seca, en un recipiente cerrado herméticamente con vapores de yodo en su interior. Las manchas de los distintos aminoácidos aparecerían de color violeta pardo.

## EXPERIENCIA n.º 2. SEPARACION DE LOS COMPONENTES DE UNA MEZCLA DE INDICADORES POR CROMATOGRAFIA DE PAPEL.

### 2.1. Material necesario:

Rojo fenol, azul de bromofenol, rojo congo, alcohol n-butílico, alcohol etílico, amoniaco 2N, papel de filtro Whatman núm. 1 ó 3, capilar, vaso de precipitado de 500 mls.

### 2.2. Método:

En un vaso de precipitado de 500 mls. se adiciona una disolución de alcohol n-butílico-alcohol etílico-amoniaco 2N en proporción 3:1:1 hasta una altura de 1 cm. Se toma un papel de filtro de altura inferior a la del vaso de precipitado y de una anchura tal que se pueda formar con él un cilindro y quepa en el vaso de precipitado sin tocar las paredes de éste. Sobre este papel y a una distancia de 1,5 cm. del borde

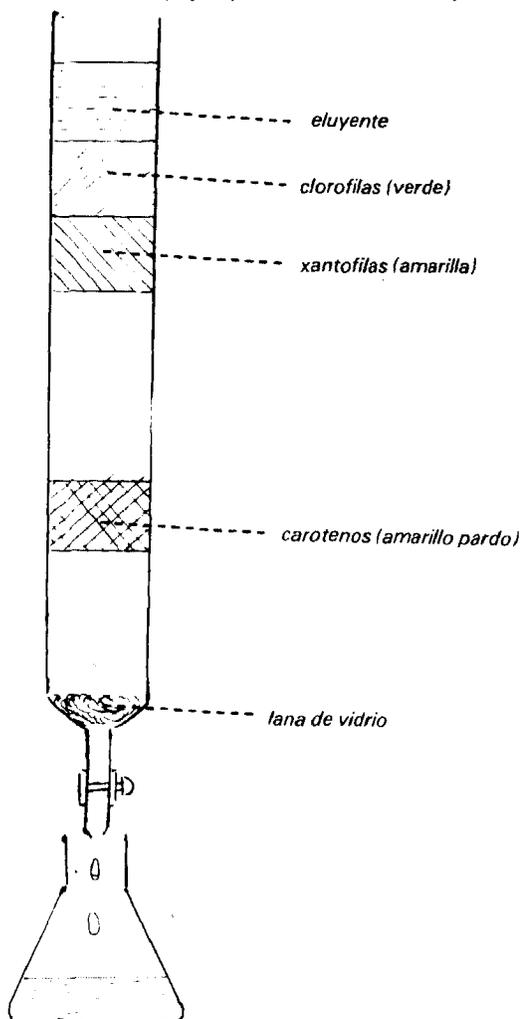


FIGURA N.º 3

inferior se traza una línea, paralela al borde, con un lápiz suave y sobre ella se coloca en cuatro puntos varias gotas de cada uno de los indicadores (uno por punto) y en el cuarto punto se coloca varias gotas de una mezcla equimolecular de los tres indicadores. Antes del desarrollo del papel se expone éste a los vapores de amoniaco concentrado, que convertirá a cada indicador en la forma que presenta en medio básico, y a continuación se enrolla en forma cilíndrica cogido por dos clips y se introduce en el vaso de precipitado, cerrándolo con un vidrio de reloj o placa de vidrio. Se deja desarrollar el cromatograma hasta que el frente líquido

## CASSETTE-HOMENAJE A MARIA ZAMBRANO



- Voz de María Zambrano en lectura de texto inédito.
- Estudio de Jesús Moreno.
- Lectura de fragmentos de la obra de M. Z. por Javier Sádaba.

Otras producciones de esta serie

## HOMENAJES Y CONMEMORACIONES

- Azorín. Conmemoración de su nacimiento.
- Moguer. Conmemoración del nacimiento de Juan Ramón Jiménez.

Precio de cada cassette: 400 ptas.

**Edita: Servicio de Publicaciones del  
Ministerio de Educación y Ciencia**



- Planta baja del Ministerio de Educación y Ciencia. Alcalá, 34.
- Paseo del Prado, 28. Madrid-14.
- Edificio del Servicio de Publicaciones. Ciudad Universitaria. Madrid-3. Teléfono: 449 67 22.

alcance una altura indicada y razonable. Se saca el cilindro de papel del vaso y se seca (figura num. 2).

### 2.3. Resultados:

Una vez seco el papel se observa que del cuarto punto ha aparecido tres manchas de Rf y color correspondiente a cada uno de los indicadores que existían en la mezcla y que han ascendido de los puntos 1 (Rojo fenol), 2 (Azul de bromofenol) y 3 (Rojo congo) paralelamente. El valor de estos Rf es el correspondiente a la forma básica de cada indicador; si los indicadores se desarrollan en la forma que presentan en medio ácido los valores de los Rf son distintos, lo cual se puede comprobar en un experimento posterior.

### EXPERIENCIA n.º 3. SEPARACION DE PIGMENTOS VEGETALES POR CROMATOGRAFIA DE COLUMNA

#### 3.1. Materiales necesarios:

Bureta de 100 mls., pipeta de 5 mls., erlenmeyer de 250 mls., alúmina, zanahoria y éter de petróleo.

#### 3.2. Llenado de columna:

Como columna se puede utilizar una bureta de 100 mls. en la que por dentro, en la parte inferior, se coloca lana de vidrio. Se cierra la llave y se adicionan 20 mls. de éter de petróleo. Se cogen 15 gr. de alúmina y se suspenden en 50 mls. de éter de petróleo, procurando que la suspensión sea homogénea. Se adiciona ésta por lo alto de la columna hasta que se llenen las dos terceras partes de ésta. Se enrasa la columna dejando un centímetro de éter de petróleo por encima de la superficie de la alúmina hasta el comienzo de la separación.

#### 3.3. Método:

5 mls. de una solución obtenida por extracción con éter de petróleo de algunas rodajas de zanahorias se adicionan por encima de la columna de relleno anteriormente preparada, se enrasa hasta la superficie de la alúmina y se agrega más éter de petróleo, procurando que el flujo a través de la columna tenga un caudal constante y procurando que la columna no se seque. Una vez que se observe una separación nítida de bandas coloreadas se dá por terminado el desarrollo.

#### 3.4. Resultados:

Una vez desarrollado el cromatograma se observa con nitidez la separación de bandas coloreadas correspondiente a los distintos pigmentos vegetales. Cuando se utiliza como material de partida hojas verdes de plantas (espinaca o hierba fresca) la separación de los pigmentos vegetales, en columna utilizando como soporte sólido magnésia (óxido magnésico) y como eluyente ciclohexano, es aún más nítida, observándose cuando se desarrolla el cromatograma la separación de bandas correspondiente a la clorofila (verde), xantofilas (amarilla) y carotenos (amarillo más oscuro). Cuando en lugar de magnésia se coloca almidón se consigue desdoblarse la banda verde de clorofila en dos: una amarilla (clorofila b) y otra verde (clorofila a) (figura núm. 3). La separación de estos pigmentos también se consigue con nitidez utilizando la cromatografía de papel, empleando hojas de alguna planta verde y como eluyente éter etílico. En esta separación se observan tres bandas o manchas coloreadas: una verde (clorofilas), otra amarilla (xantofilas) y otra grisácea (mezcla de clorofila y caroteno). El método de separación es idéntico a la de la experiencia n.º 2, con la salvedad de que conviene extraer los pigmentos moliendo en un mortero las hojas en presencia de acetona y arena de mar, lavada y seca, y posterior filtración del material insoluble.