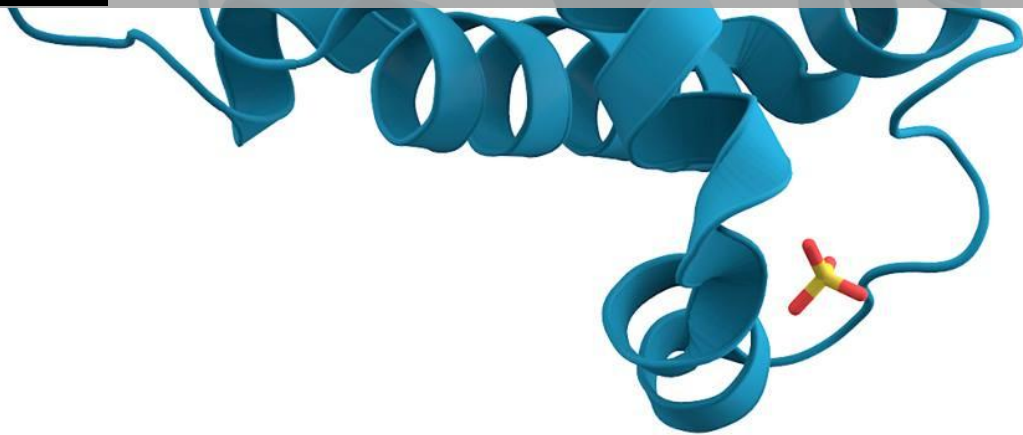


CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO



Integrantes: | Álvarez - Costanzo - Diaz Zegarra -Gerez- Hollman-
Hurtado- Lucero- Macuso- Ruggieri- Strack

INTRODUCCIÓN.

La cromatografía de intercambio iónico es un método que permite la separación de moléculas basada en sus propiedades de carga eléctrica. Se compone de dos fases: la fase estacionaria o intercambiador iónico, y la fase móvil. La fase estacionaria insoluble lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas, que retienen contraiones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil, la cual suele ser una disolución acuosa con cantidades moderadas de metanol u otro disolvente orgánico miscible con agua que contiene especies iónicas generalmente en forma de buffer. Los iones de ésta compiten con los analitos por los sitios activos de la fase estacionaria.

FUNDAMENTO

El principio básico de la cromatografía de intercambio iónico es que las moléculas cargadas se adhieren a los intercambiadores de forma reversible de modo que dichas moléculas pueden ser asociadas o disociadas cambiando el ambiente iónico. La separación mediante intercambiadores iónicos se realiza por lo general, en dos fases: en la primera las sustancias a separar se unen al intercambiador utilizando condiciones que originan una unión fuerte y estable; a continuación, se eluye de la columna con buffers de diferentes pH o diferente fuerza iónica, compitiendo los componentes del buffer con el material por los sitios de unión.

R^+A^- es un intercambiador aniónico en la forma A^- y B^- representa a los aniones en la disolución.



PROPIEDADES DE LOS INTERCAMBIADORES IÓNICOS

Un intercambiador iónico es, por lo general, un polímero que tiene grupos cargados unidos. La mayoría de las proteínas son estables dentro de un margen de pH determinado (es decir, hay un margen en el que no se desnaturalizan), en el que están cargadas positiva o negativamente. Por lo tanto si una proteína es estable a valores de pH por encima del punto isoeléctrico, se debe utilizar un intercambiador aniónico. Si es estable a valores de pH situados por debajo del punto isoeléctrico, debe utilizarse un intercambiador catiónico.

INTERCAMBIADORES ANIÓNICOS: Son portadores de grupos con cargas positivas que unen aniones de forma reversible. Si el grupo cargado es positivo, es un intercambiador de aniones. Los intercambiadores débilmente básicos más corrientes son los grupos aminos alifáticos o aromáticos.

INTERCAMBIADOR CATIÓNICO: Los intercambiadores catiónicos son portadores de grupos con carga negativa que unen cationes de modo reversible. Un grupo típico que se utiliza en los intercambiadores de cationes es el grupo sulfónico, SO₃⁻. Si se une un H⁺ al grupo, se dice que el intercambiador se encuentra en forma ácida y puede, por ejemplo, intercambiar un H⁺ por un Na⁺ o dos H⁺ por un Ca²⁺. El grupo ácido sulfónico es un intercambiador de cationes fuertemente ácido. Otros grupos de utilización corriente son el carbonilo e hidroxilo fenólico, dos intercambiadores catiónicos débilmente ácidos.

Los polianiones y policationes se unen a los intercambiadores de aniones y de cationes. Sin embargo, las proteínas y los polielectrolitos (polímeros poliónicos) que son portadores de cargas positivas y negativas pueden unirse tanto a los cambiadores de cationes como a los de aniones, dependiendo de su carga neta. La afinidad con la que un polielectrolito concreto se une a un cambiador ionico determinado depende de las identidades y de las concentraciones de los demás iones presentes en la disolución, debido a la competencia entre los diversos iones por los sitios de unión sobre el intercambiador iónico. Las afinidades de unión de los polielectrolitos portadores de grupos ácidos-base dependen también, en gran medida, del PH ya que sus cargas netas varían con dicho valor.

La matriz puede estar hecha de diferentes materiales. Los de uso más corriente son *el dextrano, la celulosa, poli(acrilamida), copolímeros del estireno y divinilbenceno*, en los que el divinilbenceno contiene los grupos cargados y se entrecruza con las cadenas de poliestireno. La elección entre intercambiadores fuertes o débiles está basada en el efecto del pH sobre la carga y la estabilidad. Por ejemplo, si se va a cromatografía una sustancia débilmente ácida que necesita pH muy altos o muy bajos para su ionización, se requiere un intercambiador fuerte debido que este funciona a pH extremos. No obstante, si la sustancia es lábil, es preferible la utilización de intercambiadores débiles. Los intercambiadores débiles son también excelentes para la separación de moléculas con una carga elevada de aquellas con poca carga, debido a que los iones débilmente cargados no se unen, por lo general, al intercambiador. Permiten, asimismo, una mayor resolución de las sustancias si las diferencias de carga son muy pequeñas.

Para una correcta elección de la porosidad y del tamaño de la malla es necesario tener en cuenta que las moléculas pequeñas se separan mejor sobre matrices con tamaño de poro pequeño (o sea, un elevado grado de entrecruzamientos) debido a que la capacidad disponible es grande, mientras que las macromoléculas necesitan un tamaño de poro mayor. Los intercambiadores de celulosa han probado ser los mejores para la purificación de moléculas grandes como proteínas y polinucleótidos. Ello es debido a que la matriz es fibrosa, por lo que todos los grupos funcionales se encuentran en la superficie y disponibles, incluso, para las moléculas mayores.

PROCEDIMIENTO

Esta técnica está basada en 4 etapas:

1- Equilibrio:

El primer paso es el equilibrio de la fase estacionaria con las condiciones iniciales deseadas. Cuando el equilibrio se ha logrado, toda la fase estacionaria se encuentra asociada a iones complementarios (que pueden ser cloro o sodio). Por ejemplo, un intercambiador catiónico sulfonado asociado a Na^+ producto de la disociación de NaOH.

2- Aplicación y Lavado:

El paso siguiente es sembrar la muestra a la cual queremos filtrar a través de la columna mediante un lavado específico. Para ello es necesario aplicar un buffer con el mismo pH y fuerza iónica que el buffer inicial para que todas las proteínas cargadas se unan al intercambiador. Por ejemplo: A la forma sódica de la resina lavada se le añade una solución ácida (pH=3) de la mezcla de aminoácidos; a dicho pH los aminoácidos se encuentran en forma de cationes con carga neta positiva. Los aminoácidos catiónicos tienden a desplazar algunos de los iones ligados a las

partículas de resina. A pH 3 los aminoácidos más básicos se unirán a la resina de forma más estrecha que los más ácidos.

3- Elusión:

Las moléculas captadas por el intercambiador son eluidas debido a cambios en la composición del buffer. La elusión puede realizarse de dos formas diferentes; la más usual consiste en aumentar progresivamente la concentración de un contra ión, de modo de desplazar el equilibrio de unión de la macromolécula hacia la forma libre. El contra ión es normalmente una sal, disuelta en eluyente (NaCl, KCl, etc).

Las macromoléculas de una mezcla se irán desplazando de manera secuencial, de acuerdo a la fuerza de unión: las que posean menos densidad de carga eluirán antes, mientras que para las de mayor carga neta el tiempo de retención será mayor.

La otra manera es realizar un cambio en el PH del solvente; esta técnica se emplea con intercambiadores débiles. La lógica es que al cambiar el PH, de modo de acercarnos al PI de cada proteína, la carga neta de esta irá disminuyendo y en algún punto dejara de interaccionar con la matriz. Sin embargo, esta técnica posee sus desventajas. Dado que es este caso las proteínas se eluirán a un PH igual a su PI su solubilidad estará disminuida y pueden precipitar. Además, La disminución del pH protonará a los grupos negativos de los aminoácidos, por lo que su carga neta tenderá a ser positiva, por lo cual se necesitarán intercambiadores catiónicos (portadores de grupos con cargas negativas) que van a unir estos cationes de forma reversible; en contraposición el aumento del PH provocara una desprotonación de los grupos positivos de los aminoácidos, por lo cual su carga neta tenderá a ser negativa; necesitándose así intercambiadores aniónicos que unan reversiblemente cargas negativas.

Las diversas fracciones pueden analizarse cuantitativamente mediante la reacción con *ninhidrina*. Los aminoácidos aniónicos aparecen primero y los más catiónicos aparecen posteriormente (con un intercambiador catiónico).

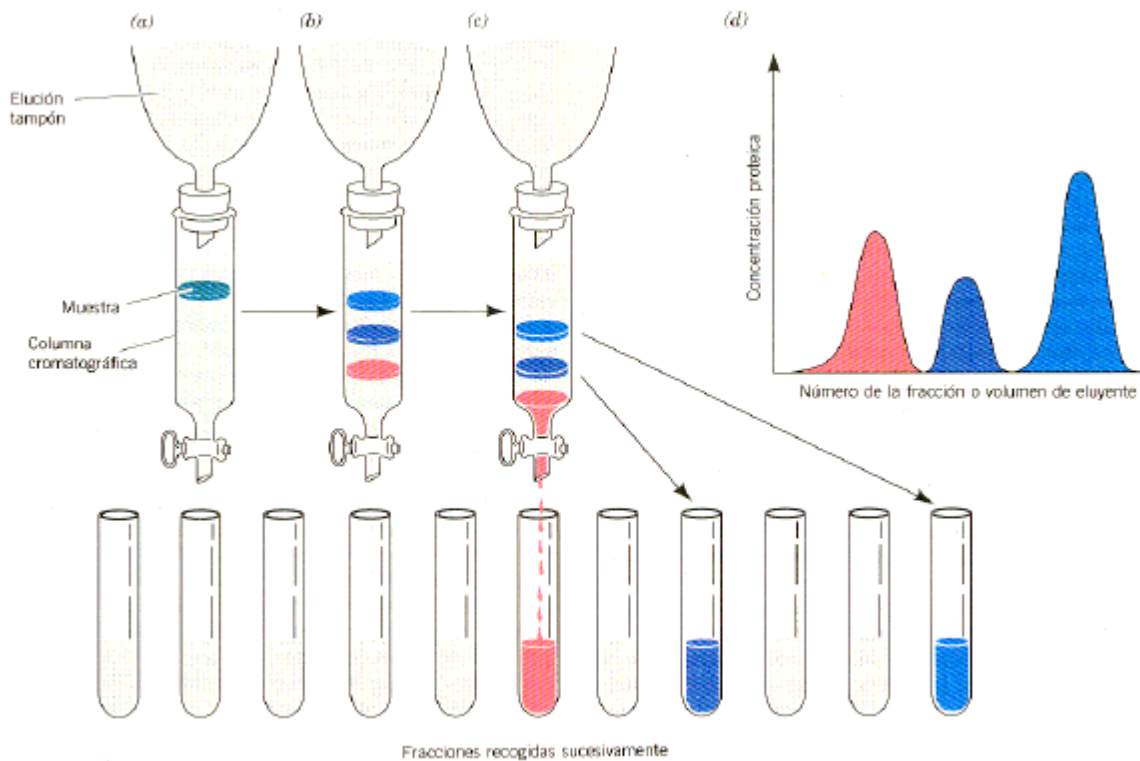
4- Regeneración:

Por último, se remueven las partículas que aún están asociadas al intercambiador. Los iones que se adhieren a los sitios activos de la resina son de muy diferente tipo y pueden ser removidos total o parcialmente durante el proceso de regeneración. Una vez agotadas las resinas, se pueden regenerar a su forma inicial para reanudar la operación de intercambio. Así, el intercambio iónico es un proceso cíclico y no continuo. La regeneración de las resinas se hace según reacciones inversas.

Tipos de regenerantes

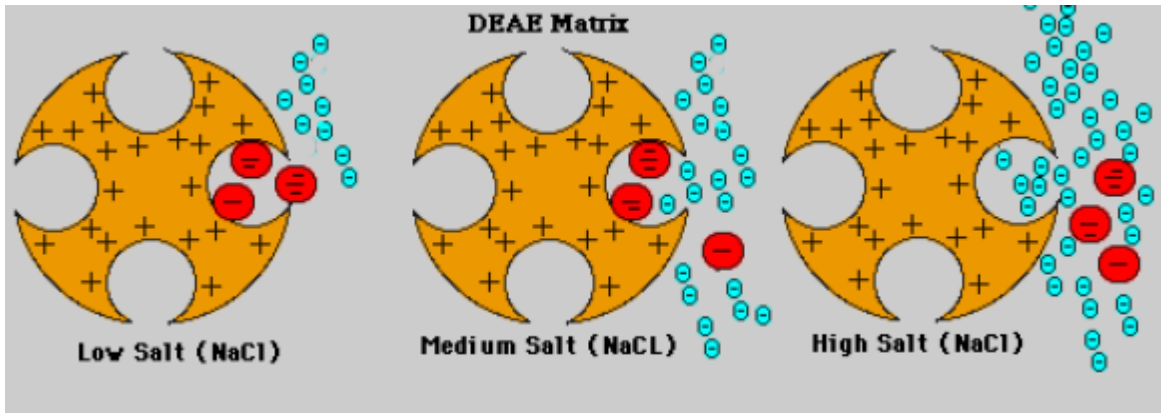
- El cloruro de sodio (NaCl) se emplea normalmente para regenerar las resinas fuertemente ácidas usadas en ablandamiento, y las resinas fuertemente básicas en la eliminación de nitratos.
- En ablandamiento, el **cloruro de potasio** (KCl) puede también emplearse cuando la presencia de sodio en la solución tratada es indeseable.
- En ciertos procesos de tratamiento de condensados muy calientes, el **cloruro de amonio** (NH₄Cl) se puede utilizar también.
- En la eliminación de nitratos, la resina fuertemente básica se puede regenerar con otros compuestos que producen iones de cloruro, tales como el **ácido clorhídrico** (HCl).

- En el proceso de descationización — la primera etapa de una desmineralización — la resina fuertemente ácida (SAC) se debe regenerar con un ácido fuerte. Los regenerantes más comunes son el ácido clorhídrico y el ácido sulfúrico.
 - El **ácido clorhídrico** (HCl) es muy eficaz y no produce precipitados en el lecho de resina.
 - El **ácido sulfúrico** (H₂SO₄) es más fácil de transportar y almacenar y a veces más barato, pero es menos eficaz que el clorhídrico: la capacidad útil de la resina SAC es menor. Además, su concentración se debe ajustar precisamente para impedir la precipitación de sulfato de calcio en la resina (detalles abajo). Una vez precipitado en la columna, CaSO₄ es muy difícil disolver de nuevo.
 - El **ácido nítrico** (HNO₃) se puede también emplear, por lo menos en principio, pero **no es recomendado**, porque puede producir reacciones muy exotérmicas, hasta **explosiones**. Por lo tanto, hay que considerar el ácido nítrico como peligroso.
- En descarbonatación, lo mejor es regenerar la resina débilmente ácida (WAC) con **ácido clorhídrico** (HCl). El sulfúrico se debe aplicar a concentraciones muy bajas (< 0,8%) para que no precipite sulfato de calcio. La cantidad de agua de dilución es por lo tanto muy grande. Otros ácidos más débiles pueden también regenerar resinas WAC, por ejemplo el **ácido acético** (CH₃COOH) o el **ácido cítrico**, una molécula con tres grupos —COOH: (CH₂COOH-C(OH)COOH-CH₂COOH = C₆H₈O₇).
- En desmineralización las resinas fuertemente básicas se regeneran siempre con **sosa cáustica** (NaOH) aunque la **potasa cáustica** (hidróxido de potasio KOH) es otra opción, pero en general más cara.
- Las resinas débilmente básicas (WBA) se regeneran en general también con sosa cáustica, pero otras bases más débiles se pueden emplear:
 - **Amoníaco** (NH₄OH)
 - **Carbonato de sodio** (Na₂CO₃)



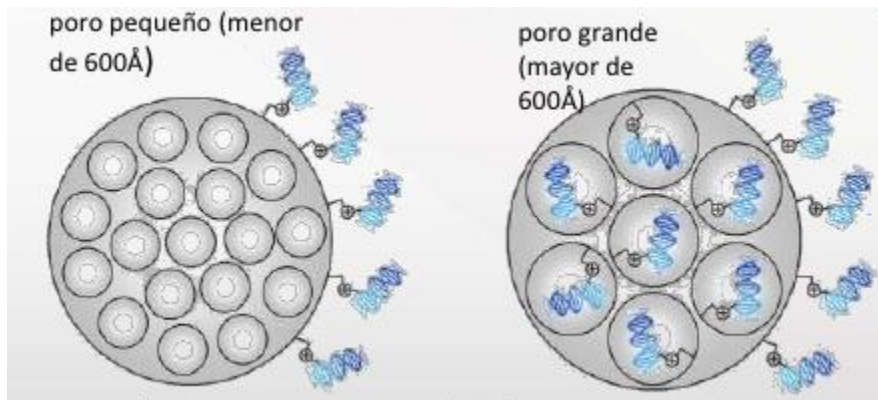
FACTORES QUE AFECTAN LA RETENCIÓN

- **Tiempo de retención (T_r):** En la cromatografía de intercambio iónico la retención está basada en la atracción entre iones del soluto y la carga complementaria de la fase estacionaria. Los intercambiadores iónicos favorecen la unión de iones de mayor carga y radio inferior. Cuando la retención de los compuestos se ve afectada, se favorece la elusión de ellos para ser recolectados en una serie de fracciones.
- **pH:** Las resinas ácidas fuertes siguen ionizadas incluso en disoluciones muy ácidas, en cambio las resinas ácidas débiles se protonan a un pH próximo a 4 y pierden su capacidad de intercambio catiónico, reduciéndose así, el tiempo de retención. Los grupos muy básicos de amonio cuaternario siguen siendo catiónicos a cualquier valor de pH. Los básicos débiles de amonio terciario se desprotonan en disoluciones moderadamente básicas y pierden entonces su capacidad, reduciéndose también el tiempo de retención.
- **Cargas:** La fuerza de enlace de la muestra depende de la magnitud de la carga. La fuerza de retención es mayor y, por consiguiente la de elusión es menor, mientras más cargado se encuentre el compuesto, ya sea negativa (aniones) o positivamente (cationes).
- **Gradiente:** Aumentando la concentración de la fase móvil, los iones compiten cada vez más favorablemente con la muestra por los sitios activos cargados de la fase estacionaria.



Esquema del gradiente del Buffer con contraiones cargados negativamente. Se presenta un gráfico con el poder de elusión (fuerza iónica) y el porcentaje de proteína eluída, que muestra una gradiente directamente proporcional.

- Porosidad:** El tamaño del poro de la resina al que se une el compuesto móvil por intercambio iónico influye directamente en la capacidad de unión. En membranas cuyo tamaño de poro es pequeño (menor de 600Å) no hay espacio suficiente para unir el ión dentro de dichos poros por lo que la cantidad de intercambiador por unidad de superficie es menor. Sin embargo, en membranas con tamaño de poro mayor (mayor de 600Å) se puede unir el compuesto móvil dentro de dichos poros, con lo que se incrementa la cantidad de intercambiador por unidad de superficie. La porosidad busca una mayor superficie de intercambio.



Donde existe mayor porosidad (derecha), se puede unir el compuesto móvil dentro de estos poros incrementando la cantidad de intercambiador de superficie.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) <http://www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia>
- (2) Harris, Daniel C. "Análisis Químico Cuantitativo",
- (3) Lehninger, "Principios de bioquímica", quinta edición.
- (4) Voet Bioquímica, tercera edición y cuarta edición.