

Práctico 2

Laboratorio:

Difusión a través de la membrana

Sección Biofísica

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Introducción:

La difusión es un proceso que permite a iones, moléculas u otras partículas en solución, moverse en función de la existencia de gradientes de potencial electroquímico (es decir diferencias de concentración y existencia de campos eléctricos). En particular, es un fenómeno de transporte pasivo, por lo tanto, el movimiento se da de mayor a menor potencial electroquímico, es decir, en el sentido en que se disipa el gradiente.

A nivel celular, este fenómeno permite el movimiento de diferentes partículas pequeñas a través de la membrana celular, facilitando el intercambio de nutrientes y desechos.

¿Qué factores afectan la tasa de difusión a través de una membrana?

- La tasa de intercambio se ve afectada por la magnitud del gradiente de concentración. Cabe destacar que las partículas individuales se mueven de manera aleatoria debido a la agitación térmica, pero las partículas como colectivo se mueven “a favor” del gradiente de concentración ¿Por qué estos fenómenos no son contradictorios?
- Características de la membrana en sí, como la permeabilidad, superficie o coeficiente de partición.

OBJETIVOS:

- Medir la tasa de transporte de iones utilizando un sensor de conductividad.
- Estudiar el efecto del gradiente de concentración sobre la tasa de difusión.
- Determinar si la difusión de una molécula es afectada por la presencia de otras moléculas.

Materiales

Interfase Vernier

Sensor de conductividad

Programa Logger Pro

Agua destilada

Sal de mesa

Azúcar

Balanza

Vaso de bohemia 400 mL

Vasos de bohemia 100 mL
Pipetas Pasteur
Tubo de diálisis (2.5 x 15 cm)
Pinzas plásticas

Fundamento del protocolo experimental:

Una forma de medir la tasa de difusión a través de una membrana es midiendo la variación de concentración de la molécula de interés en una región dada. Para los iones en particular, que son capaces de transportar corriente en solución, de manera dependiente de la concentración, puede utilizarse un sensor de conductividad para medir la concentración de iones a lo largo del tiempo y a partir de estas medidas, calcular la tasa de difusión.

Por ejemplo, tomemos el cloruro de sodio (NaCl) que en solución se disocia en el catión Na^+ y el anión Cl^- , los cuales son capaces de transportar corriente. Si bien la relación entre la corriente transportada por los iones y la concentración no es siempre proporcional, intuitivamente puede verse que la cantidad de iones se refleja en la capacidad de transportar corriente. Es decir, la concentración se relaciona con la conductividad y por lo tanto pueden usarse medidas de conductividad para medir concentración.

Entonces, si colocamos una solución salina en un tubo de diálisis (que actuaría de membrana) y lo sumergimos en un contenedor con agua destilada, podemos utilizar un sensor de conductividad para medir la variación de concentración iónica en la solución externa. En otras palabras, el sensor de conductividad permitiría monitorear la aparición de iones en el recinto externo y calcular la tasa de difusión.

Variando la composición de la solución en el tubo de diálisis y en el recinto externo, se puede estudiar cómo los gradientes de concentración y la presencia de diferentes partículas afectan la difusión.

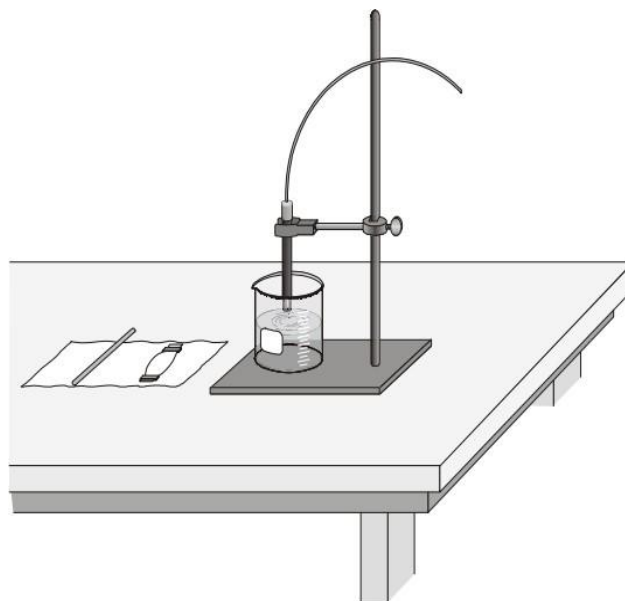


Figura 1: Esquema del dispositivo experimental.

Procedimiento:

- 1) Conectar el sensor de conductividad a la interfase Vernier. Asegúrese de que el sensor esté configurado en sensibilidad intermedia (2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$).
- 2) Preparar la computadora para la recolección de datos abriendo el archivo "01A Membrane difussion" de la carpeta "Advance Biology with Vernier" en Logger Pro.

PARTE 1- Gradientes de Concentración

- 3) Testear si los diferentes gradientes de concentración afectan la tasa de difusión. Se utilizarán tres soluciones con diferentes concentraciones (1%,5% y 10% de NaCl) en agua destilada. Cada solución se colocará en tubos de diálisis y se le permitirá difundir al medio externo. Se medirá el cambio de la conductividad eléctrica en el agua del vaso de bohemia, utilizando el sensor.

Preparación de las soluciones:

- Para preparar las diferentes soluciones que se utilizarán en la práctica, se deben preparar 50 mL de solución de NaCl 10% m/v (solución madre). Deben pesarse 5 g de NaCl y llevarlo al volumen final indicado utilizando agua destilada.
- Las otras dos soluciones se preparan por dilución a partir de la solución de 10%. Realizar los cálculos para preparar 20 mL de solución 5% y 20 mL de solución 1% de NaCl. Medir el volumen necesario de solución madre para cada caso y lleve a volumen final con agua destilada.
- Para la preparación de la solución de sacarosa 5%, deben disolverse 15 g de sacarosa en 300 mL de agua destilada.

Nota: dado que las concentraciones no requieren tanta exactitud pueden utilizarse vasos de bohemia para preparar las soluciones, rotulando cada uno cuidadosamente (a simple vista todo es transparente).

- 4) En la tabla 1, predecir qué ocurrirá en este experimento. Por ejemplo ¿cómo cree que cambiará la tasa de difusión de la solución 10% de NaCl en contacto con agua destilada, con respecto a la solución 1%?



Figura 2: Preparación de tubos de diálisis

5) Preparación de los tubos de diálisis:

Utilizar una sección de tubo de diálisis húmeda (de las dimensiones indicadas en “Materiales”). Usando hilo dental o haciendo un nudo, cerrar uno de los extremos del tubo de diálisis, aproximadamente a 1 cm del mismo.

6) Por otro lado, medir 10 mL aproximadamente de la solución NaCl 1% con una jeringa y transferirlo al tubo de diálisis (Figura 2). Sellar el otro extremo del tubo de diálisis utilizando una pinza. Evitar que queden burbujas de aire dentro del tubo. El mismo debería quedar firme luego de cerrarlo. Eliminar cualquier exceso de hilo dental (en caso de que corresponda). Importante: lavar el tubo externamente con agua destilada para remover el exceso de solución salina.

7) Colocar 300 mL de agua destilada en un vaso de bohemia de 400 mL.

8) Posicionar el sensor de conductividad en el agua. Colocar el tubo de diálisis en el vaso de bohemia. Asegurarse que el tubo quede totalmente sumergido en el agua destilada. Importante: tratar de que en todos los experimentos el sensor de conectividad este a la misma distancia del tubo de diálisis.

9) Luego de agitar la solución por 30 segundos, comenzar la recolección de datos clickeando “Collect”. Continuar agitando la solución lenta y continuamente, durante un periodo de recolección de datos de 2 min.

10) Para determinar la tasa de difusión:

- a) En el gráfico presentado por Logger Pro, seleccionar los datos a partir del punto en que comienza a aumentar la conductividad.
- b) Dar click en el botón “Linear Fit”, para realizar una regresión lineal. Aparecerá un cuadro con la ecuación del mejor ajuste encontrado por el programa.
- c) Registrar la pendiente de la recta como la tasa de difusión en la Tabla 2.

11) Remover la pinza y descartar la solución salina. Dependiendo del estado del tubo, puede reutilizarse o usar uno nuevo. Siempre antes de reutilizar, lavar con abundante agua destilada.

- 12) Repetir los pasos del 6 al 11 para las soluciones 5 y 10 % NaCl.
- 13) Examinar los datos cuidadosamente y sacar conclusiones. Registrar las conclusiones en la Tabla 1.

PARTE 2- Efecto de la presencia de otras moléculas.

Se medirá la tasa de difusión de la sal en presencia de otra solución no conductora. Una solución de sacarosa se utilizará en el medio externo para determinar si ésta interfiere con la difusión del NaCl.

- 14) Nuevamente, en la tabla 1, intentar predecir el resultado del experimento.
- 15) Colocar agua destilada en un vaso de bohemia. Utilizar el sensor de conductividad para determinar el nivel de sales disueltas en el agua destilada. Registrar el resultado en la Tabla 3.
- 16) Colocar 300 mL de solución de sacarosa 5% en un vaso de bohemia de 400 mL. Al igual que con el agua destilada, utilizar el sensor de conductividad para determinar la cantidad de sólidos conductores disueltos y registrar el resultado en la tabla 3.
- 18) Repetir los pasos del 6 al 11, pero utilizando solución de sacarosa 5% en el exterior y solución de NaCl 5% dentro del tubo de diálisis. Registrar el resultado en la Tabla 4.
- 19) Examinar los resultados cuidadosamente. Registrar las conclusiones obtenidas en la Tabla 1.

Resultados:

Tabla 1		
	Predicción	Conclusión
PARTE 1		
PARTE 2		

Tabla 2	
Concentración de sal (%)	Tasa de difusión $mg/L.s$
1	
5	
10	

Tabla 3	
Solución	Concentración (mg/L)
Agua destilada	
Solución de sacarosa	

Tabla 4	
Solución	Tasa de difusión $(mg/L.s)$
5% NaCl	
5% NaCl + 5% sacarosa	

Preguntas para discutir:

- 1) ¿Qué conclusiones puede obtener de la Tabla 2?
- 2) Con los datos obtenidos, ¿cómo podría estimar la tasa de difusión para una solución de sal al 3%? Hágalo.
- 3) ¿Cómo compararía las predicciones hechas en la Tabla 1 con los resultados finalmente obtenidos?
- 4) Si hubo variaciones en las tasas de difusión registradas en la Tabla 2, calcule qué tan rápido ocurrió el transporte con respecto a la solución de NaCl 1%.
- 5) Compare la concentración iónica del agua destilada con la solución de sacarosa. ¿Cómo explica este resultado?
- 6) ¿Qué conclusiones obtiene observando las Tablas 3 y 4?