

UF8

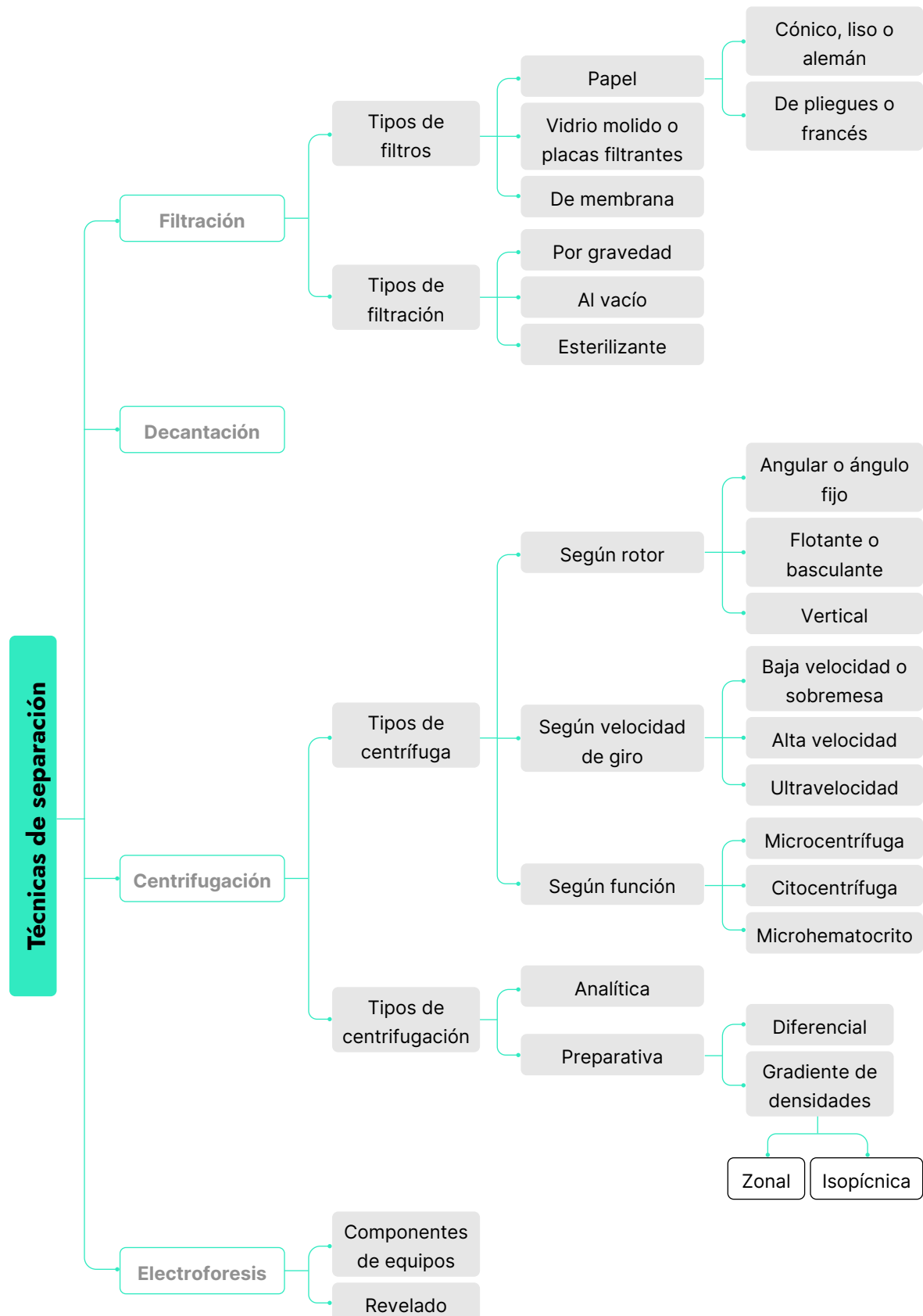
Técnicas de separación

Técnicas generales de laboratorio

ÍNDICE

Mapa conceptual	03
1. Técnicas de separación por filtración	04
1.1. Tipos de filtros	04
1.2. Filtración por gravedad.....	05
1.3. Filtración al vacío	06
1.4. Filtración esterilizante.....	07
2. Técnicas de separación por decantación	09
3. Técnicas de separación por centrifugación	11
3.1. Tipos de centrífugas	11
3.2. Tipos de centrifugación	13
4. Técnicas de separación por electroforesis	16
4.1. Componentes de los equipos de electroforesis	17
4.2. Revelado de los geles de electroforesis	18

Mapa conceptual



01 Técnicas de separación por filtración

DEFINICIÓN

La filtración es un **método físico de separación de sustancias**, ya que separa los componentes de una suspensión en función del tamaño de sus partículas. Sirve para separar por tanto mezclas **sólido-líquido** y también **sólido-gas** (aunque es menos habitual).

Se denomina **filtración** al proceso de separación de partículas sólidas de un líquido (o gas) utilizando un material poroso llamado **filtro**.

La técnica consiste en verter la mezcla sólido-líquido (o sólido-gas) que se quiere separar sobre un filtro de material poroso, el cual permite el paso del líquido pero retiene las partículas sólidas. Así pues, tras el proceso de filtración obtenemos:

»El **filtrado**: es el líquido que ha atravesado el filtro.

»La **torta o residuo**: son las partículas sólidas que han quedado retenidas en el filtro.

Habitualmente el objetivo de filtrar una muestra suele ser recoger el filtrado, aunque en ocasiones, también se puede querer recoger la torta o residuo, e incluso ambos.

Hay **dos tipos de filtración** en función de la fuerza impulsora que ayuda a que el líquido atraviese el filtro:

»Filtración por gravedad.

»Filtración al vacío.

Existe otro tipo de filtración especial que es la filtración **esterilizante**.

1.1. Tipos de filtros

El **objetivo** de un filtro es retener las partículas cuyo diámetro es superior al del poro de dicho filtro y permite el paso del líquido y de las partículas de menor tamaño al del poro, es decir, se consigue separar las partículas en suspensión de la mezcla sólido-líquido.

Se dice que un filtro está **colmatado** cuando hay tantas partículas retenidas en él que ni tan siquiera lo atraviesa el líquido.

El filtro en el laboratorio suele ser **papel poroso**, pero puede ser de otros materiales que permitan el paso de líquidos. Independientemente, es necesario seleccionar la porosidad del filtro según el **diámetro de las partículas** que se quieren separar, ya que si por ejemplo queremos separar partículas o microorganismos de tamaño muy pequeño, del orden de micras, no podremos emplear papel y deberán ser filtros de vidrio molido o placas filtrantes.

FILTROS DE PAPEL	Están hechos con papel filtro y pueden ser de dos tipos: • Filtro cónico, liso o alemán. Se emplea si interesa conservar la torta o residuo. • Filtro de pliegues o francés. Es el más usado y habitualmente se emplea cuando interesa conservar el filtrado. Suele filtrar más rápido, ya que su superficie de filtración es mayor que el filtro cónico.
FILTROS DE VIDRIO MOLIDO O PLACAS FILTRANTES	Son placas hechas de polvo de vidrio molido, tamizado y aglomerado que van montadas en un embudo o en un crisol. Tienen una gran resistencia química y se comercializan con tamaños distintos de poro (2-200 micras). Las placas filtrantes están hechas de celulosa, coadyuvantes filtrantes y resinas, en forma de planchas planas con espesores de entre 1,5 hasta 4,5 mm. Estos tipos de filtros o placas se pueden reutilizar si se realiza una limpieza adecuada tras cada uso.
FILTROS DE MEMBRANA	Son filtros en forma de disco de acetato o nitrato de celulosa que tienen tamaños de poros concretos. Se suelen emplear para realizar filtraciones esterilizantes.

Tabla 1. Tipos de filtros.

1.2. Filtración por gravedad

En esta técnica de separación mediante filtración, la **gravedad** es la **fuerza impulsora** para que el líquido atraviese. Es el método más sencillo y tradicional.

El **objetivo** suele ser recoger el filtrado. Para ello, se vierte la mezcla sólido-líquido a través del filtro y se recoge el líquido filtrado. Primero se coloca el papel de filtro dentro del embudo y este se sitúa sobre el recipiente de recogida, que suele ser un vaso de precipitados o matraz Erlenmeyer. El filtro se puede mojar con la misma clase de disolvente que contiene la suspensión. A continuación, se vierte lentamente la suspensión sobre el filtro con la ayuda de una varilla de vidrio, de forma que no se derrame el contenido.

Hay que tener la precaución de que **no se colmate el filtro**, de lo contrario se puede romper y liberar fibras de celulosa junto con la mezcla y habría que repetir el proceso de filtración.



Fig. 1. Filtración por gravedad.

1.3. Filtración al vacío

En esta técnica de separación de filtración, se aplica el vacío con el fin de **acelerar la velocidad de filtración**. Este tipo de filtración se suele emplear cuando se quiere recuperar la fase sólida de la mezcla o bien cuando la fuerza de la gravedad no es suficiente para filtrar ciertas suspensiones.

Para la filtración al vacío necesitaremos un montaje específico que requiere de embudo Büchner, **papel de filtro circular** (un círculo plano de un tamaño que cubra la base del embudo Büchner), matraz Kitasato, adaptador de goma o de caucho, conexión a un sistema de vacío (bomba de succión). El embudo Büchner y el papel de filtro se pueden sustituir por una placa de filtración.

Puedes ver un ejemplo de kit de filtración al vacío en: <https://bit.ly/3WZWnMw>.

1.4. Filtración esterilizante

Esta técnica se emplea para **eliminar los microorganismos** de disoluciones termolábiles que por tanto no pueden esterilizarse en el autoclave.

Para la filtración esterilizante se emplean **filtros de membrana**, para los que se elige el tamaño de poro del filtro en función de los microorganismos y partículas que se deseen eliminar. Es muy importante que todos los materiales que se empleen estén esterilizados y la filtración se realice en una cabina de seguridad biológica. Se realiza con ayuda de una jeringa o bomba de vacío para así forzar el paso del líquido.

Puedes ver un ejemplo de kit de filtración esterilizante en: <https://bit.ly/3P3pWLR>.

	TAMAÑO DEL PORO	PARTÍCULAS QUE RETIENE
MICROFILTRACIÓN	0,1-10 μm	• Bacterias • Sólidos • Moléculas grandes
ULTRAFILTRACIÓN	50-1000 angstroms ($\text{\AA}$)	• Virus • Macromoléculas: proteínas, hemoglobina, pectinas, etc.
NANOFILTRACIÓN	2-50 angstroms ($\text{\AA}$)	• Iones • Moléculas pequeñas

Tabla 2. Tipos de filtración esterilizante.

1 CASO PRÁCTICO



REALIZA UN FILTRO CÓNICO Y UNO DE PLIEGUES

Aunque en el laboratorio en el que trabajas suelen comprar los filtros, precisamente hoy se han terminado y necesitas filtrar una disolución por gravedad, así que debes elaborar un filtro cónico y uno de pliegues. ¿Cómo los harías?

SOLUCIÓN:

Para la elaboración de ambos tipos de filtros (cónico y de pliegues) debes emplear papel de laboratorio y recortar un cuadrado (o si lo prefieres un círculo) que sobrepase en unos 5 cm aproximadamente el tamaño del embudo que vas a emplear. Hay distintas formas de realizar los filtros cónicos y de pliegues, y en el vídeo <https://vimeo.com/manage/videos/771950039> puedes visualizar una técnica que resulta fácil y rápida de aprender.

Como puedes observar, el filtro cónico es mucho más simple que el de pliegues (puesto que el filtro de pliegues ofrece una mayor superficie de absorción). El filtro cónico es realmente el paso previo al filtro de pliegues, ya que a partir del cónico se van realizando pliegues simétricos hacia uno y otro lado.

02 Técnicas de separación por decantación

La decantación es la técnica de separación más utilizada en la industria **química** y en la **alimentaria**. Por ejemplo, con el fin de realizar el tratamiento de potabilización de aguas, el refinamiento del petróleo, la fabricación de vinagres o la conocida decantación del vino.

DEFINICIÓN

La **decantación** es una técnica de separación física que sirve para separar suspensiones (mezclas sólido-líquido) o emulsiones (mezclas líquido-líquido) en función de la densidad de los componentes por la fuerza de la gravedad.

En el **laboratorio de análisis clínicos** se suele emplear la técnica de decantación para **clarificar líquidos** antes de realizar otras técnicas de análisis. Habitualmente, la decantación es menos eficaz que otras técnicas de separación sólido-líquido, con lo que en el contexto del laboratorio de análisis clínicos, suele usarse como método complementario antes de realizar una filtración o centrifugación.

La decantación de suspensiones, es decir, la separación de mezclas sólido-líquido, también se conoce como **clarificación** o **sedimentación**.

Así pues, esta técnica consiste en la separación del componente más denso de la mezcla:

» **Suspensiones (mezclas sólido-líquido)**. Se deja reposar la mezcla en un recipiente, por ejemplo un tubo de ensayo, vaso de precipitados, matraz Erlenmeyer, etc. Una vez el sólido ha sedimentado en el fondo, se suele recuperar el líquido, vertiéndolo en otro recipiente con ayuda de una pipeta si es necesario.

» **Emulsiones (mezclas líquido-líquido)**. Se emplean habitualmente embudos de decantación (o instrumentos similares) para extraer la fase líquida más densa por la parte inferior gracias a la llave de paso que llevan acopladas. Esta llave se puede abrir y cerrar para extraer el componente deseado.

2 CASO PRÁCTICO



LA DECANTACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS

Una de las múltiples salidas laborales de un técnico superior de laboratorio es poder trabajar en un laboratorio de tratamiento de aguas. ¿Sabrías decir en qué lugar y para qué sirve la técnica de decantación en el tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales?

SOLUCIÓN

La decantación es una fase fundamental en el tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales, ya que se consigue separar y concentrar los fangos, así como los sólidos presentes en el agua residual para posteriormente realizar el resto de tratamientos de las aguas. Puedes consultar los siguientes enlaces:

- <https://bit.ly/3X3SBIB>.
- <https://bit.ly/3NoBNT3>.

03 Técnicas de separación por centrifugación

DEFINICIÓN

Dado que en los laboratorios de análisis clínicos las muestras deben ser procesadas con **rapidez** y **eficacia**, la técnica de separación por centrifugación es una técnica básica que se emplea continuamente.

La **centrifugación** es una técnica de separación física que permite la separación de los componentes de **suspensiones** (mezclas sólido-líquido) y **emulsiones** (mezclas líquido-líquido) gracias a la acción de la fuerza centrífuga.

Así pues, la centrifugación acelera el proceso de sedimentación de las partículas que se produciría si se dejase en reposo la suspensión o emulsión a analizar por la fuerza de la gravedad, sometiéndola a una fuerza de rotación, denominada **fuerza centrífuga**.

La fuerza centrífuga es la que se ejerce sobre un cuerpo cuando este gira alrededor de un eje.

Cuando realizamos el proceso de centrifugación de una mezcla, obtenemos dos fracciones:

» **Sobrenadante**. Es el componente de menor densidad que queda sobre el precipitado. Habitualmente suele ser la fracción líquida.

» **Precipitado o pellet**. Es el componente de mayor densidad y sedimenta en la zona del recipiente más alejada del eje de rotación de la centrífuga. Suele ser la fracción sólida.

3.1. Tipos de centrífugas

Los aparatos que se emplean para llevar a cabo las técnicas de separación por centrifugación, son las **centrífugas**. Se pueden clasificar de diferentes formas, según la velocidad de giro (fuerza centrífuga aplicada) o según su función.

Las centrífugas constan de un **rotor** que gira alrededor de un eje central a través de un **motor** eléctrico. El rotor tiene unas fundas o vainas donde se introducen los tubos con las muestras a centrifugar.

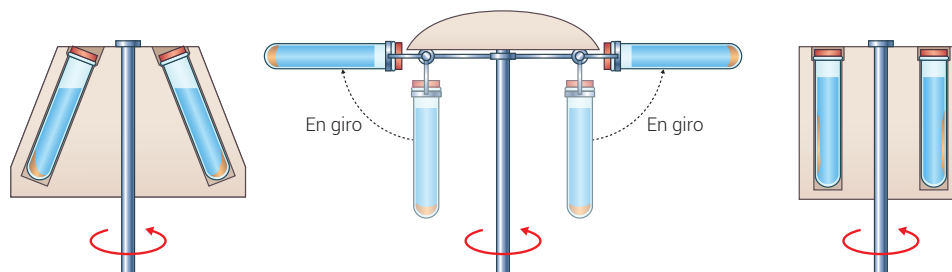


Fig. 2. Funcionamiento de la centrífuga.

La velocidad a la que gira el rotor se mide en **fuerza centrífuga relativa o fuerza g (RCF)**. Es la cantidad de aceleración que se aplicará a la muestra. Depende de las **revoluciones por minuto (rpm)** y del radio del rotor. La fuerza g tiene relación con la fuerza de la gravedad de la Tierra. En los PNT suele figurar rpm, aunque lo más correcto sería indicar la fuerza g o RCF, ya que el tamaño de los rotores será diferente dependiendo la marca y, por lo tanto, la velocidad para que sedimenten las partículas será diferente.

DEFINICIÓN

Para que una **centrífuga** funcione correctamente y de forma segura, el **rotor** debe estar siempre bien **equilibrado**.

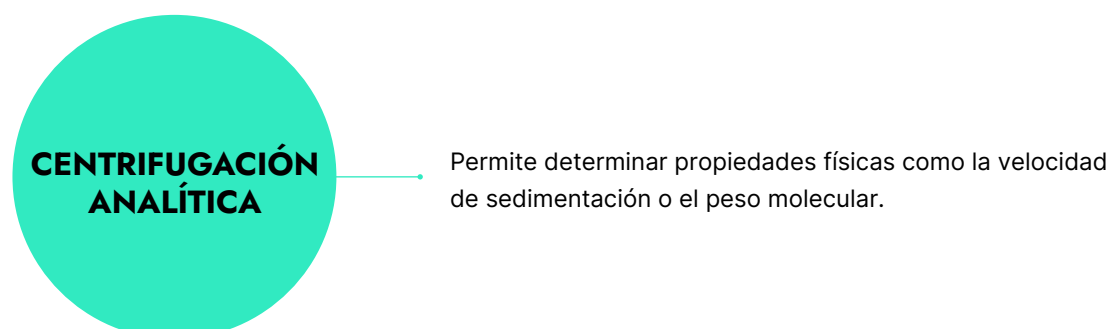
SEGÚN EL TIPO DE ROTOR	ANGULAR O DE ÁNGULO FIJO	Las fundas son de ángulo fijo. Se usan para volúmenes grandes de muestra. El pellet se deposita en parte en el lateral más alejado del eje de giro y en parte en el fondo.
	FLOTANTE O BASCULANTE	Las fundas se colocan en posición de 90° respecto al eje cuando empieza a girar. Se usan para volúmenes pequeños de muestra y se emplean altas velocidades. El pellet se deposita al fondo del tubo.
	VERTICAL	Las fundas son fijas verticales. Se usan para volúmenes grandes. El pellet se deposita en el lateral más alejado del eje de giro.

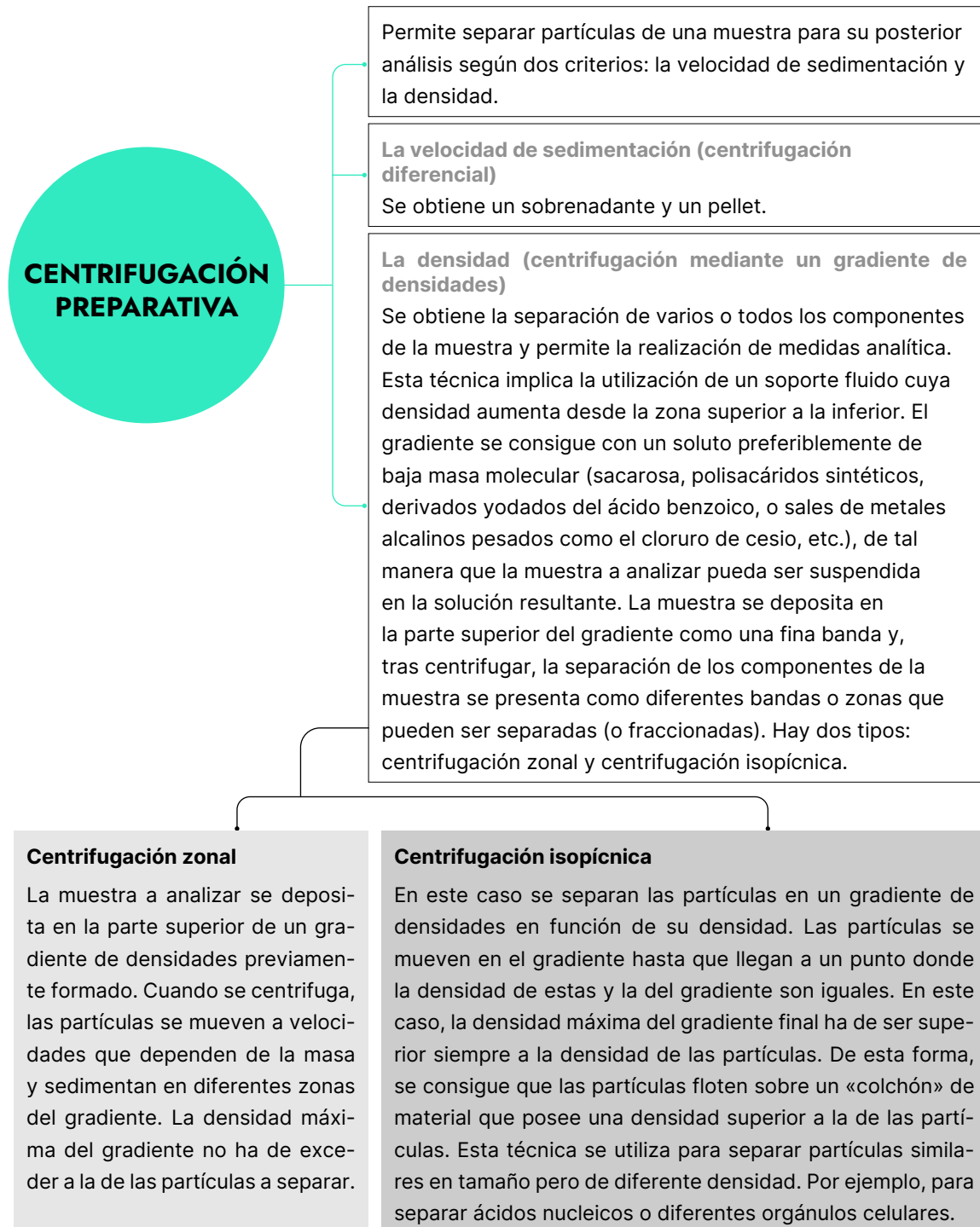
SEGÚN LA VELOCIDAD DE GIRO	DE BAJA VELOCIDAD O SOBREMESA	De pequeño tamaño. No suelen llevar sistema de refrigeración. Alcanzan velocidades entre 4.000-15.000 rpm. Se emplean para la separación de suspensiones con partículas grandes.
	DE ALTA VELOCIDAD	Alcanzan velocidades entre 18.000-25.000 rpm. Suelen llevar un sistema de refrigeración y de vacío. Se emplean para separar suspensiones de partículas muy pequeñas, como pueden ser fracciones celulares, pero insuficientes para la separación de ribosomas, virus o macromoléculas en general.
	ULTRACENTRÍFUGAS	Alcanzan velocidades superiores a 50.000 rpm, por lo que llevan un sistema de refrigeración y de alto vacío. Hay ultracentrífugas analíticas que permiten la obtención de datos precisos de propiedades de sedimentación (coeficientes de sedimentación, pesos moleculares), y preparativas que permiten aislar partículas de bajo coeficiente de sedimentación (microsomas, virus, macromoléculas).
SEGÚN SU FUNCIÓN	MICROCENTRÍFUGAS	Son de pequeño tamaño, ya que se suelen emplear para centrifugar tubos Eppendorfs con volúmenes pequeños.
	CITOCENTRÍFUGAS	Su rotor es especial. Se emplean para acelerar la sedimentación de células presentes en el líquido a estudio (orina, LCR, líquido sinovial, etc.) sobre un portaobjetos.
	MICROHEMATOCRITO	Son específicas para realizar la determinación del hematocrito, por lo que sus vainas son especiales para poner los capilares sanguíneos.

Tabla 3. Clasificación de las centrifugas atendiendo a diferentes criterios.

3.2. Tipos de centrifugación

Las técnicas de centrifugación se pueden clasificar en:





Esquema 1. Tipos de centrifugación (continuación).

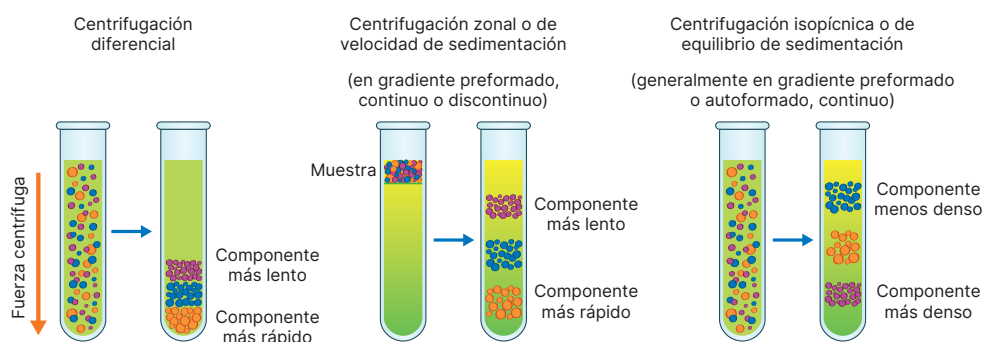


Fig. 3. Tipos de centrifugación.

3 CASO PRÁCTICO



¿CÓMO EQUILIBRAR UNA CENTRÍFUGA?

Como has estudiado, es condición indispensable que para que el rotor de una centrífuga funcione correctamente y de forma segura, debe estar bien equilibrado.

Tienes cinco tubos de muestras sanguíneas de 10 mL de volumen total cada uno. ¿Cómo vas a proceder para conseguir que la centrífuga esté equilibrada?

SOLUCIÓN

Para poder equilibrar de forma correcta el rotor de la centrífuga, tenemos que colocar los tubos enfrentados entre sí (o en diagonal), con lo que siempre necesitaremos que los tubos sean pares. Como tenemos cinco tubos, añadiremos otro tubo de las mismas características con 10 mL de agua.

Si aun así la centrífuga se parase por no estar bien equilibrada, el sexto tubo deberíamos pesarlo y poner un volumen de peso equivalente al de otro tubo de muestra.



VÍDEO LAB

Para consultar el siguiente video sobre cómo solucionar un problema con la centrífuga, escanea el código QR o [pulsa aquí](#).

04 Técnicas de separación por electroforesis

Las técnicas electroforéticas representan una herramienta fundamental de análisis **cualitativos** y **cuantitativos** en diversos campos de las ciencias biológicas como la biología molecular, la bioquímica o la proteómica.

Estas técnicas permiten la separación de biomoléculas según su movilidad y naturaleza (generalmente ADN, ARN o proteínas) en un campo eléctrico sobre una matriz porosa (habitualmente son **geles**), cuya composición depende de la biomolécula a analizar.

La mayoría de las **biomoléculas poseen carga eléctrica**. Esta carga **depende del pH del medio** en el que se encuentran. Por ello, **se desplazan por la matriz** (lo más común es que es sea un **gel**) cuando se ven sometidas a un **campo eléctrico**.

DEFINICIÓN

La electroforesis es **la técnica mediante la cual se separan las biomoléculas en disolución**, según su movilidad, **cuando se ven sometidas a un campo eléctrico** sobre una matriz porosa (gel).

Para la **separación de ácidos nucleicos** se usan los **geles de agarosa**, la electroforesis de campo pulsado (PFGE) o la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) y para la **separación de proteínas** se usan **geles de poliacrilamida** con duodecil sulfato de sodio (SDS) y la electroforesis bidimensional.

Para que se separen las moléculas, estas deben migrar a través del gel desde un polo a otro.

Tras la elaboración del gel y su solidificación, este se coloca en el soporte de la cubeta de electroforesis y se sumerge con un tampón adecuado, el cual sirve como conductor de la electricidad y controla el pH, que ayuda a la estabilidad de las moléculas biológicas. Las muestras se preparan con un **tampón de carga** (habitualmente glicerol) que les da una mayor densidad para que permanezcan en el pocillo sin salirse.

La cubeta tiene un electrodo **positivo** en un extremo y un electrodo **negativo** en el otro extremo.

Los geles tienen **poros microscópicos** que permiten separar las moléculas según su carga, forma y tamaño. Las muestras se cargan en los pocillos del gel con ayuda de una micropipeta.

¿Cómo **migran** las moléculas a través del gel?

- Las moléculas con una carga negativa migran hacia el electrodo positivo (ánodo), mientras que las moléculas con una carga positiva migran al electrodo negativo (cátodo).
- Las moléculas más pequeñas y lineares migran más fácilmente que las de mayor tamaño.
- Si hay dos moléculas con el mismo peso molecular y forma, migra más rápido la que mayor carga tenga.

4.1. Componentes de los equipos de electroforesis

Los componentes básicos de los equipos de electroforesis son los siguientes:

- » **Soporte plástico:** lugar donde se solidifica el gel.
- » **Cubeta de electroforesis**, compuesto por:
 - **Soporte central** (puente) para el gel.
 - Dos depósitos de **tampón de electroforesis** en cada extremo.
 - **Dos electrodos**, uno en cada extremo, el cátodo (electrodo negativo) y ánodo (electrodo positivo).
- » **Fuente de alimentación** para suministrar una corriente eléctrica continua.

Estos equipos pueden disponerse de forma:

- » **Horizontal:** es el más utilizado para separar moléculas de ácidos nucleicos en geles de agarosa.
- » **Vertical:** el más empleado para separar proteínas en geles de poliacrilamida.

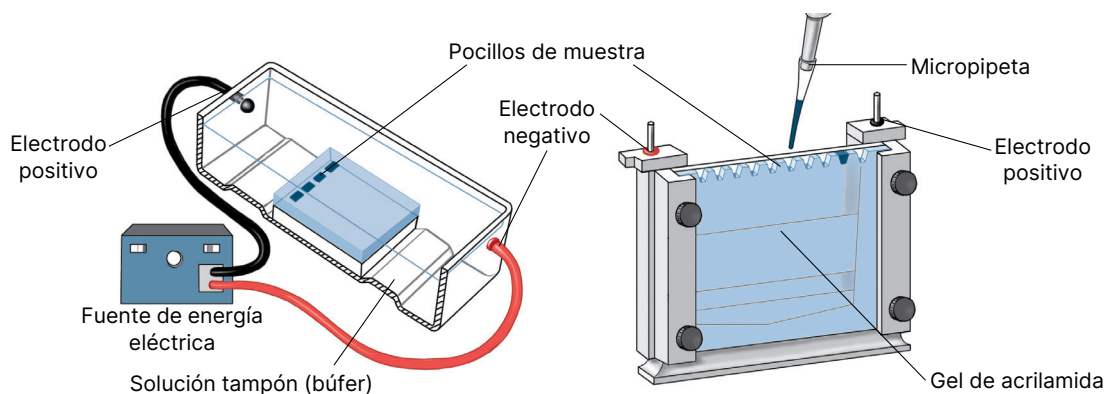


Fig. 4. Electroforesis de gel de agarosa en horizontal (izda.) y electroforesis en gel de poliacrilamida en vertical (dcha.).

4.2. Revelado de los geles de electroforesis

Para poder visualizar la migración de los fragmentos moleculares de las sustancias en los geles de electroforesis, hay que realizar un **revelado** de estos. Para ello, hay que teñir las proteínas o los ácidos nucleicos con sustancias coloreadas o fluorescentes.

Una vez realizada la electroforesis, el gel se sumerge en un recipiente con una disolución del colorante que se vaya a emplear, con el fin de que dicho colorante se una a los fragmentos moleculares de la muestra que se han separado.

DEFINICIÓN

Para la **tinción de proteínas** se suelen emplear colorantes orgánicos: rojo Ponceau, azul brillante de Coomassie o negro amido.

Para la **tinción de ácidos nucleicos** se suelen emplear frecuentemente compuestos fluorescentes e intercalantes, como el bromuro de etidio. También se puede emplear un colorante orgánico, como el azul de metileno, pero es menos frecuente.

Tras lavar el gel para eliminar el exceso de tinción que no se haya unido específicamente, se observa, fotografía o cuantifica mediante **densitometría**.

4 CASO PRÁCTICO



MIGRACIÓN CORRECTA

Es importante comprobar que la electroforesis se está llevando de forma correcta mientras se suministra la corriente eléctrica para saber si está yendo todo bien. ¿Qué puedes emplear para comprobarlo?

SOLUCIÓN

Para comprobar si una electroforesis funciona correctamente, se emplean marcadores de peso molecular coloreados que se van separando en función de su tamaño. Además de servirnos como referencia acerca de la migración de las muestras a través del gel, nos ayudan también a identificar el tamaño de los fragmentos que están migrando. Puedes consultar el siguiente enlace: <https://bit.ly/43RSVpr>.

X T A R T
FP SALUD