



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Centrifugación a escala de laboratorio

Apellidos, nombre	Seguí Gil, Lucía (lusegil@upvnet.upv.es)
Departamento	Departamento de Tecnología de Alimentos
Centro	Universidad Politécnica de Valencia



1 Resumen

En este artículo se presenta la centrifugación como técnica de separación en laboratorio con fines preparativos o analíticos. Además, se presentarán las principales características de los equipos centrífugos empleados a escala de laboratorio y los componentes necesarios para llevar a cabo la separación. Por último, se distinguirá entre tipos de centrifugación y las principales aplicaciones de cada una de las técnicas descritas.

2 Introducción

La centrifugación es una técnica de separación por sedimentación, acelerada gracias al uso de una fuerza centrífuga. Se trata de una operación habitual a nivel industrial en distintas industrias como la industria alimentaria, farmacéutica y biotecnológica, entre otras. En el contexto biotecnológico, la centrifugación se aplica a la separación de células y micelios del medio de cultivo (recuperación primaria), a la separación del líquido que contiene el compuesto de interés de los sólidos generados por disrupción celular, o bien a la separación de mezclas de partículas, células, orgánulos o moléculas.

La centrifugación es una técnica habitualmente empleada en el laboratorio, empleándose tanto con fines preparativos como con fines analíticos. En el primero de los casos el objetivo será separar las partículas para su aprovechamiento posterior, mientras que en el segundo de ellos la finalidad será determinar alguna propiedad de las partículas estudiadas tales como la velocidad de sedimentación o el peso molecular.

3 Objetivos

Tras leer atentamente este documento, el estudiante será capaz de:

- **Seleccionar el tipo de centrifugación** más apropiada para cada aplicación.
- **Discriminar entre los equipos, componentes y condiciones** adecuados para llevar a cabo una separación en particular.
- **Diseñar** un proceso de separación centrífuga que incluya las etapas necesarias para completar la separación deseada.

4 Desarrollo

En primer lugar, se revisarán brevemente los fundamentos de la separación centrífuga para posteriormente pasar a describir los equipos centrífugos y sus características. A continuación, se distinguirán las formas de llevar a cabo la centrifugación, describiéndose con detalle los aspectos clave que diferencian la centrifugación diferencial de la centrifugación en gradiente de densidad, aportándose ejemplos de aplicación en el contexto biotecnológico de cada una de estas técnicas.



4.1 Fundamentos de la sedimentación centrífuga

El estudio de la **separación sólido-líquido por centrifugación** está fundamentada en la **teoría de la sedimentación**, basada en la **ley de Stokes** (Ecuación 1), que establece el movimiento de una partícula sólida en un medio líquido cuando existe un gradiente de densidad entre ambos (Graham, 2001). Esta ley describe la velocidad de sedimentación de una partícula esférica en un medio continuo para Reynolds menores a 1 (Tejeda et al., 2011).

La ley de Stokes determina que, bajo determinadas condiciones de centrifugación, cada partícula sedimenta a una velocidad diferente, de modo que las partículas de mayor tamaño equivalente y densidad tenderán a sedimentar en primer lugar, siendo el tamaño la variable de mayor influencia. De la ley de Stokes también se deduce que la velocidad de sedimentación puede incrementarse mediante el uso de la fuerza centrífuga. Se puede suponer que para las suspensiones diluidas características de los caldos biológicos esta ley es aplicable.

$$v_{\omega} = \frac{d_p^2 \Delta \rho \omega^2 r}{18 \mu} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

- v_{ω} : velocidad de sedimentación centrífuga.
- $\omega^2 r$: aceleración centrífuga.
- ω : velocidad de rotación en radianes.
- r : Distancia radial del eje de rotación a la partícula.
- d_p : diámetro de la partícula.
- $\Delta \rho$: gradiente de densidades entre partícula y medio.
- μ : viscosidad del medio

4.2 Equipos centrífugos e instrumental necesario

En el laboratorio, el instrumental empleado y los equipos centrífugos son diferentes a los equipos industriales, aunque obedecen a los mismos principios físicos. Los equipos centrífugos a escala de laboratorio permiten regular la velocidad, el tiempo y la temperatura, mientras que los diferentes accesorios disponibles permiten también modificar la capacidad de los tubos de centrifuga, así como su forma y el material de que están hechos. En términos generales se distinguen los tubos de fondo cónico y de fondo redondeado. Es frecuente utilizar tubos Eppendorf para microcentrífugas, y tubos Falcon para centrífugas de mayor tamaño.

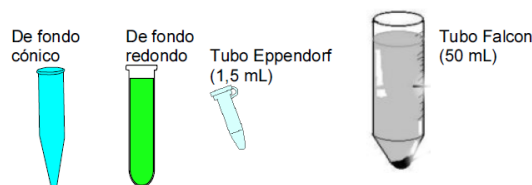


Figura 1. Tipos de tubos empleados para llevar a cabo la centrifugación. (Adaptado de Técnicas de laboratorio en bioquímica. Centrifugación. <http://biomodel.uah.es/>)

Con respecto a los equipos centrífugos, existen centrífugas de tipo bascular y centrífugas angulares (rotor bascular y rotor angular, respectivamente). En ocasiones pueden servir para los mismos propósitos, aunque existen aplicaciones para las que el empleo de uno u otro tipo puede resultar más apropiado.



Figura 2. Fila superior: centrífuga de rotor angular, elementos y posición de los tubos durante el giro. Fila inferior: centrífuga de rotor basculante, elementos y posición de los tubos.

4.3 Formas de llevar a cabo la centrifugación

La centrifugación puede llevarse a cabo de diversas formas. Según la velocidad de rotación aplicada suele distinguirse entre centrifugación a baja velocidad (<10.000 rpm), centrifugación a elevada velocidad (10.000-20.000 rpm) y ultracentrifugación (>20.000 rpm). Además, la centrifugación puede realizarse con propósitos analíticos, con el fin de determinar las propiedades físicas de las partículas que sedimentan; o con propósitos preparativos, con el fin de aislar las partículas, células o moléculas de interés. Finalmente, existen diferentes formas de llevar a cabo la centrifugación según el medio en el que se lleva a cabo la separación, y la forma en la que se introduce la muestra al tubo de centrífuga: centrifugación diferencial, y centrifugación de gradiente de densidad, que pasarán a desarrollarse en detalle a continuación.

4.4. Centrifugación diferencial

Hablamos de **centrifugación diferencial** cuando la muestra se introduce en el tubo y se centrifuga a una velocidad determinada. El comportamiento de cada partícula presente en la suspensión dependerá de su tamaño, forma y densidad, según viene establecido por la ley de Stokes (Ecuación 1), así como de las condiciones de centrifugación. Así pues, en la centrifugación diferencial, tanto la velocidad de rotación de la centrífuga como el tiempo de centrifugación determinarán la separación de las partículas. En una centrifugación diferencial, partículas de distintas densidades o tamaño sedimentan a diferentes velocidades, de forma que las de mayor tamaño y más densas sedimentan más rápido, seguidas de las menos densas y más pequeñas (Figura 3). Al finalizar la operación se obtiene un sedimento (también llamado precipitado o pellet) y un sobrenadante.

La centrifugación diferencial puede emplearse para separación de células, dado que una suspensión de células sometida a una serie de ciclos de fuerza centrífuga creciente dará lugar a una serie de pellets conteniendo células de velocidad de sedimentación decreciente.

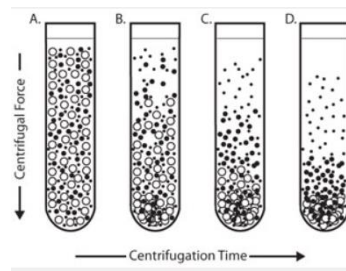


Figura 3. Centrifugación diferencial. (Mark Frei, BioFiles).

Una aplicación típica de la centrifugación diferencial es el fraccionamiento celular, que consiste en separar los principales orgánulos (sub)celulares de una suspensión celular homogenizada. No es habitual emplear más de cuatro ciclos de centrifugación para separar los orgánulos subcelulares.

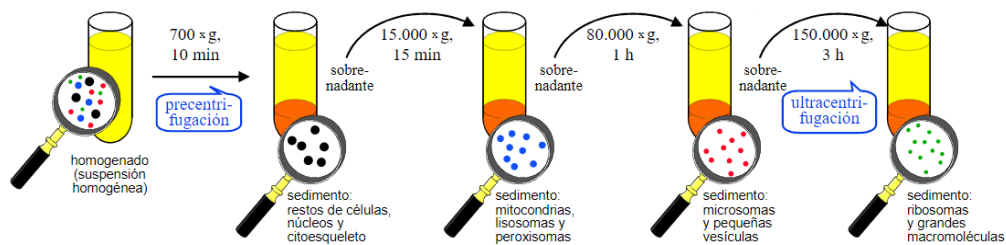


Figura 4. Fraccionamiento celular por centrifugación diferencial (<http://biomodel.uah.es/>).


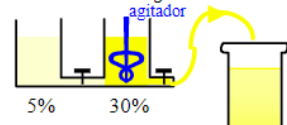
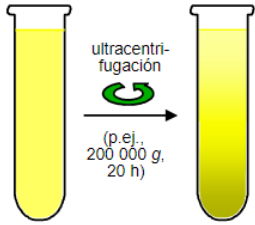
Debido a la heterogeneidad de las partículas biológicas, la centrifugación diferencial puede resultar poco exitosa o bien los diferentes sedimentos pueden aparecer contaminados por partículas diferentes a las deseadas. En ese caso, se puede realizar un lavado del sedimento mediante re-suspensión y re-centrifugación, aunque las aplicaciones de fraccionamiento celular suelen requerir del uso de gradientes de densidad.

4.5. Centrifugación en gradiente de densidad

La **centrifugación en gradiente de densidad** emplea un medio continuo de densidad variable a lo largo del tubo de centrifuga. A diferencia de la centrifugación diferencial, es necesario emplear centrifugas de rotor basculante. Se distinguen dos tipos de centrifugación en gradiente de densidad, la **centrifugación zonal** y la **centrifugación isopícnica**.

El gradiente de densidad se crea mediante un gradiente de concentración que consiste en preparar concentraciones crecientes de un componente adecuado, a medida que se baja por el tubo de centrifuga. Para ello, se emplean compuestos tales como la sacarosa, el cloruro de cesio, la albúmina de suero bovino, o algunos medios comerciales tales como Ficoll® o Percoll®. Se puede preparar un gradiente discontinuo de forma manual, un gradiente continuo con un equipo adecuado, o bien un gradiente autoformado por centrifugación, este último normalmente al mismo tiempo que se fracciona la muestra (Tabla 1) (Técnicas de laboratorio en bioquímica. Centrifugación. <http://biomodel.uah.es/>).

Tabla 1. Tipos de gradiente de densidad. Ejemplos de preparación (Adaptado de: Técnicas de laboratorio en bioquímica. Centrifugación. <http://biomodel.uah.es/>)

GRADIENTE PREFORMADO		GRADIENTE AUTOFORMADO										
Gradiente discontinuo	Gradiente continuo	Gradiente continuo										
<p>Ejemplo de preparación, mediante mezcla de varias disoluciones (válido para centrifugación zonal e isopícnica, dependiendo de las densidades elegidas y del tiempo de centrifugación)</p>  <p>Se depositan capas sucesivas de distinta concentración de sacarosa (y distinta densidad)</p> <table border="1"> <tr> <td>10%</td> <td>1.038</td> </tr> <tr> <td>15%</td> <td>1.059</td> </tr> <tr> <td>20%</td> <td>1.081</td> </tr> <tr> <td>25%</td> <td>1.104</td> </tr> <tr> <td>30%</td> <td>1.127</td> </tr> </table> <p>(% peso/vol) (g/cm³)</p>	10%	1.038	15%	1.059	20%	1.081	25%	1.104	30%	1.127	<p>Ejemplo de preparación, mediante mezcla de 2 disoluciones en un dispositivo formador de gradientes</p>  <p>Se llena el tubo con la mezcla gradual de dos disoluciones de distinta concentración (y densidad)</p>	<p>Ejemplo de preparación, mediante centrifugación. El gradiente se va formando a la vez que se separan los componentes de la muestra. (El ejemplo, CsCl, no se usa para células, sino para separar ácidos nucleicos)</p>  <p>Se ultracentrifuga una disolución concentrada de CsCl que sedimenta gradualmente formando un gradiente de concentración y de densidad</p> <p>(p.ej., 200 000 g, 20 h)</p> <p>d = 1.70 g/cm³ arriba: 1.66 g/cm³ abajo: 1.76 g/cm³</p>
10%	1.038											
15%	1.059											
20%	1.081											
25%	1.104											
30%	1.127											

4.5.1. Centrifugación zonal o de velocidad de sedimentación

En la **centrifugación zonal** las partículas que sedimentan más rápidamente no se ven contaminadas por las que sedimentan más lentamente puesto que existe una clasificación por velocidades de sedimentación, concentrándose las partículas en zonas o bandas discretas. La muestra se introduce en la zona superior de un tubo de centrifuga que contiene una disolución en gradiente de densidad. El gradiente de densidad proporciona un medio de densidad y viscosidad creciente que estabiliza las diferentes bandas que se generan durante la centrifugación (Figura 5).

La velocidad de avance de las partículas será el mecanismo de separación, y dependerá fundamentalmente de su forma y tamaño, de modo que las partículas de distintos tamaños se separarán en mejor medida gracias al gradiente de densidad creado, formando bandas que posteriormente podrán separarse. Los componentes separados se recogerán aspirando cuidadosamente las bandas, o bien perforando los tubos en su base. Puesto que la densidad de las partículas es mayor a la densidad del gradiente, todas las partículas formarán sedimentado en caso de centrifugarse durante suficiente tiempo. Por lo tanto, la centrifugación zonal debe finalizar antes de que los componentes más grandes lleguen al fondo del tubo. En la figura 6, se presenta un esquema donde se detallan las etapas de la centrifugación zonal.

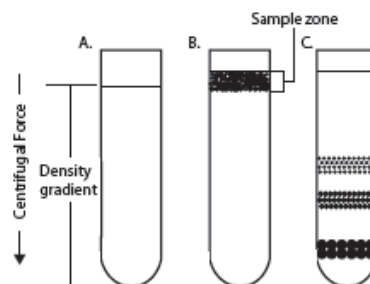


Figura 5. Centrifugación zonal (Biofiles online. Sigma.com/biofiles)

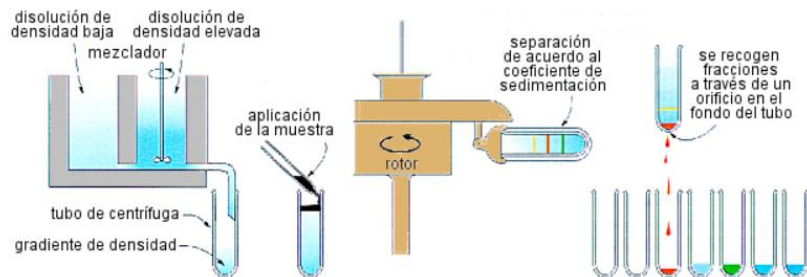


Figura 6. Etapas de la centrifugación zonal. (A) Formación de un gradiente de densidad con un dispositivo formador de gradientes (B) Colocación de la muestra encima del gradiente (C) colocación de tubos en rotor oscilante y centrifugación (D) recolección de pellets separados en bandas (Fuente: Técnicas de laboratorio en bioquímica. Centrifugación. <http://biomodel.uah.es/>).

4.5.2. Centrifugación isopícnica o de equilibrio de sedimentación

La **centrifugación isopícnica o de equilibrio** también emplea un gradiente de densidad, pero durante un tiempo de centrifugación suficiente como para que se alcance el equilibrio de sedimentación. De este modo, el principio de separación no será la velocidad de sedimentación sino la densidad de la partícula, que quedará separada del resto en una banda que agrupa las partículas de igual densidad.

Para llevar a cabo una centrifugación isopícnica, será necesario que el gradiente tenga una densidad mayor que las partículas de mayor densidad de la mezcla, ya que de otro modo alcanzarían el fondo del tubo durante la centrifugación. Se emplean gradientes continuos que cubren todo el intervalo de densidades de los componentes de la muestra, superando la del componente más denso. Así, independientemente del tiempo de centrifugación, las partículas nunca sedimentarán al fondo del tubo, sino que se quedarán en una posición estable intermedia en el gradiente, donde se concentran en una banda muy estrecha de mayor resolución (Figura 7). En la centrifugación isopícnica es habitual que el gradiente sea autoformado: la muestra se mezcla con el gradiente y se aplican velocidades de ultracentrifugación para provocar la separación.

Además de la mayor resolución obtenida por este método, lo interesante de este tipo de separación es que se consigue separar exclusivamente por densidades, situándose los componentes en una banda en la que sólo se encuentran los componentes de igual densidad (isopícnico = del griego, de igual densidad). Se emplea fundamentalmente para la separación y purificación de ácidos nucleicos.

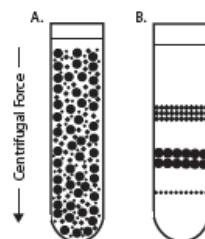


Figura 7. Centrifugación isopícnica (Biofiles online. Sigma.com/biofiles)



5 Cierre

En este objeto de aprendizaje hemos revisado la teoría de separación centrífuga y cómo esta puede aplicarse en laboratorio para llevar a cabo separaciones de aplicación en el área biotecnológica. En particular se han presentado los equipos y se ha distinguido entre los tipos de centrifugación habitualmente empleadas.

A partir de lo aprendido, ¿podrías distinguir qué técnicas de centrifugación están representados a cabo en el siguiente esquema? (Figura 8)

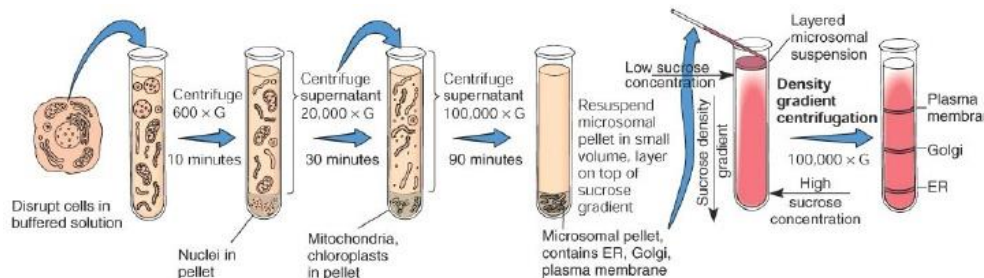


Figura 8. Fraccionamiento celular por centrifugación. Adaptado de Biology, Seventh Edition CHAPTER 4 Organization of the Cell fractionation Copyright © 2005 Brooks/Cole - Thomson Learning. Disponible online en <https://slidetodoc.com/biology-seventh-edition-solomon-berg-martin-chapter-4/>

Para terminar, te propongo que realices el siguiente ejercicio de integración: Elabora una tabla comparativa de los diferentes tipos de centrifugación en el que se incluyan:

- Representación gráfica del tubo al inicio y al final de la separación.
- Tipo de rotor empleado.
- Empleo o no de gradiente de densidad. Tipo de gradiente, en su caso.
- Principio fundamental de separación (velocidad, densidad, tamaño, influencia del tiempo de centrifugación).
- Principal aplicación.

6 Bibliografía

Centrifugation Separations. Merck. Mark Frei, BioFiles v6 n5.

Centrifugation. Biofiles online. Sigma.com/biofiles.

Graham, D.J. (2001). Biological Centrifugation (1st ed.). Garland Science. <https://doi.org/10.1201/9781003076797>

Methods of Cell Separation. Laboratory Techniques in Biochemistry & Molecular Biology. Elsevier Science, 2012.

Solomon, Berg, Martin. (2005) Biology, Seventh Edition Ch4. Organization of the Cell. Fractionation. Brooks/Cole Thomson Learning

Técnicas de laboratorio en bioquímica. Centrifugación. <http://biomodel.uah.es>

Tejeda, A., Montesinos, R.M. y Guzmán R. (2011). Bioseparaciones (2ª Ed). Capítulo II.4. Pearson Educación de México.