

Los productos químicos en el laboratorio

Técnicas Generales de Laboratorio
(tgl)

Tipos de productos químicos

- ▶ Los productos químicos presentes en los laboratorios se pueden clasificar aplicando diferentes criterios. Por ejemplo, según el criterio de riesgo para la salud.



Tipos de productos químicos según su función

- ▶ **Disolventes**
 - ▶ **Reactivos.**
 - ▶ **Colorantes.**
 - ▶ **Indicadores.**
 - ▶ **Patrones primarios.**
 - ▶ **Medios de cultivo.**
- 

Tipos de productos químicos

- ▶ **Disolventes:** Son productos líquidos que se usan para elaborar disoluciones. El más utilizado es el agua.
- ▶ **Reactivos.** Son sustancias de naturaleza y concentración conocidas que se utilizan para producir reacciones químicas.

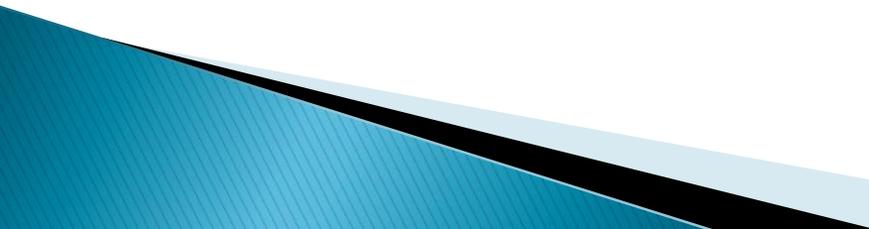
Los objetivos de estas reacciones pueden ser diversos: determinar la presencia o la concentración de una sustancia, identificar un microorganismo, inactivar una sustancia tóxica, etc.

Tipos de productos químicos

- ▶ **Colorantes.** Son sustancias que tiñen tejidos, células, partes de células, bacterias u otras estructuras orgánicas para facilitar su visualización. El mecanismo de acción de algunos colorantes se basa en reacciones químicas, mientras que muchos otros sencillamente se concentran en zonas concretas.



Tipos de productos químicos

- ▶ **Indicadores.** Son productos que se adicionan al medio y que cambian de color en el punto final de la reacción. Por ejemplo, las tiras indicadoras de pH o las tiras para verificar un proceso de esterilización contienen indicadores.
 - ▶ **Patrones primarios.** Son sustancias que se utilizan como referencia al hacer una valoración o una estandarización.
- 

Tipos de productos químicos

- ▶ **Medios de cultivo.** El estudio microbiológico requiere la siembra de la muestra, debidamente preparada, para que los microorganismos presentes se reproduzcan y puedan ser identificados. La mayoría de los medios de cultivo se comercializan con todos sus componentes y van acompañados de las instrucciones para prepararlos.



E. Colli en Agar Mac Conkey



Los reactivos

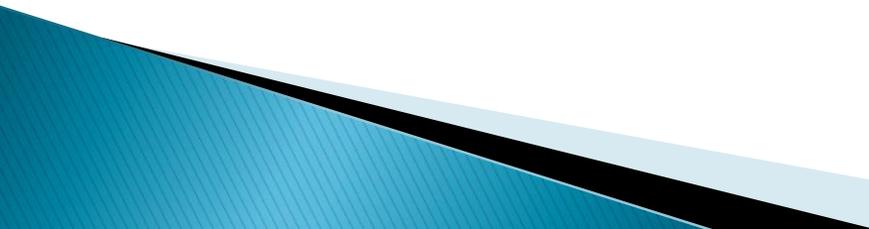
- ▶ Un **reactivo** es toda sustancia que interactúa con otra en una reacción química y que da lugar a otras sustancias de propiedades distintas, denominadas productos de reacción.

Estas reacciones proporcionan muchas opciones en el laboratorio: Se puede provocar una reacción porque el producto resultante es más fácil de cuantificar que el/de origen, o porque la reacción provocará un cambio de color que permitirá determinar si un analito está presente, o porque reducirá la peligrosidad de un producto y facilitará la gestión de los residuos resultantes, etc.

Clasificaciones de los reactivos

- ▶ Los reactivos se pueden clasificar teniendo en cuenta muchos criterios. Podemos destacar:
- ▶ Según su **estado de agregación**: sólidos, líquidos o disoluciones preparadas.
- ▶ Según su **naturaleza química**.
Distinguimos dos grandes grupos:
 - ORGÁNICOS
 - INORGÁNICOS

Reactivos inorgánicos

- ▶ La mayoría de los reactivos comunes pertenecen a este grupo. La clasificación química detallada se corresponderá a la de todas las sustancias químicas: ácidos, bases, sales, etc.
 - ▶ Dentro de estos reactivos inorgánicos se puede distinguir entre reactivos para análisis clásicos, preparados para análisis instrumentales y disolventes.
- 

Reactivos orgánicos

- ▶ Son habituales los disolventes orgánicos en muchos laboratorios.
- ▶ Otros productos, como los destinados a síntesis orgánicas, solo los encontramos en algunos laboratorios.

La pureza

- ▶ En la práctica debemos tener en cuenta que en el “mundo real” no hay sustancias puras. Podemos encontrar preparados comerciales con grados de pureza muy elevados, pero no existe la garantía de pureza absoluta, ya que siempre hay algún nivel de impureza.
- ▶ Las impurezas que acompañan a un reactivo son sustancias que no reaccionarán en la reacción que estamos estudiando. Para diferenciar la parte de reactivo que sí reaccionará (parte pura) de la que no (parte impura), se define la pureza del reactivo, que se expresa en porcentaje y se refleja en la etiqueta del producto.

La pureza

- ▶ Por ejemplo, si un envase de cloruro sódico especifica que tiene una pureza del 99,6% significa que 100 g de este producto están formados por 99,6 g de NaCl y 0,4 g de impurezas.
- ▶ La cantidad de impurezas presentes en los reactivos químicos determinan una clasificación de los reactivos. Las categorías de interés en los laboratorios de análisis son, en orden de pureza:

La pureza

- ▶ Grado químicamente puro (QP).
 - ▶ Grado reactivo analítico (PA, DC, RA).
 - ▶ Grado HPLC (*high purity liquid chromatography*).
 - ▶ Además de estos, existen grados de menor pureza (mercantil, industrial y técnico), que generalmente no usaremos en el laboratorio.
- 

La pureza

- ▶ **Grado químicamente puro (QP).** Es el grado que se aplica a los productos de una pureza inferior a los de grado reactivo.
- ▶ **Grado reactivo analítico (PA, DC, RA).** Tienen un porcentaje muy bajo de impurezas, lo cual hace a estos reactivos adecuados para utilizar en técnicas analíticas de diagnóstico. Dentro de este grupo, los más utilizados son los que cumplen con las normas de la ACS (American Chemical Society), que indican en su etiqueta PA-ACS.

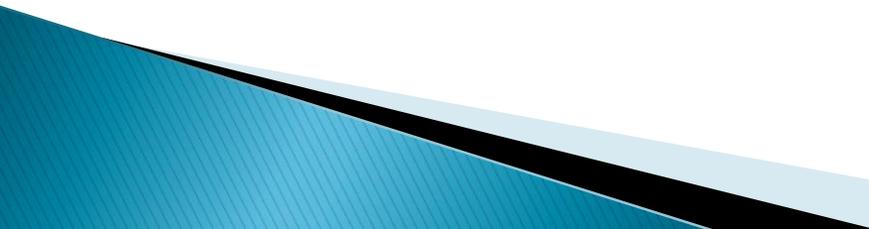
La pureza

- ▶ Grado **HPLC** (*high purity liquid chromatogha-phy*). Los productos que se encuentran clasificados como HPLC son los de mayor pureza, y son aptos para su uso en cromatografía líquida de alta resolución.
- ▶ Además de estos, existen grados de menor pureza (**mercantil, industrial y técnico**), que generalmente no usaremos en el laboratorio.

La pureza

- ▶ La información sobre la composición química y la pureza de cada reactivo constan en su etiqueta, y es una información esencial ya que cada técnica analítica tiene establecido el nivel de pureza que deben tener los reactivos utilizados en ella.

Los kits de reactivos

- ▶ La automatización de las pruebas diagnósticas ha conducido a que las empresas suministren kits de reactivos específicos para los equipos que comercializan. También existen kits para determinadas técnicas.
 - ▶ Un **kit de reactivos** es un conjunto de dos o más reactivos que se emplean para determinar una sustancia y que se comercializan conjuntamente.
- 

El agua

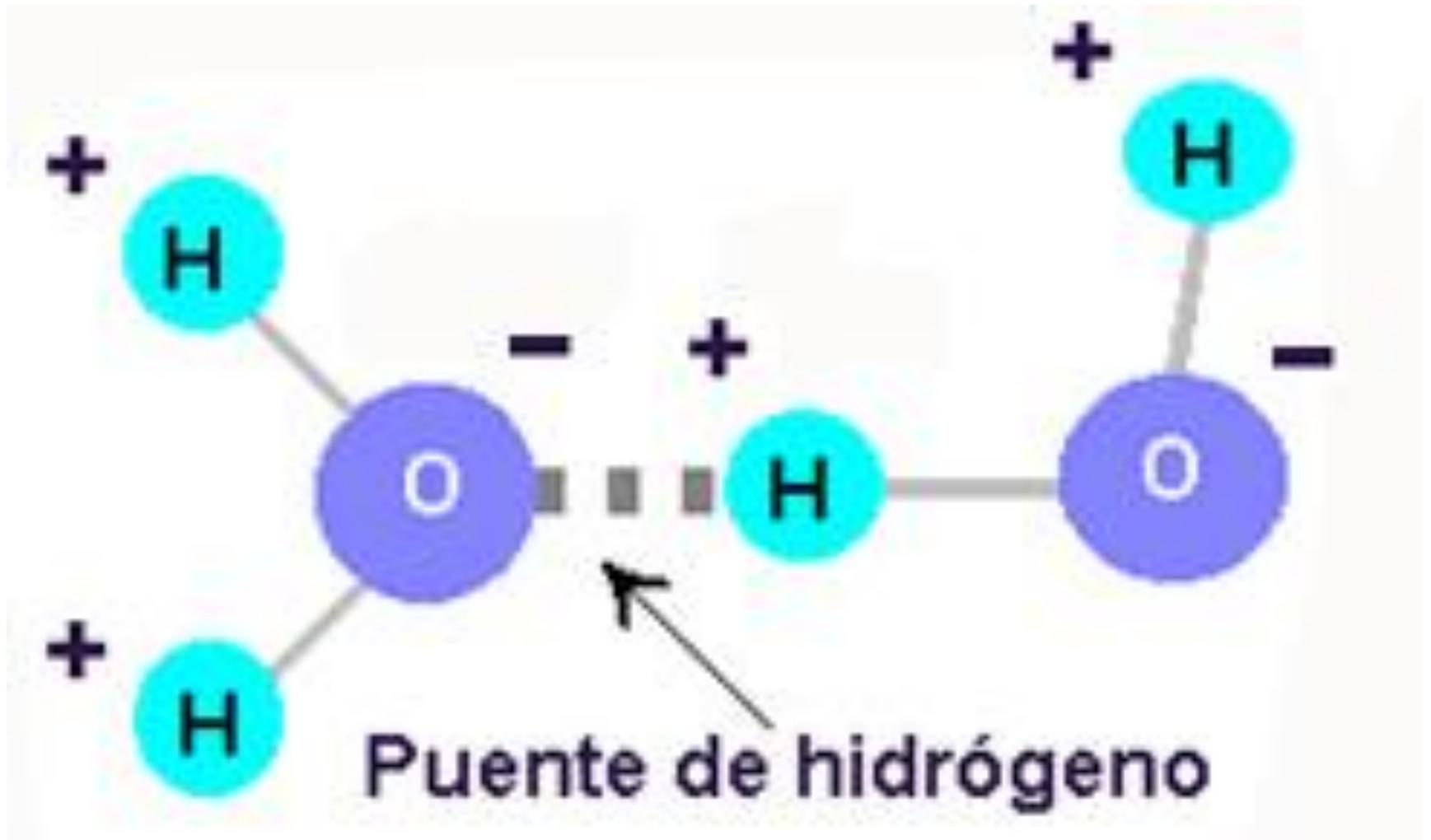
- ▶ Muchos de los procesos que se realizan en el laboratorio requieren el uso de agua como disolvente. Además, también se utiliza como reactivo, en operaciones de limpieza, o como elemento necesario en distintos procesos (esterilización con autoclave, destilaciones, etc.).
- 

Las propiedades del agua

- ▶ La molécula de agua está compuesta por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno, dispuestos de tal manera que forman un ángulo de 105° con el oxígeno en el vértice.
- ▶ En la molécula, los electrones se disponen cerca de este vértice, de forma que la molécula queda con las cargas negativas en ese vértice y las positivas en el otro extremo, es decir, es una molécula polar (con dos polos, uno con carga positiva y otro con carga negativa).

Las propiedades del agua

- ▶ A causa de esta polaridad, entre las distintas moléculas de agua se forman unas uniones mediante puentes de hidrógeno. Estas uniones son débiles y se rompen y se vuelven a formar con frecuencia en el agua líquida.
- 



Las propiedades del agua

- ▶ Estas características químicas hacen que el agua sea un excelente disolvente.
- ▶ De hecho, del agua se dice que es el disolvente universal, ya que puede disolver sustancias polares o con carga iónica (alcoholes, aminoácidos, proteínas, sustancias salinas, etc.).

La calidad del agua

- ▶ Existen distintos niveles de calidad del agua, con base en parámetros de dureza, fisicoquímicos y microbiológicos, y para cada uso se debe seleccionar el tipo de agua adecuado.
- ▶ Ejemplos:
- ▶ Al preparar un medio de cultivo usando como disolvente un agua sin garantías de esterilidad, en el cultivo que realicemos lo más probable es que obtengamos un crecimiento de microorganismos procedentes del agua
- ▶ Al aplicar una técnica potenciométrica a una disolución realizada con agua que contiene iones, la lectura resultante no será la correcta.

La calidad del agua

- ▶ Al igual que comentábamos en referencia a la pureza de los reactivos, también la calidad del agua es un parámetro establecido para cada técnica analítica y procedimiento que se realice en el laboratorio.

Clasificación del agua de acuerdo a su dureza

- ▶ El agua dura o calcárea es aquella que contiene un alto nivel de sales de magnesio y calcio.
- ▶ La dureza del agua se expresa normalmente como cantidad equivalente de carbonato de calcio (aunque propiamente esta sal no se encuentre en el agua) y se calcula a partir de la suma de las concentraciones de calcio y magnesio (en miligramos por litro o en partes por millón).

Clasificación del agua de acuerdo a su dureza

Tipos de agua	mg CaCO ₃ /L agua
Agua blanda	≤ 17
Agua levemente dura	≤ 60
Agua moderadamente dura	≤ 120
Agua dura	≤ 180
Agua muy dura	≥ 180

Clasificación del agua de acuerdo a su calidad fisicoquímica

- ▶ Teniendo en cuenta diversos parámetros fisicoquímicos, se distinguen cuatro tipos de agua:
- ▶ I, II, III y IV, siendo la tipo I la más pura y la tipo IV, la menos pura.

Clasificación del agua de acuerdo a su calidad fisicoquímica

- ▶ **Tipos III y IV o de grado laboratorio:**
- ▶ Para el aclarado final del material de vidrio, pruebas cualitativas y preparación de algunos reactivos y medios de cultivo.

Clasificación del agua de acuerdo a su calidad fisicoquímica

- ▶ **Tipo II o de grado analítico:**
- ▶ Se usa en la mayoría de los analizadores automáticos y para preparar la mayoría de los medios de cultivo y reactivos.

Clasificación del agua de acuerdo a su calidad fisicoquímica

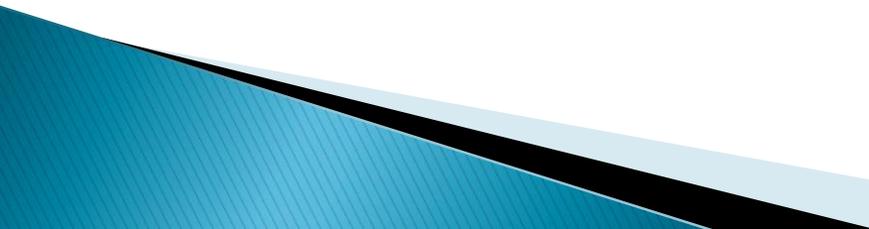
- ▶ **Tipo I o ultrapura:**
- ▶ **Se usa para cultivos celulares, absorción atómica y HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia, high performance liquid chromatography).**

- ▶ **Hay que tener en cuenta:**
- ▶ Que para que el agua mantenga su nivel de calidad es necesario aplicar los procedimientos de almacenamiento y manejo que corresponda. Por ejemplo, el agua purificada en contacto con la atmósfera absorbe una pequeña cantidad de CO_2 , lo cual hace que su conductividad aumente un poco.

Clasificación del agua según su calidad microbiológica

- ▶ El agua también se clasifica según su calidad microbiológica, es decir, según la cantidad de microorganismos presentes

Procesos para purificar el agua

- ▶ **Filtración**
 - ▶ **Osmosis inversa**
 - ▶ **Destilación**
 - ▶ **Desionización**
- 

Filtración

- ▶ La filtración es un paso previo antes de aplicar cualquier otro medio de purificación. El procedimiento más común es usar un filtro de partículas que impide el paso de sólidos y a continuación filtros de carbón activado que adsorben gran parte de las sustancias orgánicas disueltas en el agua.
 - ▶ El carbón activado está tratado para incrementar su capacidad de adsorber, lo cual se consigue haciéndolo más poroso.
- 

Filtración

- ▶ No hay que confundir **absorción** y **adsorción**:
- ▶ **Absorción**: la sustancia absorbida penetra en la que la absorbe.
- ▶ **Adsorción**: la sustancia adsorbida es atraída y retenida en la superficie de la que la adsorbe, pero no penetra en ella.

Osmosis inversa

- ▶ La ósmosis inversa consiste en aplicar presión sobre una disolución concentrada separada mediante una membrana semipermeable de otra solución menos concentrada.
- ▶ Al aplicar la presión se consigue que pase agua pura y se separe del agua con mayor concentración de sustancias. Se puede decir que ocurre lo contrario que en una ósmosis, ya que mientras en la ósmosis el equilibrio se consigue por el paso de agua desde la disolución diluida a la concentrada, en la ósmosis inversa se consigue por el paso del agua desde la disolución concentrada a la diluida.

Osmosis inversa

- ▶ Las membranas tienen un tamaño de poro muy pequeño, de alrededor de $0,0005 \mu\text{m}$ de diámetro, y evita el paso de sales, materias inorgánicas, sustancias orgánicas, pirógenos, virus y bacterias.
- ▶ Resulta un procedimiento relativamente barato y es eficaz para muchos usos del laboratorio, lo que lo convierte en el método de elección para la purificación de agua a gran escala.

Osmosis inversa

- ▶ El equipo de ósmosis inversa puede tener varias configuraciones, dependiendo de la calidad del agua de alimentación, pero todos poseen una o varias membranas semipermeables a través de las cuales se hace circular el agua.
 - ▶ Como las membranas se van colmatando, se deben limpiar de forma periódica para asegurar que el sistema continúe funcionando con el máximo rendimiento.
- 

Destilación

- ▶ Permite separar sustancias en función de sus puntos de ebullición. El proceso básico para purificar agua mediante destilación consiste en calentar al agua de origen; una vez que se alcanza el punto de ebullición del agua, esta comienza a evaporarse y estos vapores se recogen y se enfrían para que vuelva a estado líquido.
- ▶ El producto resultante es **agua destilada**, y en el recipiente origen quedan las impurezas

Destilación

- ▶ En ocasiones se aplica una segunda destilación al agua destilada; en este caso se obtiene **agua bidestilada**.
 - ▶ Mediante este proceso se eliminan muchos de los contaminantes del agua, ya que la mayor parte de las impurezas son sales, que quedarán en el tanque de ebullición; no elimina, sin embargo, los contaminantes volátiles.
- 

Destilación

- ▶ El gran inconveniente de la destilación es que gasta mucha energía, lo que hace que sea un procedimiento demasiado caro cuando se necesitan grandes volúmenes de agua.
- 

Desionización

- ▶ La desionización, también llamada desmineralización, se logra al pasar el agua a través de unas resinas de intercambio iónico, que emiten iones al agua y atraen a determinadas moléculas presentes en ella; el producto que se obtiene es agua desionizada. Los equipos de intercambio iónico tienen dos tipos de resinas:
 - ▶ **Resinas de intercambio de cationes.**
 - ▶ **Resinas de intercambio de aniones.**

Desionización

- ▶ **Resinas de intercambio de cationes:**
Retiran iones positivos del agua (como Na^+ , Ca^{2+} , etc.) y le aportan protones (H^+).
- ▶ **Resinas de intercambio de aniones:**
Retiran iones negativos (como Cl^- , HCO_3^- , CO_3^{2-}) y aportan grupos hidroxilos (OH^-).

Desionización

- ▶ Los iones liberados por las resinas (H^+ y OH^-), se combinan entre sí y forman agua.
- ▶ Este método es fácil de instalar y proporciona mayor volumen de agua pura que la destilación, pero las resinas se deben regenerar periódicamente para que funcionen correctamente, y este es un procedimiento caro.
- ▶ Además, la desionización sola no elimina la materia orgánica.

Eficacia de los procedimientos para purificar el agua

	Filtración	Osmosis Inversa	Destilación	Desionización
Pirógenos y virus	*	**	***	*
Bacterias	**	***	***	*
Partículas	**	***	***	*
Sólidos inorgánicos disueltos	*	**	**	***
Gases inorgánicos disueltos	-	*	**	***
Compuestos orgánicos disueltos	-	**	**	***

*** Excelente ** Buena * Baja - Sin efecto

El agua ultrapura

- ▶ El agua ultrapura no se puede obtener a partir de un solo proceso, se requiere la combinación de más de uno de ellos para lograr la calidad deseada tanto en lo fisicoquímico como en lo microbiológico.
- ▶ Una forma de lograrla es filtrando el agua de la red de suministro con filtros de sedimentos y de carbón activado, para eliminar las partículas de mayor tamaño y el cloro residual.

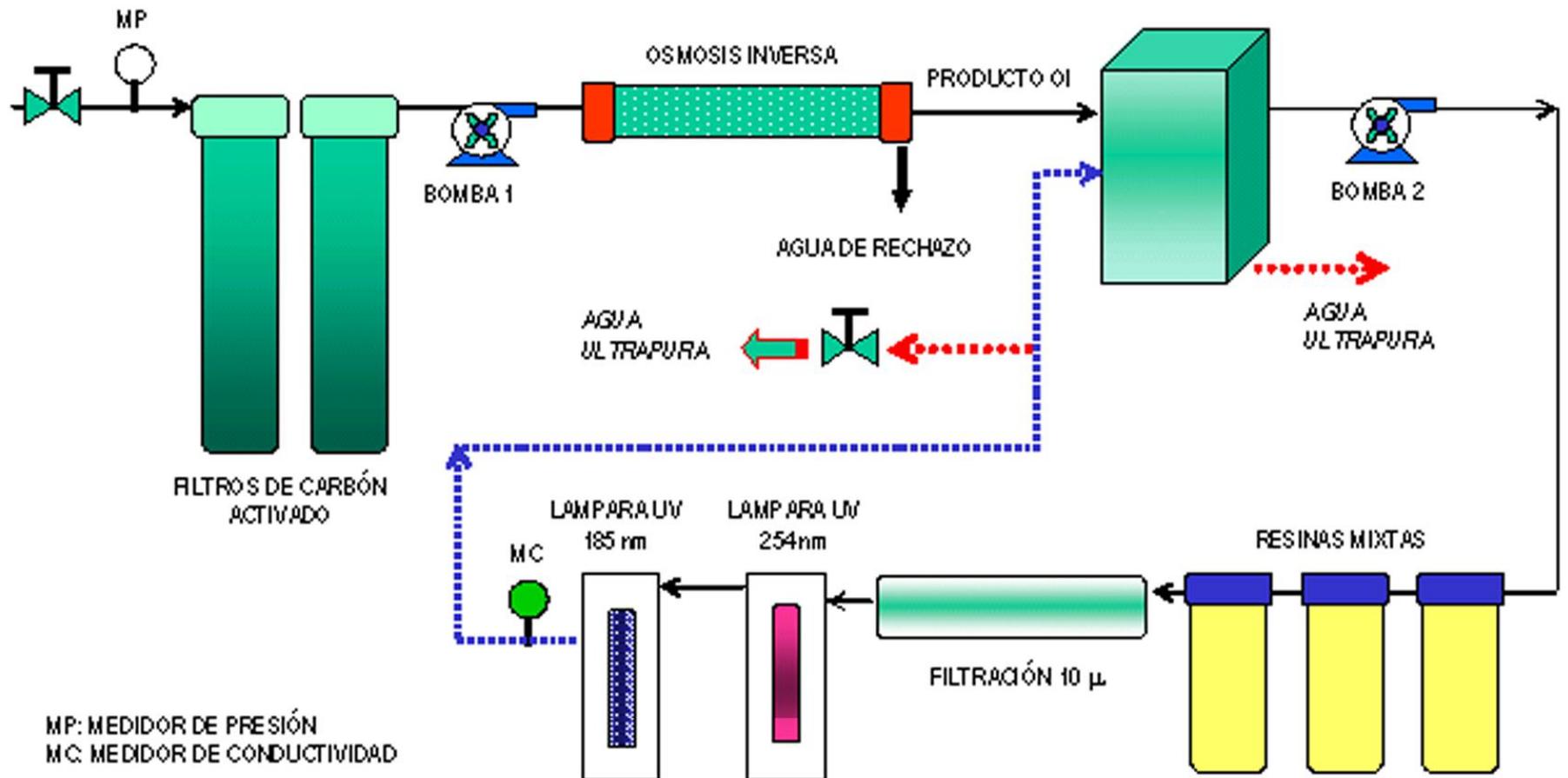
El agua ultrapura

- ▶ El agua resultante se pasa a una unidad de ósmosis inversa, donde se eliminan las sales disueltas con una eficiencia de entre el 95 y el 98%.
 - ▶ Finalmente, se pasa por un equipo de intercambio iónico. El agua que se obtiene no necesariamente cumple con los estándares de calidad y es conveniente hacer varios pasos a través de las resinas.
- 

El agua ultrapura

- ▶ Finalmente, se pasa por un equipo de intercambio iónico. El agua que se obtiene no necesariamente cumple con los estándares de calidad y es conveniente hacer varios pasos a través de las resinas.
- ▶ Cuando el agua tratada circula, se intercala una lámpara UV de 254 nm para su desinfección y una segunda lámpara UV de 185 nm para efectuar la destrucción de la materia orgánica al nivel de trazas, que siempre se genera cuando el agua está en contacto con la resina mixta y demás componentes del equipo.

El agua ultrapura



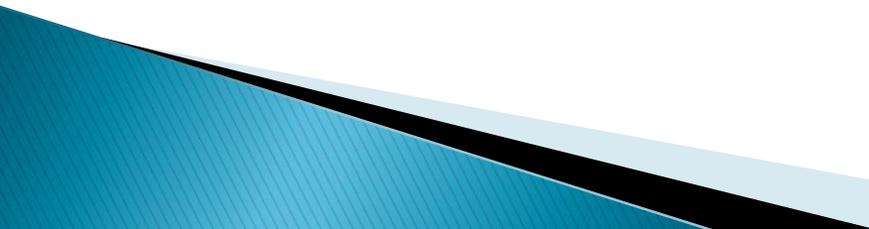
El agua ultrapura

- ▶ Hay que tener en cuenta además que el agua almacenada pierde sus cualidades, por lo que el reciclado continuo es muy conveniente.

Productos específicos de los distintos laboratorios

- ▶ Cada tipo de laboratorio utiliza productos químicos específicos para su actividad. A continuación veremos de forma resumida cuáles cuales son los más habituales en los laboratorios de Análisis Clínicos y en los de Anatomía Patológica.

Productos químicos en los laboratorios de Análisis Clínicos

- ▶ En todos ellos encontraremos reactivos comunes a cualquier laboratorio, como el agua, o ciertos ácidos y bases, y además algunos productos específicos.
- 

Bioquímica Clínica

- ▶ Además de reactivos comunes, estos laboratorios utilizan mayoritariamente **kits de reactivos**, adecuados a los equipos de análisis automatizados de que dispongan.

Hematología

- ▶ En este caso encontramos reactivos comunes y kits de reactivos para los analizadores comerciales, pero también distintos colorantes para poder teñir las células de la sangre y la médula ósea.
- ▶ Los colorantes vienen ya preparados y listos para usar. Los que se usan más habitualmente en Hematología son los derivados de la mezcla de colorantes ácidos y básicos (eosina y azul de metileno), como:

Hematología

- ▶ La **solución de May-Grünwald**, que contiene eosina (como colorante aniónico) y azul de metileno (como colorante catiónico) disueltos en metanol.
 - ▶ La **solución de Giemsa**, que contiene eosina, azul de metileno y productos de la oxidación del azul de metileno (azur A, azur B, violeta de metilo y azul de metilo).
- 

Inmunología

- ▶ Los reactivos típicos del laboratorio de Inmunología son los anticuerpos que al ponerlos en contacto con sus antígenos dan lugar a la unión antígeno-anticuerpo que se visualizará mediante otros reactivos enzimáticos o fluorescentes.

Biología molecular

- ▶ En los laboratorios de **Biología Molecular** se usan kits específicos para extracción de ADN o ARN y una mezcla de reactivos para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que nos permitirá obtener múltiples copias de un fragmento de ADN.
 - ▶ Para este procedimiento, que estudiaremos en el módulo de Biología Molecular, se necesitan productos como:
- 

Biología molecular

- ▶ Los cuatro desoxirribonucleótidos–trifosfato (dNTP), que serán los sustratos para polimerizar nuevo ADN.
- ▶ Cebadores o iniciadores (*primers*), que delimitan la zona de ADN que se va a amplificar y son los que permiten que la polimerasa inicie la reacción.

Biología molecular

- ▶ Iones divalentes, que actúan como cofactores de la polimerasa. Se suele usar magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$).
 - ▶ Iones monovalentes, como el potasio.
 - ▶ Una solución tampón o *buffer*, que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- 

Biología molecular

- ▶ Iones divalentes, que actúan como cofactores de la polimerasa. Se suele usar magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$).
 - ▶ Iones monovalentes, como el potasio.
 - ▶ Una solución tampón o *buffer*, que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- 

Biología molecular

- ▶ ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de 70°C (la más común es la polimerasa Taq).
 - ▶ ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.
- 

Citogenética

- ▶ Mitógenos, como la fitohemoaglutinina, para inducir la mitosis durante la incubación de la muestra.
 - ▶ Colchicinas, que interfieren en la polimerización de los microtúbulos del huso mitótico y detiene la mitosis en la prometafase.
- 

Citogenética

- ▶ Un medio hipotónico (0,075M KCl) para provocar un choque osmótico y un aumento de volumen de la célula, con lo cual se consigue una buena separación cromosómica.
 - ▶ Productos para la fijación de las células.
 - ▶ Colorantes para la tinción de los cromosomas, que los hace identificables.
- 

Microbiología

- ▶ Los **medios de cultivo**. Permiten el crecimiento de colonias de microorganismos para su posterior identificación. Algunos de ellos contienen factores que favorecen o inhiben a determinados géneros o especies. Los medios de cultivo ya vienen preparados comercialmente.
 - ▶ Los **reactivos** para la identificación de microorganismos. Cada género, incluso cada especie, tiene diferentes reacciones cuando se les enfrentan diferentes reactivos y las pruebas de reacción ante reactivos forman parte de los protocolos de identificación.
- 

Microbiología

- ▶ Los **colorantes**, para determinar la reacción ante el producto (qué color adquieren) o para teñir estructuras y mejorar la visualización al microscopio. Destacamos:

Tinción de Gram, que revela la forma de las bacterias, su agrupación y el grupo taxonómico al que pertenecen: Gram positivo o Gram negativo. Utiliza un primer colorante (complejo Cristal Violeta–Iodo), un decolorante (alcohol acetona) y un segundo colorante o colorante de contraste (la safranina)

Microbiología

Tinción de Ziehl Neelsen: es una técnica de tinción diferencial usada para la identificación de ciertos microorganismos patógenos, las micobacterias, también denominada ácido alcohol resistente (BAAR). Utiliza un primer colorante (fucsina), un decolorante (alcohol Clorhídrico) y un segundo colorante o colorante de contraste (azul de metileno).

Tinción de esporas mediante la técnica de Wirtz -Conklin, que utiliza dos colorantes, verde malaquita y safranina.

Los laboratorios de Anatomía Patológica

- ▶ En los laboratorios de Anatomía Patológica el trabajo se basa en el estudio de las alteraciones morfológicas.
 - ▶ Las técnicas que se aplican en estos laboratorios, por tanto, van destinadas a la preservación de las muestras y a su preparación para la observación directa o con microscopio.
- 

Productos químicos más usuales en los laboratorios de A.P.

- ▶ El formol, como fijador más común para las muestras de tejidos.
 - ▶ El alcohol y el xilol, para los procesos de deshidratación de muestras.
 - ▶ La parafina, para la inclusión de tejidos en bloque de parafina, lo que permite llevar a cabo la microtomía.
- 

Colorantes más usuales en los laboratorios de A.P.

- ▶ **Tinción hematoxilina–eosina.** Se aplica hematoxilina, que tiñe estructuras basófilas, como los núcleos celulares, en tonos azul y púrpura; ya continuación eosina, que tiñe las estructuras acidófilas, como algunas proteínas del citoplasma, en tonos rosa.
- ▶ **Tinción argéntica.** Este tipo de tinción es importante especialmente para estudios del sistema nervioso y se caracteriza porque el contraste se logra al precipitar átomos de plata sobre algunas neuronas y no sobre otras.

Colorantes más usuales en los laboratorios de A.P.

- ▶ **Tinción de Papanicolaou.** Se utiliza para la detección precoz del carcinoma de cérvix y contiene una mezcla de colorantes: la hema-toxilina que tiñe el núcleo, la eosina que tiñe el citoplasma y el orange G que tiñe la queratina.