
2

HIPOTESIS

2.- HIPOTESIS

Como paso previo a una investigación que nos lleve a conocer mejor la aplicación de la *prueba de Adler* en el diagnóstico genérico de las manchas de sangre, haremos una revisión de los compuestos que intervienen en la misma y del tipo de reacción que se produce.

La *prueba de Adler*, como todos los demás métodos que hemos llamado catalíticos, tiene como fundamento químico una reacción de oxidación-reducción que, aunque es un concepto bien conocido, presenta algunas peculiaridades no tan difundidas. Por ello consideramos conveniente hacer un breve repaso de lo que conocemos por oxidación y reducción.

Los términos oxidación y reducción⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾ han sido utilizados por los químicos desde hace casi un siglo. Inicialmente se entendía por oxidación procesos tan diversos como la combustión, la oxidación de los metales y la respiración de los organismos vivos. Por otro lado, se utilizaba el término reducción para describir la fusión de los minerales para obtener metales.

Poco a poco se fue ampliando el concepto, por lo que se llamó oxidación a la combinación de un elemento con el oxígeno y al consiguiente aumento de oxígeno en la composición centesimal de un cuerpo, es decir, a la introducción de átomos de oxígeno en la molécula.

De la misma forma, por reducción se entiende el proceso contrario, es decir, es una reacción por la cual un compuesto pierde átomos de oxígeno.

Posteriormente, se consideró también como oxidación, una pérdida de átomos de hidrógeno, mientras que la reducción implicaba ganancia de hidrógeno.

Sin embargo, como es bien sabido, existen reacciones en las que no intervienen, ni el oxígeno, ni el hidrógeno y que se explican también mediante un mecanismo de oxidación-reducción. Por ejemplo, la combustión del hierro en atmósfera de cloro no implica la presencia de oxígeno, aunque, durante el proceso, el hierro se oxida.

Considerando este tipo de reacciones, se amplió el concepto de oxidación-reducción, de forma que, actualmente, se considera que una **reacción redox** es aquella en la que varía el número de oxidación de dos o más elementos de los reactivos.

Según esta definición, una oxidación implica un aumento del número de oxidación de un elemento, y una reducción una disminución del mismo; dicho de otra forma, una oxidación es una pérdida de electrones y una reducción una ganancia, por lo que a este tipo de reacciones se les llama también reacciones de transferencia de electrones.

Un agente oxidante es, por lo tanto, una especie química capaz de captar electrones, reduciéndose y un agente reductor es, pues, una especie química capaz de cederlos, oxidándose. Un par redox es el conjunto formado por la forma oxidada y la reducida de una sustancia.

Traslademos ahora este proceso al marco investigador de las pruebas de orientación:

Las técnicas implicadas se basan en la presencia en la sangre de **peroxidases**, es decir, enzimas que catalizan reacciones en las que el peróxido de hidrógeno actúa como oxidante de un sustrato.

Se trata de metaloproteínas⁽²¹⁾ cuyo grupo prostético es el grupo hemo. Su estructura consta de una cadena polipeptídica (apoproteína), y un grupo hemo (grupo prostético) formado a su vez por un isómero de la porfirina, la protoporfirina IX, unida a un ión metálico, que es el Fe(III), a diferencia de la hemoglobina que contiene Fe(II).

El átomo de Fe puede formar seis enlaces, cuatro de ellos los forma con los N de la protoporfirina. La quinta y sexta posiciones de coordinación las emplea en un enlace con un nitrógeno de un aminoácido histidina y con una molécula de agua respectivamente.

Cuando se produce el contacto, el peróxido de hidrógeno se une a la proteína a través del hierro, desplazando a la molécula de agua. El sustrato que será oxidado, también debe quedar unido al enzima para que tenga lugar la reacción.

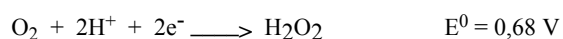
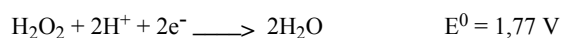
El mecanismo de reacción implica la formación de especies intermedias de la proteína -un peroxocomplejo de Fe(III)- y, durante el proceso, no existe un contacto directo entre el agua oxigenada y el sustrato que será oxidado.

La efectividad del enzima se explica porque permite tener Fe(III) a grados de pH altos en los que, en disolución o formando complejos simples, no es estable. Solamente a grados de pH altos el agua oxigenada (por ser un ácido débil), existe como OOH- y permite la formación del peroxocomplejo intermedio.

El enzima, la peroxidasa en definitiva, lo que hace es *corregir* las propiedades antagónicas del Fe(III) y el agua oxigenada.

Por otra parte, debemos indicar que la efectividad de las peroxidases es independiente del pH. Esto es ciertamente importante, dado que existen otros compuestos capaces de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno, pero su acción catalítica sí varía con el pH del medio.

La química redox del **agua oxigenada** en solución acuosa⁽²²⁾, se puede resumir mediante los siguientes potenciales:



Como fácilmente se colige, el peróxido de hidrógeno, es un agente oxidante fuerte en disolución ácida o básica. Sólo se comporta como reductor frente a oxidantes muy fuertes como el permanganato potásico.

Habitualmente, las reacciones de oxidación con el peróxido de hidrógeno, se producen rápidamente en medio básico y de forma muy lenta si el pH es ácido. Pero debemos hacer notar que, en presencia de

peroxidasas, el peróxido de hidrógeno puede actuar como oxidante de diferentes sustratos independientemente del pH imperante en el medio.

Ya hemos recordado que en la reacción de ADLER, el sustrato que interviene es la bencidina. Este compuesto es una amina aromática, cuya fórmula es la siguiente:

La bencidina, cuando pasa a su forma oxidada cambia de color. Esta característica se aprovecha para poder comprobar la presencia de peroxidasas en una muestra, puesto que la reacción no se produciría si no existe catalizador. Por lo tanto, el cambio de color indica la posibilidad de que la mancha estudiada sea sangre.

En principio se puede suponer que cualquier compuesto cuyo potencial redox sea menor que el del peróxido de hidrógeno, podría actuar como sustrato en una reacción similar a la descrita para la *prueba de Adler*.

Tras este breve y superficial, quizá innecesario, recuerdo de la química redox, retomamos la línea de la investigación.

A grandes rasgos, el trabajo se estructura partiendo de una comprobación específica de la *prueba de Adler* para, a renglón seguido, comprobar qué es lo que ocurre, en una serie de situaciones, si además de la bencidina, existe en la misma muestra, otro posible sustrato, es decir, otro compuesto capaz de ser oxidado por el peróxido de hidrógeno. El último paso trata de esclarecer algunos aspectos del mecanismo íntimo de la prueba.

Todo ello se contempla en una serie de proposiciones que se desarrollan a continuación.

PRIMERA HIPOTESIS:

En un primer paso de nuestro trabajo plantearemos una hipótesis que parte de la afirmación hecha por BORDAS en 1910, que señala que la *prueba de Adler* es sensible para concentraciones de sangre de 1/200000. Desde entonces, se han ido proponiendo diferentes valores de concentración de sangre para los que la prueba da un resultado positivo.

Según hemos comprobado en la revisión bibliográfica, se admite que la sensibilidad de la reacción de ADLER oscila entre 1/200000 y 1/500000, variando según los distintos autores consultados.

Estudiaremos la sensibilidad de la *prueba de Adler*, sobre los diferentes soportes en los que se puede encontrar la mancha que se va a identificar, de forma que podamos conocer si existen o no diferencias en la efectividad de la reacción, y también contrastar los resultados obtenidos con los que se indican en la bibliografía revisada.

SEGUNDA HIPOTESIS:

Ya hemos apuntado anteriormente, al describir la reacción en que se basa la *prueba de Adler*, que, en presencia de peroxidasas, cualquier compuesto cuyo potencial sea menor que el del peróxido de hidrógeno, puede actuar como sustrato en la reacción de descomposición del peróxido, siendo oxidado.

Si es cierto, podremos deducir qué ocurrirá si, en la muestra de sangre que estamos analizando, existe un compuesto capaz de actuar como sustrato, y que por lo tanto pueda competir con la bencidina por el peróxido de hidrógeno, o bien alterar de alguna forma el mecanismo de catálisis, impidiendo la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno.

Según esta afirmación, pueden existir compuestos que actúen como contaminantes, dando lugar a falsos negativos en la *Prueba de Adler*, al impedir la oxidación de la bencidina.

Ya que hemos podido comprobar experimentalmente que al añadir zumo de limón a una muestra de sangre, no se obtiene el resultado positivo que indica la existencia de sangre en la mancha, planteamos pues la hipótesis de que deben existir diferentes sustancias que, añadidas a la sangre impiden la reacción de la bencidina dando lugar a falsos negativos en la *prueba de Adler*.

Estudiaremos en qué condiciones de concentración de la muestra y el contaminante se produce la interferencia en la reacción, y también la influencia del tipo de soporte sobre el que se aplican las pruebas de identificación de la mancha de sangre.

TERCERA HIPOTESIS:

Una vez que hayamos verificado la hipótesis anterior, continuaremos nuestra investigación centrándonos en el estudio de qué componente del contaminante (zumo de limón), es el causante de la interferencia.

La composición del zumo de limón es la siguiente: agua, proteínas, grasas, azúcar, minerales, caroteno, vitamina B1, vitamina B2, nicotinamida, ácido fólico, vitamina C, ácido málico y ácido cítrico.

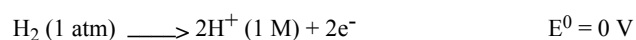
En nuestra hipótesis de trabajo suponemos que el ácido ascórbico puede ser el causante del falso negativo que se ha obtenido en la *prueba de Adler*⁽¹⁸⁾.

Para hacer esta propuesta, nos basamos en que la reacción de la bencidina implica un mecanismo de oxidación-reducción.

Recordemos brevemente algunos conceptos que ayuden a plantear la hipótesis:

En las reacciones redox, el valor del potencial estándar (ΔE°), nos dará la medida cuantitativa de la tendencia de la reacción a producirse. Este potencial se mide para reaccionantes y productos en estado estándar, es decir, concentración 1 M para materiales solubles, presión de 1 atm para gases y para sólidos su forma más estable a 25°C. Una variación de potencial positiva indica que la reacción se produce espontáneamente de izquierda a derecha. Cuando mayor es dicha diferencia de potencial, más fácilmente se produce la reacción.

El potencial estándar es el resultado de la suma de los potenciales de cada una de las dos semirreacciones que intervienen en la reacción redox. Para obtener valores de potencial absolutos para cada una de las semirreacciones, se ha asignado arbitrariamente el valor cero a la semirreacción del ión hidrógeno-gas hidrógeno:



Comparando cada par redox con el par ión hidrógeno-gas hidrógeno, podremos calcular los potenciales absolutos.

Todas las semirreacciones se escriben como reducciones, y su potencial es la medida de la tendencia de la reacción a producirse de izquierda a derecha (reducción), cuando más positivo sea el potencial de un par redox, más tendencia tendrá a reducirse (es más oxidante). Si se invierte el sentido de una reacción, se debe cambiar el signo del potencial.

Comparando los potenciales de dos pares redox, podremos saber cuál de ellos será el oxidante y cuál el reductor.

Por otra parte, sobre el compuesto que estudiaremos como contaminante de la muestra, podemos indicar lo siguiente:

El ácido ascórbico o vitamina C⁽²³⁾⁽²⁴⁾, es la forma enólica del 3-ceto-1-gulofuranolactona, su fórmula es:

Se trata de un compuesto formado por cristales blancos de sabor ácido, hidrosolubles y poco solubles en etanol. Es fuertemente reductor, y aunque la forma cristalizada es estable al aire, en solución acuosa es sensible a la luz y al oxígeno, y lábil al calentamiento en presencia de oligometales como el cobre. Por otro lado, es estable a la congelación.

Se encuentra principalmente en las frutas cítricas, las moras, el melón, la col cruda, los pimientos verdes y los vegetales verdes.

Su estructura es semejante a la de un monosacárido pero contiene un grupo enol en el segundo y tercer átomos de carbono. Este grupo es sensible a la oxidación y, por eliminación de hidrógeno, se convierte en un grupo diceto formando el ácido dehidroascórbico.

Como ya hemos indicado, el ácido ascórbico se oxida espontáneamente al contacto con el aire, y es, probablemente, la menos estable de todas las vitaminas hidrosolubles. Sin embargo, tanto la forma oxidada como la reducida son funcionalmente activas. El sistema redox formado por los ácidos dehidroascórbico y ascórbico tiene un potencial de 0,127 V.

En una reacción redox entre el ácido ascórbico y cualquier otro par redox con un potencial mayor de 0,127 V, el ácido ascórbico será oxidado. El agua oxigenada tiene un potencial de 1,77 V, luego, en principio, puede actuar como oxidante frente al ácido ascórbico.

En nuestra hipótesis de trabajo proponemos que el ácido ascórbico puede actuar como contaminante provocando falsos negativos en la *prueba de Adler*, y que la interferencia se debe producir tanto para muestras líquidas, como para manchas o huellas de manchas.

En principio, y aunque este punto lo estudiaremos más adelante, podemos apuntar que la interferencia se puede producir por dos caminos distintos: bien por alteración de la peroxidasa, bien por modificar la reacción de oxidación-reducción al existir, en la muestra, un compuesto muy reductor que puede intervenir alterando los resultados.

CUARTA HIPOTESIS:

La experiencia que inició nuestra investigación, fue realizada a partir de sangre fresca recién extraída. Ahora estudiaremos la presencia de falsos negativos en muestras que proceden del banco de sangre y que, por lo tanto, han sido sometidas a un proceso de conservación.

Para conocer en qué condiciones se encuentran estas muestras, hemos recurrido al Real Decreto 1854/1993 del 22 de octubre en el que se determina con carácter general los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y bancos de sangre, del que extraemos la siguiente información:

"La sangre total y todos los componentes eritrocitarios líquidos deben ser almacenados de forma continuada a una temperatura comprendida entre 1-6°C. La sangre total y los componentes eritrocitarios separados en circuito cerrado, utilizando un método que garantice un hematocrito final inferior al 80 por 100, tendrán una fecha de caducidad no superior a veintiún días a contar desde la fecha de extracción si el anticoagulante empleado es ACD o CPD, y de treinta y cinco días si el anticoagulante es CPD-Adenina. Cuando se utilizan soluciones aditivas la fecha de caducidad será la adecuada para esa solución".

Al realizar pruebas con muestras que proceden del banco de sangre, utilizamos sangre sometida a conservantes, y a bajas temperaturas durante un tiempo mínimo de 35 días. Suponemos que en estas condiciones los resultados al aplicar la *prueba de Adler* pueden variar con respecto a la sangre fresca recién extraída.

En este punto de la investigación también veremos si las pruebas realizadas conducen a los mismos resultados tanto si se utiliza muestra en tubo de ensayo, como si se aplica directamente sobre manchas o mediante la obtención de la *huella de Taylor*.

QUINTA HIPOTESIS:

Suponemos que el tiempo que haya transcurrido desde que se produjo la mancha, hasta que se sometió a las pruebas de identificación, puede influir sobre el resultado de la *prueba de Adler*. Estudiaremos muestras con contaminante que dejaremos almacenadas durante periodos determinados.

Está generalmente admitido⁽¹⁵⁾ que la antigüedad de una mancha de sangre no impide su identificación por la *prueba de Adler*, y que tampoco afecta a la sensibilidad de la misma.

Es predecible que si la muestra contiene contaminantes, el tiempo puede variar sus propiedades alterando su capacidad de interferencia en la reacción de identificación. Como ya se ha indicado, el ácido ascórbico es poco estable, y sensible a la luz y al oxígeno. También la temperatura puede variar sus propiedades. En teoría, y si admitimos que la antigüedad de la sangre no influye en el resultado del test, cualquier diferencia con respecto a los resultados obtenidos en experiencias correspondientes a hipótesis anteriores, se deberán a la alteración del contaminante. Para confirmar estas hipótesis, realizaremos pruebas con sangre con y sin ácido ascórbico. Los resultados obtenidos nos permitirán determinar el posible efecto de la data de la muestra y/o del contaminante sobre la sensibilidad de la *prueba de Adler*.

SEXTA HIPOTESIS:

Si hemos llegado a comprobar que la reacción de ADLER puede verse afectada por la presencia en la muestra de ácido ascórbico, nos podemos preguntar ahora de qué forma actúa el contaminante.

En principio, como ya hemos apuntado anteriormente, podemos pensar que una posibilidad sería que el ácido ascórbico inhibe al enzima que cataliza la reacción, impidiendo su acción, por lo que la descomposición del peróxido de hidrógeno no tendría lugar, y por lo tanto, no se produciría la reacción de oxidación de la bencidina.

Por otra parte, y si tenemos en cuenta que el ácido ascórbico es un compuesto muy reductor, podría ocurrir que tuviera mayor capacidad para oxidarse que la bencidina, consumiendo el oxígeno liberado por el peróxido de hidrógeno, e impidiendo que se invirtiera en la oxidación de la bencidina. Por lo tanto, no se observaría el positivo de la *prueba de Adler*.

Una tercera posibilidad sería que el ácido ascórbico actuara reduciendo a la bencidina que previamente había sido oxidada por el peróxido de hidrógeno, de forma que impidiera que se pusiera de manifiesto el color azul característico porque desaparece rápidamente al ser reducida la bencidina.

Para trabajar sobre estas hipótesis, tendremos que diseñar un método que nos permita conocer el posible mecanismo de actuación del contaminante. Este método implicará la realización de pruebas sencillas, en las que comprobaremos las propiedades redox de los compuestos implicados en la reacción. Como punto de partida, vamos a estudiar distintos procedimientos para conseguir descomponer el peróxido de hidrógeno. De todos ellos los más usuales son:

1. Reacción con el permanganato potásico⁽²⁵⁾:

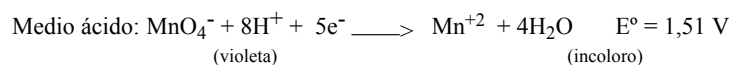
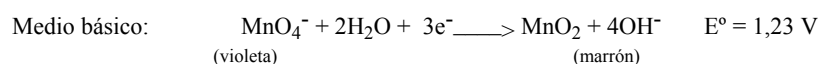
Este método se suele utilizar para comprobar la presencia de peróxido de hidrógeno en una muestra. Para ello, se pone una pequeña cantidad de permanganato de concentración 0,1

N en un tubo de ensayo, y se añade unas gotas de ácido sulfúrico 2 N. La solución tiene un color violeta oscuro.

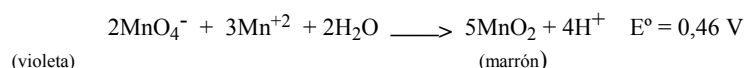
Si a continuación se agrega peróxido de hidrógeno, se observa como inmediatamente, la disolución se decolora pasando a ser transparente, a la vez que se desprenden burbujas de oxígeno elemental, que verifican la descomposición del peróxido. El cambio de color se debe a la reducción del permanganato, que como Mn(II), es incoloro. Esta reacción es sencilla, rápida y se produce sin necesidad de calentar la muestra. Tiene el inconveniente que el permanganato interviene directamente en la misma, lo que puede plantearnos problemas a la hora de utilizarla para nuestro trabajo. La reacción que se produce es la siguiente:



El permanganato potásico es un reactivo importante en la Química Analítica. Es un oxidante fuerte tanto en medio ácido como en básico, como podemos comprobar por los valores del potencial redox en los dos casos:



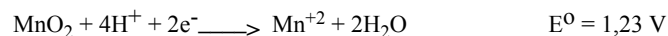
Como el MnO_4^- , puede oxidar al Mn^{+2} , si existe un exceso de permanganato, se produce la reacción siguiente:



Las propiedades redox del permanganato, se pueden aplicar para el estudio que nos proponemos realizar, comprobando lo que ocurre cuando hacemos reaccionar el reactivo de ADLER y el ácido ascórbico con el permanganato.

2. Descomposición catalizada por catalizadores químicos:

Existen distintos compuestos químicos, como son los óxidos de Cu(II), Ni, Zn y el de Mn(IV), que son capaces de catalizar la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno. De todos ellos, el más efectivo es el óxido de Mn(IV)⁽²⁶⁾. El dióxido de Manganeso⁽²⁷⁾, es un sólido cuyo color oscila entre el gris y el negro. Es un compuesto no estequiométrico y que presenta siempre deficiencia en oxígeno. En medio ácido, es un agente oxidante muy fuerte, con un potencial redox de 1,23 V. La semirreacción es la que indicamos a continuación:



Sin embargo, en medio básico es muy poco oxidante, tal como queda reflejado en el valor del potencial, que es de -0,50 V. Es decir, que, a diferencia de las peroxidases, su poder como catalizador, varía con el pH del medio.

La reacción en la que el dióxido de manganeso actúa catalizando la descomposición del peróxido de hidrógeno, se lleva a cabo de la forma siguiente⁽²⁸⁾: se pone en un tubo de ensayo 1 g de dióxido de manganeso, se añade 50 ml de agua destilada y 2 ml de peróxido de hidrógeno de 20 volúmenes. Se puede comprobar que el peróxido se ha descompuesto porque se observa la aparición de burbujas de oxígeno. Es importante recordar que los compuestos que actúan como catalizadores quedan inalterados al finalizar la reacción.

Podemos realizar otra serie de pruebas a partir de este óxido, comprobando lo que ocurre cuando se le añade reactivo de ADLER y ácido ascórbico.

Para estudiar el efecto de los contaminantes sobre la reacción de ADLER, proponemos un procedimiento que consiste en comprobar lo que ocurre si hacemos reaccionar el reactivo de ADLER y el ácido ascórbico con un agente oxidante. Veremos si la interferencia del contaminante se produce también en este caso. Y en cualquier caso a la vista de los resultados intentaremos dar una explicación a los falsos negativos que obtenemos al aplicar la *prueba de Adler*.
