5

RESULTADOS Y DISCUSION

5.- RESULTADOS Y DISCUSION

OBJETIVO 1

Los resultados que hemos obtenido en la experiencia realizada para estudiar hasta qué valor de la concentración en sangre es efectiva la *prueba de Adler*, los reflejamos en la **tabla 1**.

En ella contemplamos en la primera columna la concentración en sangre de las muestras que vamos a estudiar, utilizando como unidad de medida los ml de sangre por ml totales de muestra. En la fila superior, indicamos los distintos soportes sobre los que hemos trabajado, analizando posibles diferencias en el resultado de la prueba. Como se ha adelantado, disponemos de 3 muestras por cada concentración y soporte. Completamos el resto de filas indicando si la reacción tiene o no lugar, para esto, representamos convencionalmente el resultado positivo con el signo + y el negativo con el -.

Según vemos en la tabla, la sensibilidad varía no sólo con la concentración, como es lógico, sino también según el soporte utilizado.

PRUEBAS CON MUESTRAS LIQUIDAS

Al realizar las pruebas con muestras líquidas, encontramos que desde una concentración 1/10, hasta 1/1000 en sangre, la reacción se produce según las pautas que se indicaron en la descripción del método, es decir:

- Al poner el reactivo en la muestra, no se produce ninguna alteración del color.

- Al añadir el peróxido de hidrógeno, se produce inmediatamente el cambio de color de la muestra. Se puede ver al color azul intenso indicativo de la reacción positiva por la oxidación de la bencidina, y el tiempo necesario para observar el desarrollo del color es inferior a 10 segundos.

- El color es uniforme. Por comparación con la muestra que utilizamos como control, comprobamos que es el color característico indicativo del resultado positivo del test.

Cuando hacemos la prueba para las diluciones 1/10000 y 1/100000, encontramos que, aunque se puede considerar que el resultado es positivo, el color tarda algo mas de 10 segundos en aparecer. El tiempo que transcurre desde que se añade el peróxido de hidrógeno, hasta que se observa el color indicativo del resultado positivo es, aproximadamente, de 30 segundos.

También hay que señalar, que la coloración es más tenue que la que se ha podido observar en las pruebas correspondientes a diluciones de menor concentración. En cualquier caso, se puede considerar el resultado como positivo, puesto que se puede ver el color azul característico de la oxidación de la bencidina, y la diferencia de tiempo con respecto las diluciones menos concentradas, no es muy alta.

Debemos señalar también que, con el tiempo, el color de la disolución pasa a violeta.

Para una disolución de concentración 1/100000, comprobamos que al añadir el reactivo, la muestra, que es transparente, pasa a color blanco. Al agregar agua oxigenada, aparece un color azul pálido después de esperar 1 minuto. Pese a ello, consideramos el resultado positivo

A partir de diluciones de concentración 1/200000, comprobamos que al igual que ocurre con las muestras anteriores, al añadir el reactivo, la disolución pasa de ser transparente, a tener color blanco, pero posteriormente no varía cuando se añade el peróxido de hidrógeno. El color en este caso tampoco cambia con el tiempo. El resultado de la *prueba de Adler* es, pues, negativo.

PRUEBAS CON MANCHAS EN PAPEL DE FILTRO

Las manchas correspondientes a diluciones de concentraciones comprendidas entre 1/10 y 1/10000, dan positiva la *prueba de Adler* siguiendo las pautas que indicamos anteriormente.

Se observa cómo, al añadir los reactivos, se forma rápidamente una mancha de color azul que se extiende por toda la superficie de la muestra. Para estas concentraciones, no se puede dudar del resultado positivo de la prueba.

Cuando realizamos el test sobre manchas que hemos obtenido a partir de muestras de sangre de concentración 1/100000 y 1/200000, vemos que, al añadir el peróxido de hidrógeno, no se desarrolla el color uniformemente por toda la superficie de la mancha, sino que se forman trazos de color azul.

El tiempo necesario para que el color se ponga de manifiesto, es inferior a 10 segundos. Consideramos el resultado de la prueba positivo, ya que estamos estudiando muestras muy diluidas y, por lo tanto, no cabe esperar que toda la mancha cambie de color.

Para manchas que se han formado a partir de disoluciones de sangre de concentración 1/300000 hasta 1/500000, comprobamos que, al agregar peróxido de hidrógeno, se puede observar como aparecen puntos azules sobre la muestra, indicativos de que ha tenido lugar la reacción de oxidación de la bencidina.

Estos puntos aparecen en menos de 10 segundos. En estas pruebas, como la concentración de sangre es muy baja, puede darse el caso que en alguna de las 3 manchas que utilizamos, no se vea claramente el resultado positivo. En este caso hemos repetido el ensayo con nuevas manchas.

PRUEBAS CON LA HUELLA DE TAYLOR

Desde una dilución 1/1, hasta 1/100, se observa claramente el resultado positivo de la *prueba de Adler*, es decir, se puede comprobar la aparición de una mancha de color azul que se extiende por toda la superficie de la huella, y que indica el positivo en la prueba en un tiempo inferior a 10 segundos.

Para la huella que obtenemos a partir de la mancha que corresponde a una concentración 1/1000 en sangre, también el resultado es positivo, aunque en este caso, no se puede ver una mancha azul, sino trazos azules, quedando sobre la muestra zonas en las que no se observa cambio de color.

Cuando realizamos la prueba sobre la huella que corresponde a una concentración 1/10000, se observa lo mismo que en el caso de la concentración 1/1000, pero la cantidad de trazos es menor.

A partir de la dilución 1/100000, el resultado que obtenemos cuando aplicamos la *prueba de Adler* sobre las huellas es negativo.

Hemos comprobado que en estas experiencias, igual que ocurre en las pruebas realizadas con muestras líquidas, la sensibilidad es menor. En este caso, la menor efectividad puede ser debida a que la huella no recoge toda la sangre que se encuentra en la mancha, por lo que la concentración es menor que la esperada. Además

el papel de filtro que utilizamos, se debe humedecer con agua destilada, por lo que el reactivo estará más diluido y su fuerza es menor.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

Hemos podido comprobar que la sensibilidad de la *prueba de Adler* varía según el tipo de soporte utilizado para la muestra. La eficacia es mayor cuando se aplica sobre manchas. Esto se puede explicar considerando que en muestras líquidas, el reactivo sufre el efecto de la dilución, por lo que su fuerza es menor, lo que no ocurre si obtenemos una mancha de la muestra líquida.

En el caso de las *huellas de Taylor*, debemos tener en cuenta que, en principio, la concentración de sangre en la huella no debe ser la que existe en realidad en la mancha, sino que será menor. A esta circunstancia se le puede sumar el efecto de dilución del reactivo por estar el papel de filtro humedecido. De todos estos resultados, podemos apuntar que en cualquier valoración de la sensibilidad de la *prueba de Adler*, es imprescindible indicar las condiciones en que se ha obtenido el valor propuesto, o, dicho de otra forma, en qué circunstancias se puede esperar encontrar ese valor de sensibilidad, puesto que hemos podido comprobar que, sobre soporte sólido, la prueba es cinco veces más efectiva que cuando se aplica sobre disoluciones de sangre.

OBJETIVO 2

La **tabla 2** que recoge los resultados obtenidos en esta experiencia, indica en la primera columna, la concentración en sangre de las muestras, utilizando como unidad de medida los ml de sangre por ml totales de muestra y en la segunda, los soportes sobre los que se estudia la muestra. En la fila superior, las concentraciones de las distintas disoluciones de zumo de limón que hemos preparado, y que medimos en ml de zumo de limón por ml totales de disolución.

Como en la experiencia anterior, para los ensayos preparamos 3 muestras, con el fin de poder confirmar los resultados obtenidos en cada prueba. Completamos la tabla indicando si se ha podido comprobar el resultado positivo de la *prueba de Adler* con un signo +, y, en caso contrario, con un -. Las zonas sombreadas corresponden a pruebas no realizadas por haber obtenido un resultado negativo al realizar la prueba sobre sangre sin contaminante.

Señalemos que, aunque para realizar la experiencia, se han preparado disoluciones de zumo de limón de concentración 1/1 hasta 1/100000 ml zumo/ml de disolución, y se ha realizado la prueba con todas ellas, en la tabla, por motivos de claridad y espacio, hemos omitido algunos resultados. Ello ha sido debido a no ofrecer significación, puesto que nos interesaba, sobre todo, reflejar aquellas concentraciones para las que los resultados pasan de ser positivos a negativos o al contrario.

Las pruebas de control que se han realizado aplicando la *prueba de Adler* sobre el zumo de limón, han dado un resultado negativo para todas las concentraciones. Es decir, el zumo de limón no da, en ningún caso, un resultado positivo.

PRUEBAS CON MUESTRAS LIQUIDAS

Analizando la tabla podemos ver que para concentraciones de sangre 1/1, y 1/10, no obtenemos negativos en la *prueba de Adler*, ni siquiera utilizando zumo de limón sin diluir.

Cuando pasamos a estudiar la concentración 1/100, encontramos que no se observa un resultado positivo hasta llegar a la concentración 1/2 en contaminante.

Para muestras de concentración 1/1000, se obtiene el positivo al llegar a una concentración 1/100 en contaminante. El color que se puede ver es azul claro, y el tiempo que tarda en desarrollarse oscila entre 20 y 30 segundos.

En muestras 1/10000, se obtiene el positivo cuando la concentración de contaminante es de 1/1000, y como ocurre con las muestras 1/1000, el color es tenue, y se necesita de 30 segundos para poderlo observar.

Cuando se aplica la prueba sobre muestras 1/100000, no conseguimos comprobar un resultado positivo en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

PRUEBAS CON MANCHAS EN PAPEL DE FILTRO

En este tipo de muestras, los resultados obtenidos indican que no se produce interferencia del contaminante cuando las concentraciones de sangre varían entre 1/1 y 1/10000. Debemos señalar que en esta última muestra, al aplicar la *prueba de Adler* se observa la aparición sobre la mancha de puntos azules, que consideramos indicativos de un resultado positivo.

Al pasar al estudio de las manchas de sangre correspondientes a una concentración 1/100000, vemos que se obtienen resultados negativos hasta llegar a la disolución de concentración 1/1000 en contaminante.

Para las soluciones de zumo de limón más diluidas, el resultado es positivo y se puede ver como se forman trazos azules sobre la mancha al realizar la prueba.

Para manchas correspondientes a la muestra 1/200000, todos los resultados son negativos.

PRUEBAS CON LA HUELLA DE TAYLOR

No existe interferencia cuando se estudia la *huella de Taylor* para concentraciones de sangre comprendidas entre 1/1 y 1/1000.

Se obtiene resultados negativos al realizar las pruebas con las muestras correspondientes a la concentración 1/10000 en sangre, hasta llegar a la disolución 1/1000 en contaminante.

Para disoluciones menos concentradas en zumo de limón, el resultado de la prueba es positivo y se comprueba la aparición de trazos azules sobre la huella.

No realizamos la experiencia para muestras 1/100000, puesto que al aplicar la prueba sobre un blanco, es decir obteniendo la huella correspondiente a la mancha sin contaminante, el resultado es negativo, confirmando lo que ya se comprobó en la experiencia correspondiente al primer objetivo

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

Las experiencias realizadas nos han permitido demostrar que existen sustancias que añadidas a la muestra de sangre, provocan un resultado negativo de la *prueba de Adler.*

Hemos comprobado que, como cabría esperar, de la misma forma que el soporte utilizado afecta a la sensibilidad de la *prueba de Adler*, esto también ocurre cuando se estudia sobre muestras que contienen contaminante. Se puede demostrar que la efectividad sigue siendo mayor en el caso de que se analicen manchas sobre papel de filtro que para muestras líquidas o huellas de manchas. Se observa que en muestras líquidas se detecta el efecto del contaminante para concentraciones más altas en sangre, que para otros soportes. Así pues, para muestras 1/100 ya se producen interferencias en la reacción. Hay que destacar que la efectividad de la prueba, aún en el caso de que existan contaminantes, es mayor cuando se realiza sobre manchas sobre papel de filtro. Y que, en el caso de las *huellas de Taylor*, aunque la sensibilidad de la prueba es menor, puesto que no da positivo para concentraciones 1/100000, el efecto del contaminante es menor que en muestras líquidas, puesto que no se comprueba la aparición de falsos negativos hasta llegar a una concentración 1/10000 en sangre.

OBJETIVO 3

Los resultados que hemos obtenido en estas sesiones de laboratorio quedan reflejados en la **tabla 3** que aparece a continuación. Su estructura es igual a la correspondiente a la segunda experiencia, pero sustituyendo las concentraciones de las disoluciones de zumo de limón, por las correspondientes a las disoluciones de ácido ascórbico.

En el método descrito para esta experiencia, indicamos ya que hemos preparado una disolución base de ácido ascórbico que contiene una concentración de 0,38 mg/ml del ácido.

Para obtener la disolución hemos pesado 0,0387 g de ácido ascórbico que han sido disueltos en 100 ml de agua destilada, de forma que tenemos una concentración de 0,3870 mg/ml. Esta disolución sería equivalente a la de concentración 1/1 en zumo de limón pues contiene, aproximadamente, la misma cantidad de ácido ascórbico.

Para poder comparar con más facilidad las tablas que indican los resultados de las experiencias 2 y 3, consideramos que la disolución base como una disolución 1/1, de forma que por ejemplo, la disolución 1/2, corresponde en realidad a una concentración de 0,1935 mg/ml.

También en esta experiencia, realizamos las pruebas sobre 3 muestras iguales para asegurarnos de que obtenemos el resultado correcto. Convencionalmente, en la tabla el signo + representa el resultado positivo de la prueba y el - el negativo.

En la tabla hemos omitido, al igual que en la experiencia anterior algunas de las disoluciones de ácido ascórbico que, aunque las hemos utilizado, no aportan ningún dato de interés a los resultados. De esta forma intentamos que la tabla sea más clara y menos extensa

Previamente hemos comprobado que la *prueba de Adler* no da positiva para ninguna concentración de ácido ascórbico.

PRUEBAS CON MUESTRAS LIQUIDAS:

Según los datos que indicamos en la tabla, podemos ver que no obtenemos resultados negativos al aplicar la *prueba de Adler*, sobre las muestras preparadas a partir de las disoluciones de sangre más concentradas, es decir, 1/1 y 1/10, a las que añadimos 1 ml de la disolución base de ácido ascórbico. La concentración de la disolución base aparece en la tabla como 1/1, y corresponde realmente a 0,3870 mg/ml.

Cuando pasamos a estudiar la muestra de sangre de concentración 1/100, obtenemos resultados negativos hasta llegar a la disolución 1/2 (0,1935 mg/ml) en ácido.

Debemos indicar que para todas las pruebas realizadas con disoluciones más concentradas de ácido, el resultado lo consideramos negativo aunque con el tiempo las muestras adquieren un color verde oscuro.

Cuando pasamos a estudiar las muestras que contienen sangre y ácido ascórbico, correspondientes a la concentración 1/1000 en sangre, obtenemos resultados negativos de la prueba hasta llegar a la disolución 1/10 en contaminante. El color que indica el resultado positivo es azul claro.

Para muestras 1/10000 en sangre, obtenemos un resultado positivo para la disolución de contaminante de concentración 1/1000, y al igual que en las pruebas realizadas para la disolución de sangre 1/1000, el color es tenue y en este caso se necesitan 30 segundos para poder observarlo.

Para muestras 1/100000, aunque el resultado de la prueba sobre la muestra sin contaminar es positivo, cuando estudiamos el efecto del contaminante obtenemos resultados negativos en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

PRUEBAS CON MANCHAS EN PAPEL DE FILTRO:

Los resultados obtenidos para estas muestras nos indican que no se produce interferencia del contaminante para concentraciones de sangre entre 1/1 y 1/100000. Sin embargo debemos indicar que en el caso de las muestras 1/10000 y 1/100000, lo que se observa al realizar la prueba, es la aparición sobre la mancha de trazos azules, que consideramos que indican el resultado positivo de la misma.

Para las muestras correspondientes a una concentración 1/200000, determinamos que el resultado de la prueba sobre manchas preparadas sin contaminante, es positivo, y podemos observar cómo aparecen puntos azules sobre la mancha.

Al someter a la *prueba de Adler* a las manchas que contienen contaminante, comprobamos que sólo se obtiene un resultado positivo cuando la concentración de contaminante es de 1/100000, es decir, de 3,87 10^{-6} mg/ml. También en este caso vemos sobre la mancha puntos azules, que consideramos como indicativos del resultado positivo de la reacción.

Para el resto de las manchas que obtenemos para concentraciones de sangre desde 1/300000 hasta 1/500000, al añadir contaminante no obtenemos resultados positivos para ninguna de las disoluciones de ácido ascórbico.

PRUEBAS CON LA HUELLA DE TAYLOR:

No se observa interferencia en la reacción cuando se estudia la *huella de Taylor* para concentraciones de sangre comprendidas entre 1/1 y 1/1000. Para esta última disolución aparecen sobre la mancha trazos azules.

Se obtiene resultados negativos al realizar las pruebas con las muestras correspondientes a la concentración 1/10000 en sangre, para todas las disoluciones de ácido ascórbico de las que disponemos. Sin embargo sí que da positiva la prueba realizada sobre la huella que se obtiene de la mancha sin contaminante

No realizamos la experiencia para muestras 1/100000, puesto que al aplicar la prueba sobre una mancha de sangre sin contaminante, el resultado es negativo.

AJUSTE DE LA CONCENTRACION DEL CONTAMINANTE

Elegimos para las pruebas la disolución de sangre de concentración 1/1000. Como indicamos en el método preparamos tubos de ensayo con 1 ml de sangre en cada uno. Para esta dilución el ácido ascórbico actúa como contaminante a partir de la concentración 1/10 (es decir, 0,0387 mg/ml).

Añadimos a cada tubo un volumen distinto de ácido ascórbico, desde 0,1 hasta 1 ml. Como en todos los ensayos que realizamos, prepararemos 3 tubos para cada prueba. Los resultados que hemos obtenido al aplicar sobre las muestras la *prueba de Adler*, se indican en la **tabla 4** que sigue:

	Volumen ácido ascórbico 1/10 (ml)									
	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Resultado	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Prueba Adler	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Como es evidente, el resultado es positivo para todas las muestras excepto la que contiene 1 ml de contaminante.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

También en esta experiencia podemos comprobar que la sensibilidad de la prueba varía según el soporte utilizado para la muestra, siendo mayor la efectividad cuando se estudian manchas obtenidas sobre papel de filtro.

De igual forma, el efecto del contaminante es de mayor importancia en el caso de muestras líquidas, ya que hemos obtenido interferencias en concentraciones 1/100 en sangre, y la acción del ácido ascórbico es menor en manchas sobre papel e incluso en las huellas correspondientes a las manchas.

Los resultados obtenidos son superponibles a los correspondientes a la segunda experiencia, en la que utilizó el zumo de limón como contaminante. No obstante, encontramos que, para manchas en papel, varía ligeramente, puesto que hemos podido comprobar que la reacción es positiva para concentraciones de sangre de 1/200000, cuando se utiliza la disolución de contaminante 1/100000, ($3{,}87\ 10^{-6}$ mg/ml). Sin embargo en las pruebas realizadas con zumo de limón no obtenemos resultados positivos en ningún caso.

Con la *huella de Taylor* correspondiente a manchas obtenidas a partir de disoluciones 1/10000 en sangre, los resultados son negativos para todas las soluciones de ácido ascórbico. Resaltemos que, con zumo de limón, obtuvimos un resultado positivo para disoluciones de contaminante de baja concentración.

Con respecto a la segunda parte de la experiencia, podemos decir que, pequeñas variaciones en la concentración de contaminante, producen cambios significativos en el resultado de la prueba.

Así, hemos comprobado que con 0,9 ml de la disolución 1/10 el resultado es positivo, pero, sin embargo, con 1 ml, vemos que pasa a ser negativo. En la primera muestra, la concentración real de ácido ascórbico teniendo en cuenta el factor de dilución es de 0,0174 mg/ml, y en la segunda es de 0,0387 mg/ml.

4º OBJETIVO

Los resultados de esta experiencia los representamos en la **tabla 5**, cuya estructura es igual a la descrita para la correspondiente al tercer objetivo.

Señalemos también que hemos utilizado la misma disolución base de ácido ascórbico que preparamos para la experiencia 3.

Los resultados son los siguientes:

PRUEBAS CON MUESTRAS LIQUIDAS:

En el estudio de las muestras de concentración 1/10 en sangre más 1/1 en contaminante, el color indicativo del resultado positivo tarda 1 minuto en desarrollarse. Esto no ocurría al utilizar muestras preparadas a partir de sangre recién extraída en las que el viraje del reactivo se producía inmediatamente.

En las muestras que contienen una concentración en sangre de 1/100, la interferencia del ácido ascórbico se detecta a menores concentraciones de contaminante que en las muestras equivalentes de la tercera experiencia, de forma que para las disoluciones de concentración mayor a 3/10 (0,1161 mg/ml), los resultados son negativos.

Además debemos indicar que los positivos que se obtienen en el intervalo de concentraciones 3/10 hasta 1/100, tardan en desarrollarse aproximadamente 1 minuto, dando un color muy poco intenso.

Los positivos obtenidos para las muestras 1/1000 en sangre, dan también un color pálido y necesitan de un tiempo superior a 10 segundos para poder ser confirmados. La interferencia del ácido se produce para la misma concentración que en las muestras estudiadas en la experiencia anterior

Para muestras 1/10000 en sangre, la interferencia del contaminante se produce para todas las disoluciones utilizadas. Esto no ocurría al utilizar muestras preparadas a partir de sangre recién extraída.

Las muestras 1/100000, dan un resultado positivo de la prueba, cuando se aplica sobre la muestra sin contaminar. Sin embargo también en este caso el color es débil y tarda aproximadamente 30 segundos en desarrollarse.

PRUEBAS CON MANCHAS EN PAPEL DE FILTRO:

La interferencia del contaminante se produce para concentraciones 1/10000 en sangre, ya que con estas muestras no obtenemos positivos para ninguna de las disoluciones de ácido ascórbico utilizadas. Para asegurarnos de que los resultados son correctos, hemos repetido las pruebas utilizando hasta 6 manchas correspondientes a esa muestra sin obtener ningún positivo.

Otro aspecto a destacar es que la prueba no es sensible para las muestras 1/400000 y 1/500000. En el caso de la dilución 1/300000, se observa la formación de puntos azules sobre la mancha que indican el resultado positivo.

PRUEBAS CON LA HUELLA DE TAYLOR:

También en estas muestras encontramos algunas diferencias con respecto a los resultados obtenidos en la tercera experiencia de forma que para las huellas correspondientes a la disolución 1/1000 en sangre, la prueba sólo es positiva cuando se aplica sobre la correspondiente a sangre sin contaminar.

No vemos resultados positivos al realizar la prueba sobre huellas obtenidas a partir de muestras 1/10000 en sangre en ausencia de contaminante. Esto indica que para estas muestras la prueba es menos sensible que al utilizar sangre recién extraída.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

Al igual que en las experiencias anteriores, podemos comprobar la influencia del tipo de soporte sobre el que se realiza la prueba en la sensibilidad de la misma, y también en la acción del contaminante.

Podemos indicar también que, para estas muestras, la sensibilidad de la *prueba de Adler* es menor que cuando se utiliza sangre recién extraída, de la misma forma que es mayor la influencia del contaminante.

Es decir, el tratamiento de conservación al que ha sido sometida la muestra ha influido en la capacidad de la misma para dar positiva la *prueba de Adler*, manteniéndose el efecto del contaminante.

5º OBJETIVO

Los resultados correspondientes a cada uno de los periodos estudiados, los indicamos en tablas de igual estructura a las que fueron descritas en experiencias anteriores

MUESTRAS DE UNA SEMANA DE ANTIGÜEDAD:

Los resultados quedan reflejados en la **tabla 6**, que sigue:

PRUEBAS CON MUESTRAS LIQUIDAS

Al comparar los resultados que hemos obtenido con los que corresponden a muestras recién preparadas, comprobamos que la sensibilidad de la *prueba de Adler* cuando se estudia sangre sin contaminar es la misma en los dos casos.

Sin embargo con muestras que contienen ácido ascórbico observamos que la interferencia es menor que cuando se analiza la muestra recién preparada. Es decir, el tiempo transcurrido desde que se prepara la muestra, hasta que se somete a la *prueba de Adler*, disminuye la capacidad del ácido ascórbico para impedir la reacción positiva.

Así, por ejemplo, para diluciones 1/1000 en sangre, cuando se trata de muestras recién preparadas, existe interferencia del ácido ascórbico a partir de la concentración 1/10. Esto no ocurre cuando la muestra se estudia después de transcurrida una semana, ya que en este caso no se produce interferencia del contaminante.

PRUEBAS CON MANCHAS EN PAPEL DE FILTRO

Analizando los resultados obtenidos en el estudio de muestras sin contaminar, debemos señalar que la sensibilidad de la prueba es menor para manchas antiguas que para las recientes, de forma que si estas últimas, nos han dado resultados positivos para las muestras correspondientes a diluciones 1/500000 en sangre, para manchas antiguas obtenemos resultados negativos a partir de concentraciones de 1/200000 en sangre.

En el caso de las muestras preparadas a partir de sangre y ácido ascórbico, comprobamos que no se produce interferencia del contaminante en ninguno de los ensayos realizados, si bien, como ya hemos comentado anteriormente, nos hemos tenido que limitar a las manchas correspondientes a concentraciones hasta 1/200000.

PRUEBAS CON LA HUELLA DE TAYLOR

También en este caso, si comparamos los resultados obtenidos con los que ya teníamos para huellas que procedían de manchas recientes sin contaminar, podemos ver que la sensibilidad de la prueba disminuye y es sensible sólo hasta las muestras que corresponden a la dilución 1/1000 en sangre. Es decir la sensibilidad es 10 veces menor que en el caso de muestras recién preparadas.

El efecto del contaminante, que sólo podemos estudiar hasta la concentración de sangre 1/1000, es el mismo que cuando se analizaban huellas correspondientes a manchas recientes.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS:

De los datos obtenidos a partir del análisis de muestras de sangre en los tres soportes estudiados, comprobamos que, la sensibilidad de la prueba se mantiene en caso de muestras líquidas, pero baja sensiblemente cuando se trata de manchas o huellas.

Por otra parte, cuando se realizan los ensayos correspondientes a muestras que hemos preparado a partir de sangre y ácido ascórbico, observamos que, para muestras líquidas, la capacidad de interferencia del contaminante disminuye con el paso del tiempo.

Esto último no lo hemos podido constatar con manchas y huellas, ya que para estos soportes, el efecto del contaminante es menor que en el caso de disoluciones y la pérdida de sensibilidad de la prueba no nos ha permitido llegar hasta las muestras obtenidas a partir de diluciones para las que el ácido ascórbico provocaba un resultado negativo de la reacción.

MUESTRAS DE DOS SEMANAS DE ANTIGÜEDAD:

A partir de los datos obtenidos para estas muestras, y que resumimos en la **tabla 7**, resaltaremos lo siguiente:

PRUEBAS CON MUESTRAS LIQUIDAS

Hemos comprobado que la sensibilidad de la prueba, cuando se aplica sobre sangre sin contaminante, ha disminuido, puesto que no da positiva para las muestras 1/100000. Las muestras 1/10000, dan positivo después de transcurridos 30 segundos desde que se añade el peróxido de hidrógeno, y el azul que se observa es muy tenue.

Para las muestras correspondientes a sangre con ácido ascórbico, podemos indicar que en las muestras 1/10 y 1/100, aunque el contaminante no interfiere, sí que comprobamos que la reacción positiva tarda más de 10 segundos en producirse (20 segundos).

Las que contienen sangre 1/1000 y 1/10000, nos dan resultados que varían con respecto a los obtenidos para las muestras de una semana de antigüedad. Así, para las muestras 1/1000, se detecta interferencia del contaminante. Esto no ocurría con las de igual concentración y menor antigüedad.

Comprobamos además que, para muestras que contienen ácido ascórbico a concentración 1/2, podemos ver el viraje del reactivo si dejamos transcurrir 4 minutos desde que se añade a la muestra.

De la misma forma, en el caso de las muestras 1/10000, el ácido ascórbico provoca resultados negativos a menor concentración que en las más recientes.

De estos resultados podemos destacar que la pérdida de sensibilidad nos indica que empezamos a detectar una alteración en las características de la sangre, que se pone de manifiesto además por la mayor influencia del contaminante, que es capaz de afectar de nuevo a muestras que contienen sangre a concentración 1/1000.

PRUEBAS CON MANCHAS EN PAPEL DE FILTRO

Con respecto a las manchas también comprobamos una pérdida de sensibilidad de la prueba, que no da positiva para 1/100000.

En las pruebas realizadas con el objetivo de estudiar la interferencia del ácido ascórbico, no encontramos diferencia al comparar los datos con los correspondientes a muestras de una semana de antigüedad.

PRUEBAS CON LA HUELLA DE TAYLOR

En el estudio de las muestras mediante la obtención de la *huella de Taylor*, señalaremos que se ha perdido también sensibilidad, de forma que tenemos resultados positivos hasta concentraciones 1/100.

Respecto a las pruebas correspondientes a muestras preparadas con sangre y ácido ascórbico, los resultados no nos permiten observar diferencias al compararlos con los que obtuvimos en experiencias anteriores.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

Tras dejar las muestras durante dos semanas a temperatura ambiente, comprobamos que para los tres soportes sobre los que se ha hecho el estudio, la sensibilidad de la prueba baja con respecto a muestras menos antiguas. Podríamos deducir de este resultado que la sangre se ha alterado por el paso del tiempo.

Por otra parte, la interferencia del ácido ascórbico, aún siendo menor que cuando se estudian muestras recién extraídas, aumenta ligeramente con respecto a las que corresponden a una antigüedad de una semana.

MUESTRAS DE CUATRO SEMANAS DE ANTIGÜEDAD:

La **tabla 8** recoge los resultados correspondientes a las pruebas realizadas sobre muestras que hemos guardado durante cuatro semanas.

Como se puede comprobar, estos resultados son superponibles a los que se obtienen en la experiencia anterior, para muestras de dos semanas de antigüedad, tanto en lo que se refiere a la sensibilidad de la *prueba de Adler* sobre sangre como en el efecto del contaminante sobre la reacción.

Sin embargo, debemos señalar algunas diferencias en lo que respecta a la valoración del resultado positivo de la prueba. Son las siguientes:

PRUEBAS CON MUESTRAS LIQUIDAS

En las muestras 1/1000 que contienen ácido ascórbico 1/2 (0,1925 mg/ml), obtenemos un resultado positivo de la prueba si dejamos transcurrir 2 minutos desde que se añade el reactivo. Es decir se produce la reacción positiva con menor dificultad que en el caso de muestras de dos semanas de antigüedad.

Con las soluciones 1/10000, la *prueba de Adler* nos da un resultado positivo. Sin embargo resulta difícil de ver por ser una coloración muy tenue (azul pálido-gris), y que puede inducir a error. Hemos considerado positivo este resultado por comparación con el que hemos obtenido para las muestras 1/100000.

De la misma forma, para las pruebas realizadas con sangre y ácido ascórbico, los resultados no nos permiten decir directamente si la prueba es positiva, sino que es necesario comparar con el color obtenido para la muestra de sangre sin contaminar.

PRUEBAS CON MANCHAS EN PAPEL DE FILTRO

En el estudio de las manchas, debemos indicar que para muestras 1/10000, resulta difícil ver el resultado positivo de la reacción.

Hemos realizado la prueba en 6 manchas y sólo en 3 de ellas han aparecido trazas azules indicativas de la reacción de la bencidina. Lo mismo ocurre cuando analizamos manchas que proceden de muestras que contienen ácido ascórbico.

Así pues, la prueba puede dar lugar a conclusiones erróneas porque no da positiva para todas las muestras, y es necesario repetirla para asegurar el resultado.

PRUEBAS CON LA HUELLA DE TAYLOR

También en este caso, para las muestras correspondientes a la concentración 1/100, las pruebas las realizamos con 6 huellas y no obtenemos el positivo en todas ellas. Esto ocurre también cuando se trata de sangre con ácido ascórbico.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

De los datos obtenidos, podemos deducir que el tiempo que transcurre desde que se prepara la muestra hasta que se somete a la *prueba de Adler*, produce una pérdida de sensibilidad que es más acusada en el caso de manchas y huellas que para muestras líquidas. Esta pérdida de sensibilidad se observa en los tres soportes estudiados y aumenta con el tiempo.

Para muestras con contaminante, comprobamos que la capacidad de interferencia del mismo disminuye con respecto a las muestras recién preparadas.

Esto puede explicarse porque el ácido ascórbico en solución acuosa es sensible a la luz y al oxígeno. Esta pérdida en la capacidad de interferencia se detecta en períodos cortos (1 semana). Cuando el tiempo que transcurre es mayor, aumenta ligeramente debido probablemente a que la sangre también sufre alteraciones que se traducen en variaciones en la influencia del contaminante.

6º OBJETIVO

I.- PRUEBAS CON OXIDANTES QUIMICOS:

La **tabla 9** resume los resultados de las pruebas correspondientes a este punto. En ella indicamos el color de las disoluciones y los cambios que se producen cuando se realizan los diferentes ensayos, lo que nos permite deducir las reacciones que han tenido lugar.

1.- PRUEBAS CON DIOXIDO DE MANGANESO

1.1.- Con el reactivo de ADLER:

Al añadir el reactivo a la disolución de dióxido de manganeso, aparece la coloración azul que indica que se ha producido la oxidación de la bencidina. Esta reacción tiene lugar sin necesidad de añadir peróxido de hidrógeno, por lo que prescindiremos de este reactivo en las siguientes pruebas.

Si a continuación añadimos a la preparación 1 ml de ácido ascórbico, podemos ver como pierde inmediatamente el color azul. Es decir, el ácido ascórbico reduce al reactivo de ADLER.

1.2.- Pruebas con ácido ascórbico:

Al agregar este reactivo a la solución de dióxido de manganeso, esta pasa de color marrón a marrón más claro. Según este resultado, no podemos afirmar que se produzca la oxidación del ácido ascórbico, puesto que no se produce un cambio significativo que nos permita interpretar si ha tenido lugar alguna reacción.

1.3.- Pruebas con reactivo de ADLER y ácido ascórbico:

Al añadir al dióxido de manganeso el contenido del tubo de ensayo que hemos preparado con reactivo de ADLER y ácido ascórbico, comprobamos que la disolución pasa a color azul, indicando la oxidación de la bencidina. A continuación, lentamente, se pierde el color azul. Esto nos indica que el ácido ascórbico reduce de nuevo a la bencidina.

2.- CON PERMANGANATO POTASICO

2.1.- Pruebas con el reactivo de ADLER:

Cuando añadimos el reactivo a la disolución de permanganato, (color violeta), vemos inmediatamente como se desarrolla la coloración azul que indica la oxidación de la bencidina.

En un segundo paso del ensayo que estamos realizando, agregamos a la preparación anterior 1 ml de ácido ascórbico.

Comprobamos que la disolución pasa a color marrón-amarillento. Esto indica en primer lugar que el ácido ascórbico ha reducido a la bencidina, puesto que desaparece el color azul.

Por otra parte, el color marrón resultante se puede explicar por la formación de dióxido de manganeso debido a que existe un exceso de permanganato. Debemos suponer además que, probablemente, parte del ácido ascórbico ha sido oxidado por el permanganato. Para poder obtener más datos de este ensayo, haremos la misma prueba utilizando disoluciones menos concentradas de permanganato. los resultados son:

2.1.1.- Con permanganato 0,01 M:

Con el reactivo de ADLER la solución pasa de violeta a azul intenso. Al añadir 1 ml de ácido ascórbico, cambia de color y pasa como en el ensayo anterior a marrón-amarillento.

2.1.2.- Con permanganato 0,001 M:

El color azul que indica la oxidación de la bencidina se atenúa al añadir el ácido ascórbico sin llegar a desaparecer. Esto se puede explicar considerando que parte del ácido ascórbico ha podido ser oxidado también por el permanganato que, a esta concentración se reduce a Mn(II), (incoloro), sin que se produzca oxidación del mismo a dióxido de manganeso, ya que esta segunda reacción sólo tiene lugar cuando existe un exceso de permanganato en la disolución.

2.1.3.- Con permanganato 0,0001 M:

Al añadir el ácido ascórbico desaparece inmediatamente el color azul, y la solución pasa a transparente como consecuencia de la reducción de la bencidina por el ácido.

2.2.- Pruebas con ácido ascórbico:

Al añadir a la solución de permanganato 1 M y 0,01 M 1 ml de ácido ascórbico, el color cambia de violeta a rojizo.

Podemos explicar este resultado porque se produce la oxidación del ácido por el permanganato que se reduce a Mn(II) (incoloro). Como existe un exceso de permanganato, se produce también la oxidación del Mn(II) que pasa a dióxido de manganeso (marrón).

Cuando repetimos la prueba con concentraciones más bajas de oxidante (0,001 y 0,0001 M), comprobamos que la solución se vuelve transparente inmediatamente. Es decir que se produce la oxidación del ácido ascórbico por el permanganato que se decolora.

2.3.- Pruebas con reactivo de ADLER y ácido ascórbico (reactivo neutralizado):

Al realizar el ensayo a partir de la disolución 1 M en permanganato, comprobamos que cuando añadimos el reactivo neutralizado al oxidante, la solución pasa a color azul intenso inmediatamente. Este color es permanente y no se atenúa con el tiempo. Repetimos la misma prueba utilizando soluciones de permanganato de concentraciones 0,01 M, 0,001 M, 0,0001 M. Los resultados son los siguientes:

2.3.1.- Para una solución 0,01 M:

Comprobamos que se produce la oxidación de la bencidina, dando lugar al color azul característico de esta reacción.

2.3.2.- Para una solución 0,001 M:

El resultado es superponible.

Sin embargo si el reactivo neutralizado lo preparamos con 2 ml de ácido ascórbico y 2 gotas de reactivo de ADLER, es decir, aumentamos la cantidad de ácido ascórbico, el resultado es distinto.

En este último caso la solución adquiere inicialmente el color azul característico de la oxidación de la bencidina, pero a continuación este color se pierde, y la solución queda transparente.

2.3.3.- Para una solución 0,0001 M:

Al añadir el reactivo neutralizado, observamos que inmediatamente se produce un color azul muy intenso, que progresivamente va decreciendo en intensidad hasta que la disolución llega a ser transparente.

Esta prueba nos indica que la bencidina es oxidada por el permanganato (color azul), y reducida de nuevo por el ácido ascórbico (transparente).

II.- PRUEBAS CON SANGRE:

1.- Realizamos la *prueba de Adler* sobre 1 ml de la disolución de sangre de concentración 1/1000.

En este caso, la solución adquiere color azul indicativo de la reacción positiva de la prueba.

Al añadir a continuación unas gotas de ácido ascórbico, la muestra pierde rápidamente el color azul. Esto ocurre porque se produce la reducción de la bencidina por el ácido.

2.- Al repetir el mismo ensayo sobre una mancha, obtenemos idéntico resultado, es decir, el color azul indicativo del resultado positivo de la *prueba de Adler*, desaparece al añadir unas gotas de ácido ascórbico sobre la mancha.

3.- La prueba aplicada sobre la *huella de Taylor* nos proporciona el mismo resultado que el obtenido en los dos soportes anteriores.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

Según los resultados que hemos obtenido, todo apunta a que es muy posible que la interferencia del ácido ascórbico en la *prueba de Adler*, se produzca porque el ácido actúa reduciendo rápidamente la bencidina que fue oxidada por el peróxido de hidrógeno, impidiendo que podamos ver el color azul que demuestra la oxidación del reactivo.

A concentraciones altas de oxidante, este es capaz de oxidar al ácido ascórbico y también al reactivo de ADLER, impidiendo o atenuando la acción del contaminante. Con soluciones menos concentradas, éste actúa sobre la bencidina oxidándola y el ácido ascórbico la reduce inmediatamente, por lo que desaparece el color azul indicativo del resultado positivo de la prueba.

Con estos ensayos hemos intentado dar una explicación química del mecanismo de interferencia del ácido ascórbico en la *prueba de Adler*.

Un mejor conocimiento de cómo se produce esta interferencia, nos permitirá en trabajos sucesivos, buscar una forma de impedir que se produzca, evitando los falsos negativos, y, por otra parte, diseñar pruebas preliminares sencillas que, aplicadas sobre las muestras a analizar, nos indiquen la posibilidad de que exista contaminación de la muestra y que, por lo tanto, puedan darse resultados erróneos.