

Consideraciones Generales Sobre Espectroscopia de la Sangre

por la profesora Clelia Dotta Vigliette

Los métodos establecidos para la investigación de sangre así como para todos los derivados circunstanciales, han sido objeto de múltiples modificaciones, pretendiendo los autores obtener con cada una de ellas, mayor sensibilidad y certeza en los resultados.

Ante tales variantes, diseminados en textos y revistas, en las clases prácticas debe estudiarse la caracterización de la sangre por los procedimientos más aceptados, previo el conocimiento de ciertas cuestiones necesarias para su exacta aplicación.

Basadas las formas de caracterización en métodos físicos y químicos, quedan los procedimientos biológicos para el estudio del origen de la sangre. Entre los métodos físicos cuentan con gran número de adeptos, los procedimientos espectroscópicos que se dirigen a la caracterización de la materia colorante de la sangre y sus derivados.

La sustancia colorante de la sangre de los vertebrados es la hemoglobina, que se encuentra en los glóbulos rojos; molécula muy grande cuyo peso se ha calculado alrededor de 60.000.

La hemoglobina es un prótido, formado por una parte de albúmina y por otra parte un grupo prostético colorido que contiene un metal pesado.

Si se descompone la hemoglobina en ausencia de oxígeno, se obtiene por una parte la albúmina rica en histidina, y por otra parte el grupo prostético que contiene el hierro al estado de ferro, el **hemocromógeno**.

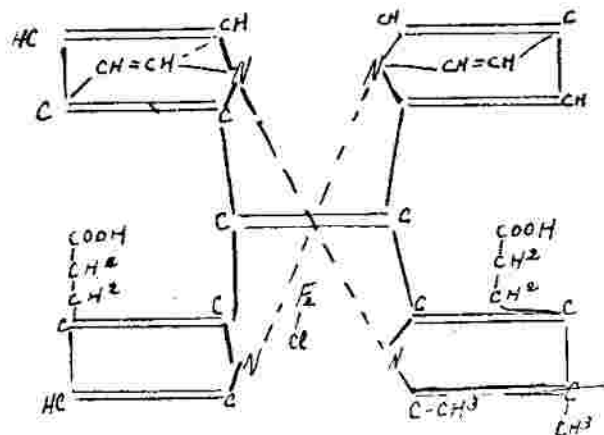
Si la descomposición se hace en presencia del oxígeno, el producto que se ob-

tiene es la **hemina**, combinación no saturada, que se comporta como ácido débil y cuyo peso molecular parece ser 651.

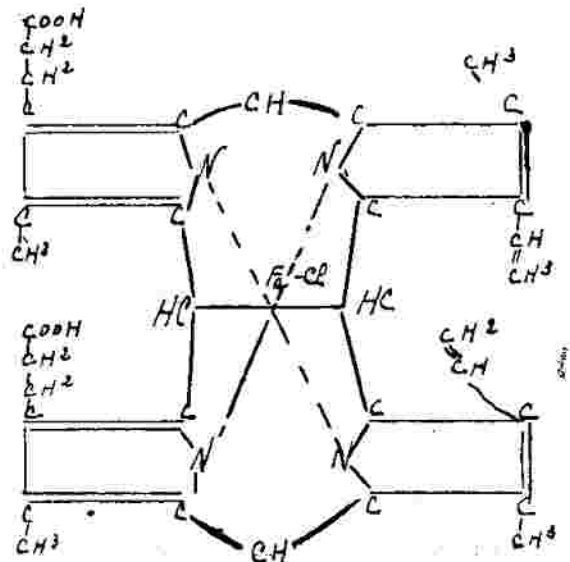
Se han dado muchas fórmulas de la hemina cuyo cloro aparece unido al Fe trivalente = Fe + Cl.

Küster acepta la presencia de dos heminas, difíciles de diferenciar químicamente.

La fórmula dada por Willstätter y Fischer en 1933, $C^{33}H^{32}O^4N^4FeCl$.



difiere de la que Küster dió en 1921, $C^{34}H^{32}O^4N^4FeCl$:



Si se disuelve la hemina en un álcali se reemplaza el cloro por el hidroxilo y se obtiene la **hematina**: $C^{34} H^{33} O^5 N^4 Fe$. La

forma $Fe \begin{array}{c} / O \\ | \\ \backslash O \end{array}$ explicaría, según Roche, la presencia del O lábil.

La hematina reducida da también el hemocromógeno cuyo Fe queda bivalente al perder el oxígeno, = Fe.

Según Javilliers, el compuesto que posee = Fe - OH, correspondería a la parte pigmentaria de la metahemoglobina, se llamaría metahematina o más bien un subóxido del hemocromógeno. La relación sería:

Hemocromógeno $\left\{ \begin{array}{l} \text{Hemocromógeno O,} \\ \text{llamado Metahematina} \end{array} \right\}$ Hemocromógeno O^2 ,
llamado Hematina

Hemoglobina $\left\{ \begin{array}{l} \text{Hemoglobina O} \\ \text{Metahemoglobina} \end{array} \right\}$ Hemoglobina O^2
Oxihemoglobina

Esto, aceptando con Nucloux y Roche, que la metahemoglobina tiene la mitad del oxígeno de la oxihemoglobina.

La **hematoporfirina**, que no contiene más hierro, puede obtenerse a partir de la hemoglobina por la acción de un ácido fuerte, o por la acción del ácido bromhídrico sobre la hemina o la hematina.

Es una base débil diácida que en las intoxicaciones por el trional, sulfonal o el plomo, así como en cualquier trastorno producido por el metabolismo de la hemoglobina en el hígado aparece en la orina.

En una intoxicación oxicarbonada aparece otro derivado de la hemoglobina por fijación del CO; la carboxihemoglobina, compuesto más fijo que la oxihemoglobina, propiedad que nos permite diferenciarlos.

Todos estos compuestos nos interesan desde el punto de vista toxicológico porque durante los procesos de desecación y putrefacción de la sangre la hemoglobina puede transformarse en uno de sus derivados, de los que obtendremos la disolución al tratar la mancha.

Obligados a veces a emplear otros disolventes que el agua, la hemoglobina al reaccionar con ellos puede transformarse en uno de sus derivados.

Debemos, pues, aprender a conocerlos y a obtenerlos, si es necesario, en el Laboratorio.

El cuadro que va en la página siguiente con el título de Hemoglobina, nos dará la pauta a seguir.

Caracterización de la oxihemoglobina.
Técnica:

1.º Se procede a la maceración de la mancha en agua destilada con el fin de obtener una solución de un tinte rojizo. La mejor dilución es 1 en 10 cuando se

observa bajo un espesor de 1 y $\frac{1}{2}$ c. c.

2.º Se coloca en el recipiente de caras paralelas.

3.º Se coloca el micrómetro de manera que la raya del sodio coincida con la división 80 y se observa. Si se trata de la oxihemoglobina habrá dos bandas de absorción, de bordes difusos, cuyas partes centrales coinciden con las divisiones 84-85 para la primera y 103-104 para la segunda.

La primera es más estrecha, extendiéndose aproximadamente del 81 al 87, y la segunda, más tenue, del 97 al 106.

El carmín, la alizarina y otros colorantes dan bandas muy parecidas a las de la oxihemoglobina, pero se diferencian en que **no se puede** obtener con ellas la banda de Stokes.

Si la solución anterior se trata por un reductor, las dos bandas desaparecen para dar lugar a la formación de una sola, más tenue, más difusa, pero más ancha, que ocupa el espacio comprendido entre las otras dos; aproximadamente del 87 al 97. Es la que se conoce con el nombre de banda de Stokes.

Son varios los reductores que pueden emplearse con este fin; el sulfohidrato de amonio, el hidrosulfito de sodio, la amalgama de sodio, el oxalato ferroso, etc., Stokes empleaba una solución al 5 % de protocloruro de estaño, adicionada de ácido tártrico y neutralizada por amoníaco.

El reactivo cuya fórmula hemos dado lo empleaba con muy buen éxito.

La banda de Stokes permite diferenciar la oxihemoglobina de la carboxihemoglobina, cuyas bandas de absorción son muy semejantes en cuanto a su posición; las de la carboxihemoglobina están un poco desviadas hacia la derecha.

Tratados ambos derivados de la hemoglobina por un reductor, la carboxihemoglobina, más estable, no se reduce, sus bandas permanecen inalterables, en tanto

que la de la oxihemoglobina se reduce y da la banda de Stokes.

Cuando existe una mezcla de las dos, que es el caso corriente en las intoxicaciones por el CO, los dos espectros se superponen; y al tratarlos por el reductor obtendremos la banda de Stokes y la persistencia de las de la carboxihemoglobina, cuya intensidad varía en razón directa, de las concentraciones. Mientras las dos bandas de la carbo sean más oscuras, se podrá precisar la presencia de este compuesto, pero llegará un momento en que la intensidad de las tres bandas es la misma y solamente el ancho de las tres juntas nos podrá dar una indicación; pues la 1.^a de la oxi comienza en el 81 y la última termina en el 106, en tanto que la de Stokes comprende del 87 al 97. Cuando están

Hemoglobina

Por la acción de	Se transforma en	Que por la acción de	Se transforma en	Que puede caracterizarse por métodos	De preferencia por métodos
Oxígeno	Oxi-hemoglobina	—	—	químicos [cos espectroscópi-	espectroscópico
Oxidantes	Meta-hemoglobina	—	—	químicos [cos espectroscópi-	espectroscópico
Acidos débiles, álcalis, calor	Hematina	En medio alcalino Reductores	Hemo-cromógeno	químicos [cos espectroscópi-espectro-microscópico	espectro-microscópico
		HCl o cloruros	Hemina	químicos cristalográficos	cristalográfico
Acidos fuertes	Hemato-porfirina	—	—	espectros-cópicos	espectroscópico

las 3, será pues una banda única cuyos límites son 81 y 106. Se facilita la observación superponiendo dos espectros.

Metahemoglobina. - Sustancia que se produce por oxidación de la hemoglobina, favorecida por un comienzo de putrefacción. En el Laboratorio se obtiene mediante oxidación de la hemoglobina por nitrito de sodio al 1/10, permanganato, clorato de potasio, yodo o ácido ósmico.

En solución ácida: una banda en el rojo cuya parte central coincide con la división 68 y un espectro oscuro a partir del 100.

En solución alcalina: una banda muy pálida en 80. Se debe tener en cuenta la presencia simultánea de la oxihemoglobina.

Hematina. - Se produce cuando la putrefacción es avanzada. En el Laboratorio por tratamiento con ácidos o bases débiles. A 1 c. c. de sangre oxalatada, 30 c. c. de ácido acético y 1 c. c. de HCl, o bien lejía de soda o medio volumen de amoníaco.

En solución ácida: una banda en 58 y el espectro oscuro desde el 60. A veces se distinguen otras dos bandas cercanas a las de la oxihemoglobina.

En solución alcalina: una banda ancha en 80 y el espectro oscuro a partir de 105.

Hemocromógeno. — Si el líquido que contiene la hematina en solución alcalina se trata por un reductor, el sulfohidrato de amonio, por ejemplo, se obtiene un espectro muy fácil de caracterizar, el del hemocromógeno.

Presenta dos bandas: la primera muy oscura, estrecha en el 98 que se ve con toda claridad; la otra más ancha pero más tenue, en el 112.

Este espectro y sobre todo su primera banda es muy característica y muy sensible. Es el que debe buscarse cuando se dispone de soluciones diluidas y el que se trata de obtener para las observaciones espectro-microscópicas.

Es conveniente precisar al micrómetro la posición de las bandas, pues puede dar lugar a confusiones si tenemos en cuenta que las manchas viejas suelen tener hematina en lugar de oxihemoglobina.

La hematina + reductor = hemocromógeno.

La oxihemoglobina + reductor = banda de Stokes.

La carboxihemoglobina + reductor = no se modifica, dando las bandas de carboxihemoglobina.

Si no tenemos en cuenta la presencia de la hematina, podemos confundir las bandas del hemocromógeno con la persistencia de las bandas de la carboxihemoglobina.

Al tratar la sangre por un reductor para constatar la presencia de la carboxihemoglobina, esperamos obtener la banda de Stokes si se trata de oxihemoglobina o la persistencia de las dos bandas si se trata de carboxihemoglobina.

En presencia de la hematina no se producen ninguno de los dos espectros, sino el del hemocromógeno que podemos confundir con las bandas de la carboxihemoglobina.

Hematoporfirina. — Cuando se ha tratado la sangre por un ácido fuerte o un álcali fuerte (H^2SO^4 , NaOH), se observa:

En solución ácida: tres bandas estrechas en 80, 100 y 118. La 100 es la más intensa.

En solución alcalina: una en 92, una estrecha y pálida en 108 y otra muy oscura en 135. El espectro oscuro a partir de 170.

Sin tener la sensibilidad del hemocromógeno, los espectros de la hematoporfirina pueden ser muy útiles al toxicólogo, pues es el único espectro que puede observarse cuando las telas u objetos que tienen las manchas han sido en parte quemadas y la hemoglobina transformada.

También cuando las manchas de sangre, demasiado viejas no se disuelven en

agua, ni en ácido acético, ni en la potasa débil. Se hace la disolución con H^2SO^4 , que da hematorfirina y se observan las bandas.

Dentro de los procedimientos usuales para la investigación de la sangre en manchas, problema que se presenta comunemente en Toxicología, la técnica espectroscópica para la hemoglobina y sus posibles derivados debidos a circunstancias variadas, está considerado como el más ventajoso y el de manipulación más simple.

Desde el punto de vista de su especificidad los espectros de absorción dados por los pigmentos sanguíneos es absoluta, con

la ventaja de un posible contralor por la transformación cómoda de unos en otros compuestos de espectroscopía diferencial.

Ancho de bandas de absorción y oscuridad presentada demuestra concentración o riqueza de sangre en la solución estudiada, cuya aplicación inmediata sería la determinación aproximada del porcentaje de hemoglobina.

Presenta el inconveniente de necesitar una cantidad de material de la que no se dispone siempre, pero para estos casos existe todavía una aplicación espectroscópica, la del espectro-microscopio.

**El Consejo de la Facultad
debe defender los derechos
de los Profesores.**
