

La reacción violeta dada por el reactivo de difenilamina

I — *Con suero normal y con el de los enfermos de fiebre reumática*¹
Wáshington Ayala,² Lucile V. Moore y Eugene Hess

(Trabajo realizado en el Rheumatic Fever Research Institute, Northwestern University Medical School. Chicago, Illinois)

Por considerarlo de interés, damos a continuación una traducción de este trabajo, aparecido en el *Journal of Clinical Investigation*, vol. XXX, N.º 7, pág. 781-785, de julio de 1951, efectuada por su autor Prof. Wáshington Ayala Bonilla.

Niazi y State (1), comunicaron recientemente que, cuando el suero humano se calienta con Reactivo de Difenilamina de Dische (2,3), se desarrolla una coloración violeta. Dichos autores observaron también que en ciertos estados patológicos, p. ej. carcinoma, tuberculosis pulmonar y fiebre reumática, la reacción violeta era de una intensidad mucho mayor que la dada por el suero de personas normales.

Nosotros observamos esta reacción coloreada, en ocasión de estar investigando la presencia de ácido desoxiribonucleico en los extractos salinos de amígdalas de bovino, usando para ello el Reactivo de Difenilamina de Dische.

El subsiguiente fraccionamiento de los extractos amigdalianos, nos reveló que la sustancia que daba la reacción violeta con la difenilamina, era una mucoproteína, con un punto isoeléctrico notablemente bajo ($pI < 2,0$) (4). En confirmación con ciertas comprobaciones de

Niazi y State (1), observamos que el suero proveniente de enfermos de fiebre reumática o de artritis reumatoidea, dá una coloración de intensidad mucho mayor a la producida por el suero de individuos sanos.

La solución violeta resultante de la reacción, tiene una banda de absorción en el espectro visible, con máxima a 530 m μ . Esta misma banda de absorción está presente, ya sea que provenga de la reacción con el suero o con nuestra mucoproteína obtenida de las amígdalas bovinas.

En esta comunicación presentaremos observaciones con respecto a la reacción y sugeriremos modificaciones de técnica. Hemos luego aplicado el método al suero de enfermos de fiebre reumática y sus resultados también se incluyen en el presente trabajo.

Condiciones de la reacción: La adición del reactivo de Dische (3), directamente al suero, produce, previo calentamiento, una solución coloreada pero turbia, inapta para lecturas colorimétricas. Si las proteínas séricas se precipitan previamente con solución de ácido tricloroacético al 20 %, la reacción violeta se produce en el hidrolizado ácido que se obtiene por calentamiento del precipitado y está ausente en cambio en el filtrado tricloroacético. La fracción que da el color violeta, dializa del suero solamente cuando éste ha sido sometido previamente a una hidrólisis ácida o alcalina. En el procedimiento descrito por Niazi y State (1), las proteínas eran precipitadas del suero con una solución de ácido tricloroacético al 20 %, se descartaba el filtrado y el precipitado era hidrolizado con una solución del mismo ácido al 5 % y el líquido claro obtenido por centrifugación se ensayaba con el reactivo de difenilamina. Desde que el filtrado obtenido por precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético al 20 % no contiene ninguna sustancia que interfiera, consideramos más práctico hidrolizar el suero directamente con dicha solución.

Un estudio de la etapa hidrolítica nos mostró que la intensidad del color violeta aumenta con el tiempo de hidrólisis, hasta los veinte minutos y luego disminuye lentamente y se hace negativa después de varias horas. Por esta razón, hemos adoptado veinte minutos como tiempo standard de hidrólisis.

El tiempo de calentamiento del hidrolizado sérico con el reactivo, es otro factor importante en la intensidad del color producido. La curva que representa la producción de color (en términos de densidad óptica a 530 m μ) en función del tiempo de calentamiento, muestra que hay un rápido incremento hasta las dos horas, después de lo cual, el aumento de color es muy escaso. Por otra parte, cuando el calentamiento se continúa, el color violeta vira hacia el azul, lo cual es ya perceptible a las dos horas y la curva de absorción espectrofotométrica de la solución resultante, muestra la presencia de una nueva banda a

650 m μ en adici3n a la ya mencionada a 530 m μ . La variaci3n en la forma de la curva de absorci3n con el tiempo de calentamiento, se observa en la Fig. 1. Finalmente, hemos seleccionado los treinta minutos, como tiempo standard de calentamiento de la reacci3n, pues en dicho tiempo se obtiene un intenso desarrollo de color violeta, con muy escasa interferencia de la banda azul, como puede verse en la Fig. 1.

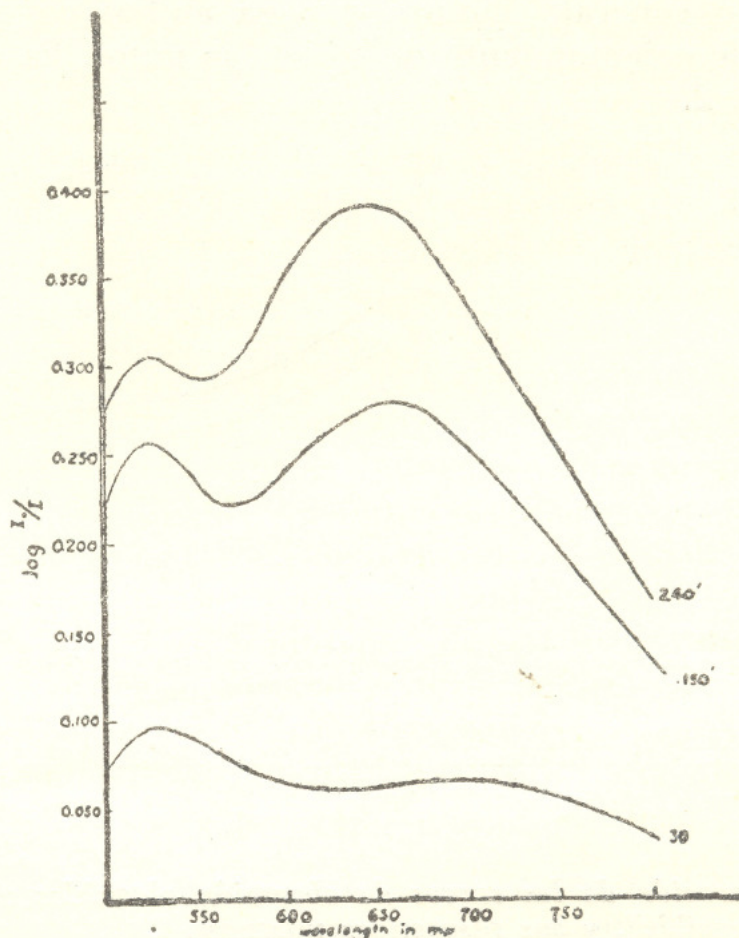


Fig. 1. Variaci3n en el espectro de absorci3n, con el tiempo de calentamiento de la reacci3n.

Se muestran las curvas a los 30, 150 y 240 minutos de calentamiento en ba \tilde{n} omaria hirviendo. Las medidas de absorci3n fueron efectuadas en el Espectrof3tmetro de Beckman, Modelo DU.

La variaci3n de la concentraci3n de difenilamina en el reactivo, entre 0,5 y 1,5 %, tiene escasa influencia en el desarrollo del color. Por ello hemos mantenido la concentraci3n del 1 %, propia del reactivo original de Dische. En cambio, hemos comprobado que la concentraci3n de 3cido sulf3rico en el reactivo tiene una marcada influencia en el rendimiento de color; la intensidad de la reacci3n aumenta a medida que la concentraci3n del 3cido aumenta hasta el 10 % en volumen, luego de lo cual la curva se vuelve asint3tica.

Luego, si se reemplazan los 2,75 ml. de 3cido sulf3rico concentrado usado en la f3rmula original de Dische, por 10 ml., se obtiene un

reactivo que permite investigar el componente dado, aun cuando se halle en muy escasa concentración en el medio. En el curso de esta comunicación, llamaremos "Reactivo sensible"⁴ al que contiene 10 ml. de ácido sulfúrico concentrado %, y "Reactivo patrón"³ el preparado de acuerdo con la fórmula original de Dische.

Es importante señalar que las curvas de absorción obtenidas del suero, usando el Reactivo patrón o el Reactivo sensible, tienen la misma forma en general, siempre que en ambos casos se utilice el tiempo patrón de calentamiento de treinta minutos. Esto puede observarse en la Fig. 2.

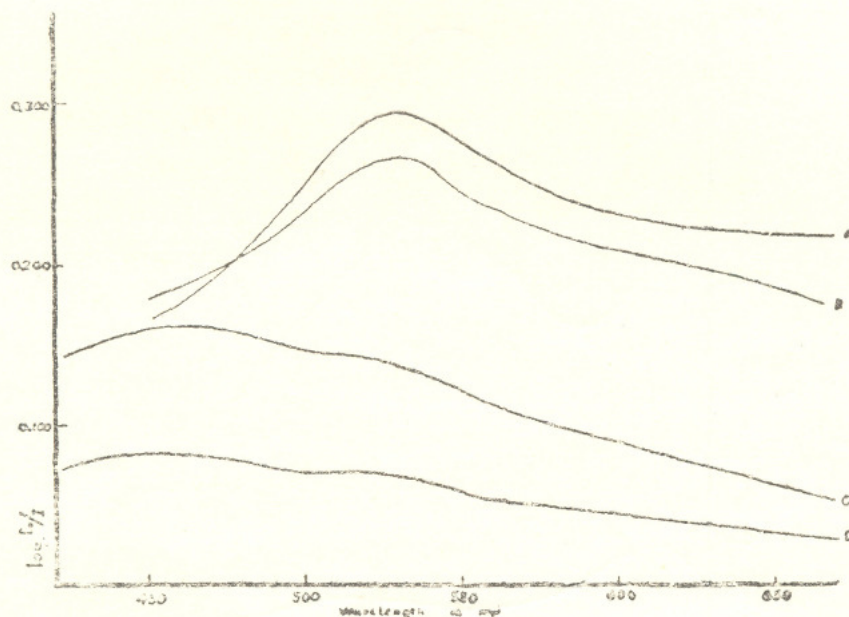


Fig. 2. Comparación de las curvas de absorción obtenidas usando los reactivos "patrón" y "sensible", y sus respectivas mixturas.

Medidas realizadas en un Espectrofotómetro Beckman, Modelo DU.

- A. Curva correspondiente al Reactivo "sensible".
- B. Curva correspondiente al Reactivo "Patrón".
- C. Curva correspondiente a la Mixtura "Sensible".*
- D. Curva correspondiente a la Mixtura "Patrón".*

* Denominamos mixtura, la mezcla ácido acético-ácido sulfúrico en la proporción usada en cada reactivo, pero sin difenilamina.

Usando un Espectrofotómetro Beckman, Model DU, hemos comprobado que la reacción coloreada obedece la Ley de Beer, dentro del límite de densidades ópticas con las cuales hemos trabajado. Las mediciones incluídas en la Tabla I y en la Fig. 3, fueron realizadas con un Espectrofotómetro Coleman, Model 6A. Al usar este instrumento, cuando la densidad óptica medida era mayor de 0,650, se acostumbró a diluir la muestra y multiplicar la lectura por el factor de dilución correspondiente.

Técnicas que se sugieren

Sobre la base de las constataciones precedentes, se recomiendan los siguientes procedimientos:

a) *Macrotécnica.* — Dos ml. del material (plasma o suero) se colocan en un tubo de ensayo de 25×150 mm. y se agregan lentamente y agitando el tubo, 10 ml. de solución de ácido tricloroacético al 5 %, para obtener un precipitado en copos finos. Se coloca entonces el tubo en un bañomaría hirviendo, por exactamente veinte minutos, después de lo cual se enfría súbitamente por inmersión del tubo en hielo. Los tubos deben mantenerse tapados durante la hidrólisis, con un tubo de goma perforado, al cual se adapta un tubo de vidrio de unos 20 cm. de longitud, que actúa como condensador.

El hidrolizado es luego filtrado y se transfieren 1,5 ml. del líquido claro, a un tubo de ensayo de 18×150 ml., a los cuales se les agrega 3 ml. del "Reactivo patrón". Se sumerge el tubo en el bañomaría hirviendo, por exactamente 30 minutos; se enfría luego inmediatamente por inmersión en hielo y luego se le deja volver a la temperatura ambiente, a la cual, el color es estable por varias horas. Se procede a determinar la densidad óptica en un Espectrofotómetro de Coleman, Modelo 6A, a 530 $m\mu$, en los tubos en los cuales se efectuó la reacción. Con tal finalidad se seleccionaron previamente un gran número de tubos de ensayo Pyrex de 18×150 mm., con propiedades ópticas lo más uniformes posible. En nuestro caso los tubos seleccionados presentaban una uniformidad de $\pm 0,005$ unidades de densidad óptica, a una densidad óptica de 0,300 y a una longitud de onda de 530 $m\mu$, lo cual los colocaba dentro del error standard del método. El adaptador del Espectrofotómetro de Colemann fué modificado para reducir el pasaje de la luz a una altura de 15 mm., a fin de efectuar la lectura en dichos tubos, con un volumen de 4,5 ml.

Se requieren dos "blancos"; uno consiste en ácido tricloroacético al 5 % y reactivo patrón, en la proporción correspondiente a la usada en la reacción. Este blanco se utiliza para establecer el "cero" de densidad óptica en el espectrofotómetro. El segundo blanco consiste en 1,5 ml. de hidrolizado sérico, y 3,0 ml. de mixtura aceto-sulfúrica (sin Difenilamina)⁵; este blanco debe ser preparado separadamente para cada muestra de suero y su densidad óptica sustraída de la correspondiente lectura del tubo de reacción, para obtener la densidad óptica corregida.

La mixtura acético-sulfúrica en las proporciones usadas en el reactivo, da, cuando es agregada al hidrolizado sérico y calentada en las mismas condiciones que la reacción, un color marrón claro, con una amplia banda de absorción, como puede apreciarse en la fig. 2. Es el ácido sulfúrico de la mixtura el que determina el desarrollo de color.

Desde que la intensidad de éste varía con cada muestra de suero, está justificada la necesidad de efectuar la correspondiente sustracción, de la densidad óptica obtenida en el tubo de reacción.

b) *Semicro-técnica*. — Para muestras de suero escasas, se sugiere el siguiente procedimiento. A 0.2 ml. del material (suero o plasma), colocados en un tubo de ensayo, se agrega 5 ml. de ácido tricloroacético al 5 %, lentamente y con agitación. El método descrito como "macrotécnica" se sigue a continuación, con la única diferencia que se debe usar reactivo sensible, en lugar del reactivo patrón, y mixtura sensible, en lugar de mixtura patrón.

REPRODUCTIBILIDAD DE LOS RESULTADOS

La media aritmética de las densidades ópticas de 20 muestras del mismo suero, usando la macrotécnica, fué de 0,440, con una desviación standard de 0,018. Se constató que el coeficiente de variación es de 4,09 %.

Debemos hacer notar que expresamos los resultados de la reacción, en términos de densidad óptica a 530 m μ , desde que la estructura molecular de la o las sustancias responsables de la producción del color violeta con la difenilamina, es aún desconocida. Las evidencias que serán discutidas en otro trabajo (5) sugieren que el desarrollo del color violeta es debido a una fracción carbohidrato ligada principalmente, sino exclusivamente, a las mucoproteínas del suero, y encontrada en la fracción alfa-globulina del mismo.

El término medio aritmético de la densidad óptica de reacciones provenientes de muestras de 17 sueros de adultos normales (hombres y mujeres) usando la macrotécnica, fué de 0,374 con una desviación standard de 0.041. Se hace notar que hemos establecido el margen normal de variación, usando el doble de la desviación standard de cada lado de la media aritmética, en cuyas condiciones el margen normal de variación de la densidad óptica, resulta ser de 0,292 a 0,456. Desde que nuestro procedimiento difiere del usado por Niazi y State (1), nuestros valores no son directamente comparables con aquéllos. No obstante, los valores obtenidos por Niazi y State, difieren sólo muy ligeramente de los valores señalados más arriba.

La media aritmética de la densidad óptica de la reacción, efectuada con muestras de sueros provenientes de 14 adultos normales (mujeres y hombres) usando la semi-micro técnica, es de 0,332, con una desviación standard de 0.022. El margen de variación normal es pues de 0,288 a 0,376, usando este procedimiento.

APLICACION DEL METODO AL ESTUDIO DE LA FIEBRE REUMATICA

El plasma o suero de pacientes de fiebre reumática fué ensayado, utilizando la macrotécnica antes descrita. Hemos encontrado que tanto el suero como el plasma, dan la misma intensidad de color, dentro del error experimental del método.

Las muestras de sangre fueron obtenidas de pacientes, ya sea en estado de ayuno o post prandial, en las salas del Children's Memorial Hospital y también de pacientes ambulatorios que asisten a las Clínicas Bridgeport. Cuando se utilizó suero, éste fué extraído por centrifugación del coágulo lo más pronto posible y la reacción fué efectuada inmediatamente. Cuando esto no fué posible, las muestras de suero fueron guardadas a 5°C., habiéndose comprobado que el estacionamiento del suero a esta temperatura hasta por seis días, no afecta el rendimiento de la reacción. Cuando se usó plasma, se partió de muestras de sangre heparinizadas, las que fueron centrifugadas lo más pronto posible. La Heparina no da la reacción violeta y no interfiere en la producción de la misma.

Hemos estudiado un total de 107 muestras de sangre proveniente de pacientes de fiebre reumática, en diferentes etapas de la enfermedad. Los resultados se resumen en la Tabla I.

TABLA I

Valores de la reacción violeta, encontrados en sueros de pacientes con fiebre reumática (en términos de densidad óptica a 530 m μ)

(Macrotécnica)

N.º de casos	Estado	Media aritmética del grupo	Por ciento de aumento sobre lo normal
40	Casos clínicamente agudos	0,609	62,8 %
33	" con escasa actividad	0,530	41,7 "
34	" inactivos	0,420	12,3 "

Los datos numéricos de dicha Tabla muestran que, en enfermos en el período agudo de la afección, los valores medios de la reacción

están significativamente elevados (62,8 % más altos que el valor medio normal).

La fig. 3 representa gráficamente la distribución de los valores encontrados en el grupo clínicamente activo, alrededor de la media aritmética del grupo. A los fines comparativos, los valores normales están representados en la misma forma.

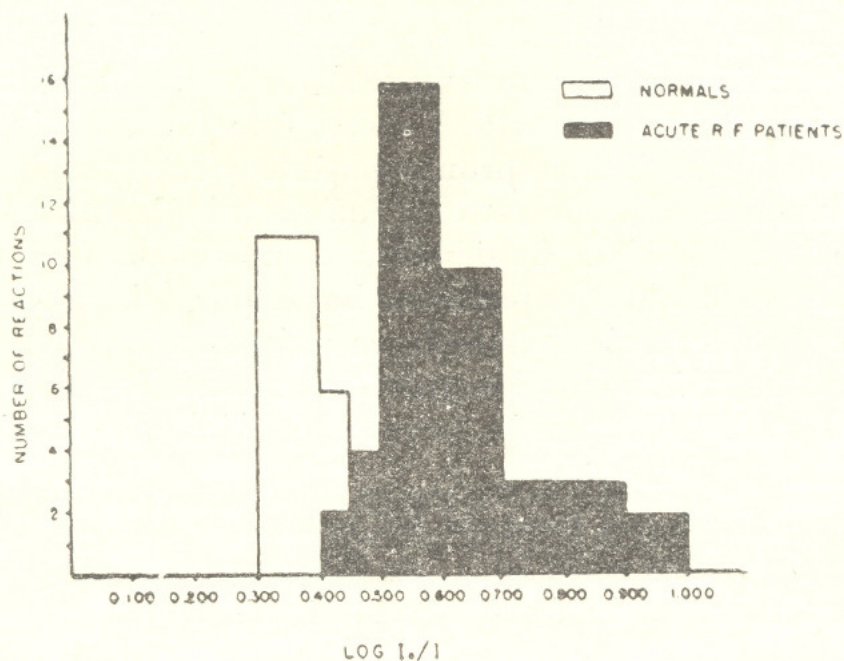


Fig.3. Distribución de los valores de la Reacción Violeta, en sueros normales y reumáticos, usando la Macrotécnica.

El segundo grupo de la Tabla I, incluye pacientes que no tenían síntomas clínicos de actividad reumática, pero tenían aún temperatura ligeramente elevada o tenían velocidades de sedimentación globular algo por encima de lo normal. En este grupo también, la media aritmética de los valores fué significativamente más elevada que lo normal, pero en un plano inferior al Grupo anterior.

El tercer grupo está formado de sujetos reumáticos inactivos. La media aritmética de este grupo, aunque por encima de la media normal (12,3 %), cae dentro de los límites de variación normal.

La reacción violeta parece estar significativamente elevada durante la fiebre reumática aguda, decrecer con la disminución de la actividad reumática y retornar a los valores normales con la curación. Mas aún, la intensidad de la reacción parece seguir una marcha paralela a la velocidad de eritrosedimentación, excepto cuando ésta disminuye como consecuencia de insuficiencia cardíaca congestiva; en este último caso, la reacción continúa mostrando paralelismo con la actividad reumática.

SUMARIO

1.º Las condiciones de la reacción entre el suero y el reactivo de difenilamina, se estudian en el presente trabajo. Basado en dicho estudio, un procedimiento simplificado para realizarla es aconsejado. Con dicho procedimiento, la media aritmética de las densidades ópticas para el suero normal, es de 0.374 ; la desviación standard es de 0,041 y el margen normal de variación es de 0.292 a 0.456.

También se da la composición de un reactivo más sensible. Con este reactivo es posible efectuar determinaciones con 0,2 ml. de plasma o suero (semimicrotécnica). La media aritmética de las densidades ópticas para el suero humano normal, es de 0.332 con dicha semimicro técnica. La desviación standard es de 0.022 y el margen de variación normal es de 0,288 a 0.376.

2.º Ciento siete muestras de sangre proveniente de pacientes de fiebre reumática en diferentes estados de la enfermedad, han sido estudiadas con la macrotécnica. El nivel de color violeta en el suero o plasma, se comprobó que estaba significativamente elevado durante la actividad reumática. En cambio, en los sujetos reumáticos inactivos, la media del grupo se encontraba dentro de los márgenes de variación normal.

Determinaciones seriadas con esta reacción pueden ser usadas como un agregado a los métodos corrientes para seguir el curso de la actividad reumática.

1. Subvencionada en parte por United States Public Health Service y por Chicago Heart Association.

2. En uso de una beca concedida por la Facultad de Química y Farmacia de Montevideo.

3. Composición del reactivo: Acido acético glacial 100 ml. Acido sulfúrico concentrado, 2,75 ml. Difenilamina, 1 gr.

4. Composición del Reactivo sensible; Acido acético glacial, 90 ml. Acido sulfúrico concentrado, 10 ml. Difenilamina, 1 gr.

5. Composición de la mixtura aceto-sulfúrica (patrón); Acido acético glacial, 100 ml. Acido sulfúrico concentrado, 2,75 ml..

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Niazi, S., and State, D., The diphenylamine reaction of human serum. *Cancer Research*, 1948, 8, 653.
- (2) Dische, Z., Über Microbestimmung der Kohlehydrate in tierschen Organen und im Blut mit Hilfe charakteristischer Farbereaction. I. *Mikrochemie*, 1929, 7, 33.
- (3) Dische, Z., Über einige neu charakteristische Farbereaktionen der Thymonulkeinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierschen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen. *Mikrochemie*, 1930, 8, 4.
- (4) Hess, E. L., Ayala, W., Cobure, A., and Herranen, A., The separation and properties of a mucoprotein from beef tonsils. In preparation.
- (5) Hess, E. L., and Ayala, W., Structural features of substances giving the purple color reaction with diphenylamine reagent. In preparation.