

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Sección de Fisiología de Valencia
(Prof. J. García-Blanco)

Acción de diversos colorantes sobre la Tinción Peroxidásica Bencidínica

por J. GARCÍA-BLANCO, J. VIÑA y J. L. COMÍN

Recibido para publicar el 2 de julio de 1948

La combinación de los métodos peroxidásicos bencidínicos que tiñen el citoplasma de eritroplastos y hematíes, con coloraciones de contraste especialmente nucleares, ha de proporcionar resultados de gran interés en las investigaciones hematológicas.

Iniciada ya con un trabajo precedente (1) de este mismo laboratorio, a consecuencia de los resultados allí obtenidos, hemos abordado el estudio de la acción química de los colorantes de contraste sobre la oxidación de la bencidina, obtenida por el peróxido de hidrógeno en presencia de la hemoglobina.

Se han seguido tres procedimientos:

1.º Capacidad de los colorantes histológicos para inhibir la oxidación de la bencidina en las condiciones dichas.

2.º Capacidad decolorante de los mismos para la bencidina oxidada.

3.º Capacidad de las soluciones de tintes histológicos para decolorar una extensión de sangre de rana teñida en azul por la bencidina.

Los resultados obtenidos con los tres procedimientos han sido concordantes.

Técnica utilizada.

A fin de estudiar la capacidad de los colorantes histológicos para inhibir la oxidación de la bencidina por el peróxido

y la hemoglobina se han determinado en primer término las condiciones óptimas a que una solución de hemoglobina en presencia de peróxido de hidrógeno y de bencidina, proporciona una coloración azul verdosa estable.

Partiendo de solución de hemoglobina pura al 1×5.000 y de otra de peróxido de hidrógeno a 2 volúmenes por ciento, la concentración mínima de bencidina capaz de teñir de azul verdoso, estable durante 5 a 10 minutos, es de $0'0001$ molar. La reacción de referencia se practica en una cápsula de porcelana absolutamente limpia; se coloca un c. c. de la solución de bencidina (CIH) $0,0001$ molar y a ella se agregan sucesivamente un c. c.-de la solución de agua oxigenada a dos volúmenes por ciento y un c. c. de solución de hemoglobina al 1×5.000 . El color azul aparece inmediatamente y alcanza en unos doce segundos su intensidad máxima, siempre que el pH de la solución permanezca entre 5 y 6.

1.º *Capacidad inhibidora de los colorantes.*

Para estudiar la capacidad inhibidora de los colorantes se siguió la técnica siguiente: Se dispuso en la cápsula 1 c. c. de la solución del colorante, en concentración molar conocida ($0'001$ a $0'000001$ molar) agregando luego 1 c. c. de la solución $0,0001$ molar de bencidina (CIH), 1 c. c. de agua oxigenada a 2 vol. % y 1 c. c. de solución de hemoglobina al 1×5.000 , anotando la concentración mínima de colorante capaz de impedir la aparición del color azul indicado. No se ha intentado una aproximación mayor que las comprendidas en la serie 1×10^{-2} , 2×10^{-2} , 3×10^{-2} , etc.

El color azul de la reacción ha impedido el estudio de aquellos colorantes como azul de metileno que aun a grandes diluciones imprimen dicha coloración u otra análoga al medio.

Los cuerpos utilizados fueron Bencidina Merck, Peróxido de hidrógeno Merck, Rojo Ponceau Merck, Rosanilina Merck, Hematoxilina Geigy, Rosa bengala Grüber, Rodamina B Merck, Violeta cristal Merck, Rojo neutro Grüber, Eosina azulada Merck, Crysoidina Grüber, Rojo Burdeos Merck, Orange 2 Merck, Aurantia Grüber, Orange G Grüber, Pardo Bismarck, Sandoz.

2.º *Decoloración de la bencidina oxidada, por los colorantes histológicos.*

La técnica seguida en este grupo de ensayos ha sido la siguiente :

A 1 c. c. de bencidina 0'0001 molar se agregan sucesivamente 1 c. c. de peróxido de hidrógeno a 2 volúmenes % y 1 c. c. de Hemoglobina al 1×5.000 . En cuanto el color azul había alcanzado su máximo se añadía 1 c. c. de la solución de colorante, anotando la concentración mínima de éste capaz de decolorar en menos de treinta segundos el líquido.

Servía a término de comparación una cápsula testigo conteniendo 1 c. c. de agua y la mezcla de bencidina, peróxido y hemoglobina a la misma concentración.

Los *resultados* obtenidos con *ambas* técnicas son concordantes y se resumen en el cuadro :

Rojo Ponceau	M :	300.000
Rosanilina	M :	200.000
Hematoxilina	M :	200.000
Rosa bengala	M :	50.000
Rodamina B.	M :	30.000
Violeta cristal	M :	30.000
Rojo neutro	M :	30.000
Eosina azulada	M :	20.000
Cryoidina	M :	10.000
Rojo Burdeos	M :	10.000
Orange 2	M :	10.000
Aurantia	M :	5.000
Orange G	M :	1.000
Pardo Bismarck	M :	1.000

3.º *Decoloración de las extensiones de rana teñidas con bencidina.*

Las extensiones de sangre de rana teñidas con el método M. B. (véase 1), esto es, bencidina y meta amino-benzoico en mezcla de metanol y peróxido de hidrógeno, proporcionan en el citoplasma de los hematíes del batracio una tinción azul intensa que resiste bien al lavado con agua. Para apreciar el efecto que los colorantes antes indicados ejercer sobre la tinción bencidínica se han bañado extensiones teñidas con soluciones diluídas de Hematoxilina, Rosanilina, Rojo Ponceau, etc., a las diluciones mayores a que son capaces de decolorar

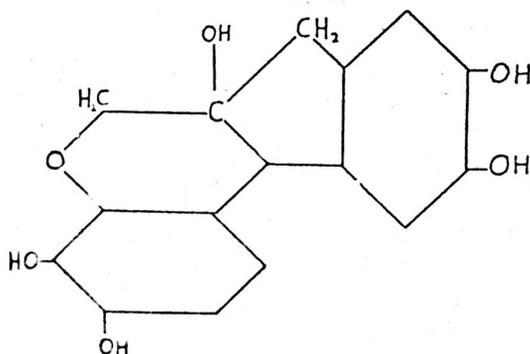
las soluciones 0'0001 molar de bencidina oxidada antes descrita. Los resultados concuerdan con los indicados en los ensayos químicos del cuadro precedente. A más de la decoloración del preparado que cambia su color azul en otro castaño, en viraje bien visible, se ha observado una relación entre la concentración del colorante y el tiempo necesario para que se realice el cambio de color. En el cuadro siguiente se aprecia un ejemplo de ello. Los resultados con Hematoxilina, Rosanilina y Rojo Ponceau, son :

Rojo Ponceau	0'00001 M.	Decoloración	6 minutos
Rosanilina	0'00001 M.	Decoloración	6 minutos
Hematoxilina	0'00001 M.	Decoloración	6 minutos
Hematoxilina	0'0001 M.	Decoloración	2 minutos
Hematoxilina	0'001 M.	Decoloración	20 segundos

COMENTARIO

En los resultados precedentes se aprecia una gran diferencia en la capacidad de los diversos colorantes para inhibir la oxidación bencidínica.

El examen de su constitución química puede aclararnos en algunos casos la gran actividad de algunos de ellos. Así, para uno de los más activos, la Hematoxilina, se admite la fórmula

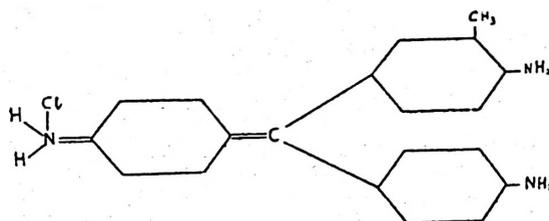


Los cuatro hidróxilos en posición pirocatequínica fundamentan la hipótesis de que sean los causantes de las propiedades reductoras. Se han realizado por ello determinaciones de la capacidad inhibidora que los dioxibenzoles y el trioxi-

benzol pirogalol, manifiestan para la oxidación bencidínica siguiendo la misma técnica antes descrita. Los resultados fueron :

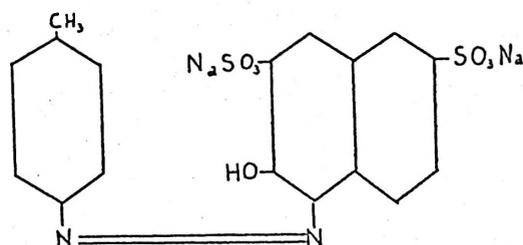
Pirocatequina	M :	200.000
Resorcina	H :	200.000
Hidroquinona	M :	50.000
Pirogalol	M :	300.000

En el grupo de los derivados del triamino trifenilmetano tenemos un colorante de gran actividad, la Rosanilina



que decolora en solución M : 200.000 debido al grupo amino, pues el bloqueo total de éstos por grupos metilos, como es el caso del violeta cristal descende su capacidad a un décimo aproximadamente.

Entre los colorantes azoicos encontramos el Ponceau H.



que actua a disoluciones M : 300.000. En este mismo grupo y con una constitución química muy análoga se encuentra el Orange G, que posee el mismo esqueleto nuclear, dos grupos sulfónicos, el azoico y un solo hidróxilo ; sin embargo el Orange G carece casi de acción inhibitoria.

En algún caso, es admisible que las impurezas que acompañan a estos colorantes sean responsables del poder reductor.

CONCLUSIONES

1.º Se estudia la capacidad de varios tintes histológicos para decolorar la tinción paroxidásica bencidínica de los hematíes de rana.

2.º En un modelo químico se determinan las concentraciones mínimas en que los citados colorantes impiden la oxidación bencidínica en presencia de peróxido de hidrógeno y de solución de hemoglobina o decoloran la bencidina oxidada en las mismas condiciones.

Summary

A study is made of the capacity of different histological stains to discolour the benzydinic peroxidasic coloration of the erythrocytes of the frog. With a chemical model are determined the minimum concentrations at which the said stains prevent benzydinic oxidation in the presence of hydrogen peroxide and hemoglobin solution or discolour oxidated benzydin in the same conditions.

Bibliografía

1. J. GARCÍA-BLANCO y G. FORTEZA. — Nuevos métodos de coloración en hematología. Editorial Saber. 1948, pág. 54 y siguientes.