

**Universidad FASTA**

**Facultad de Ciencias Jurídicas y Sociales**

# **Sangre: Ocultamiento de evidencia con pintura y alteración de los resultados del Luminol**

**Tecnicatura en Criminalística**

**Alumnas: -SARRINI, Rocío Belén**

**-SANCHEZ, María del Rosario**

**Tutores: -Lic. GACIO, Hernán**

**-Mg. JESSURUM, Paula**

**Agosto, 2023**

## Agradecimientos

*A nuestros padres, por su paciencia, dedicación, enseñanzas y su tiempo indefinido para que hoy lleguemos a estar presentando este trabajo.*

*A nuestros profesores, por su transmisión de saberes indiscutibles y alucinantes.*

*A nuestros amigos y parejas, que siempre que necesitamos, estuvieron para ayudarnos y acompañarnos.*

## Índice

<b>Resumen</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	7
<b>Introducción</b> .....	8
<b>Marco teórico</b> .....	11
<b>Célula</b> .....	11
<b>Tejidos: concepto y clasificación</b> .....	11
<b>Tejido conjuntivo</b> .....	12
<b>Generalidades de la sangre</b> .....	12
<b>Plasma</b> .....	13
<b>Eritrocitos</b> .....	13
<b>Leucocitos</b> .....	15
<b>Linfocitos</b> .....	16
<b>Monocitos</b> .....	17
<b>Trombocitos</b> .....	17
<b>Hemograma</b> .....	18
<b>Sistemas de grupos sanguíneos ABO y Rh</b> .....	18
<b>Sistema ABO de grupo sanguíneo</b> .....	18
<b>Sistema Rh de grupo sanguíneo</b> .....	19
<b>Antecedentes: técnicas de identificación de Sangre</b> .....	19
<b>La sangre como evidencia física</b> .....	22
<b>El significado de la evidencia física</b> .....	22
<b>Manchas de sangre en el lugar del hecho</b> .....	22
<b>Situación de una mancha</b> .....	23
<b>Diagnóstico de la naturaleza de la mancha</b> .....	23
<b>Fundamento químico de la sangre</b> .....	24
<b>Catalasas</b> .....	24
<b>Peroxidasas</b> .....	24
<b>Reactivos catalíticos</b> .....	25
<b>Prueba de orientación: Luminol</b> .....	27
<b>Análisis de la muestra de sangre</b> .....	28

<b>Observación de las muestras .....</b>	<b>28</b>
<b>Ensayos preliminares.....</b>	<b>28</b>
<b>Ocultamiento de rastros hemáticos con pintura.....</b>	<b>30</b>
<b>Pintura - Componentes.....</b>	<b>30</b>
<b>Hipótesis de investigación.....</b>	<b>31</b>
<b>Metodología de investigación.....</b>	<b>32</b>
<b>Análisis de datos .....</b>	<b>38</b>
<b>Discusión de resultados .....</b>	<b>42</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>43</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>44</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>45</b>

## Resumen

La investigación que expone este trabajo estudia el ocultamiento de evidencia con pintura y la posible alteración de los resultados de la prueba de Luminol.

El luminol es un ensayo orientativo, que se realiza en el lugar del hecho, para identificar la presencia de manchas hemáticas; la cuestión con esta prueba, es que solo se puede valorar un resultado negativo como fehaciente; no así el resultado positivo.

La pregunta planteada es si, realmente, un resultado negativo es determinante; por lo cual se procederá a indagar si existe algún tipo de pintura que pueda ocultar la presencia de sangre de la reacción del luminol, independientemente de si la muestra ha sido o no limpiada.

Los objetivos de la presente investigación buscan determinar si existen componentes de ciertas pinturas que alteren los elementos formes de la sangre, y también, si esto no sucede, analizar la cantidad de capas de pintura necesarias para lograr el ocultamiento del fluido biológico en cuestión y la alteración de la reacción del luminol.

Nuestra hipótesis afirma que existen tipos de pinturas que, con la aplicación de al menos una capa de estas sobre una superficie porosa (pared), permite ocultar la presencia de las manchas biológicas de sangre independientemente de que hayan sido limpiadas o no, alterando de esta manera los resultados de la reacción del Luminol.

Para realizar la experimentación sobre la temática en cuestión; se procedió a tomar muestras de sangre y aplicarlas en una pared blanca. Se dividió la superficie en dos columnas identificadas como A y B, y filas 1 (uno), 2 (dos), 3 (tres) y 4 (cuatro), reservando la fila 5 (cinco) como muestra testigo; a continuación, se procedió a limpiar la columna A y dejar las muestras de la columna B con sus manchas de sangre tipo proyección. Por último, se aplicaron 4 (cuatro) tipos de pinturas diferentes en cada fila.

Luego de un tiempo de espera para el secado de la pintura, se realiza la prueba de luminol. En esta primera experimentación, reaccionan los cuadrantes 1A – 1B – 2A – 2B – 3B – 4A – 4B y no el cuadrante 3A.

A continuación, se procede a la segunda capa de pintura y reaccionan las muestras 1A – 1B – 2A – 2B – 4A – 4B y no las identificadas como 3A y 3B.

En conclusión, se puede afirmar la hipótesis de investigación; es decir, hay pinturas que pueden alterar el resultado del luminol.

Finalizado el presente trabajo, podemos afirmar fehacientemente el resultado falso negativo del test de luminol.

### Palabras Clave

Sangre – Luminol – Pintura – Falso Negativo – Falso Positivo – Manchas Hemáticas – Lugar del Hecho



## Abstract

The investigation that this work exposes, studies the concealment of evidence with paint and the possible alteration of the Luminol test results.

The luminol test is an orientation essay carried out in the crime scene, to identify the presence of blood stains. It's important to know that you can only rate a negative result of this test in a reliable way, not a positive one.

The question posed is: a negative result is truly unailing? That is why we proceed to inquire if some kind of paint could hide the presence of blood from the luminol reaction, regardless if they were cleaned or not.

The objectives of this investigation are to determine if there are elements of certain paints that change the components of blood, and if this happens, analyze if another layer of paint disturbs the result.

Our hypothesis asserts that there are types of paint that, with at least one layer on a porous surface (wall), allows to hide the presence of biological blood stains, regardless if they were cleaned or not, changing the results of the luminol reaction.

To perform the experimentation on the subject, we proceeded to take blood samples and apply them on a white wall (previously divided in nine squares identified as columns A and B; and rows one, two, three, four; reserving the five as a witness sample).

Next, four types of paint were applied; two squares for each paint, one was cleaned.

After drying, we performed the luminol test. In this first step, the squares 1A, 1B, 2A, 2B, 3B, 4A, 4B gave a positive result and the square 3A gave a negative result.

Then, we proceeded to apply the second layer and the samples 1A, 1B, 2A, 2B, 4A, 4B gave a positive result, and the samples 3A and 3B gave a negative result.

Due to this, we were able to corroborate our investigation hypothesis, which means that there are types of paint that can disturb the luminol result, giving a false negative.

After this work, we can not irrefutably affirm the absence of blood, even with a luminol test saying it.

### Key words.

Blood- Luminol- Paint- False Negative- False Positive- Blood Stains- Crime Scene.

## **Introducción**

La temática abordada tendera a constatar la posibilidad de ocultar manchas biológicas de sangre con diferentes tipos de pinturas ante la reacción del luminol.

El análisis que se expone a continuación tiene como fundamento señalar la importancia que tiene la criminalística en los procesos penales, que como ciencia ha alcanzado su tarea fundamental de llevar a cabo la investigación científica del hecho criminal y las disciplinas que integran a la criminalística.

La problemática planteada se enmarca en la disciplina de Rastros y Química Forense, ya que tiene una importante relación con ambas ramas de la Ciencia Forense. La evidencia física es de suma importancia para la resolución de crímenes, y, la presencia de sangre normalmente se encuentra en el lugar del hecho, la cual será recolectada y remitida al laboratorio correctamente para su análisis.

Dentro de las principales técnicas que se utilizan para detectar la presencia de manchas biológicas en la escena del crimen, se encuentra el reactivo luminol como ensayo orientativo.

El luminol posee la capacidad de demostrar, al oxidar el hierro que contiene la sangre, por medio de la quimioluminiscencia, su reacción positiva, por más pequeños que sean los rastros y, aun así, si estos fueron previamente lavados, o, no son perceptibles a ojo desnudo; ante la ausencia de luminosidad azulada, se considera un resultado negativo.

Existe conocimiento general que, aun habiendo limpiado la escena, se pueden encontrar, con la técnica del luminol, rastros de sangre. A raíz de lo cual, los perpetradores de un delito intentarían probablemente, ocultar los rastros de la manera más eficiente, por lo que se investigará la posibilidad de detectar, o no, estos indicios aun habiendo sido limpiados y pintando sobre los mismos con distintas pinturas. Esta problemática se plantea como una incógnita, buscando la posibilidad de establecer un resultado negativo con una capa de pintura y reiterar una vez más la aplicación en caso de ser necesario.

La investigación intentara constatar si existen pinturas que inhiban la reacción química producida por la unión del luminol junto a las células sanguíneas, compuestas por diferentes enzimas, que producen un resultado positivo generando quimioluminiscencia.

A través de fuentes primarias y secundarias se puede establecer que existen reacciones químicas entre la aplicación de luminol y otros fluidos que pueden dar resultados falsos-positivos. Asimismo, existen teorías donde se establece que el resultado negativo del luminol es altamente específico, determinando de esta manera que no se halla sangre ni ningún otro fluido ante el investigador. Lo que se buscara en esta investigación es establecer resultados falsos-negativos.

Esto se puede establecer en el “Manual de técnicas Analíticas en el Laboratorio de Toxicología” en el que dice que hay un “conjunto de pruebas que tienen todas ellas un mismo fundamento químico: la presencia de sangre y de enzimas que catalizan la reacción de descomposición del peróxido de hidrogeno. Estas enzimas forman parte del sistema de defensa que los organismos han ido desarrollando, con el fin de protegerse de la acción toxica de los productos intermedios que se pueden producir durante el proceso de reducción de oxígeno.

Existen dos tipos diferentes de enzimas capaces de catalizar la reacción de descomposición del peróxido de hidrogeno: las catalasas y las peroxidases:

- Las catalasas son enzimas que se encuentran en la sangre, la medula ósea, la mucosa, el riñón y el hígado.
- Las peroxidases son enzimas típicas de los vegetales, aunque también se encuentran en la leche y la sangre, especialmente, en los glóbulos rojos y blancos.

El grupo de pruebas, al que pertenece el luminol, tienen todas ellas el mismo fundamento que, según la bibliografía revisada, es el siguiente: las técnicas consisten en mezclar el reactivo con la muestra que se quiere identificar. Las peroxidases presentes en la muestra catalizan la descomposición del peróxido, liberándose oxígeno, que a su vez oxida al reactivo, provocando un cambio de color en la disolución.

Todos los revisados hasta el momento tienen dos características en común: 1) son muy sensibles, capaces de detectar trazas de sangre, y 2) son poco específicos, es decir, pueden dar un resultado positivo para gran cantidad de sustancias además de la sangre, por ello, solo se puede valorar un resultado negativo de la prueba.”

A partir de este postulado, la presente investigación va intentar refutar lo anteriormente dicho: “solo se puede valorar un resultado negativo de la prueba”. Por lo tanto, se valorará el resultado negativo cuando, sobre una mancha hemática seca o previamente limpia y seca, se le aplique una o dos capas de pintura, según corresponda en el momento de la experimentación y no obtengamos ninguna reacción química.

En cuanto al problema de investigación, se busca responder: ¿Qué tipo de pintura puede ocultar la presencia de sangre del ensayo de luminol, independientemente de haber sido limpiada o no? ¿Serán necesarias dos capas de pintura para que el resultado de negativo?

Orientando el problema de investigación a los objetivos planteados, se establece que se debe determinar con la aplicación de diferentes tipos de pintura si se afecta a los componentes de la sangre y no permite que sean detectados por el ensayo de luminol. Luego, según los resultados obtenidos en la primer practica y si el ensayo dio positivo, repetir experiencia con la aplicación de una segunda capa de pintura para establecer si serán ambas

necesarias para ocultar la evidencia. Con estos objetivos se busca responder las siguientes preguntas:

- ¿Existen pinturas que oculten o inhiban la presencia de las enzimas de la sangre frente al luminol y no puedan ser detectadas?
- Respecto a las pinturas, ¿afecta el resultado si el soporte de las manchas hemáticas ha sido limpiado o no?
- En caso de haber dado positivo el primer ensayo de luminol, ¿cambiaría el resultado si se le aplicara una segunda capa de pintura?

Para llevar a cabo esta investigación se utilizaron pinturas que cumplen con distintas funciones: látex, esmalte sintético, tiza y pintura al agua; rodillo para la aplicación de las pinturas; esponja de fibra de cocina y agua corriente para la limpieza de las muestras, pared de vivienda interna sin acondicionamiento previo, muestra de sangre extraída por profesional (sin utilización de ningún tipo de anticoagulante) y, por último, reactivo luminol.

Se procedió a realizar la extracción de sangre con todos los insumos necesarios y las medidas de bioseguridad obligatorias. La extracción fue realizada por un profesional en el domicilio de Sarrini Rocío Belén, ubicado en la calle Belgrano 4027, el día 24 de julio del año 2022; al momento de la extracción, se retiró la aguja y con la jeringa llena de muestra hemática se procedió a aplicar sobre la pared en forma de manchas de proyección para que estas queden dispersas por toda la superficie. Se realizó una segunda extracción para completar la pared con muestra biológica suficiente.

A continuación, se dividió la pared en dos columnas, las cuales se subdividieron en cinco filas. La columna izquierda denominada A se limpió con esponja de cocina y agua, y, la derecha (B), permaneció con las manchas de sangre en su estado original.

Luego de la limpieza, se prepararon las pinturas para su aplicación. Se prosiguió a colocar los numerales e incisos para relacionar cada muestra, y así establecer que cada fila correspondía a un tipo de pintura. La muestra cinco fue utilizada como testigo para el reactivo del luminol.

Luego se continuó con la aplicación de la primera capa de pintura para cada muestra. Durante la espera de secado de aproximadamente una hora, se preparó el reactivo luminol obtenido de una empresa de insumos forenses.

Se avanzó con la aplicación del luminol sobre las muestras y se obtuvieron los primeros resultados.

## **Marco teórico**

### **Célula**

Según Wojciech Pawlina, las células son las unidades estructurales y funcionales básicas de todos los organismos multicelulares. Los procesos que normalmente se asocian con las actividades diarias de los organismos (protección, ingestión, absorción de metabolitos, eliminación de residuos, movimiento, reproducción y hasta la muerte) son todos reflejos de procesos similares que ocurren dentro de cada una de los billones de células que constituyen el cuerpo humano.

Las células pueden dividirse en dos compartimentos principales: citoplasma y el núcleo. En general, el citoplasma es la región de la célula localizada fuera del núcleo. El citoplasma contiene orgánulos, citoesqueleto formado por proteínas polimerizadas que forma microtúbulos, filamentos intermedios y filamentos de actina, e inclusiones suspendidas en un gel acuoso denominado matriz citoplasmática.

El núcleo es el orgánulo más grande dentro de la célula y contiene el genoma junto con las enzimas necesarias para la replicación de ADN y la transcripción de ARN. El citoplasma y el núcleo no solo desempeñan diferentes papeles funcionales, sino que también trabajan en conjunto para mantener la viabilidad celular.

### **Tejidos: concepto y clasificación**

Los tejidos son cúmulos o grupos de células organizadas para llevar a cabo una o más funciones específicas (Pawlina, 2016). Por consiguiente, un conjunto organizado de células que funcionan en forma colectiva recibe el nombre de tejido.

Si bien se suele decir que la célula es la unidad básica funcional del organismo, en realidad son los tejidos los que, gracias a los esfuerzos cooperativos de sus células individuales, se encargan del mantenimiento de las funciones corporales. Las células de un mismo tejido se conectan entre sí por medio de uniones de anclaje especializadas (unión célula-célula). Las células también perciben su entorno extracelular circulante y se comunican entre sí mediante uniones intercelulares especializadas, lo que facilita la colaboración entre ellas, permitiéndoles operar como una unidad funcional.

El concepto de tejido proporciona la base para comprender y reconocer los diferentes tipos celulares dentro del cuerpo y como se interrelacionan. A pesar de las variaciones en el aspecto general, la organización estructural y las propiedades fisiológicas de los diversos órganos del cuerpo, los tejidos que los componen se clasifican en cuatro tipos básicos:

- El tejido epitelial cubre todas las superficies corporales, reviste las cavidades del cuerpo y forma glándulas.
- El tejido conjuntivo subyace o sostienen estructural y funcionalmente a los otros tres tejidos básicos.
- El tejido muscular está compuesto por células contráctiles y es responsable del movimiento.
- El tejido nervioso recibe, transmite e integra información del medio interno y externo para controlar las actividades del organismo.

### **Tejido conjuntivo**

Las células están separadas entre sí. Los espacios intercelulares están ocupados por un material producido por las células. Este material extracelular recibe el nombre de matriz extracelular. La índole de las células y de la matriz varía de acuerdo con la función del tejido. Por lo tanto, para la clasificación del tejido conjuntivo no solo se tienen en cuenta las células sino también la composición y organización de la matriz extracelular.

Algunos ejemplos de tejidos conjuntivos especializados son el hueso, el cartílago y la sangre. Estos tejidos conjuntivos se caracterizan por la naturaleza especializada de su matriz extracelular. Por ejemplo, la sangre está compuesta por células y por una matriz extracelular en la forma de un líquido con abundancia de proteínas llamado plasma, que circula por todo el organismo.

### **Generalidades de la sangre**

La sangre está formada por células y un componente extracelular (Pawlina, 2016). El volumen total de sangre en un adulto promedio es de alrededor de seis litros, lo que equivale al 7% del peso corporal total. La acción de la bomba cardiaca impulsa la sangre a través del sistema cardiovascular para que llegue a los tejidos corporales. Muchas de las funciones de la sangre son las siguientes:

- Transporte de sustancias nutritivas y oxígeno hacia las células en forma directa o indirecta.
- Transporte de desecho y dióxido de carbono desde las células.
- Distribución de hormonas y otras sustancias reguladoras a las células y los tejidos.
- Mantenimiento de las homeostasis porque actúa como amortiguación y participa de la coagulación y la termorregulación.
- Transporte de células y agentes humorales del sistema inmunitario que protege al organismo de los agentes patógenos, proteínas extrañas y células transformadas.

La sangre se compone de células y sus derivados y un líquido con abundantes proteínas llamado plasma. Las células sanguíneas y sus derivados incluyen:

- Eritrocitos, también conocidos como hematíes o glóbulos rojos;
- Leucocitos, también conocidos como glóbulos blancos;
- Trombocitos, también conocidos como plaquetas.

El plasma es el material extracelular líquido que le imparte a la sangre las propiedades de fluidez. El volumen relativo de células y plasma en la sangre entera es de aproximadamente 45% y 55% respectivamente. El volumen de eritrocitos compactados en una muestra de sangre se llama hematocrito o volumen de células compactas. El suero es igual al plasma sanguíneo excepto que esta desprovisto de los factores de coagulación.

## **Plasma**

Si bien las células de la sangre son el principal objeto de interés en muchas áreas, también es útil un breve comentario sobre el plasma. Mas del 90% del peso del plasma corresponde al agua, que sirve como disolvente para una variedad de soluto, como proteínas, gases disueltos, electrolitos, sustancias nutritivas, moléculas reguladoras y materiales de desecho. Los solutos del plasma contribuyen a mantener la homeostasis, un estado de equilibrio que proporciona una osmolaridad y un pH óptimos para el metabolismo celular.

Las proteínas plasmáticas son principalmente albumina, globulinas y fibrinógeno.

La albumina es el principal componente proteico del plasma y representa mas o menos la mitad de las proteínas plasmáticas totales. Es la proteína plasmática más pequeña y se sintetiza en el hígado.

Las globulinas comprenden las inmunoglobulinas y globulinas no inmunes. Las inmunoglobulinas son anticuerpos, una clase de moléculas funcionales del sistema inmunitario secretados por las células plasmáticas.

El fibrinógeno, la proteína plasmática es mas grande, se sintetiza en el hígado. En una serie de reacciones en cascada con otros factores de coagulación, el fibrinógeno soluble se transforma en la proteína insoluble fibrina.

El suero es igual al plasma sanguíneo excepto que esta desprovisto de los factores de coagulación. Es de práctica habitual que, con fines de diagnóstico, se extraigan muestras de sangre de una vena, procedimiento denominado venopuntura. Cuando se saca de la circulación, la sangre se coagula de inmediato.

Un coagulo sanguíneo consiste sobre todo en eritrocitos incluidos en una red de fibras finas compuestas por fibrina. Para prevenir la coagulación de una muestra de sangre, se le añade un anticoagulante como el citrato o la heparina.

## **Eritrocitos**

Los eritrocitos o glóbulos rojos son células anucleadas que carecen de orgánulos típicos. Funcionan solo dentro del torrente sanguíneo para fijar oxígeno y liberarlo en los tejidos, y en

intercambio, fijan dióxido de carbono para eliminarlo de los tejidos. Su forma es de disco bicóncavo, la cual maximiza el área de superficie, una cualidad importante para el intercambio de gases. La vida media de los eritrocitos en sangre es de 120 días. En una persona sana, cerca del 1% de los eritrocitos se elimina de la circulación cada día debido a la senescencia (envejecimiento); sin embargo, la médula ósea produce continuamente nuevos eritrocitos para reemplazar a los eliminados.

La forma del eritrocito está mantenida por proteínas de la membrana en asociación con el citoesqueleto, que proporciona estabilidad mecánica y la flexibilidad necesaria para resistir las fuerzas ejercidas durante la circulación.

A medida que los glóbulos rojos en circulación navegan a través de una pequeña red de capilares, se exponen a grandes cantidades de fuerza de fricción que hacen que sufran deformaciones rápidas y reversibles. Para hacer frente a esta fuerza, la membrana celular tiene una estructura exclusiva de citoesqueleto. Además de una bicapa lipídica normal, contiene dos grupos de proteínas importantes desde el punto de vista funciones: 1) proteínas integrales de la membrana, que son la mayor parte de las proteínas en la bicapa lipídica, y 2) proteínas periféricas de la membrana, que residen en la superficie interna de la membrana celular.

Los eritrocitos contienen hemoglobina, una proteína especializada en el transporte de oxígeno y dióxido de carbono. La función de la hemoglobina es fijar las moléculas de oxígeno en los pulmones (lo cual requiere alta afinidad por el oxígeno) y, después de transportarlas a través del sistema circulatorio, liberar el oxígeno en los tejidos) que tienen baja afinidad por el oxígeno). Un monómero de la hemoglobina es similar en composición y estructura a la mioglobina, la proteína fijadora de oxígeno que está en el músculo.

La forma del disco del eritrocito facilita el intercambio de gases porque una cantidad mayor de moléculas de hemoglobina está más cerca de la membrana plasmática de lo que estaría en una célula esférica. Por lo tanto, los gases tienen menos distancia para difundirse dentro de la célula hasta alcanzar un sitio de fijación de la hemoglobina. Dentro de los eritrocitos hay una alta concentración de hemoglobina que es la causa de la tinción uniforme de eosina y de la granulación citoplasmática visible con el MET.

La hemoglobina se compone de cuatro cadenas polipeptídicas de globina, cada una de las cuales forma un complejo con un grupo hemo que contiene hierro. Durante la oxigenación, cada uno de los cuatro grupos hemo que contiene hierro puede unir una molécula de oxígeno de manera reversible. Durante los periodos gestacionales y posnatales, la síntesis de las cadenas polipeptídicas de hemoglobina varía, lo que resulta en diferentes tipos de hemoglobina. Según la activación de diferentes genes de globina y la síntesis de la cadena de globina particular que haya en la macromolécula, se pueden distinguir los siguientes tipos:

- Hemoglobina HbA, que tiene gran prevalencia en los adultos, representa alrededor del 96% de la hemoglobina total.
- Hemoglobina HbA2, que constituye el 1,5% al 3% de la hemoglobina total en los adultos.
- Hemoglobina HbF, que comprende menor del 1% de la hemoglobina en los adultos.

## **Leucocitos**

Los leucocitos se subclasifican en dos grupos generales. El fundamento para esta división es la presencia o ausencia de gránulos específicos prominentes en el citoplasma. Como se señaló antes, las células que contienen gránulos específicos se clasifican como granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), y las células que carecen de gránulos específicos se clasifican como agranulocitos (linfocitos y monocitos). No obstante, tanto los granulocitos como los agranulocitos poseen una pequeña cantidad de gránulos inespecíficos azurófilos, que son los lisosomas.

### **Neutrófilos**

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes y también los granulocitos más comunes. Se caracterizan por las múltiples lobulaciones de su núcleo; por esta razón, también reciben el nombre de neutrófilos polimorfonucleares o polimorfos. Los neutrófilos maduros poseen de dos a cuatro lóbulos unidos por finas hebras de material nuclear.

Los neutrófilos contiene tres tipos de gránulos: 1) gránulos azurófilos (gránulos primarios, que son más grandes y menos abundantes que los específicos; 2) gránulos específicos (gránulos secundarios), son las gránulos más pequeños y por lo menos dos veces más abundantes que los azurófilos; y 3) gránulos terciarios, que don de dos tipos, uno que contiene fosfatasas y el otro tiene metaloproteinasas, como colagenasas y gelatinasas, que se cree que facilitan la migración de los neutrófilos a través del tejido conjuntivo.

Los neutrófilos son células móviles; abandonan la circulación y migran hacia su sitio de acción en el tejido conjuntivo. Su migración es controlada por la expresión de moléculas de adhesión que interactúan con los ligandos correspondientes en las células endoteliales y, a menudo participan en la unión celular. Estas interacciones aseguran que se produzca la diapédesis (movimiento de salida de la circulación).

Una vez que el neutrófilo se ha introducido en el tejido conjuntivo, la migración adicional hacia el sitio de la lesión es dirigida por un proceso conocido como quimiotaxis, que consiste en la unión de moleculares quimiotácticas y proteínas de la matriz extracelular a receptores específicos en la superficie de los neutrófilos.

Los neutrófilos son fagocitos activos que utilizan una gran variedad de receptores de la superficie para reconocer bacterias y otros agentes infecciosos en los sitios de inflamación.

### **Eosinófilos**

Los eosinófilos tienen más o menos el mismo tamaño que los neutrófilos y su núcleo es normalmente bilobulado. Reciben su nombre a causa de los grandes gránulos refringentes de su citoplasma. El citoplasma contiene dos tipos de gránulos: los específicos que son grandes, alargados y abundantes y los azurófilos. Los eosinófilos se asocian con reacciones alérgicas, infestaciones parasitarias e inflamación crónica.

### **Basófilos**

Los basófilos tienen más o menos el mismo tamaño que los neutrófilos y se llaman así debido a que los abundantes gránulos grandes que hay en su citoplasma se tiñen con colares básicos. Son los menos abundantes de todos los leucocitos y representan menos del 0,5% del total.

El citoplasma basófilo contiene dos tipos de gránulos: gránulos específicos, que son mayores que los gránulos específicos de los gránulos de los neutrófilos y gránulos azurófilos inespecíficos.

La función de los basófilos está muy relacionada con la de los mastocitos. Tanto los mastocitos como los basófilos fijan un anticuerpo secretado por células plasmáticas, la IgE. La exposición y reacción posterior al antígeno específicos (alergeno) para la IgE desencadena la activación de los basófilos y mastocitos y la liberación de agentes vasoactivos de los gránulos. Estas sustancias causan las alteraciones vasculares importantes asociadas con reacciones de hipersensibilidad.

### **Linfocitos**

Los linfocitos son las principales células funcionales del sistema linfático o inmunitario. Los linfocitos son los agranulocitos más comunes y representan aproximadamente el 30% del total de los leucocitos sanguíneos. Para comprender la función de estos, debe tener en cuenta que la mayor que se encuentran en la sangre o la linfa representan células inmunocompetentes recirculantes, es decir, células que han adquirido la capacidad de reconocer y responder a antígenos y están en tránsito desde un tejido linfático a otro.

En el organismo hay tres tipos de linfocitos distintos desde el punto de vista funcional: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK. Los linfocitos T se llaman así porque sufren diferenciación en el timo. Los linfocitos B se llaman así debido a que fueron identificados en los mamíferos en los órganos bursaequivalentes como la médula ósea. Las células Natural Killer se originan de las mismas células precursora que los linfocitos B y T y se denominan así porque están programadas para destruir ciertos tejidos de células transformadas.

## **Monocitos**

Los monocitos son los precursores de las células del sistema fagocítico mononuclear. Son los leucocitos más grandes en el frotis de grande. Ellos viajan de la médula ósea a los tejidos del cuerpo, donde se diferencian en los diversos fagocitos del sistema fagocítico mononuclear, como, por ejemplo, los macrófagos del tejido conjuntivo, los osteoblastos, los macrófagos alveolares, los perisinusoidales hepáticos y los macrófagos de los ganglios linfáticos, el bazo y la médula ósea. Los monocitos permanecen en la sangre solo unos tres días.

Los monocitos se transforman en macrófagos que actúan como células presentadoras de antígenos en el sistema inmunitario.

## **Trombocitos**

Los trombocitos (plaquetas) son pequeños fragmentos citoplasmáticos limitados por membrana y anucleados que derivan de megacariocitos. Las plaquetas actúan en la vigilancia continua de los vasos sanguíneos, la formación de coágulos de sangre y la reparación del tejido lesionado.

Las plaquetas intervienen en varios aspectos de la hemostasia (detención de la hemorragia). Constantemente inspeccionan el revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos en busca de brechas o roturas. Cuando la pared de un vaso sanguíneo se lesiona o se rompe, el tejido conjuntivo expuesto en el sitio del daño promueve la adhesión plaquetaria. La adhesión de las plaquetas desencadena su desgranulación y la liberación de serotonina, adenosina difosfato y el tromboxano A<sub>2</sub>. Estas tres, son las responsables de la aglomeración plaquetaria adicional para formar un tapo hemostático primario. La masa de plaquetas aglomeradas detiene la extravasación de la sangre.

El glucocálix plaquetario provee una superficie de reacción para la conversión del fibrinógeno soluble en fibrina. La fibrina forma, entonces, una red laxa sobre el tapón inicial y se estabiliza aún más por enlaces cruzados covalentes que producen una aglomeración densa de las fibras. En la red, quedan atrapadas plaquetas y eritrocitos. El tapón plaquetario inicial se transforma en el coágulo definitivo, llamado tapón hemostático secundario, por la acción de factores tisulares adicionales secretados por las células del vaso lesionado.

Después de formado el coágulo definitivo, las plaquetas provocan la retracción del coágulo, probablemente como una función de la actina y la miosina que se encuentran en la zona estructural de la plaqueta. La contracción del coágulo permite el retorno del flujo sanguíneo normal a través del vaso. Finalmente, después que el coágulo ha cumplido su función, es lisado por la plasmina, una enzima fibrinolítica que circula en el plasma en una forma inactiva conocida como plasminógeno.

Una función adicional de las plaquetas es contribuir a la reparación de los tejidos lesionados más allá del vaso mismo.

## **Hemograma**

El hemograma es un análisis de sangre completo que más comúnmente se solicita al laboratorio (Pawlina, 2016). Proporciona cantidad relativas y cálculos obtenidos a partir de las células y elementos formados en la muestra de sangre.

Un hemograma típico incluye lo siguiente:

- Conteo de los leucocitos (glóbulos blancos)
- Tipo de leucocitos
- Conteo de eritrocitos (glóbulos rojos)
- Hematocrito (también llamado volumen de célula compacta) que mide el porcentaje de volumen de eritrocitos en la muestra de sangre.
- Hemoglobina, establecimiento la capacidad de un eritrocito para transportar oxígeno.
- Índices de eritrocitos: volumen corpuscular medio (tamaño de los glóbulos rojos), hemoglobina corpuscular media (cantidad de hemoglobina en un eritrocito promedio), concentración media de hemoglobina corpuscular (porcentaje de la concentración de hemoglobina en un eritrocito promedio) y la amplitud de la distribución de los eritrocitos (muestra si los eritrocitos son todos iguales o si son diferentes en tamaño o forma).
- Conteo de trombocitos (plaquetas)

## **Sistemas de grupos sanguíneos AB0 y Rh**

### **Sistema AB0 de grupo sanguíneo**

El sistema AB0 consiste en tres antígenos denominados A, B y 0. Estos antígenos son glucoproteínas y glucolípidos y solo difieren levemente en su composición. Están presentes en la superficie de los eritrocitos y se unen a los dominios extracelulares de proteínas integrales de membrana.

La presencia de antígenos A, B o 0 determina los cuatro grupos sanguíneos principales: A, B, AB y 0. Todos los seres humanos poseen enzimas que catalizan la síntesis del antígeno 0. Los individuos con un grupo de sangre A tienen un enzima adicional que se añade al antígeno 0. Las personas con grupo sanguíneo B tienen una enzima que añade galactosa al antígeno 0. Los individuos con el grupo sanguíneo AB expresan ambas enzimas, mientras que las personas con grupo sanguíneo tipo 0 carecen de ambas enzimas.

Las diferencias en las moléculas de hidratos de carbono de estos antígenos se detectan por anticuerpos específicos contra los antígenos A o B. las personas con antígenos A poseen anticuerpos anti-B séricos que están dirigidos contra el antígeno B. Las personas con antígenos B poseen anticuerpos anti- A séricos que se dirigen contra el antígeno A. las personas con grupo sanguíneo AB no tienen anticuerpos dirigidos contra los antígenos A o B. por lo tanto, son receptores universales de cualquier tipo de sangre. Las personas del grupo 0 poseen anticuerpos tanto para anti-A como anti-B en su suero y no tiene antígeno A ni B en sus eritrocitos. Por lo tanto, estas personas son donadores universales de sangre.

Si un individuo es transfundido con sangre de un tipo compatible, sus anticuerpos atacarán los eritrocitos del donante, causando una reacción transfusional hemolítica o destrucción de los eritrocitos transfundidos.

### **Sistema Rh de grupo sanguíneo**

El otro sistema de grupo sanguíneo importante, el sistema Rh, se basa en el antígeno Rhesus (Rh). En los seres humanos, este sistema está representado por un polipéptido Rh30 transmembrana no glucosilado que comparte sitios antigénicos con eritrocitos de mono Rhesus. El polipéptido es un componente más grande de proteína integral de membrana eritrocitaria que incluye la glucoproteína Rh50. Si bien el polipéptido RG30 expresa muchos sitios de antígeno en su dominio extracelular, solo tres de ellos, antígenos D, C y E, tienen importancia clínica.

Las interacciones entre moléculas RH30 y Rh50 son esenciales para la expresión de los antígenos. Una persona que posee solo uno de estos tres antígenos es claramente Rh positivo. Los tres antígenos estimulan la producción de anticuerpo anti-Rh en individuos que carecen de los mismos antígenos.

La incompatibilidad Rh puede incluir una reacción transfusional hemolítica en los neonatos provoca la enfermedad hemolítica eritroblastosis fetal. Esta se produce en neonatos Rh (D)+ de madres Rh(D)- y es el producto de una reacción inmunitaria de inmunoglobulina anti-D que pasaron a través de la placenta de la madre.

### **Antecedentes: técnicas de identificación de Sangre**

Ya en el año 1929, Barruel, ideó un método que permitía distinguir la sangre humana del animal. Consistía en hervir la sangre que se quería identificar en ácido sulfúrico. El autor propuso que el olor que se desprendía cuando la sangre era humana, era distinto que el que se podía percibir cuando la sangre procedía de animales; incluso, señalaba, por el olor desprendido, era posible deducir si la sangre era de hombre o de mujer. Este método, pese a su falta de rigor, fue considerado importante durante bastante tiempo.

Unos años más tarde, LUDWIG TEICHMANN-STAWLARSKY, describió el método conocido como prueba de TEICHMANN y que consiste en disolver la mancha de sangre seca, colocar unas gotas en un cristal junto con una pequeña cantidad de sal común y ácido acético cristalizado y calentar hasta la ebullición de la mezcla.

Aparecen unos cristales característicos de la sangre que llamó cristales hemínicos y que se forman a partir de la Hemoglobina. El método es aplicable cuando la mancha de sangre se encuentra sobre metales oxidados o cuando se ha sometido a altas temperaturas; se admite desde entonces que, si se observa la formación de los cristales, la mancha es, con toda seguridad, de sangre, existiendo dudas si la prueba resulta negativa.

En 1861, VAN DEEN, propuso un método que consistía en demostrar la existencia de peroxidasas en la muestra a analizar, provocando la oxidación de la tintura de guayaco por el oxígeno.

En 1863, SCHÖNBEIN describió un método que está basado en comprobar si la muestra contenía o no catalasas añadiendo peróxido de hidrógeno. Esta prueba, junto con la ya mencionada de VAN DEEN, están incluidas en el grupo de técnicas dirigidas a realizar las pruebas de orientación, por lo que las describiremos con detalle más adelante.

El año 1859, marcó el inicio del desarrollo de otro grupo importante de técnicas basadas en el análisis espectral de la sangre. Ya entonces se conocía que cuando la luz atravesaba un prisma y se dirigía sobre una pantalla, se obtenía una banda semejante al arco iris y se observaban los siete colores del rojo al violeta.

BUNSEN y KIRCHHOFF, descubrieron que cualquier compuesto capaz de irradiar luz, tenía su espectro característico. Comprobaron que los sólidos, líquidos o gases que se sometían al calor o a descargas eléctricas, emitían radiaciones específicas para cada sustancia, dando lugar a un espectro distinto para cada una de ellas y que permite su identificación. En el caso de sustancias que no emiten luz propia se pueden obtener los espectros de absorción. Para esto, se proyecta una luz sobre la sustancia que vamos a estudiar. Parte de esta luz la absorbe la sustancia que se está analizando y el espectro que se obtiene también es característico de esa sustancia.

Posteriormente se descubrió la existencia de rayos ultravioleta e infrarrojos, que producen espectros que son visibles a través de la fotografía y que son de gran ayuda para conseguir identificar sustancias desconocidas.

La hemoglobina tiene un espectro de absorción característico que permite su identificación.

Si se trata de sangre fresca, se puede obtener tratándola sólo con sal común; si se analiza sangre seca, se disuelve la mancha con ácido acético, ácido sulfúrico o alcohol. Las

pequeñas alteraciones que se provocan en la hemoglobina por la acción de los disolventes, no impiden su identificación.

Aplicando las técnicas de análisis espectral, MAGNANINI, en 1898, propuso un método para distinguir la sangre humana de la sangre animal, basado en la diferente velocidad con que se forma hematina cuando la sangre se trata con potasa. Así, cuando la sangre era humana, se formaba más rápidamente que cuando se trataba de animales. Este método sólo se podía aplicar a sangre fresca y no a las manchas.

En 1901, PAUL UHLENHUT, publicó un estudio llamado "Método para diferenciar diversos tipos de sangre, y, en especial, para comprobar, mediante un diagnóstico diferencial, la existencia de sangre humana", y que fue considerado la innovación más importante de la Medicina Forense durante el siglo XIX.

También en 1901, LANDSTEINER, descubre la presencia de diferentes grupos sanguíneos en humanos. Fue lo que llamó el sistema ABO. En 1902, RICHTER, intentó aplicar este sistema a la identificación de sangre seca, pero esto no fue posible hasta 1916, mediante una técnica desarrollada por LEONE LATTES

KASTLE y SCHEEDE en 1903 y, posteriormente, MEYER, propusieron el método basado en la oxidación de la Taleina de Fenol, que describiremos detalladamente más adelante, ya que este método está incluido en el conjunto de técnicas que se utilizan en las pruebas de orientación para el diagnóstico genérico de las manchas.

En 1904, ADLER, describió un método para identificar manchas de sangre utilizando bencidina (ver anexo) y, más adelante, en 1911, VON FURTH, propuso la utilización de la leucomalaquita verde en sustitución de la bencidina.

El método de VON FURTH, fue modificado en 1912 por MICHEL, y unos años después, en 1931 por MEDINGER. También en 1912, RUTTAN y HARDISTY, utilizaron la O-Toluidina, sustituyendo a la bencidina en la prueba de ADLER. Transcurrido más de un cuarto de siglo, en 1939, GERSHENFELD, propuso sustituir la bencidina por O-Toluidina.

Fue en 1937, cuando WALTER SPECHT, describió su método basado en la identificación de la sangre por luminiscencia.

Por otro lado, a partir de 1927, se suceden importantes descubrimientos que llevan a desarrollar métodos que permitirán el diagnóstico de especie de las manchas de sangre.

A partir de 1962, se introdujeron técnicas basadas en la luminiscencia. Las técnicas espectroscópicas adquirieron un gran desarrollo entre los años 1970 y 1980. Un paso definitivo, que en este momento se encuentra en plena expansión, se dio en 1987 cuando JEFFREYS propuso el proceso basado en la obtención de lo que se llamó la "huella genética". Por las características de nuestro trabajo, debemos centrarnos ya en los métodos empleados en las pruebas de orientación de las manchas de sangre, y para ello, haremos una revisión

de los más conocidos y discutiremos su fiabilidad. Las primeras pruebas que se propusieron eran poco sensibles.

## **La sangre como evidencia física**

### **El significado de la evidencia física**

Según Guzman (1997) hay tres caminos principales para coadyuvar en la solución de un hecho: confesión del sujeto, manifestaciones de una víctima o testigos y la información obtenida a través de la evidencia física.

La evidencia física es normalmente inanimada y provee realidades o hechos imparciales, constituye el testigo mudo del evento. Si se utiliza con eficacia puede superar una serie de afirmación conflictivas y confusas ofrecidas por testigos que observaron el mismo incidente al mismo tiempo.

Evaluada la evidencia en forma de impresión dactilares, latentes, armas, vainas, proyectiles, impactos, machas, fibras, etc. y practicada una última búsqueda final detallada, se procederá a la recolección, registro, señalización y preservación de la evidencia. Al respecto se destaca la importancia que reviste la preservación e identificación de elementos, mediante el auxilio de contenedores apropiados.

### **Manchas de sangre en el lugar del hecho**

De acuerdo a lo planteado por Raffo (1993), la sangre es el elemento que habitualmente acompaña al lugar del hecho; pero no siempre es posible encontrarla, no porque no existe, sino porque pudo proyectarse en finísima salpicadura o haberse intentado hacerla desaparecer.

No solo se busca sobre el cuerpo de la víctima; la mancha puede caer sobre el piso, madera, tierra o muebles y otros objetos que hayan podido tener relación con el delito. Después de inspeccionar estos lugares con luz artificial y con lupa, hay que realizarlo con luces oblicuas de linterna que hacen resaltar el brillo de las zonas maculadas cuando el soporte es opaco.

El vestigio hemático exige una búsqueda meticulosa, ingenio y paciencia por parte del perito, porque demostrar que es sangre, y de procedencia humana, es obtener, desde el comienzo, importante prueba indiciaria.

La reacción instintiva del homicida es lavarlas manos. Es de buena práctica examinar los recipientes de desperdicios y su contenido. En la mayor parte de los casos, las manchas de sangre son fáciles de reconocer, habrá que descubrir en el lugar del hecho, su aspecto, forma, número, color y dimensiones.

Todo esto permitirá recoger datos relacionados con la posición de víctima y victimario de lucha previa a la muerte, movimientos posibles del herido o huellas de arrastre del cuerpo.

Las manchas de sangre tienen aspectos diferentes, según la edad sea reciente o antigua, y varían también con la naturaleza del soporte en el que se encuentren. La recientemente derramada es de color rojo brillante, coagula en minutos, se deseca en horas, adquiriendo la tonalidad del café, y se vuelve negra con el transcurso de los días; esto se debe a la transformación sucesiva de la hemoglobina en metahemoglobina y hematina ácida. De la permeabilidad del soporte depende el espesor y forma de la mancha, y de sus particulares caracteres cromáticos, el camuflaje o resaltado del color de sangre de la mancha. La permeabilidad al líquido, permitirá que se adhiera (o penetre) en mayor o menor grado en el objeto que la lleva, variando espesor, contorno y color. Las condiciones ambientales de humedad, sequedad y luminosidad del lugar son factores capaces de enmascarar su fisionomía.

La mancha hemática puede aportar datos importantes, relacionados con las circunstancias del hecho que se investiga; según el mecanismo de formación, las manchas se pueden clasificar en:

- Manchas de proyección: gota, salpicadura.
- Manchas por escurrimiento: charcos, regueros.
- Manchas por contacto (impresiones sangrientas de manos, pies, etc.).
- Manchas de impregnación: imbibición de prendas textiles.
- Manchas de limpiamiento: del arma, de las manos en un paño, etc.

Las gotas formadas por proyección de sangre tienen también gran importancia. Si la gota cae perpendicularmente y la altura de la caída es pequeña, su forma es redondeada; si la altura aumenta, el borde es dentado y, si aumenta aún más, se agregan a la gota madre pequeñas gotitas satélites independientes.

Hay también un goteo dinámico, cuando proceden de una persona que se desplaza, la forma es diferente, porque se alarga adoptando la forma de "signo de admiración", señalando, la parte más gruesa, la procedencia de la marcha y, la punta, su dirección.

### **Situación de una mancha**

Por situación de una mancha se entiende no solamente su ubicación sobre el soporte sino la relación de distancia que guarda con el continente y el contenido del escenario y, en especial, con el cuerpo. El número, tamaño y distribución topográfica admiten las mismas consideraciones.

### **Diagnóstico de la naturaleza de la mancha**

Hay pruebas de orientación y pruebas de certeza. Las primeras son de técnica sencilla, rápida respuesta y extrema sensibilidad, pero su especificidad es escasa. Pueden utilizarse en el mismo lugar del hecho, pero teniendo en cuenta los siguientes factores:

- Dan reacciones positivas con otras sustancias no hemática (jugos de fruta, leche, etc.);
- Su verdadero valor reside en el fenómeno inverso, la negatividad; existe, entonces, certeza de que no es sangre;
- Se ensambla para completar la inspección del lugar, después de haber levantado los ratos hemáticos principales;
- La técnica consiste en comprimir la zona sospechosa con un papel de filtro humedecido en agua destilada y aplicar, en la zona un papel con la que se ha hecho contacto, unas gotas de reactivo; si hay sangre, virara el color; al verde, con reactivo de leucomalaquita, el azul, con reactivo de guayaco, etc.

Las pruebas de certeza evidencian los caracteres propios de la sangre, excluyendo a toda otra sustancia. Esto se logra demostrando la existencia de glóbulos rojos o la de su materia colorante, la hemoglobina. Se utilizan métodos histológicos, físicos (caracteres ópticos) o microquímicos (formación de cristales).

## **Fundamento químico de la sangre**

La presencia de enzimas en la sangre catalizan la reacción de descomposición del peróxido de hidrogeno (Ponce, 2014). Estas enzimas forman parte del sistema de defensa que los organismos han ido desarrollando, con el fin de protegerse de la acción toxica de los productos intermedios que se pueden producir durante el proceso de reducción del oxígeno.

Existen dos tipos diferentes de enzimas capaces de catalizar la reacción de descomposición del peróxido de hidrogeno: las catalasas y las peroxidadas.

### **Catalasas**

Las catalasas son enzimas que se encuentran en la sangre, la medula ósea, la mucosa, el riñón y el hígado.

Estos catalizadores utilizan dos moléculas de peróxido de hidrogeno, una de ellas actúa como substrato dador de electrones y la otra como oxidante o receptor de electrones.

Durante el proceso se libera oxígeno, de forma que, si a una muestra que contiene catalasas, le añadimos peróxido de hidrogeno, se observa la formación de burbujas como consecuencia del oxígeno que se desprende en la reacción.

En 1863, Schonbein, propuso una técnica para identificación de manchas de sangre que se basaba en la existencia de catalasas en la muestra.

### **Peroxidasas**

Las peroxidadas son enzimas típicas de los vegetales, aunque también se encuentran en la leche y en la sangre, específicamente, en los glóbulos rojos y blancos.

En los eritrocitos, la enzima glutatión peroxidasa cataliza la reacción implicada en la destrucción del peróxido de hidrógeno mediante la reducción del glutatión, lo que protege a los lípidos de la membrana y a la hemoglobina contra la oxidación.

A diferencia de las catalasas, las peroxidasas, para descomponer el peróxido de hidrógeno, necesitan la presencia de otro sustrato en el medio de reacción, que a su vez es oxidado durante el proceso. Es por esto que son enzimas ambivalentes, ya que actúan descomponiendo el peróxido y obteniendo a la vez un metabolito, como resultado de la oxidación del sustrato.

El grupo de pruebas que vamos a describir a continuación, tienen todas ellas, el mismo fundamento que, según la bibliografía revisada, es el siguiente: las peroxidasas presentes en las muestras que se van a identificar, actúan catalizando la descomposición del peróxido de hidrógeno, produciéndose una liberación de oxígeno. Para hacer fácilmente evidente la reacción, se deben preparar reactivos que, al ser oxidados, cambien de color.

Las técnicas consisten en mezclar el reactivo con la muestra que se quiere identificar, y añadir a continuación, peróxido de hidrógeno. Las peroxidasas presentes en la muestra catalizan la descomposición del peróxido, liberándose oxígeno, que a su vez oxida el reactivo, provocando un cambio de color en la disolución.

### **Reactivos catalíticos**

- 1) Tintura de Guayaco: si en presencia de tintura de guayaco se añade a la solución de sangre un compuesto capaz de actuar como donante de oxígeno, como la esencia ozonizada de trementina, se observa la aparición de un color azul. Esto se debe a que las oxidasas de la sangre provocan la liberación de oxígeno por parte de la trementina alcanzándose la oxidación de la resina de guayaco. Esta reacción es fácilmente detectable ya que la forma oxidada de la resina de guayaco es de color azul.

Simultáneamente, se deja durante varios días un frasco de esencia de trementina abierto para que capte oxígeno. Se comprueba que la preparación es buena cuando es capaz de decolorar una solución de índigo.

La técnica consiste en mezclar en un recipiente no metálico, una gota de solución sanguínea con dos gotas de tintura. Se añade la esencia de trementina y observamos el cambio de color de ambas a azul.

La técnica se puede aplicar también en aquellos casos en los que la mancha se encuentra sobre un objeto que no puede deteriorarse, aplicando sobre la mancha un papel de filtro previamente humedecido con agua destilada, es decir, obteniendo una huella de Taylor.

2) Tintura de Aloine: es la misma técnica descrita anteriormente, pero sustituyendo el guayaco por aloine. La tintura de aloine, que tiene un color rosado, vira primero a naranja y luego a rojo cereza. Es una técnica menos sensible que la anterior.

3) Bencidina: fue utilizada por Adler desde 1904 en la clínica y posteriormente se aplicó en Medicina Legal. Es el método más utilizado de los aquí descritos y desde que fue propuesto, ha estado sometido a diferentes modificaciones que afectan tanto a los reactivos empleados como a la técnica que se utiliza en su aplicación.

El procedimiento consiste en disolver a saturación la bencidina en ácido acético glacial. También se ha utilizado como reactivo una disolución de bencidina en ácido hidroclórico. Como donante de oxígeno lo más habitual es utilizar el agua oxigenada. Algunos autores proponen la aplicación de otros compuestos como la trementina ozonizada y el perborato de sodio.

Este último se ha estudiado como sustituto del peróxido de hidrogeno. Es bien sabido que el agua oxigenada es un compuesto bastante inestable, lo que podrían traducirse en posibles variaciones en la efectividad del método. La prueba puede utilizarse con muestra en disolución y también sobre manchas secas directamente, u obteniendo antes la huella de Taylor.

La técnica consiste en añadir una o dos gotas del reactivo y esperar unos segundos para ver si hay un cambio de color en la disolución como consecuencia del viraje del reactivo. Si este se produce, la oxidación de la bencidina es inespecífica y la prueba no tiene valor. Si no hubo viraje, se añaden una o dos gotas de agua oxigenada concentrada. Cuando la muestra contiene peroxidasas, se observa inmediatamente el viraje del reactivo y la solución adquiere un color azul intenso. Para considerar el resultado del test como positivo, el viraje se debe observar en menos de 10 segundos.

Es una prueba muy sensible. Sin embargo, a la hora de dar un valor orientativo del grado de sensibilidad de la reacción, nos encontramos con bastantes discrepancias entre los autores.

Actualmente, se sabe que la bencidina puede ser peligrosa debido a su poder cancerígeno, es por esto que algunos autores recomiendan que se sustituya por la O-Tolidina, que es un derivado de la bencidina, pero menos cancerígeno.

4) O-Tolidina: la técnica consiste en añadir una o dos gotas del reactivo a la muestra a analizar, y a continuación una o dos gotas de la disolución de peróxido de hidrogeno. Si el resultado es positivo se verá inmediatamente un color azul. Como en el caso de la prueba de la bencidina, para poder considerar la reacción positiva,

el viraje debe tener lugar en menos de 10 segundos. La sensibilidad del método es similar a la de la bencidina.

5) Leucomalaquita verde: también se le llama reacción de Medinger. La técnica, si se utiliza el primer reactivo, consiste en añadir una o dos gotas del mismo a la muestra. Si se utiliza el segundo, se añaden una o dos gotas del reactivo y a continuación una o dos gotas de la solución de peróxido de hidrógeno. Para que la reacción sea considerada como positiva se debe observar en menos de 10 segundos un color azul verdoso. La sensibilidad del método es de 1/100000.

6) Fenoltaleína: Esta reacción fue descrita por KASTLE y SCHEEDE y posteriormente por MEYER, por lo que también se le conoce con el nombre de reacción de KASTLE-MEYER. Fue introducida en el campo de la Medicina Legal por BALTHAZARD y LAMBERT. En esta reacción, el reactivo se obtiene a partir de la fenoltaleína y como dador de oxígeno se utiliza el peróxido de hidrógeno.

El reactivo de KASTLE-MEYER, se prepara a partir de 2 g de Taleina de fenol, 30 g de potasa anhidra, 100 g de agua destilada y 20 g de polvo de zinc. A continuación, se hierve la mezcla, que en este momento es de color rojo, hasta que se decolora totalmente.

Esto ocurre porque la Taleina de fenol se reduce a fenoltaleína. Después se filtra en caliente y la solución obtenida, se conserva en frascos oscuros y cerrados herméticamente. El reactivo es muy inestable, y se oxida con mucha facilidad. Poco a poco va retomando un color rosado hasta que vira totalmente. Esta oxidación se puede retrasar, si, como aconsejan DELARDE y BENOIT, se pone una pequeña cantidad de polvo de zinc dentro del frasco

La técnica consiste en, una vez obtenido el reactivo, añadir 2 ml del mismo a otros 2 ml de la solución problema. Al adicionar unas gotas de agua oxigenada, si la muestra contiene peroxidasa, se observa el cambio de color a rosa oscuro. En este proceso debemos tener ciertas precauciones:

- La temperatura debe ser menor de 30°C, porque a temperaturas superiores, el reactivo se oxida, aunque no haya sangre.
- Debemos controlar también el pH de la muestra, y solamente debemos considerar el resultado de la prueba como positivo, si el viraje se produce inmediatamente.

## **Prueba de orientación: Luminol**

La prueba de Luminol es una de las técnicas bioquímicas forenses más utilizadas en la investigación forense para detectar trazas de sangre en una escena del crimen. La quimioluminiscencia de color azul del Luminol es catalizada por la hemoglobina de la sangre.

El reactivo Luminol (5-amino-2,3dihydro-1,4-phthalazinedione) reacciona con la hemoglobina de la sangre. Esta reacción es ampliamente utilizada en la investigación por la comunidad científica forense como una prueba orientativa para la búsqueda de manchas de sangre. La emisión de luz es casi instantánea, cuando el luminol es rociado sobre la sangre. El luminol puede ser utilizada para detectar la presencia de sangre en cantidades tan bajas o diluidas como 1:106. Incluso las manchas de sangre de una antigüedad mayor a seis años, pueden ser localizadas en superficies lavas, en ambientes amplios y sobre diferentes soportes. La prueba de Luminol es una prueba preliminar previa a la determinación serológica y por ADN (QUISPE SERGIO, 2014).

El luminol no destruye la mancha y no interfiere en el caso de que se realicen después otras pruebas de confirmación o serológicas, no interfiere en las pruebas de ADN que posteriormente se realicen sobre ella.

El Luminol se prepara de la siguiente manera al momento de utilizarse:

- Solución A: Luminol 0,1 gr / carbonato de sodio 1 gr / agua destilada 100 ml-
- Solución B: hidracina hidratada al 95% 0,1 gr / agua destilada 100 partes-

Al ml de la solución A, se añade una gota de agua oxigenada e inmediatamente después, 2 gotas de solución B. Se espera un minuto y la mezcla se asperje sobre la zona sospechosa. En caso positivo, las manchas de sangre producen luminiscencia.

## **Análisis de la muestra de sangre**

La investigación completa de manchas de sangre, en lo que respecta a la tarea a realizar en el laboratorio, puede considerarse escalonada en varias etapas:

### **Observación de las muestras**

El material será cuidadosamente obtenido, utilizando los elementos de bioseguridad correspondientes.

### **Ensayos preliminares**

Tienen valor como ensayos de orientación, pero no aseguran la presencia de sangre en la mancha en estudio.

Se realizan solamente cuando suficiente cantidad de muestra para no dificultar, por falta de la misma, las reacciones posteriores de certificación de la existencia de sangre, de investigación de la especie y de su tipificación.

Los ensayos preliminares son pruebas rápidas basadas en la actividad de peroxidasa que posee el grupo hemo de la hemoglobina de la sangre y que, en presencia de agua oxigenada y de ciertos reactivos orgánicos, dan lugar a la aparición de coloraciones o luminiscencia que orientan sobre la posible existencia de sangre en las muestras analizadas.

La peroxidasa descompone el agua oxigenada, produciéndose agua y oxígeno. Es este oxígeno el que actúa sobre el reactivo orgánico reducido, transformándolo en forma oxidada, de color característico o luminiscente.

Dada la gran sensibilidad de los ensayos preliminares, además de ser utilizados en el laboratorio, se emplean también en el escenario del delito, como un medio para resguardar aquellas manchas sospechosas de contener sangre.

Si el resultado de los ensayos preliminares es negativo, la mancha no contiene sangre en cantidades detectables como para permitir su posterior análisis. Si el resultado es positivo, se requiere continuar con los ensayos para conformar su presencia.

Todos los ensayos preliminares que se conocen sufren en mayor o menor grado, la interferencia de las peroxidases de secreciones biológicas y peroxidases vegetales. También interfieren agentes fuertemente oxidantes, algunos metales y sales metálicas.

Mayor confiabilidad en los resultados ofrecen los reactivos que actúan en medio alcalino pues disminuye la posibilidad de falsos positivos.

Entre estos reactivos se encuentra el que emplea fenolftaleína reducida en medio alcalina, reactivo de Kaster Meyer y el que utiliza 3-aminofthalhidrazida (luminol).

La alta sensibilidad en medio líquido de la reacción con fenolftaleína reducida (1 en 1.000.000) se pone de manifiesto en la localización de sangre en soluciones muy diluidas, como son las muestras recogidas en lavados, cañerías, etc.

Al agregar gotas del reactivo y de agua oxigenada, se desarrolla, en presencia de vestigios de sangre, una coloración rosada intensa.

La reacción con Luminol es sumamente sensible (1 a 5.000.000). Esta prueba de orientación, resulta ideal para aplicar a grandes superficies, como pisos o escaleras que hayan sido lavadas con el objeto de remover la sangre.

El inconveniente de este método es que la reacción positiva se manifiesta por la aparición de luminiscencia, por lo que se debe observar en la oscuridad.

Algunos autores han expresado que las manchas viejas de sangre reaccionan mejor que las recientes, con luminol y agua oxigenada, y que la sensibilidad de la reacción con sangre fresca se mejoraba si se rocía primero con ácido clorhídrico al 2 % la superficie a ensayar. Posteriores experiencias han demostrado que este tratamiento previo es innecesario.

Las superficies porosas y las que no fueron limpiadas inmediatamente, retienen una cantidad relativamente apreciable de sangre y dan reacciones bastante intensas con luminol.

## **Ocultamiento de rastros hemáticos con pintura**

### **Pintura - Componentes**

Para Guzman en su Manual de Criminalística (1997) La pintura es un líquido que luego de ser aplicado con pincel, spray o rodillo, se endurece por evaporación de disolventes, por oxidación o por una combinación de estos, para formar una capa protectora y decorativa. Comúnmente está formada por los siguientes componentes:

- Excipientes: incluye aceites, resinas o elementos plásticos que forman la película que une los pigmentos y se adhiere a la superficie.
- Pigmentos y sustancias colorantes: la pintura se colorea con pigmentos y/o tinturas que pueden combinarse a ser disueltos con el excipiente. Los pigmentos son finísimas partículas sólidas que dan el color deseado y consistencia a la pintura; pueden incluir sustancias que aumentan el volumen de ellas o mejorar sus propiedades.
- Tinturas: son necesarias en todas las pinturas que contienen aceites. Habitualmente son compuestos orgánicos que contienen cobalto, plomo o manganeso. La existencia de uno de estos elementos implica la utilización de un aceite en la preparación.
- Disolventes: se emplean para regular la consistencia de la pintura, de tal manera que pueda ser convenientemente aplicada como un líquido. Se evaporan con facilidad y no están presentes en las pinturas acrílicas.

## **Hipótesis de investigación**

Existe algún tipo de pintura que, con la aplicación de al menos una capa, sobre una superficie porosa (pared), permite ocultar la presencia de las manchas biológicas de sangre independientemente de que hayan sido limpiadas o no, alterando de esta manera los resultados de la reacción del Luminol.

## Metodología de investigación

El día 24/07/2022 se procedió a realizar la experimentación del presente trabajo en la vivienda de Rocío Belén Sarrini, ubicada en la calle Belgrano 4027 de la ciudad de Mar del Plata, dando comienzo a la misma a partir de las 10:00 hs AM. El objetivo principal es lograr afirmar, modificar o refutar la hipótesis de investigación.



El primer paso fue la división de una pared blanca porosa de la vivienda, en 10 cuadrados con cinta de papel. Los ocho primeros cuadrados serán utilizados para la aplicación de los diferentes tipos de pintura y la quinta fila será utilizada para testigo de luminol.



Luego se procedió a la extracción de sangre por parte de un extraccionista profesional cuyo nombre es Matías Castellón. La extracción de sangre se realizó con instrumental esterilizado y todas las medidas de bioseguridad correspondientes, sin aplicación de ningún anticoagulante. Se realizó la primera venopunción a Sarrini Rocío Belén.

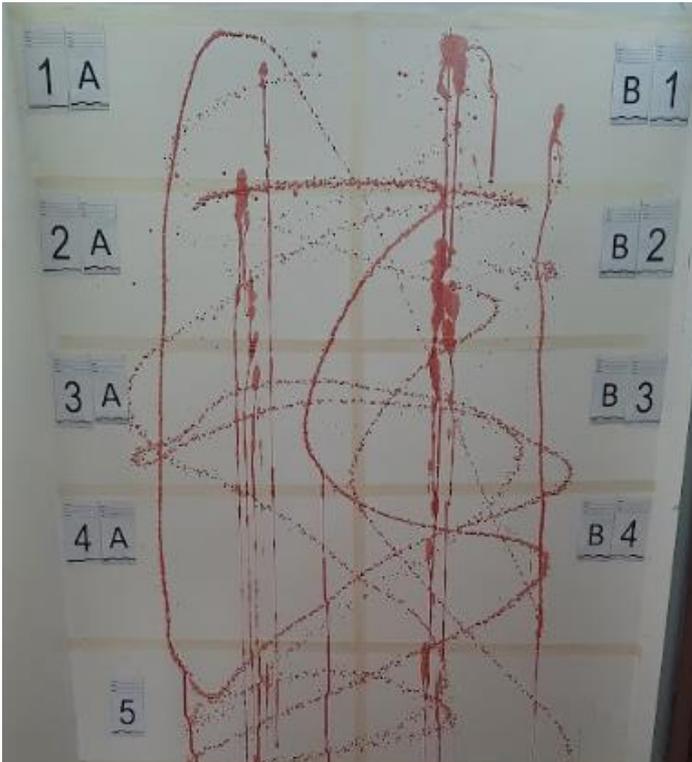


Al momento de la extracción, casi de manera automática, se procedió a aplicar la muestra sobre la pared, generando manchas de proyección a través de la eyección de la jeringa.

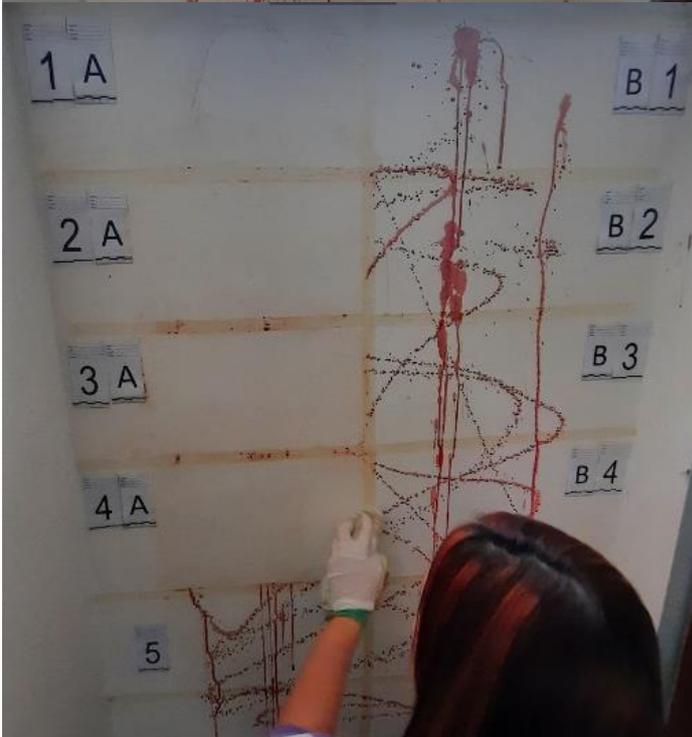


A continuación, se realizó la venopunción a Sánchez María del Rosario.

Se repitió la aplicación del fluido biológico sobre la pared de la misma manera que se realizó con la eyección de la sangre de Sarrini Rocío Belén, dando como resultado todos los patrones que se visualizan en la imagen.



A continuación, se colocó la señalización de cada cuadrante con su número y letra, es decir, se denominó a la columna de la izquierda con la letra A, la cual corresponde a las muestras próximas a limpiar, y, a la columna B, como las muestras que van a ser pintadas sin previa limpieza. Asimismo, a cada fila se le asignó un número de arriba hacia abajo del uno al cuatro, las cuales corresponden a cada tipo de pintura a aplicar.



Posteriormente se inició el lavado de la columna A (izquierda). La misma fue lavada con agua corriente potable con la utilización de una esponja de fibra común de cocina y, la otra mitad, identificada como columna B (derecha) se mantuvo con los patrones hemáticos realizados al principio de la experimentación.

Se seleccionaron cuatro tipos de pintura para llevar a cabo la experimentación y se utilizaron cuatro rodillos diferentes para cada una de ellas. La pintura seleccionada para los cuadros 1 A y 1 B fue la pintura **“Alba cielo raso látex interior mate”**; para los cuadrados identificados como 2 A y 2 B la pintura **“Craft Eq tiza blanco”**; para los cuadrados identificados como 3 A y 3 B la pintura **“Alba esmalte sintético satinado interior y exterior”**; y, para los cuadrados identificados como 4

A y 4 B la pintura “*Alba esmalte al agua*”; como se dijo anteriormente, el cuadrado identificado como 5, se utilizó como muestra testigo, no habiendo sido limpiado ni pintado.



Una vez aplicada la pintura en cada uno de los cuadrados y haber dejado pasar un tiempo prudente de secado, se procedió al preparado del luminol adquirido en “División Forense”, productos e insumos de criminalística.





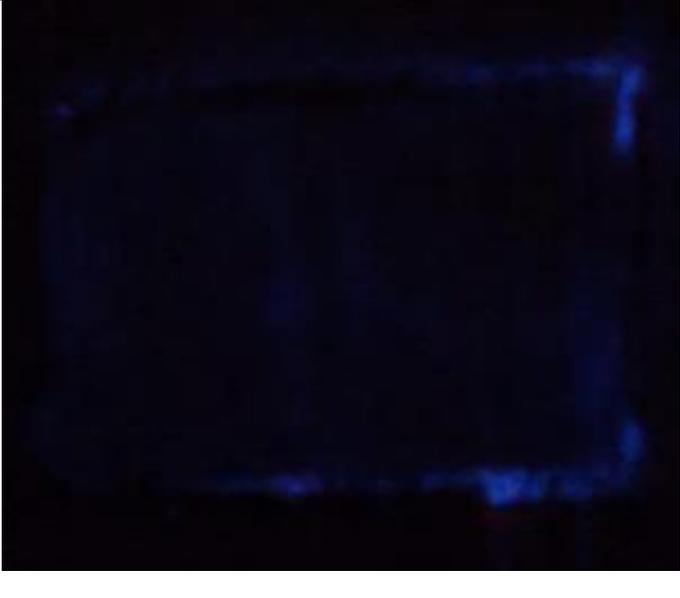
Una vez acondicionado el ambiente para su aplicación, sin ningún tipo de luz y con la protección necesaria del personal para la aplicación del luminol; se aplicó el ensayo en el cuadrado designado como testigo para corroborar que la solución funcionaba correctamente.

Una vez corroborado esto, se procedió a la aplicación sobre los 8 cuadrado

restantes.

## Análisis de datos

Posterior al secado de la primera capa de pintura, se realizó la aplicación del reactivo Luminol. Se presentan a continuación en el siguiente recuadro los resultados de la primera etapa:

Muestra / REACCION	IMAGEN
Muestra 1 A: Positivo	
Muestra 1 B: Positivo	
Muestra 2 A: Positivo	

Muestra 2 B: Positivo



Muestra 3 A: Negativo



Muestra 3 B: Positivo



Muestra 4 A: Positivo	
Muestra 4 B: Positivo	
Muestra 5: testigo para corroborar el correcto funcionamiento del Luminol	

Luego de la lectura de los resultados de la primera etapa, siendo solo la muestra 3A la que arroja un resultado negativo, se procede a aplicar una segunda capa de pintura en todas las muestras. Se muestra a continuación los resultados, en el siguiente cuadro:

Muestra/ REACCION	IMAGEN
Muestra 1 A y 1 B: Positivo ambas.	
Muestra 2 A y 2 B: positivo ambas.	
Muestra 3 A y 3 B: negativo ambas.	
Muestra 4 A y 4 B: Positivo ambas.	

## **Discusión de resultados**

En las investigaciones preliminares no encontramos estudios que tuvieran la temática presente en esta investigación, por lo cual no podemos llevar a cabo una comparación con otros resultados. Asimismo, está corroborado que el test de luminol no puede afirmar la presencia de sangre como una verdad absoluta, razón por la cual es considerado un ensayo de orientación; por esta misma razón se requiere un ensayo de certeza para confirmar que es sangre. De lo contrario, cuando el luminol da negativo, es considerado un resultado válido. En este proyecto se refuta esta afirmación, el resultado negativo del luminol es falso negativo, porque lo que buscamos afirmar es que existen tipos de pintura que al aplicarlas sobre manchas hemáticas y cubrirlas con una o dos capas de pintura si se pueden alterar los resultados negativos de luminol.

## Conclusiones

Nuestra investigación corrobora la posibilidad de ocultar manchas biológicas de sangre con diferentes tipos de pinturas ante la reacción del luminol. Nos pareció una temática de gran significancia, justamente por la relación que tiene en un presunto hecho delictivo la presencia o ausencia de manchas biológicas, sirviéndonos tanto de la disciplina de Rastros, como de Química Forense; haciendo uso de la teórica y técnicas de ambas, como también de la Ciencia Criminalística en general.

Siendo el Luminol una prueba de orientación muy utilizada en la práctica, creemos de suma importancia conocer cuales son sus deficiencias y, por eso, nuestra hipótesis se baso en comprobar si existe algún tipo de pintura de venta libre que pueda ocultar la presencia de este indicio tan importante en la escena del crimen.

Para nuestra experimentación se procedió a aplicar sangre extraída por un profesional sobre una pared de tipo porosa, realizar la limpieza de manchas seleccionadas denominadas con la letra A y utilizar diferentes tipos de pintura, para luego, proceder a aplicar el ensayo de Luminol para determinar si las muestras reaccionaban o no.

En conclusión, esta investigación afirma la hipótesis planteada, y comprobamos que existen pinturas como el esmalte sintético satinado que oculta la sangre ante la reacción del luminol. De las 8 (ocho) muestras a analizar, dos de ellas confirman la hipótesis, ambas con la pintura mencionada en este mismo párrafo; una de ellas con una sola capa de pintura, y la otra con dos.

Esto nos permite tener en cuenta que el test de Luminol es, no solo orientativo, sino poco fiable en circunstancias particulares como estas; y se deben extremar los cuidados tanto para confirmar como para negar la existencia de manchas biológicas en un lugar del hecho.

## Bibliografía

- Balthazard. (1933). *Manual de Medicina Legal*. Barcelona: Labor S.A.
- Guzman. (1997). *Manual de Criminalística*. Buenos Aires: Ediciones La Rocca.
- Pawlina, W. (2016). *Ross Histología texto y Atlas* . Barcelona: Wolters Kluwer.
- Ponce, A. C. (2014). *Revision critica del diagnostico de orientacion en el estudio de las manchas de sangre*. Valencia.
- QUISPE SERGIO, F. A. (2014). *scielo*. Obtenido de [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2310-02652014000100010&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2310-02652014000100010&script=sci_arttext)
- Raffo, O. H. (1993). *La muerte violenta*. Buenos Aires: Universidad .

## Anexo

Imágenes de patrones hemáticos de cada cuadrante





