

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**TECNICAS DE VANGUARDIA PARA LA IDENTIFICACION DE MANCHAS
DE SANGRE EN UNA ESCENA DEL CRIMEN**

INFORME FINAL DEL TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD CURSO DE
ESPECIALIZACION

PRESENTADO POR:
WENDY IVETH AVELAR ACOSTA
NATALY ANDREA BRACETY TORRES

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

DICIEMBRE 2022

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIO INTERINO

MAESTRO. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL

M.Sc. ENA EDITH HERRERA SALAZAR

TRIBUNAL EVALUADOR

LICDA. LORENA MARGARITA RAMÍREZ MERCADO

LICDA. ANA LUISA CRUZ DE ALEGRÍA

TUTORA

M.Sc. NANCY ZULEYMA GONZALES SOSA

INDICE

	Pág. N°
Resumen	
Capítulo I	
1.0. Introducción	ix
Capítulo II	
2.0. Objetivos	
Capítulo III	
3.0. Marco teórico	14
3.1. Generalidades de la criminalística	14
3.1.1. La criminalística	14
3.1.2. Investigación criminal en la escena del crimen	14
3.2. Indicios biológicos	14
3.2.2. Manejo de indicios	15
3.3. Composición de la sangre	16
3.3.1. Manchas de sangre	17
3.4. Recolección y embalaje de muestras de sangre	18
3.5. Etiquetado de muestras con manchas sospechosas de sangre	20
3.6. Pruebas de orientación para la detección de manchas de sangre en escenas del crimen	20
3.6.1. Pruebas más comunes para la orientación de manchas de sangre en escenas del crimen	20
Capítulo IV	
4.0. Diseño metodológico	26
4.1. Tipo de estudio	26
4.2. Investigación bibliográfica	26
4.3. Desarrollo	26

Capítulo V	
5.0. Propuesta de práctica de laboratorio	28
Capítulo VI	
6.0. Conclusiones	47
Capítulo VII	
7.0. Recomendaciones	49
Bibliografía	
Anexos	

RESUMEN

Uno de los principales problemas sociales son los crímenes, como asesinatos, violaciones, secuestros, robos, etc.; en los cuales es muy probable que ocurra una lesión que puede provocarle la muerte ya sea a la víctima o al agresor, por lo que, el análisis químico forense se ha convertido en una herramienta elemental para la investigación de dichos hechos delictivos por medio de la identificación de evidencias, utilizando diferentes métodos de análisis forense.

El objetivo de esta investigación fue proponer técnicas de vanguardia para la identificación de manchas de sangre encontradas en una escena del crimen, para ello se estudiaron dos técnicas utilizadas en el análisis forense, que son la prueba de Thevenon Roland o Piramidon y la prueba de Precipitinas, las cuales son de orientación y confirmación de manchas hemáticas respectivamente.

Para realizar esta investigación se hizo uso de un estudio bibliográfico y documental, ya que se revisó información de fuentes bibliográficas confiables de diferentes repositorios institucionales, para que este trabajo sea una referencia para próximas investigaciones referentes al tema.

El resultado de este trabajo se refleja en el diseño de una práctica de laboratorio que muestra las técnicas de identificación y confirmación de manchas de sangre, que será de utilidad para los estudiantes de la asignatura Química Forense y Toxicología de la Licenciatura en Química y Farmacia. Con lo cual se pretende recomendar el diseño de otros cursos de Especialización que fomenten la aplicación y diseño de nuevas técnicas de análisis forense. Este proyecto se desarrolló como producto final del Curso de Especialización de Análisis Químico Aplicado a la Investigación Criminal de la Facultad de Química y Farmacia de La Universidad de El Salvador, ejecutándose en un periodo de seis meses bajo la modalidad a distancia.

De acuerdo a lo investigado, se concluye que, las técnicas estudiadas son apropiadas para realizar un análisis forense para el indicio biológico que es la

sangre, para su identificación y confirmación. Además, dichas técnicas, pueden ser una pauta para implementar otros estudios con respecto a la identificación de indicios biológicos.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0. INTRODUCCION

El mes de marzo fue catalogado como el más violento del año 2022 en El Salvador, debido a la gran cantidad de crímenes que se cometieron, entre ellos asesinatos, homicidios, secuestros y violaciones sexuales; para la investigación y procesamiento de dichos crímenes, hoy en día es necesaria la ciencia criminalística, ya que es un campo sumamente amplio y sus estudios son aplicados para la reconstrucción de la escena de los hechos, y con ello facilitar la obtención de los resultados que esclarezcan los hechos criminales.

Según el Manual de Procesamiento de la Escena del Delito, una escena del crimen es el lugar donde se ha cometido el hecho delictivo, donde se encuentra gran cantidad de indicios biológicos, los cuales son caracterizados como perecederos, por lo que, es importante su buen manejo e identificación.

Dentro de la gama de indicios biológicos que se pueden encontrar en una escena del crimen están: semen, saliva, orina, sangre, entre otros. La sangre es la que ocupa una posición predominante en el lugar del delito, ya que en un hecho de violencia es muy factible que se produzcan lesiones en cualquiera de los sujetos implicados en el crimen.

El estudio y análisis de indicios representan una base para reconstruir lo que sucedió en un hecho delictivo. En esta investigación se estudió la sangre como indicio biológico, recolección y embalaje de manchas hemáticas encontradas en una escena del crimen y la importancia que tiene la química forense en la implementación de técnicas de vanguardia.

Las técnicas investigadas fueron la prueba de Thevenon Roland o Piramidon, que sirve para la orientación de manchas de sangre, también la prueba de Precipitinas para la confirmación del origen de manchas con sospecha de ser sangre humana. Estas técnicas tienen la ventaja de que pueden ser utilizadas para identificar manchas de sangre sobre diferentes soportes, como objetos sólidos, tela, madera, tierra, paredes, entre otros.

Además, se diseñó una propuesta de práctica de laboratorio, la cual será de utilidad para los estudiantes que cursan la asignatura de Química Forense y Toxicología de la Licenciatura en Química y Farmacia. Este proyecto se desarrolló como producto final del Curso de Especialización de Análisis Químico Aplicado a la Investigación Criminal de la Facultad de Química y Farmacia de La Universidad de El Salvador ejecutándose en un periodo de seis meses bajo la modalidad a distancia.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Investigar técnicas de vanguardia para la identificación de manchas de sangre en una escena del crimen.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Buscar fuentes bibliográficas que contengan información relacionada a nuevas técnicas que ayuden a la identificación de manchas de sangre, encontradas en una escena del crimen.

2.2.2. Seleccionar la información mediante la lectura y análisis del material recopilado, acerca de los indicios biológicos específicamente sangre.

2.2.3. Realizar una propuesta de práctica de laboratorio, para la identificación de manchas de sangre en diferentes soportes, que se encuentran en una escena del crimen de campo abierto.

CAPITULO III
MARCO TEÓRICO

3.0. MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades de la criminalística

3.1.1. La criminalística

Es una ciencia que se aplica a la investigación criminal. Es decir, a la investigación de crímenes. Pero aquí hay que matizar este término y conocer el significado de «crimen». En el lenguaje común se suele entender como un delito en el que parece que debe haber implicada una muerte. No obstante, tiene un sentido más amplio, el de delito grave y, desde el punto de vista legal, es toda conducta, acción u omisión tipificada por la ley que resulta antijurídica y punible.¹

El objetivo primordial de la criminalística es la investigación de los indicios biológicos o las evidencias físicas dentro de la escena del crimen.

Pero ¿a qué se refiere cuando se menciona la escena del crimen?, es toda área o espacio físico, donde se ha cometido un hecho delictivo. En esta área o espacio se requiere de una investigación de parte de las autoridades de seguridad, para así realizar una investigación científica del crimen con el fin de reconstruir los hechos.²

3.1.2. Investigación criminal en la escena del crimen

Para dar inicio a la investigación criminal se debe de seguir una serie de pasos en la escena del crimen. Los pasos para esta investigación consisten en la protección del lugar, observación del lugar, fijación del lugar, recolección de indicios y el envío de los mismos al laboratorio.

Edmond Locard expone que, cuando personas y objetos entran en contacto, siempre hay una transferencia entre ellos, todo contacto deja su rastro. Lo que expertos criminalistas y médicos forenses denominan indicios.²

3.2. Indicios biológicos

Se considera como un indicio biológico a toda sustancia sólida o líquida que proviene directamente del cuerpo de una persona y que en su interior contiene

un resto de células, las cuales pueden ser identificadas por medio de pruebas químicas en una escena del crimen.

3.2.1 Podemos encontrar indicios en:

- El lugar de los hechos.
- En el cuerpo de la víctima.
- En el cuerpo del victimario.
- En zonas aledañas.

3.2.2. Manejo de indicios²

El manejo de indicios es esencial en el procesamiento de escenas del crimen, se debe evitar la contaminación de estos, ya que puede llevar a confusión de la reconstrucción los hechos.

El mal manejo de los indicios conduce a su contaminación, deterioro o destrucción, y esto impide su posterior examen en el laboratorio. Deben utilizarse técnicas adecuadas, según sea el indicio, para su recolección. Por ejemplo:

- Deben manipularse lo menos posible, para evitar contaminación o destrucción.
- Se debe recolectar una cantidad numerosa como muestra de cada una de las evidencias, parte de ellas se consumen en el análisis de laboratorio.
- Evitar contaminarla con los instrumentos que se utilizan para su levantamiento, los cuales deberán ser lavados meticulosamente antes y después de su uso.
- Levantarla por separado, evitando mezclarla.
- Marcarla en aquellos sitios que no ameriten estudio ulterior.

Los indicios biológicos comúnmente encontrados en la escena del crimen son la sangre, el semen, el suero, la saliva, orina, heces, vómito, entre otros. Para efectos de esta investigación se tomará como objeto de estudio la sangre.

3.3. Composición de la sangre ³

La sangre es un componente líquido que posee diferentes elementos que contribuyen a su identificación; es de color rojo brillante o escarlata cuando está oxigenada, o de un tono azulado cuando es desoxigenada.

La sangre está formada por plasma que ocupa aproximadamente el 55% del volumen total y por elementos en suspensión donde están las células sanguíneas que ocupan el 45% restante. Los 3 elementos corpusculares de la sangre son: leucocitos (glóbulos blancos), plaquetas y eritrocitos (glóbulos rojos), todos ellos son de gran interés forense.

- Leucocitos: También denominados glóbulos blancos o formula blanca, los cuales carecen de pigmentos a diferencia de los eritrocitos. En el hombre promedio hay unos 75,000,000,000 leucocitos en total. Una de las características de los leucocitos es que son el principal componente celular de las respuestas inflamatorias e inmunitarias. Sin embargo, para el área forense, los leucocitos son células muy importantes para determinar la identidad de un individuo, puesto que presentan núcleo, mitocondrias y otros organelos. Es decir, por ser células nucleadas, contienen información genética de la cual se puede realizar una extracción de ADN; también presentan mitocondrias y de las cuales se puede obtener ADN mitocondrial; de esta forma es posible identificar a un individuo o simplemente relacionarlo con un hecho delictivo.
- Plaquetas: Son fragmentos a nucleares que se forman a partir de los megacariocitos; cabe mencionar que las plaquetas carecen de ADN, pero contienen ARN mensajero. Estas células participan en la hemostasia primaria y en la reparación del endotelio, también participan en el proceso de formación de placas de ateroma.
- Eritrocitos: Son células sin núcleo que se originan a partir de la médula ósea y contienen una proteína transportadora de oxígeno llamada

hemoglobina. Estas células brindan mantenimiento de la vida en un proceso conocido como la respiración celular.

- Hemoglobina (Hb): Proteína globular cuaternaria, que es el componente fundamental de los eritrocitos o glóbulos rojos, da el soporte en la transferencia de O_2 de los pulmones a los tejidos periféricos y también es la encargada de transportar CO_2 de los tejidos hasta los pulmones para su posterior excreción. Otra función de la hemoglobina, es mantener el pH sanguíneo. La hemoglobina presenta 4 cadenas polipeptídicas, cada una contiene un grupo prostético denominado Hem. El grupo Hem, es un tetrapirrol cíclico que les proporciona el color rojo a los hematíes. El átomo de hierro presente en la hemoglobina, se encuentra en estado de oxidación ferroso y puede formar 5 o 6 enlaces dependiendo la unión del oxígeno a la Hb. Cuatro de estos enlaces, se producen con los nitrógenos pirrólicos de la porfirina en un plano horizontal. El quinto enlace se realiza con el nitrógeno del imidazol de una histidina denominada histidina proximal. Por último, el sexto enlace del átomo ferroso es con el O_2 , que a su vez está unido a un segundo imidazol de una histidina denominada histidina distal.

3.3.1. Manchas de sangre²

Una mancha es toda perturbación que modifica el color de una superficie o deposita otra sustancia sobre ella. Podemos encontrarlas de distintos colores rojo, negro, café, amarillos hasta transparentes según el tiempo que tengan y si han sido lavadas.

Las manchas sanguíneas son el objeto de estudio de la hematología forense, estudia su mecanismo de producción, su forma, extensión, situación, tamaño, color, aspecto, cantidad y orientación.

La investigación de manchas de sangre es una parte importante de la investigación criminalística. En estas manchas se estudia:

- Orientación.
- Certeza
- Especie
- Individual

La información que podemos obtener de un análisis de una mancha de sangre es la siguiente:

- La distancia de la sangre al blanco u objetivo
- Dirección de la sangre y los ángulos de impacto
- Qué tipo de arma se utilizó.
- Secuencia de los hechos.

3.4. Recolección y embalaje de muestras de sangre⁴

Según el Dr. Rafael Moreno González, es imprescindible la protección y conservación del lugar de los hechos, y debe entenderse como la piedra fundamental de la investigación criminalística; para ello es necesario que se haya respetado el lugar, y que se haya fijado la evidencia, además de levantarse y embalarse de forma adecuada.

Por ello, se deben seguir ciertos pasos para tomar las muestras de sangre en el lugar de los hechos, luego de que se han fijado mediante la descripción, la planimetría y fotografía:

a) En caso de encontrar sangre líquida:

- Debe tomarse con ayuda de una pipeta Pasteur o de un gotero.
- Luego se deposita en un tubo de ensayo limpio y seco.
- Añadir al tubo de ensayo con la muestra 1 mL de solución salina estéril por cada 5 mL de sangre.

b) En caso de encontrar coágulos:

- Con el extremo de un aplicador de madera tomar los coágulos
- Colocarlos en el interior de un tubo de ensayo, procediendo después como en el caso anterior.

c) En caso de encontrar solo manchas secas en objetos sólidos:

- Levantar las muestras con pequeños fragmentos de 2 x 2 cm de tela blanca y limpia humedecidos con solución salina al 0.85%
- Colocar la tela en un tubo de ensayo para su posterior envío al laboratorio.
- Tomar una muestra de control con un fragmento de tela preparado de la misma forma, de una zona del soporte que no se encuentre manchada de sangre.

d) Manchas sobre tela:

- Recortar porciones representativas de la muestra.
- Recortar también un trozo de la misma tela, problema que no esté manchado con sangre.

e) Manchas sobre vegetales:

- Recortar el trozo manchado con sangre y colocar en el interior de un sobre.
- Recoger una porción no manchada del vegetal y colocarla en otro sobre.

f) Sangre sobre tierra o arena:

- Esta debe recogerse tomando un trozo completo del soporte.
- Depositarlo cuidadosamente en una bolsa de plástico y colocarla en una caja de cartón.
- Tomar una muestra de tierra sin sangre y empacar por separado.

g) Muestra de sangre impregnada en cabellos:

- Tomar los cabellos con una pinza.
- Colocar en pequeñas bolsas de plástico y trasladar al laboratorio

h) Manchas de sangre presentes en el cuerpo de la víctima y de las que se sospeche no pudieran ser originadas por su propia sangre:

- Tomar las muestras como se describe en el literal "c".
- Tomar muestras de sangre del cadáver, a fin de compararla con la de las manchas.

i) Para manchas asentadas en superficies porosas (este método se recomienda solo para manchas muy concentradas):

- Se procede al raspado mediante una hoja de bisturí desechable,
- Se recogen las escamas en una hoja de papel que se dobla y etiqueta perfectamente.^{5,6}

3.5. Etiquetado de muestras con manchas sospechosas de sangre⁴

Todo tipo de muestras deben llevar etiquetas muy bien adheridas, en las que se anotan los datos concretos del caso a investigar, los cuales son:

- Número de averiguación o expediente.
- Fecha y hora en que se levantó la evidencia.
- Sitio de donde se recolectó
- Naturaleza presunta del indicio.
- Nombre del investigador que realizó el levantamiento y el embalaje.

3.6. Pruebas de orientación para la detección de manchas de sangre en escenas del crimen⁶

Dentro de estas podemos encontrar las pruebas coloreadas y pruebas de quimioluminiscencia para la detección de manchas de sangre, estas se basan en la capacidad potencial que posee el grupo "Hem" de la hemoglobina para ejercer la actividad peroxidasa, aportando al sistema reaccionante, peróxido de hidrógeno, induciendo el desprendimiento del oxígeno por descomposición del peróxido, el cual actúa sobre un sustrato orgánico reducido, transformándolo en su forma oxidada cromática. (Ver Anexo N°1).

3.6.1. Pruebas más comunes para la orientación de manchas de sangre en escenas del crimen.

- El Reactivo de Adler: Utiliza la solución de Bencidina en medio acético o etílico. En presencia de sangre da una tonalidad azul verdosa, por formación del azul de la bencidina. El uso de este reactivo está casi totalmente descartado debido a sus características cancerígenas.⁶

- Luminol: Comúnmente utilizada por su característica de ser luminiscente, es un sólido verdoso, poco soluble, es altamente sensible a manchas que han sido lavadas con la desventaja que, también es reactivo cancerígeno o solo puede utilizarse en zonas oscuras, además, esta reacción puede dar lugar a falsos positivos con limpiadores como la lejía.
- Fenolftaleína o prueba de Kastle Mayer: Este se aplica sobre la mancha y da una coloración rosa violeta como indicativo que la mancha encontrada es sangre.

3.7. Técnicas innovadoras para la orientación y confirmación de manchas de sangre en una escena del crimen.

3.7.1. Reacción de Thevenon Roland o también llamada Piramidon. ⁷

Es una disolución etanólica a base del reactivo piramidon, el cual, se le añade ácido acético y unas gotas de peróxido de hidrógeno, dando una coloración violeta, que es positivo para la identificación de manchas de sangre.

Esta técnica se lleva a cabo mediante reacciones redox para la detección de catalasas, peroxidasas y agentes óxido-reductores (El hierro presente en la hemoglobina), tienen la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno, en agua y oxígeno, este oxida la aminofenazona y cambia de color (incolore – violeta o morado), el ácido acético es utilizado en la reacción para dar estabilidad y en algunos casos, rompe los lisosomas liberando las peroxidasas y catalasas de cualquier tipo de células.

La aminofenazona (sustrato), se oxida por acción del hierro presente en el grupo Hem de la hemoglobina, que descompone el peróxido de hidrógeno en agua más oxígeno, y este oxígeno se adhiere a la aminofenazona coloreándola por algunos segundos. Adicionalmente, el medio ácido es requerido para garantizar la máxima estabilidad de los productos formados en la reacción (pH de 4-5 aproximadamente), contribuyendo con el tiempo de desarrollo del color del sustrato. El cambio de color del sustrato utilizado en estas técnicas se debe

al paso de su forma oxidada de la leucobase a la forma reducida, base coloreada, debido a la descomposición del peróxido de hidrógeno.

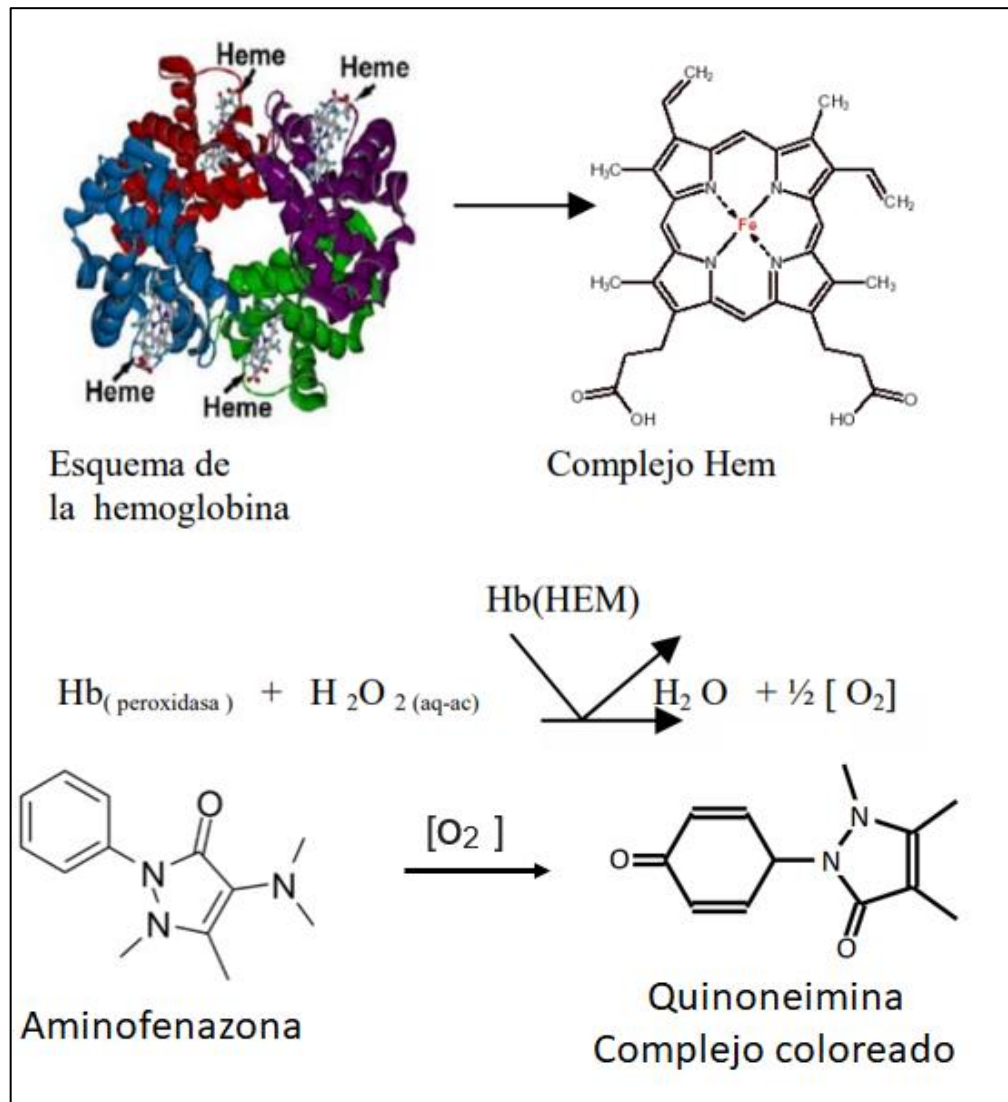


Figura N° 1. Reacción química de la prueba Thevenon Roland o Piramidon.⁶

3.7.2. Limitaciones, ventajas y desventajas de la reacción Thevenon Roland Piramidon.

Limitaciones

- Si se utiliza en tela de color, los reactivos utilizados en la prueba pueden decolorarla y se puede pensar que es mancha de sangre cuando en realidad no lo es.
- En rábano y remolacha se recomienda no usar esta prueba, ya que el color es similar a la sangre dando como resultado, falsos positivos.
- El pH de la reacción debe ser entre 4-5.

Ventajas

- Es una prueba rápida
- Bajo costo
- Fácil de aplicar
- No requiere de equipos sofisticados para su lectura
- Es altamente sensible
- Los reactivos son muy estables por varios días

Desventajas

- Solo se puede utilizar si la mancha con sospecha de sangre es visible
- Se necesita del ácido acético para su estabilidad.⁷

3.7.3. Reacción de precipitinas

Esta reacción antígeno – anticuerpo consta de varias etapas, inicialmente se forma un complejo soluble, luego al pasar el tiempo el complejo empieza a unirse, rápidamente se forman partículas del tamaño suficiente como para ser insolubles y formar un precipitado fácilmente observable en la interfase entre los dos líquidos en un tubo de ensayo o en un capilar, también puede hacerse sobre gel por medio del fenómeno de difusión entre las partes reaccionantes o bien por el método de electroforesis. (Ver Anexo N°1)

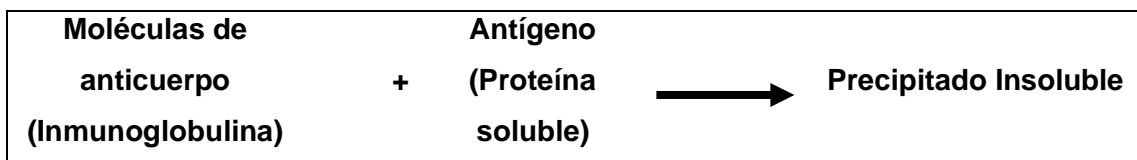


Figura N° 2. Reacción química de la prueba de Precipitinas.⁵

Esta reacción está influenciada por varias fuerzas como lo son: las fuerzas de Vander Walls, puentes de hidrógeno, interacción de dipolos, atracción entre los antígenos no polares y la superficie del anticuerpo, y la atracción electrostática.

Para que esta reacción se lleve a cabo se requiere que la concentración del antígeno y del anticuerpo sean equivalentes, ya que un exceso de alguno podría producir un resultado negativo.⁴

Factores que afectan de la prueba de precipitinas⁵

- La edad de la muestra
- La exposición a la luz solar, aire y la humedad
- Las altas temperaturas debido a que, puede provocar la desnaturalización de las precipitinas.
- El grado de putrefacción
- La contaminación con compuestos químicos.
- Las reacciones deben llevarse a cabo en condiciones de temperatura, pH, solubilidad de la muestra y de la dilución del extracto obtenido de ella.
- El agua y el jabón interfieren en los resultados positivos, debido a la presencia de sales de sodio y sulfonatos.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. Tipo de estudio

Bibliográfico:

Se realizó una búsqueda exhaustiva, principalmente en fuentes digitales, de información relacionada al tema de interés, el cual fue la identificación de manchas de sangre en escenas del crimen.

Documental:

La investigación bibliográfica permitió la recopilación de información que quedó plasmada, con el propósito de ser considerado como antecedente de futuras investigaciones de estudiantes que cursaran la asignatura de Química Forense y Toxicología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y para la población en general que esté interesada en el tema.

4.2. Investigación Bibliográfica

La investigación se llevó a cabo en las siguientes bibliotecas:

- Biblioteca central del campus de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Virtual de la Universidad de El Salvador y base de datos pertenecientes al sistema bibliotecario universitario.
- Repositorio Institucional de la Universidad Mayor de San Andrés.
- Repositorio Institucional de la Universidad Rafael Landívar
- Página Web de la Fiscalía General de la República

4.3. Desarrollo

Debido a que la investigación que se desarrolló es de carácter bibliográfico, esta se ejecutó en etapas, con la finalidad de seleccionar el material bibliográfico de mayor utilidad para los fines de esta investigación. Las etapas se dividieron de la siguiente manera:

- Búsqueda del material bibliográfico relacionado a las técnicas de vanguardia para la identificación de manchas de sangre en una escena del crimen.
- Selección y depuración del material consultado para la estructuración del documento escrito.
- Diseño de una práctica de laboratorio: Esta última etapa incluyó el diseño y estructuración de la Propuesta de Práctica de Laboratorio, basada en los lineamientos proporcionados como parte de los materiales de apoyo del Curso de Especialización de Análisis Químico Aplicado a la Investigación Criminal (ver anexo N° 2), tal propuesta constituye el capítulo V del informe final del presente trabajo de investigación y que se presenta a continuación.

CAPITULO V
PROPUESTA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
CURSO DE ESPECIALIZACIÓN
“ANÁLISIS QUÍMICO APLICADO A LA INVESTIGACIÓN CRIMINAL”**

**TÉCNICAS DE VANGUARDIA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MANCHAS
DE SANGRE EN UNA ESCENA DEL CRIMEN.**



OBJETIVOS:

- Estudiar el fundamento de las pruebas de Thevenon Roland o Piramidón y Precipitinas para la orientación y confirmación de manchas de sangre encontradas en una escena del crimen.
- Realizar la identificación presuntiva y confirmativa de manchas de sangre encontradas en una escena del crimen.
- Identificar manchas de sangre utilizando el método de coloración en diferentes soportes que se pueden encontrar en una escena del crimen.

FUNDAMENTO TEÓRICO

En los delitos donde está implicada la violencia, la sangre constituye una prueba de gran valor y es la que se podría encontrar con más frecuencia, ya sea, en forma líquida o como una mancha en diferentes superficies del lugar donde se cometió el delito; estas pueden estar frescas, de color rojo vivo y al caer sobre una superficie absorbente se difunden fácilmente, cambiando su color con el paso de las horas, tomando un tono más oscuro o negruzco que ocurre por la transformación de la hemoglobina en hematina por acción del oxígeno del aire.

Toda mancha de sangre descubierta debe ser protegida de la contaminación, humedad y temperatura. En el caso de encontrar manchas de sangre en telas oscuras, la mancha puede tomar diferentes tonalidades y llegar al punto de confundirse. Si la sangre cae sobre un material poroso, como un ladrillo, cemento, madera, el color original también puede alterarse por la absorción del soporte.

Cuando la mancha se encuentra sobre un soporte no absorbente forma costras con aspecto de escamas brillantes y estas se pueden visualizar mejor con una luz indirecta. En casos en donde la mancha ha sido lavada con agua, el color se hace rosa, esto puede ser una causa de error en la investigación debido a que la presencia de sustancias como ácidos y detergentes modifican las características estructurales de las manchas. Sin embargo, hay manchas que

pueden parecer no ser sangre y al realizar diferentes análisis se comprueba que si es una mancha de sangre.¹

Una vez que llega la muestra al laboratorio, se le debe realizar pruebas preliminares, las cuales son muy sensibles, permite individualizar y discriminar el tipo de resto biológico ante el que se encuentre.

CONOCIMIENTOS PREVIOS

- Manejo de indicios biológicos
- Descripción de la composición de la sangre
- Conocimientos sobre química general, química analítica y reacciones redox.

MATERIALES

- Tubos de ensayo
- Gotero
- Agitador de vidrio
- Diferentes soportes (tela, madera, plástico, etc.)
- Tubo capilar
- Gradilla
- 2 Erlenmeyer
- 2 Balones volumétricos de 100 mL
- Papel indicador de pH
- Hisopos estériles

EQUIPO

- Centrifugadora
- Balanza analítica

REACTIVOS

- Peróxido de hidrógeno al 3%
- Ácido acético 0.3%
- Reactivo aminofenazona
- Etanol
- Solución salina fisiológica
- Inmunoglobulina
- Antisuero humano precipitante
- NaOH 0.1%
- HCl 0.1%
- Agua destilada

Preparación de reactivos (ver anexo N°1)

PRUEBAS PRELIMINARES PARA EL ESTUDIO DE LA SANGRE

Prueba de orientación

Reacción de Thevenon Roland - Piramidon

Esta técnica se lleva a cabo mediante reacciones redox para la detección de catalasas, peroxidasas y agentes óxido-reductores (El hierro presente en la hemoglobina), tienen la capacidad de descomponer el peróxido de hidrogeno, en agua y oxígeno, este oxida la aminofenazona y cambia de color (incolore – violeta o morado), el ácido acético es utilizado en la reacción para dar estabilidad y en algunos casos rompe los lisosomas liberando las peroxidasas y catalasas de cualquier tipo de células.¹

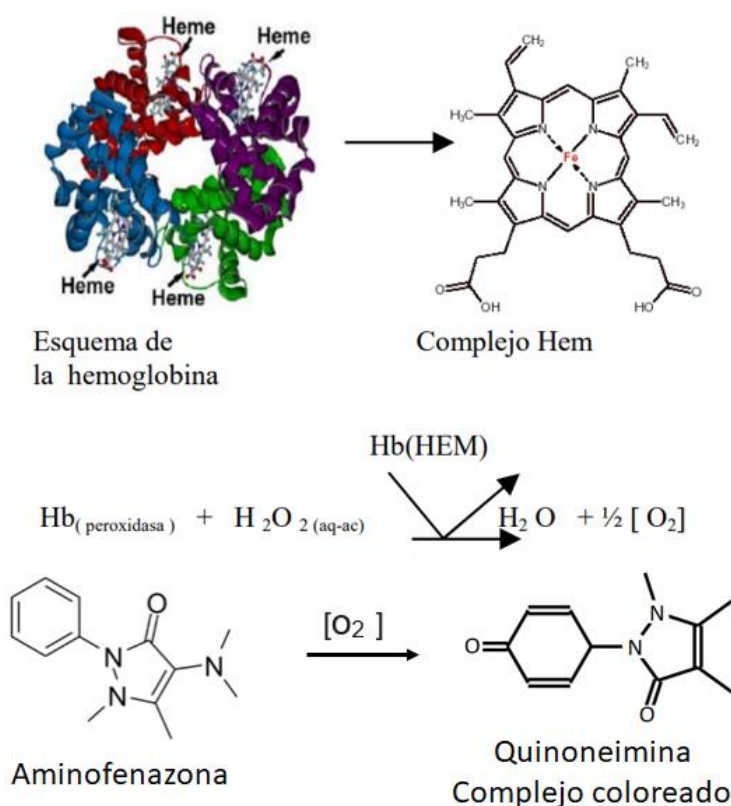


Figura N°1. Reacción química de la prueba Thevenon Roland o Piramidon.²

PRUEBA DE CERTEZA O CONFIRMACIÓN

Reacción de precipitinas ³

Esta reacción antígeno – anticuerpo consta de varias etapas, inicialmente, se forma un complejo soluble, luego al pasar el tiempo el complejo empieza a unirse, rápidamente se forman partículas del tamaño suficiente como para ser insolubles y formar un precipitado turbio y blanquecino fácilmente observable en la interfase entre los dos líquidos en un tubo de ensayo o en un capilar, también puede hacerse sobre gel por medio del fenómeno de difusión entre las partes reaccionantes o bien por el método de electroforesis.

Fundamento de la técnica Las moléculas del anticuerpo (inmunoglobulina) reacciona con el antígeno (proteína soluble) para formar un precipitado

fácilmente visible bajo condiciones de luz apropiadas y a las concentraciones equivalentes de antígeno y de anticuerpo.

Esta reacción antígeno-anticuerpo está influenciada por varias fuerzas, interactuando entre los factores reaccionantes como lo son: las fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacción de dipolos, atracción entre los antígenos no polares y la superficie del anticuerpo, y la atracción electrostática.

La reacción misma tiene lugar en varias etapas. Inicialmente se forma un complejo antígeno-anticuerpo soluble; conforme la reacción prosigue, ese complejo empieza a unirse y forma una tupida red compuesta de moléculas de anticuerpo bivalente y moléculas de antígeno polivalente. Esta Formación crece rápidamente formando partículas del tamaño suficiente como para ser insolubles y formar un precipitado visible. Debe tenerse en mente que para que la reacción se lleve a cabo se requiere que la concentración del antígeno y del anticuerpo sean equivalentes.

La técnica de precipitinas en tubo o en capilar, tiene la ventaja de ser rápida y sencilla, pero es necesario tener una muestra sin turbidez. En ella debe efectuarse una cuidadosa estratificación en donde la capa de la solución del antígeno se encuentra sobre la preparación del anticuerpo.³

Para obtener el antisuero humano se inyecta sangre humana en un animal, que suele ser un conejo o un ratón. Ante este elemento extraño (la sangre humana) el animal forma anticuerpos específicos, que se encuentran en su suero sanguíneo. Después se extrae sangre del animal y se aísla el suero, ya que contiene anticuerpos capaces de reaccionar de forma específica con antígenos humanos. Si una muestra de sangre desconocida es humana, al ponerla en contacto con el antisuero humano dará lugar a un precipitado en forma de depósito turbio.⁴

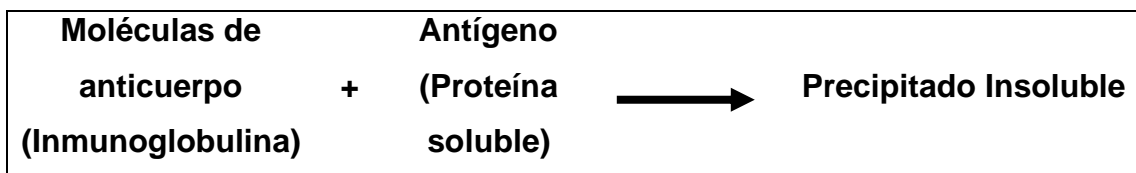


Figura N° 2. Reacción química de la prueba de Precipitinas.³

PROCEDIMIENTO

Prueba de orientación Thevenon Roland o Piramidon (Ver Anexo N° 2)

Control positivo

NOTA. No trabajar directamente sobre el soporte donde se encuentra la mancha.

1. Impregnar un hisopo de madera en solución salina
2. Tomar la muestra con el hisopo, girándolo en el soporte donde se encuentre la mancha de sangre.
3. Colocar el hisopo con la muestra en un tubo de ensayo que contenga solución salina.
4. Dejar reposar por 5 minutos para extraer la sangre a la solución salina
5. Agregar 5ml de reactivo piramidon a la solución salina que contiene la muestra.
6. Agregar unas gotas de ácido acético al 0.3%
7. Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3%
8. Observar coloración resultante y registrar el resultado.
9. Hacer el mismo procedimiento con la muestra

Tabla de resultados

Tabla N° 1. Resultados de la prueba de Thevenon Roland o Piramidon.

	Control positivo	Muestra
Color	Violeta	

Prueba de confirmación de precipitinas en capilar.³ (Ver Anexo N° 3)

1. Frotar un hisopo estéril humedecido con solución salina fisiológica sobre la superficie o soporte a investigar.
2. Extraer en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm. con unas gotas de solución salina fisiológica; el tiempo requerido dependerá de la naturaleza de la mancha; normalmente se requieren de 1 a 2 minutos.
3. Determinar el pH con papel indicador; si la reacción no es neutra, neutralizar con NaOH al 0.1% si la reacción es ácida hasta lograr un pH neutro, o con HCl al 0.1 % si es alcalina.
4. Centrifugar la muestra si existen partículas en suspensión o turbidez, hasta obtener un líquido transparente y utilizar el sobrenadante.
5. La dilución de la muestra problema deberá tener una concentración de 1 en 1000, misma que se controlará con un testigo a la misma dilución.
6. Colocar dos gotas del extracto diluido en un tubo capilar (de tal forma que el líquido humedezca la pared del tubo, por lo que es preferible hacer esto con el capilar inclinado).
7. Adicionar una cantidad igual de antisuero en el mismo capilar de una manera que quede abajo del extracto de la muestra. El tubo se fija perpendicularmente sobre un soporte.
8. Observar con luz indirecta y sobre fondo oscuro, la aparición de un anillo de precipitación blanquecino en la interfase de los dos líquidos indica reacción positiva.
9. El resultado es considerado positivo si la precipitación aparece antes de 20 minutos, después de ese tiempo el resultado deja de ser confiable.

NOTAS

- Tener en cuenta que, los análisis deben realizarse en las primeras 24 horas de haber recolectado los indicios (manchas de sangre), para evitar la contaminación y por consiguiente un resultado erróneo.
- Recordar que, para realizar las técnicas propuestas para la identificación de manchas de sangre, debe verificarse que no se haya alcanzado la fecha de caducidad de los reactivos, para evitar falsos positivos o falsos negativos en las pruebas que se realicen.

BIBLIOGRAFIA

1. Arbelaez Murillo, Luisa Fernanda; Rios Herrera, Linda Sorieth; Validación De Los Métodos Bluestar Forensic Free Y Thevenon Roland - Piramidon Como Pruebas Preliminares En La Investigación De Sangre De Interés Forense, LIBIF – INML y CF P [Internet] Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Carrera de Bacteriología, Bogotá D.C. Julio de 2009. Disponible en:
https://www.bluestarforensic.com/wpcontent/uploads/2020/09/tesis327_c_o.pdf
2. Apaza NC. Valoración De Dos Métodos Colorimétricos Para La Detección De Sangre En Manchas Secas En Diferentes Soportes Y Condiciones Ambientales Con Fines Forenses [Internet]. [La Paz-Bolivia]: Universidad Mayor De San Andrés; 2008. Disponible en:
<https://Repositorio.Umsa.Bo/Bitstream/Handle/123456789/631/TN-1027.Pdf?Sequence=1&Isallowed=Y>
3. Ambriz MF. Hematología Forense Y Otras Técnicas Serológicas [Internet]. México: Editorial Porrúa; 2002. Disponible en:
<https://www.ilustracionjuridica.com/producto/hematologia-forense-martha-franco-de-ambriz-pdf/>
4. Pilar Cornago Ramírez SES. Química Forense [Internet]. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia; 2016. Disponible en:
<https://elibro.net/es/lc/biblioues/titulos/48853>

ANEXOS

ANEXO N° 1

**PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE THEVENON
ROLAND PIRAMIDON Y PRECIPITINAS**

Preparación de 1000mL de Ácido acético 0.3% V/V

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} = \frac{0.3\% \times 1000ml}{99.8\%} = 3ml \text{ de ácido acético glacial}$$

Medir 3 mL de Ácido acético glacial transferir a un balón volumétrico de 1000 ml y diluirlo con agua destilada hasta llegar a la marca de aforo. Envasar en un frasco de plástico, para su uso en la práctica envasar en varios frascos de vidrio ámbar con gotero.

Preparación de 100mL de Peróxido de hidrógeno al 3% V/V

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} = \frac{3\% \times 100ml}{30\%} = 10ml \text{ de peróxido de hidrógeno}$$

Medir 10 mL de Peróxido de Hidrógeno al 30% y diluirlo a 100 mL con agua destilada en balón volumétrico. Envasar en un frasco de plástico, para su uso en la práctica envasar en varios frascos de vidrio ámbar con gotero.

Preparación de 100mL de reactivo de piramidon P/V

Aminofenazona	1.33g
Etanol al 90%	100ml

Pesar 1.33g de aminofenazona 100%, agregar 100ml de etanol al 90%. Mezclar y trasladar la solución a un frasco de vidrio ámbar.

Preparación de 100 mL NaOH 0.1% P/V

- Realizar procedimiento en cámara de extracción de gases.
- Pesar 100 mg de NaOH en una balanza analítica
- Agregar aproximadamente 40 mL de agua destilada a un balón volumétrico de 100 mL.
- Agregar los 100 mg de NaOH previamente pesados.

- Aforar con agua destilada hasta la marca y agitar cuidadosamente.

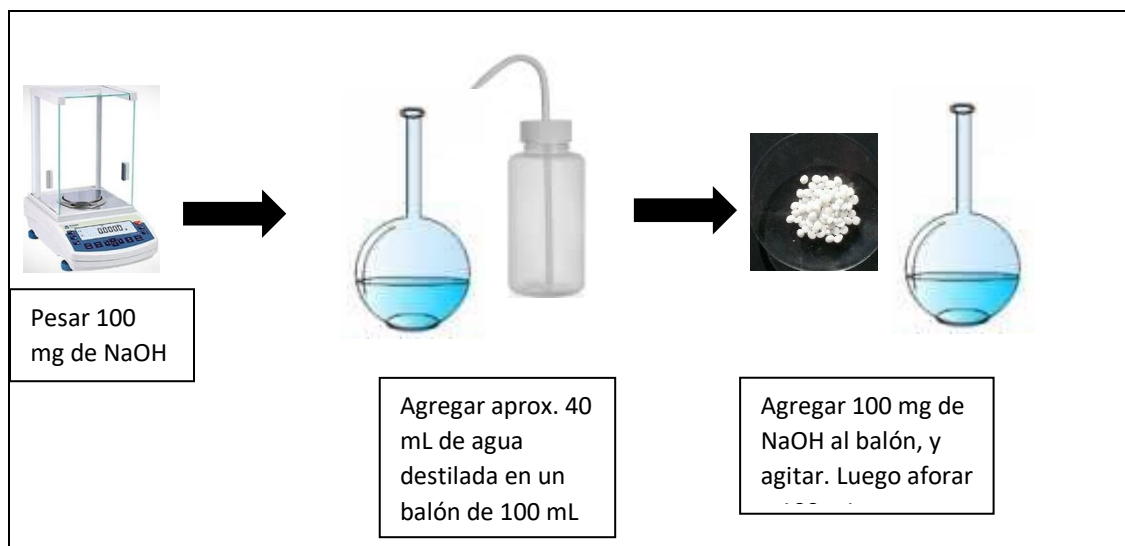


Figura N° 1. Preparación de NaOH 0.1%

Preparación de 100 mL HCl 0.1% V/V

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

A partir de ácido clorhídrico concentrado (37%)

$$V_1 = \frac{(0.1\%)(100\text{mL})}{37\%} = 0.27 \text{ mL de HCl}$$

1. En cámara de extracción de gases, tomar con una micropipeta aproximadamente 0.27 mL de HCl concentrado.
2. Agregar la alícuota de HCl concentrado en un balón volumétrico de 100 mL y aforar con agua destilada.

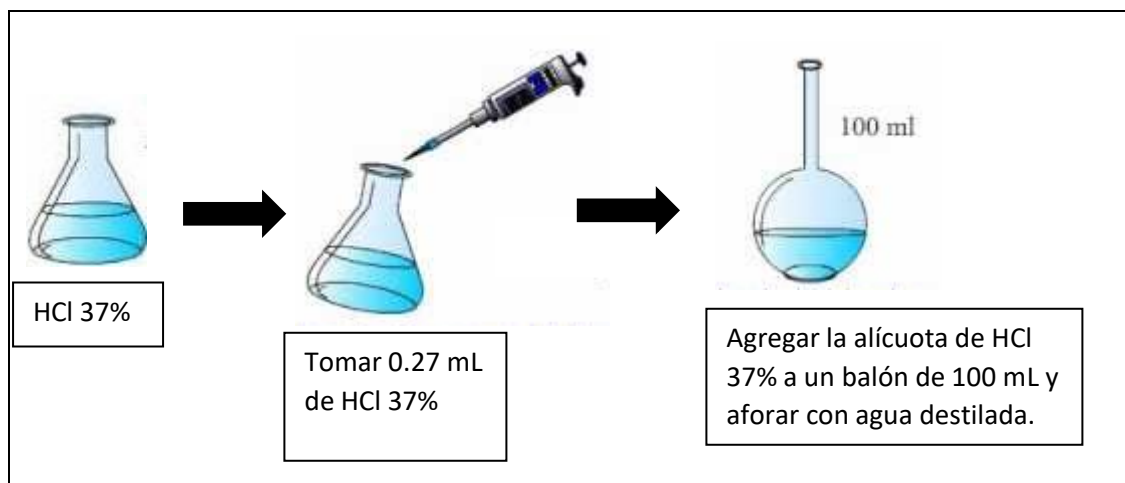


Figura N° 2. Preparación de HCl 0.1%

Se recomienda contar con la hoja de seguridad de cada reactivo para ambas prácticas.

ANEXO N°2

**ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA DE THEVENON
ROLAND O PIRAMIDON**

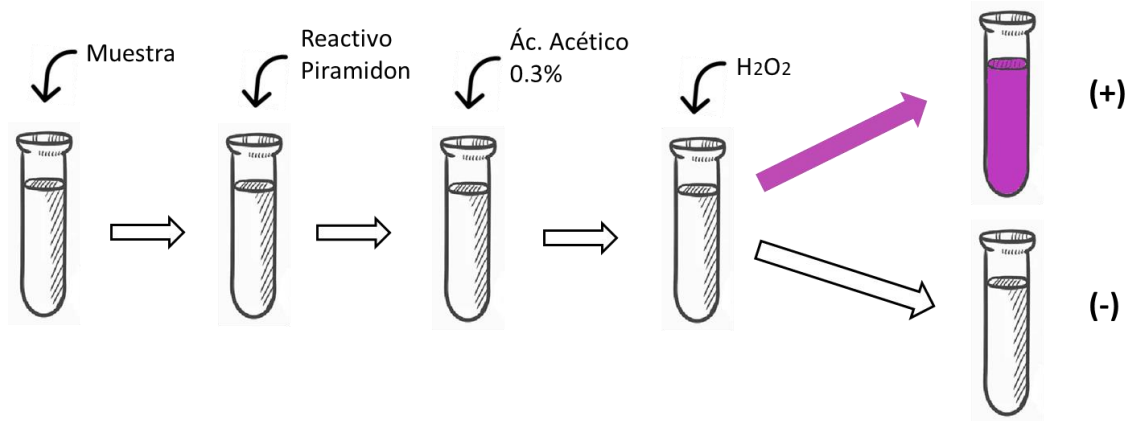


Figura N° 3. Esquema de la Prueba de orientación Thevenon Roland o Piramidon.

ANEXO N°3

ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA DE PRECIPITINAS

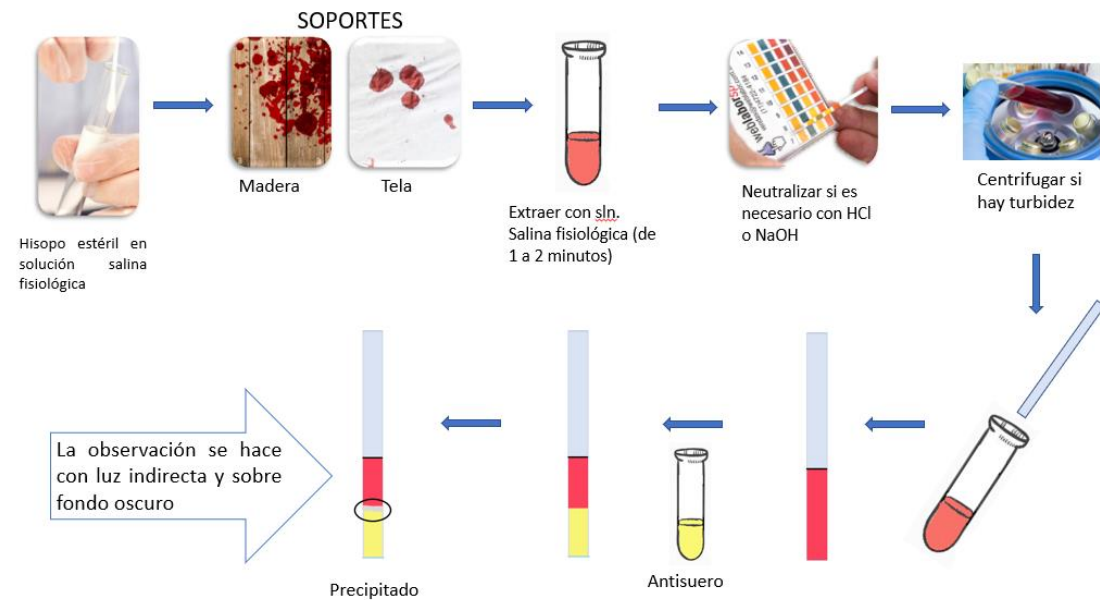


Figura N° 4. Esquema de la Prueba de Precipitinas en capilar.

**CAPITULO VI
CONCLUSIONES**

6.0. CONCLUSIONES

1. Como resultado de esta investigación, se logró cumplir el objetivo de diseñar una propuesta de práctica de laboratorio, que pueda ser implementada en el programa de la asignatura de Química Forense y Toxicología de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
2. La reacción de piramidon es una de las pruebas más apropiadas para la detección de manchas de sangre en la ciencia forense, debido a que es una reacción muy estable y puede ser utilizada para la identificación en diferentes soportes incluso hay estudios en los que se ha variado condiciones como la temperatura y esta prueba no se ve afectada.
3. La reacción de precipitinas es una de las pruebas más confiables para confirmar una mancha de sangre humana debido a su alta sensibilidad en pequeñas cantidades, en muestras de sangre diluidas o que han tratado de eliminarse lavando con agua y es capaz de identificar muestras de sangre seca.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0. RECOMENDACIONES

1. A las autoridades de la Facultad de Química y Farmacia, promover el diseño de otros Cursos de Especialización que fomenten la aplicación y diseño de nuevas técnicas de Análisis Químico Forense en la Investigación Criminal.
2. A la coordinación de Química Forense y Toxicología, gestionar la adecuación de los equipos, instrumentos y reactivos necesarios para que los estudiantes que cursan la asignatura puedan realizar prácticas de vanguardia.
3. A la coordinación de la Asignatura de Química Forense y Toxicología, que evalúen la propuesta presentada en este documento, a fin de que sea incorporada como práctica de laboratorio en el programa de la asignatura.
4. A los analistas, tener en cuenta que, los análisis deben realizarse en las primeras 24 horas de haber recolectado los indicios (manchas de sangre), para evitar la contaminación y por consiguiente un resultado erróneo.
5. A los analistas, recordar que, para realizar las técnicas propuestas para la identificación de manchas de sangre, debe verificarse que no se haya alcanzado la fecha de caducidad de los reactivos, para evitar falsos positivos o falsos negativos en las pruebas que se realicen.

BIBLIOGRAFIA

1. Pilar Cornago Ramírez SES. Química Forense [Internet]. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia; 2016. Disponible en: <https://elibro.net/es/lc/biblioues/titulos/48853>
2. Figueroa CMM. Técnicas Actuales Del Procesamiento De Manchas De Posible Sangre Encontradas En La Escena Del Crimen Y Su Comparación Con La Metodología Empleada En Guatemala [Internet]. [Guatemala]: Universidad Rafael Landívar; 2017. Disponible en: <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2017/07/03/Mus-Camila.pdf>.
3. Vera Acolt, E. M; Implementación De Los Métodos De Luminol Y O-Toluidina Para Detección De Sangre Y Comparación De Su Utilidad; [Internet] Universidad Veracruzana Instituto De Medicina Forense; Boca del Río, Veracruz 26 de mayo del 2014. Disponible en: <https://www.uv.mx/veracruz/mmf/files/2014/10/ERICA-MONTSERRAT-VERA-ACOLT-PROTOCOLO.pdf>
4. Ambriz MF. Hematología Forense Y Otras Técnicas Serológicas [Internet]. México: Editorial Porrúa; 2002. Disponible en: <https://www.ilustracionjuridica.com/producto/hematologia-forense-martha-franco-de-ambriz-pdf/>
5. Mora Díez P. Cuestiones Procesales Y Sustantivas Relativas A La Prueba De ADN En El Proceso Penal Español. Análisis Del Artículo 129 Bis Del Código Penal [Internet]. [Huelva]: Universidad De Huelva; 2021. Disponible en: http://rabida.uhu.es/dspace/bitstream/handle/10272/20137/Cuestiones_pr_ocesales.pdf?sequence=2
6. Apaza Nc. Valoración De Dos Métodos Colorimétricos Para La Detección De Sangre En Manchas Secas En Diferentes Soportes Y Condiciones

Ambientales Con Fines Forenses [Internet]. [La Paz-Bolivia]: Universidad Mayor De San Andrés; 2008. Disponible en:

<https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/631/TN-1027.pdf?Sequence=1&isallowed=y>

7. Arbelaez Murillo,Luisa Fernanda; Rios Herrera, Linda Sorieth; Validación De Los Métodos Bluestar Forensic Free Y Thevenon Roland - Piramidon Como Pruebas Preliminares En La Investigación De Sangre De Interés Forense,LIBIF – INML Y CF P [Internet] Ontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Carrera De Bacteriología, Bogotá D.C. Julio De 2009. Disponible en: https://www.bluestar-forensic.com/wp-content/uploads/2020/09/tesis327_co.pdf

ANEXOS

ANEXO N°1

ESQUEMA DE PROCESAMIENTO DE LA ESCENA DEL CRIMEN PARA MANCHAS CON SOSPECHA DE SANGRE

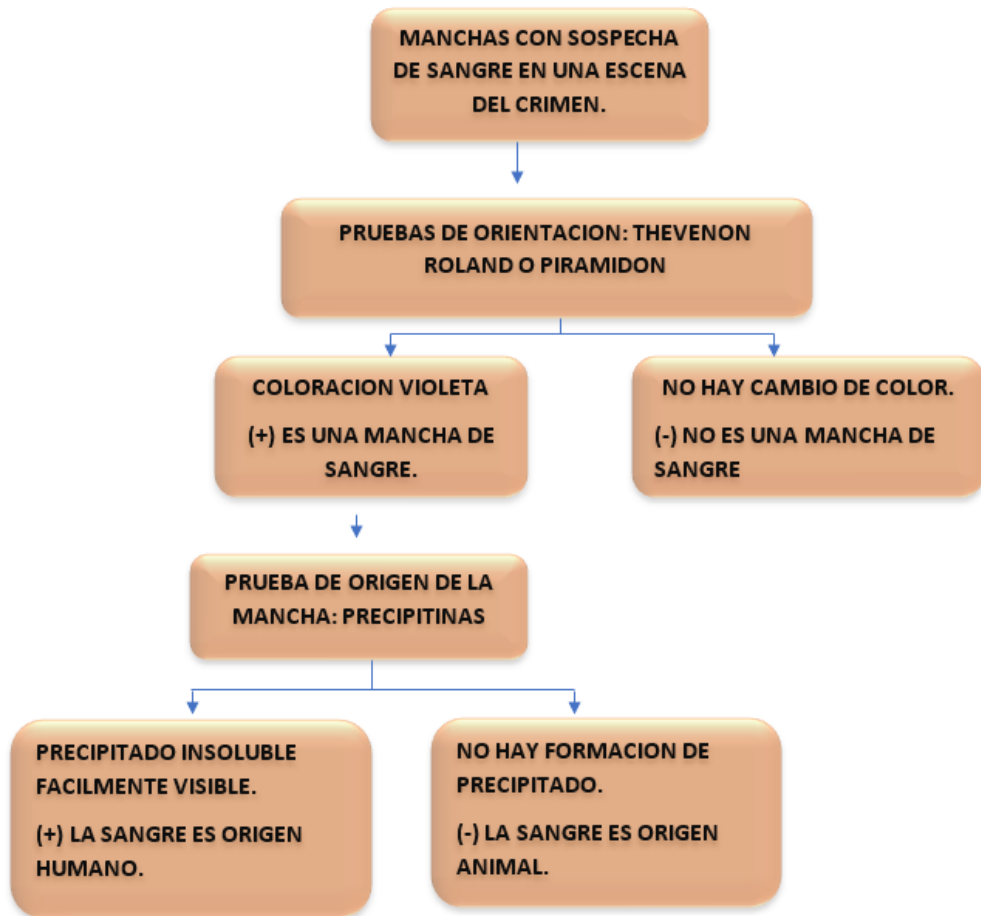


Figura N°3. Esquema de procesamiento para manchas con sospecha de sangre.^{4,7}

ANEXO N° 2

**GUÍA PARA LA ESTRUCTURACIÓN DE LA PRÁCTICA DE
LABORATORIO**

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
CURSO DE ESPECIALIZACIÓN
“ANÁLISIS QUÍMICO APLICADO A LA INVESTIGACIÓN CRIMINAL”
ESTRUCTURA DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

Portada:

Nombre de la Facultad

Nombre de la Práctica

Imagen alusiva a la temática

Objetivos:

Establecer un mínimo de tres Objetivos

Fundamento Teórico:

Deberá incluirse el fundamento químico, puede incluirse reacciones químicas que ayuden a la comprensión del tema.

Equipo, Materiales y Reactivos:

En cuanto del equipo deben ser incluidas las especificaciones.

Los materiales deben ser detallados, de igual manera se deberán incluir las especificaciones.

Los reactivos deben detallarse, los que se utilizarán en estado puro y los preparados, incluyendo información como concentraciones, en caso de ser necesario.

Conocimientos Previos:

Plasmar cualquier conocimiento previo que sea necesario para que el estudiante comprenda de manera íntegra la práctica que va a desarrollar y que no se contempla en el fundamento teórico.

Procedimiento:

Deberá ser presentado paso a paso de manera secuencial, podrá incluir un esquema que permita visualizar mejor el proceso.

Referencias Bibliográficas:

De acuerdo a Normas VANCOUVER

Anexos:

Principalmente, los que complementen al apartado de Equipo, Materiales y Reactivos; para este último se deberá incluir la forma de preparación de aquellos que no se utilicen en forma pura.