

EFECTO DEL SUSTRATO SOBRE LAS PRUEBAS DE ORIENTACION QUIMIOLUMINISCENTES (BLUESTAR FORENSIC Y LUMINOL) EN LA DETECCIÓN DE RESTOS HEMÁTICOS

Diana Mendoza Ramos¹, Juan Santos Lovaton², Wilmer Paredes Fernandez³.

(1)Escuela Profesional de Biología, Universidad Nacional de San Agustín.

(2)Área de Biología Forense, Departamento de criminalística, Policía Nacional del Perú.

(3)Laboratorio de Bioquímica y Biología molecular, Escuela Profesional de Biología, Universidad Nacional de San Agustín.

RESUMEN: Se realizó la determinación del efecto del sustrato sobre las pruebas de orientación (Bluestar Forensic y Luminol) en la detección de restos hemáticos, en el Laboratorio de Biología Forense del Departamento De Criminalística (DEPCR); como muestra se utilizó sangre humana diluida con agua desionizada estéril en concentraciones de (1/500, 1/10.000, 1/25.000, 1/1.000.000, 1/5.000.000), la muestra se colocó en los soportes de madera barnizada, monedas de latón, monedas de alpaca, vidrio, loza cerámica y telas naturales de algodón para conocer su reacción y su comportamiento en los diferentes sustratos.

En lo que respecta a la sensibilidad y especificidad, se hallaron los resultados estadísticos empleando tablas de contingencia como herramienta de análisis, estos resultados se tabularon en las casillas de la siguiente manera: (a) positivos, (b) Falsos positivos, (c) Falsos negativos y (d) negativos, datos con los cuales se calculó la sensibilidad, especificidad e índice de Kappa para las dos pruebas; además del tiempo de duración de la quimioluminiscencia producida desde el momento de agregado los reactivos hasta la finalización de la misma.

Para la evaluación de la intensidad se categorizo en; 4+ (alta), 3+ (mediano), 2+ (baja). 1+ (muy baja) y - (negativo) según fueron observadas.

Finalmente se pudo concluir que las técnicas de Bluestar Forensic y Luminol poseen diferencias altamente significativas influenciadas por el tipo de sustratos y concentración de la muestra, que interfieren con la intensidad, sensibilidad, especificidad así como también el tiempo de luminiscencia siendo el Luminol una prueba de orientación más sensible y con una luminiscencia más prolongada que el Bluestar.

Palabras Clave: Bluestar Forensic, Luminol, sustratos, intensidad, sensibilidad, especificidad, quimioluminiscencia, manchas de sangre, criminalística.

ABSTRACT: The determination of the effect of the substrate on the orientation tests (Bluestar Forensic and Luminol) in the detection of blood residues was carried out at the Laboratory of Forensic Biology of the Department of Criminalistics (DEPCR); (1/500, 1/10,000, 1/25,000, 1/1,000,000, 1/5,000,000), the sample was placed on varnished wood supports, brass coins, alpaca coins, glass, ceramic earthenware and Natural cotton fabrics to know their reaction and behavior on different substrates.

(A) positive, (b) False positives, (c) the results of the survey, False negative and (d) negative, data with which sensitivity, specificity and Kappa index are calculated for the two tests; In addition to the duration of the chemiluminescence produced from the moment of addition of the reagents until the end of the same.

For the evaluation of the intensity was categorized in; 4+ (high), 3+ (medium), 2+ (low) .1+ (very low) and - (negative) as observed.

Finally it was concluded that the techniques of Bluestar Forensic and Luminol have highly significant differences influenced by the type of substrates and concentration of the sample, which interfere with the intensity, sensitivity, specificity as well as the luminescence time, which is the Luminol a test of Orientation more sensitive and with a longer luminescence than Bluestar.

Keywords: Bluestar Forensic, Luminol, substrates, intensity, sensitivity, specificity, chemiluminescence, blood stains, criminalistics.

INTRODUCCIÓN

En toda investigación criminal, uno de los indicios de mayor interés médico-legal son las manchas, no tanto por su importancia a la hora de la reconstrucción de los hechos, sino por facilitar la identificación de las personas implicadas en la acción criminal. (Eckert, 1980). Esta parte de la investigación implica la realización de pruebas de orientación quimio luminiscentes (Bluestar Forensic y Luminol) las cuales son muy sensibles pero poco específicas porque además de la sangre, hay otras

muchas sustancias que son capaces de dar un resultado positivo al ser sometidas a las mismas. (Arbelaez & Rios, 2009). El Luminol (5 -amino- 2,3 - diidroftalazina -1,4 - diona) es un reactivo mundialmente conocido por sus propiedades quimioluminiscentes con una sensibilidad de 1/1'000.000 (Sirchie, 2011) a 1/5'000.000 (Santos, 2013) y un pH 10.4-10.8, (Monteiro, 2010). La quimioluminiscencia del luminol en medio acuoso básico se produce en presencia de un reactivo oxidante (H₂O₂, O₂, HOCl), y por lo general un metal de transición o ciertos iones inorgánicos (Navarrete et al. 2005). Presenta una vida media de 8 a 12 horas, es inestable térmicamente y se degrada con la luz. Hay varios mecanismos propuestos por diferentes autores para explicar la reacción quimioluminiscente del luminol y la mayoría de los pasos está ahora aclarada y se entienden bien, sin embargo todavía hay algunos detalles en discusión,

Correspondencia:

Wilmer Paredes Fernandez, Laboratorio de Bioquímica y Biología molecular, Escuela Profesional de Biología, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa - Perú.
E-mail: wparedes@unsa.edu.pe

como la formación de los estados intermedios electrónicamente excitados (Ferreira & Rossi, 2002). Para que la reacción se lleve a cabo, requiere un agente oxidante el más comúnmente utilizado es el peróxido de hidrógeno y el catalizador que se utiliza por lo general un metal de transición. Se puede realizar en algunos tipos de disolventes orgánico, tal como sulfóxido de dimetilo, o soluciones acuosas con buena respuesta, pero su eficiencia óptima se produce en medio básico (Queiroz – Vidotto, 2010).

El mecanismo más probable para describir la hipótesis de la reacción más simple del Luminol en solución acuosa, un metal de transición que actúa como un catalizador realiza conversión de Luminol a diazoquinona. La diazoquinona, es atacada por el anión del hidrolizado de peróxido de hidrógeno, formando de un endoperóxido que pierde una molécula de nitrógeno (N₂) y luego se forma el dianión ácido 3 – aminoftálico, que ya se produce en el estado excitado. Esta es la especie que sufre deterioro, generando quimioluminiscencia por la medio de la emisión de luz a 431 nm cuando el electrón excitado por la reacción vuelve a su estado fundamental (Dias, 2001).

En el año 2000, Loic Blum, Ph.D., descubrió una nueva fórmula a base de Luminol que posteriormente fue llamado Bluestar Forensic. (Seashols, Cross, Shrader & Rief 2013). La sensibilidad de Bluestar según su ficha técnica es hasta 1:10,000; pero según estudios en diferentes soportes inertes realizados por la misma empresa Bluestar Forensic de muestra una sensibilidad de hasta 1: 1'000,000. Con un pH de 11.5 que no destruye el ADN, permitiendo así, análisis posteriores. No es toxico, gracias a la ausencia del perborato de sodio. Bluestar tiene una luminiscencia más fuerte y duradera que no requiere oscuridad absoluta para ser visible, entre otras características, no altera el ADN y permite análisis subsecuentes de ADN y serología forense de rutina.

La reacción de quimioluminiscencia ocurre cuando la Urea (base nitrogenada) más una sustancia fuertemente alcalina (peróxido de hidrogeno) en presencia de agentes oxido reductores (hierro de la sangre), peroxidasas y/o catalasas, hacen que libere oxígeno del álcali más agua y estos desplacen nitrógenos de la urea, liberándolos, por ser estos muy inestables (N₂) forman fotones que se puede observar en la oscuridad mediante la emisión de luz azul brillante. Cuando no existe agentes oxido reductores, peroxidasas y/o catalasas en esta reacción, no se observa la emisión de luz azul brillante. En otras palabras, una mezcla de Bluestar Forensic + un agente oxidante + un medio alcalino en contacto con los agentes oxido reductores, peroxidasa y/o catalasas emiten luz azul brillante. En otras palabras, una mezcla de Bluestar Forensic + un agente oxidante + un medio alcalino en contacto con los agentes oxido reductores, peroxidasa y/o catalasas emiten luz azul brillante (Arbelaez & Rios, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las Diluciones

Se realizó 5 diluciones (1/500, 1/10.000, 1/25.000, 1/1.000 000, 1/5.00 000), un blanco de agua destilada y un control de sangre, tres repeticiones por tratamiento, haciendo un total de 126 repeticiones por bloque. Para realizar estas diluciones se preparó una batería de cinco tubos estériles con 9 ml de agua estéril, se hicieron diluciones seriadas de: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, en tubos de 13x100, con el fin de realizar los análisis para Bluestar Forensic y Luminol.

Selección de los sustratos

Se trabajó con los siguientes sustratos: monedas de latón (S1), telas naturales de algodón (S2), madera barnizada (S3), monedas de alpaca (S4), loza cerámica (S5), vidrio (S6). Debido a que es común su presencia en la escena del crimen y en el análisis forense y se tiene antecedentes sobre alteraciones en el mecanismo de reacción y por consiguiente en los resultados.

Evaluación de los Resultados

Se evaluaron los siguientes parámetros para todos los tratamientos empleados como se muestra en el Cuadro 1.

Preparación de los reactivos

Se siguió los procedimientos establecidos para Luminol y Bluestar forensic según sus correspondientes fichas técnicas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tiempo de reacción de la prueba de orientación Luminol y Bluestar Forensic en diferentes sustratos y diluciones para la detección de restos hemáticos

En los TABLA 1 y 2 las monedas de latón y alpaca (S1, S4), presentaron lecturas en las pruebas con los reactivos Luminol y Bluestar forensic en las diluciones D1, D2, D3, D4 y D5, así también como en sus respectivo blanco (B) y control (C). Las monedas de latón y alpaca poseen mayor tiempo de reacción en comparación con los otros sustratos debido a la presencia de metales de transición en su composición, cuya catálisis es lenta (Fuentes & Diaz, 1997); del mismo modo la presencia de estos metales de transición ocasionan una reacción quimioluminiscente en ausencia total de muestras de sangre (blanco).

La madera barnizada (S3) posee un tiempo de reacción alto, tuvo lecturas en las pruebas con el reactivo Luminol en las diluciones D1, D2, D3, D4, D5 y en el control (C) a diferencia del Bluestar que solo obtuvo lecturas en la dilución D1 y control (C). El barniz es una sustancia que a menudo es capaz de catalizar la quimioluminiscencia casi tan eficazmente como lo hace la sangre, pero, debido a su composición química compleja, el mecanismo exacto subyacente de estas interferencias no han sido completamente esclarecidas (Barni, 2007). El barniz aumentó la intensidad de la quimioluminiscencia, así como también la sensibilidad del Luminol reaccionando en todas las diluciones; sin embargo, en el presente estudio no se apreció la reacción exclusiva entre el barniz y el reactivo, lo cual se evidencia en la ausencia de reacción frente al blanco.

La loza cerámica (S5) y vidrio (S6), presentan tiempos de reacción en las diluciones D1, D2 con el reactivo Luminol, y con una única lectura en la en la D1 para el reactivo Bluestar forensic, por ser sustratos no absorbentes y presentan más dificultad en la calidad de quimioluminiscencia.

Estas superficies de sustrato no son capaces de retener efectivamente y almacenar sangre; y por otra parte, no puede impedir su degradación especialmente ocasionados por agentes físicos y químicos. Este comportamiento fue claramente demostrado por Barni (2007), estas superficies son bastante fácil de limpiar por completo y un intento de lavado suave con agua y jabón conduce a la eliminación de las manchas de sangre produciendo la casi inexistente reacción con Luminol.

Las telas naturales de algodón (S2) presentaron menor tiempo de reacción en las pruebas con el reactivo Luminol. Con lecturas en las diluciones D1, D2, D3, D4, D5 y control (C). A diferencia del Bluestar con lecturas únicamente en la dilución D1 y control ©.

Es sabido que la composición de este sustrato (moléculas de celulosa) (Gil, 2015), no influye en la interacción dilución *sustrato en el tiempo de las telas naturales (S2). Al ser un soporte absorbente (Almeida, 2009), este tipo de sustrato evita la degradación de los restos hemáticos por agentes biológicos como bacterias, enzimas hidrolíticas; además de proteger la sangre de agentes ambientales, físicos o químicos, tales como los rayos solares, humedad, agua, o los intentos de limpieza después del crimen debido a su estructura.

Estas características hacen posible aplicar varias veces el reactivo Luminol sin el riesgo de diluir excesivamente las manchas con el fin de visualizar mejor y fotografiar con éxito el patrón de manchas de sangre (Barni, 2007). Por las características de este sustrato es que se apreció la reacción de quimioluminiscencia en todas las diluciones, a pesar de que el tiempo de reacción obtenido con las telas de algodón fue el menor entre todos los sustratos evaluados.

Ambas pruebas mostraron diferencias altamente significativas en el tiempo de reacción con el tipo de sustrato, con la dilución de los restos hemáticos y la interacción sustrato*dilución, en la prueba de comparación múltiple de ANOVA de dos factores.

TABLA Nro.1

Definición operacional y conceptual de las variables

VARIABLES	CLASIFICACIÓN
Especificidad del soporte	-Telas de algodón, - Madera, - Metal (monedas de alpaca y latón) -Loza cerámica, -Vidrio
Tiempo	Segundos
Intensidad de Quimioluminiscencia	- 4+ (alta), - 3+ (mediano), - 2+ (baja), - 1+ (muy baja) - (negativo)
Sensibilidad	1/500 1/10.000 1/25.000 1/1.000.000 1/5.000.000

TABLA Nro.2
Tiempo de reacción de la prueba de orientación Luminol en diferentes sustratos y diluciones para la detección de restos hemáticos

SUSTRATO	DILUCIÓN	TIEMPO DE REACCIÓN $\bar{X} \pm S$ (min.)	SUSTRATO	DILUCIÓN	TIEMPO DE REACCIÓN $\bar{X} \pm S$ (min.)
S1	D1	24.40 ± 0.09	S4	D1	29.81 ± 0.12
	D2	22.68 ± 0.02		D2	26.64 ± 0.02
	D3	21.59 ± 0.02		D3	19.66 ± 0.01
	D4	20.24 ± 0.01		D4	13.27 ± 0.08
	D5	18.67 ± 0.02		D5	10.82 ± 0.02
	B	10.30 ± 0.03		B	10.81 ± 0.03
	C	30.66 ± 0.01		C	34.96 ± 0.98
S2	D1	8.53 ± 0.18	S5	D1	20.76 ± 0.06
	D2	0.66 ± 0.01		D2	7.18 ± 0.01
	D3	0.64 ± 0.01		D3	0.00 ± 0.00
	D4	0.58 ± 0.00		D4	0.00 ± 0.00
	D5	0.33 ± 0.02		D5	0.00 ± 0.00
	B	0.00 ± 0.00		B	0.00 ± 0.00
	C	9.70 ± 0.06		C	48.79 ± 0.01
S3	D1	25.46 ± 0.05	S6	D1	26.29 ± 0.03
	D2	15.46 ± 0.04		D2	4.47 ± 0.03
	D3	10.49 ± 0.01		D3	0.00 ± 0.00
	D4	8.44 ± 0.01		D4	0.00 ± 0.00
	D5	6.67 ± 0.02		D5	0.00 ± 0.00
	B	0.00 ± 0.00		B	0.00 ± 0.00
	C	28.44 ± 0.49		C	42.45 ± 0.02

TABLA Nro.3
Tiempo de reacción de la prueba de orientación Bluestar en diferentes sustratos y diluciones para la detección de restos Hemáticos

SUSTRATO	DILUCIÓN	TIEMPO DE REACCIÓN $\bar{X} \pm S$ (min.)	SUSTRATO	DILUCIÓN	TIEMPO DE REACCIÓN $\bar{X} \pm S$ (min.)
S1	D1	1.59 ± 0.01	S4	D1	1.85 ± 0.02
	D2	1.54 ± 0.01		D2	1.18 ± 0.02
	D3	1.13 ± 0.01		D3	0.47 ± 0.01
	D4	0.67 ± 0.01		D4	0.31 ± 0.01
	D5	0.57 ± 0.01		D5	0.27 ± 0.01
	B	0.35 ± 0.03		B	0.26 ± 0.01
	C	1.66 ± 0.01		C	1.88 ± 0.00
S2	D1	0.34 ± 0.01	S5	D1	1.33 ± 0.00
	D2	0.00 ± 0.00		D2	0.16 ± 0.01
	D3	0.00 ± 0.00		D3	0.00 ± 0.00
	D4	0.00 ± 0.00		D4	0.00 ± 0.00
	D5	0.00 ± 0.00		D5	0.00 ± 0.00
	B	0.00 ± 0.00		B	0.00 ± 0.00
	C	1.21 ± 0.01		C	1.48 ± 0.02
S3	D1	0.95 ± 0.03	S6	D1	0.94 ± 0.01
	D2	0.00 ± 0.00		D2	0.00 ± 0.00
	D3	0.00 ± 0.00		D3	0.00 ± 0.00
	D4	0.00 ± 0.00		D4	0.00 ± 0.00
	D5	0.00 ± 0.00		D5	0.00 ± 0.00
	B	0.00 ± 0.00		B	0.00 ± 0.00
	C	2.01 ± 0.01		C	2.95 ± 0.00

Comparación del efecto del tipo de sustrato en el tiempo de reacción de restos hemáticos de la prueba de orientación del Luminol y Bluestar Forensic.

La figura 1 (A) muestra la prueba de comparación múltiple de Tukey para el tiempo de reacción del Luminol en la que se observan seis grupos (a, b, c, d, e, f) siendo el sustrato de telas naturales de algodón (S2) el que presentó menor tiempo de reacción en la detección de restos hemáticos con 2.92 min, mientras que el mayor tiempo de reacción se presentó para monedas de latón (S1) con 21.22 min.

La Figura 1 (B) muestra la prueba de comparación múltiple de Tukey para el tiempo de reacción de la prueba Bluestar Forensic en la que se observan seis grupos (a, b, c, d, e, f) siendo el sustrato telas naturales de algodón (S2), el que presentó menor tiempo de reacción en la detección de restos hemáticos con 0.22 min, mientras que el mayor tiempo de reacción se presentó en monedas de latón (S1) con 1.07 min.

En ambas figuras se muestra que el tipo de sustrato y composición del mismo, son capaces de interferir en el tiempo de reacción.

La duración de la emisión de radiación varían de acuerdo con la naturaleza del material que la emite (Ferreira & Rossi, 2002), así también como la concentración, y van desde períodos muy cortos (menos de 1 seg) a muy largos (alrededor de 1 día) (Queiroz & Vidotto, 2010) creando un resultado positivo o negativo que interfieren con una correcta interpretación de los resultados de las pruebas presuntivas con el Luminol y el Bluestar Forensic (Bancirova, 2012).

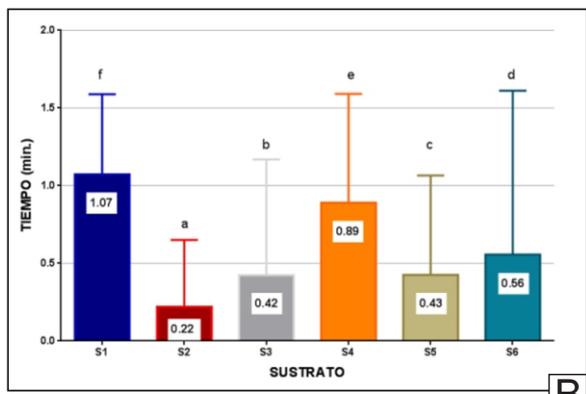
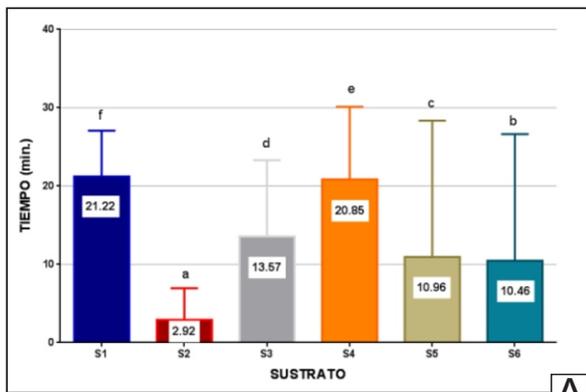


Fig. Nro.1. Comparación del efecto del tipo de sustrato en el tiempo de reacción de restos hemáticos de la prueba de orientación del Luminol y Bluestar Forensic.

Comparación del efecto de la dilución de restos hemáticos en el tiempo de reacción de la prueba de orientación del Luminol y Buestar Forensic.

La Figura 2 (A) muestra la prueba de comparación múltiple de Tukey para el tiempo de reacción del luminol en la que se observan siete grupos (a, b, c, d, e, f, g) el grupo blanco fue el que presentó menor tiempo de reacción en la detección de restos hemáticos con 3.52 min., seguido de la dilución 1/5000000 (D5) con 6.08 min.(b), mientras que la dilución 1/500 (D1) fue la que presentó mayor tiempo de reacción con 22.54 min

La Figura 2(B) muestra la prueba de comparación múltiple de Tukey para el tiempo de reacción de la prueba Bluestar en la que se observan siete grupos (a, b, c, d, e, f, g) la dilución 1/5000000 (D5) correspondiente a las monedas de latón y alpaca (S1, S4) las que presentaron menor tiempo de reacción en la detección de restos hemáticos con 0.14 min., mientras que la dilución 1/500 (D1) fue la que presentó mayor tiempo de reacción con 1.17 min.

En ambas figuras se aprecia que el tiempo de duración de la emisión ocasionada por el reactivo Luminol y Bluestar Forensic se ven afectadas por la concentración de la muestra de sangre, también por los metales de transición que conforman los sustratos e interfieren en la reacción observándose mayor tiempo de reacción comparado a los otros sustratos utilizados.

La presencia de los metales de transición origina la reacción de quimioluminiscencia en ausencia de muestras de sangre (blanco).

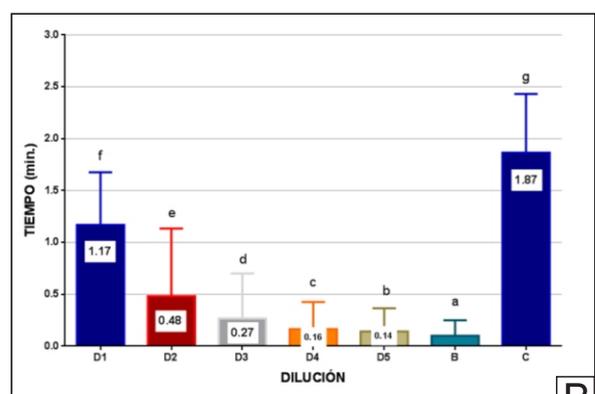
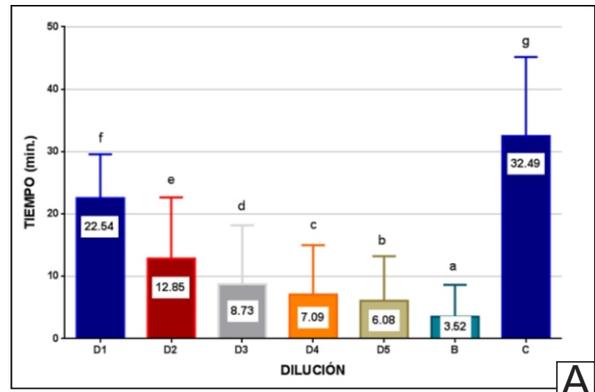


Fig. Nro.2 Comparación del efecto de la dilución de restos hemáticos en el tiempo de reacción de la prueba de orientación del Luminol y Bluestar forensic

Efecto del sustrato y la dilución de restos hemáticos en el tiempo de reacción de la prueba de orientación Luminol y Bluestar Forensic

La Figura 3 (A) muestra la interacción entre el sustrato y la dilución para la detección de restos hemáticos, siendo la interacción de telas naturales de algodón (S2) con la dilución 1/5000000 (D5) de restos hemáticos, la que presentó menor tiempo de reacción en la detección de restos hemáticos con 0.33 min. Es sabido que la composición de este sustrato (moléculas de celulosa) (Gil, 2015), no influye en el mecanismo de reacción. La interacción dilución *sustrato en el tiempo de las telas naturales (S2) tuvo lecturas en todas las diluciones realizadas D1, D2, D3, D4, D5. Al ser un soporte absorbente (Almeida, 2009) y capaz de evitar la completa degradación de los restos hemáticos (Barni, 2007).

La Figura 3 (B) muestra la interacción entre el sustrato y la dilución para la detección de restos hemáticos, siendo la interacción de loza cerámica (S5) con la dilución 1/10000 de restos hemáticos, valor igual al reportados por Touwen (2013), la que presentó menor tiempo de reacción en la detección de restos hemáticos con 0.16 min.

En las telas naturales (S2) se observó luminiscencia únicamente en las diluciones D1, D2; observándose una sensibilidad de 1/10000, valor igual al reportado por Luedeke (2016).

En la madera barnizada (S3), se tuvieron lecturas en las diluciones (D1, D2), valores superiores a comparación al reportado por Luedeke (2016).

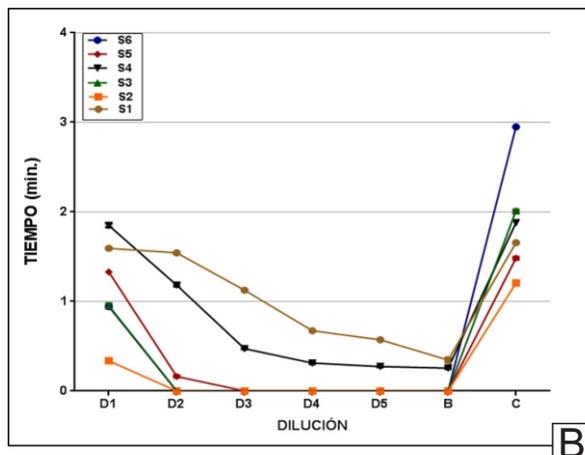
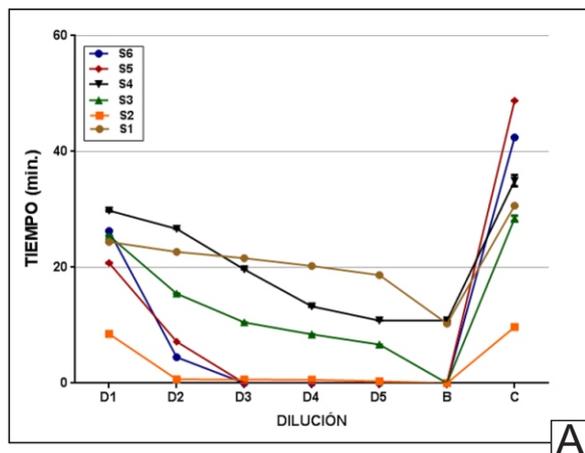


Fig. Nro.3 Efecto del sustrato y la dilución de restos hemáticos en el tiempo de reacción de la prueba de orientación Luminol y Bluestar Forensic

Comparación del mayor tiempo de reacción en la detección de restos hemáticos para las pruebas de orientación Luminol y Bluestar Forensic

Se observa en la tabla 1, la comparación de mayor tiempo de reacción para las pruebas de orientación del Luminol y Bluestar, presentándose diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) con la prueba de comparación de t de Student, siendo la prueba de orientación del Luminol para (S4-D1) la que presentó mayor tiempo reacción promedio con 29.81 min., en comparación al tiempo de reacción promedio de la prueba Bluestar con 1.85 min para (S4-D1)

TABLA Nro.1
Comparación del mayor tiempo de reacción en la detección de restos hemáticos para las pruebas de orientación Luminol y Bluestar.

PRUEBA	$\bar{X} \pm S$ (min.)	t	Sig. P
LUMINOL (S4: metal monedas de alpaca, D1: 1/500)	29.81 ± 0.12	394.10	0.000...A.S.
BLUESTAR (S4: metal monedas de alpaca, D1: 1/500)	1.85 ± 0.02		p < 0.01

Comparación del menor tiempo de reacción en la detección de restos hemáticos para las pruebas de orientación Luminol y Bluestar.

Se observa en el TABLA 2, la comparación del menor tiempo de reacción para las pruebas de orientación del Luminol y Bluestar, presentándose diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) con la prueba de comparación de t de Student, siendo la prueba de orientación Bluestar para (S5-D2) la que presentó menor tiempo reacción promedio con 0.16 min., en comparación al tiempo de reacción promedio de 0.33 min para la prueba de orientación del Luminol para (S2-D5).

TABLA Nro.2
Comparación del menor tiempo de reacción en la detección de restos hemáticos para las pruebas de orientación Luminol y Bluestar.

PRUEBA	$\bar{X} \pm s$	T	Sig. P
LUMINOL (S2: telas naturales de algodón, D5: 1/5000000)	0.33 ± 0.02	15.38	0.000...A.S.
BLUESTAR (S5: loza cerámica, D2: 1/10000)	0.16 ± 0.12		p < 0.01

Intensidad de la reacción de las pruebas de orientación Luminol y Bluestar Forensic en diferentes sustratos y diluciones

En la TABLA 3 muestra la intensidad de reacción en la detección de restos hemáticos para prueba de orientación del Luminol según sustrato y dilución, presentándose mayor intensidad de reacción para el control y la dilución de 1/500 (D1) con un grado de intensidad de (4), mientras que la mayor intensidad se presentó en el sustrato de monedas de latón (S1) y monedas de alpaca (S4) con un grado de intensidad de (4).

En la TABLA 4 muestra la intensidad de reacción en la detección de restos hemáticos para prueba de orientación Bluestar según sustrato y dilución, presentándose mayor intensidad de reacción para el control y la dilución de 1/500 (D1) con un grado de intensidad de (4), mientras que la mayor intensidad se presentó en el sustrato de monedas de latón (S1) y monedas de alpaca (S4) con un grado de intensidad de (4). Esto se debe a que, del mismo modo que con el reactivo Luminol su composición basada en metales de transición aumentan la intensidad de quimioluminiscencia al igual que la sensibilidad ocasionando una visibilidad hasta en la dilución de menor concentración e inclusive en la ausencia de muestras de sangre (Duran & Martínez, 2013)

TABLA Nro.3
Intensidad de la reacción de la prueba de orientación Luminol en diferentes sustratos y diluciones.

DILUCIÓN	SUSTRATO						PROMEDIO
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	
D1	4	3	4	4	4	4	4
D2	4	1	3	4	2	2	3
D3	4	1	2	4	0	0	2
D4	4	1	2	4	0	0	2
D5	3	1	1	4	0	0	1
B	3	0	0	4	0	0	1
C	4	4	4	4	4	4	4
PROMEDIO	4	2	2	4	1	1	2

TABLA Nro.4
Intensidad de la reacción de la prueba de orientación Bluestar Forensic en diferentes sustratos y diluciones

DILUCIÓN	SUSTRATO						PROMEDIO
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	
D1	4	4	4	4	4	4	4
D2	4	0	0	4	4	0	2
D3	4	0	0	4	0	0	1
D4	4	0	0	4	0	0	1
D5	4	0	0	4	0	0	1
B	4	0	0	4	0	0	1
C	4	4	4	4	4	4	4
PROMEDIO	4	1	1	4	2	1	2

Comparación de la sensibilidad y especificidad promedio de las prueba de orientación del Luminol y Bluestar Forensic en la detección de restos hemáticos
En la TABLA 5 se muestra la sensibilidad y la especificidad de las pruebas de orientación del Luminol y Bluestar Forensic para la detección de restos hemáticos, siendo la prueba del Luminol la que presentó mayor sensibilidad con 64.29%, mientras que las pruebas del Luminol y Bluestar Forensic presentaron igual especificidad con 66.67%.

TABLA Nro.5
Comparación de la sensibilidad y especificidad promedio de las pruebas de orientación del Luminol y Bluestar en la detección de restos hemáticos

REACTIVO	LUMINOL	BLUESTAR
SENSIBILIDAD	64.29 %	32.14 %
ESPECIFICIDAD	66.67 %	66.67 %

Concordancia entre las pruebas de orientación del Luminol y Bluestar Forensic en la detección de restos hemáticos

En el tabla 6 se muestran las frecuencias de los resultados de la prueba del Luminol y los resultados con la prueba Bluestar para la detección de restos hemáticos, de acuerdo al valor del estadístico de concordancia de Kappa $\kappa = 0,71$ se puede afirmar que la detección de restos hemáticos con la prueba del Luminol y la prueba Bluestar, presentan una concordancia de fuerza considerable de acuerdo a la valoración del coeficiente kappa de Landis y Koch 1977, al 95% de confianza.

TABLA Nro.6
Concordancia entre las pruebas de orientación del Luminol y Bluestar en la detección de restos hemáticos.

BLUESTAR	LUMINOL								Total	
	Falso Negativo		Falso Positivo		Negativo		Positivo			
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Falso Negativo	18	14.29	0	0.00	0	0.00	27	21.43	45	35.7
Falso Positivo	0	0.00	42	33.33	0	0.00	0	0.00	42	33.3
Negativo	0	0.00	0	0.00	12	9.52	0	0.00	12	9.52
Positivo	0	0.00	0	0.00	0	0.00	27	21.43	27	21.43
Total	18	14.29	42	33.33	12	9.52	54	42.86	126	100.0

CONCLUSIONES

- Primera, los sustratos de vidrio, loza cerámica, madera barnizada y telas de algodón, no interfirieron ni tampoco inhibieron la reacción de color o la emisión de luz azul brillante en la reacción con Luminol y Bluestar Forensic, mientras que las pruebas realizadas sobre los sustratos de alpaca y latón interfirieron con estas reacciones.
- Segunda, el tiempo de luminiscencia y la intensidad se vieron afectados por la concentración de elementos químicos presentes en los sustratos, el tipo de sustrato (absorbente y no absorbente) y las diferentes concentraciones (diluciones) de la muestra, obteniéndose diferencias altamente significativas entre ambas pruebas quimioluminiscentes, presentando mayor tiempo de reacción las pruebas con el reactivo Luminol.
- Tercera, la técnica del Bluestar Forensic tiene una sensibilidad de 32.14%, mientras que la técnica del Luminol tiene 64.29% para los sustratos evaluados; en lo que respecta a la especificidad, el Bluestar Forensic y el Luminol presentan el mismo valor, con 66.7% de especificidad para los sustratos evaluados.

REFERENCIAS

- [1] ALMEIDA, J. 2009. "Influência dos testes de triagem para detecção de sangue nos exames imunológicos e de genética forense", Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.Faculdade de Biociências. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Faculdade de Biociências, Porto Alegre. Pág.49-15.
- [2] ARBELAEZ L & RIOS L.2009. "Validación de los métodos bluestar forensic free y thevenon roland-piramidon como pruebas preliminares en la investigación de sangre de interés forense", lbif-inmlycf, Bogotá. Pág.28-29.
- [3] BANCIROVA, M. 2012. "Black and green tea — Luminol false-negative bloodstains detection" Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University. Pág.103.
- [4] BARNI, E., LEWIS, S., BENTI, A., MISKELLY, G., LAGO G. (2007). "Forensic application of luminol reacción as a presumptive test for latent blood detection". Molecular Biology and Genetics Unit, Carabinieri Scientific Investigation Department of Rome, Viale di Tor di Quinto 119, 00191 Rome, Italy. Pág. 905.
- [5] DIAS, J.2001." Desenvolvimento e optimização de sistemas quimioluminescentes de detecção de espécies químicas em águas". Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química da Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto. Pág.154.

- [6] DURAN, J., MARTINEZ, G., CONTRERAS, C., BERTI, M., VILLEGAS, A., ROSENDO, D. 2013. "Fijaciones fotográficas del ensayo Luminol". Unidad criminalística contra la vulneración de derechos fundamentales del estado Lara. Ministerio Público. Pág. 169.
- [7] ECKERT G, 1980. "Introduction to Forensic Sciences" second edition. Ed. Jean Jarboe. New York. Pág. 12-43.
- [8] FERREIRA, E; ROSSI, A. 2002. "A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise". Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas. Pág. 1-2.
- [9] GIL, A. 2015. "Manual de laboratorio textil", Universidad Tecnológica del Perú. pág. 49
- [10] LUEDEKE, M., MILLERA, E., SPRAGUE. 2016. "The effects of Bluestar® and luminol when used in conjunction with tetramethylbenzidine or phenolphthalein". Ohio Attorney General's Bureau of Criminal Investigation, United States. Pág. 159.
- [11] MONTEIRO, I. 2010. "Vestígios hemáticos no local de crime. Sua importância médico-legal". Dissertação (Mestrado em Medicina Legal). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade do Porto, Porto. Pág. 149.
- [12] QUEIROZ, R. & VIDOTTO, A. 2010. "Técnica de quimiluminescência em manchas de sangue: o uso de luminol para a sua identificação", Pontifícia Universidade Católica De Goiás Brasília.
- [13] SALGADO, G; NAVARRETE, J; BUSTOS, C; SÁNCHEZ, C; UGARTE, R. 2011. "Quimiluminescencia electrogenerada del luminol usando electrodos de bajo costo".
- [14] SANTOS, L. 2013. "Análisis reconstructivo forense mediante patrones de manchas de sangre". 1ª edición. Ed. Michel Herrera. Instituto Peruano de Ciencias Forenses, Oficina de Criminalística de la Policía Nacional del Perú. Pág. 52-54.
- [15] SEASHOLS, S., CROSS, H., SHRADER, D & ASHLEY RIEF, A. 2013. "A Comparison of Chemical Enhancements for the Detection of Latent Blood". Department of Forensic Science, Virginia Commonwealth University
- [16] SIRCHIE. 2011. "Technical Information" Luminol Catalog Nos. Luminol 4, Luminol 8, Luminol 16. USA. Pág. 1. <<http://www.sirchie.com/luminol-reagent-with-spray-head-4-oz-set-of-2.html#.V1Od3fnhDIU>>
- [17] TOUWEN, E. 2013. "A comparative study of chemical detection reagents for latent blood stains". Nederlands Forensisch instituut, Ministerie Van Veiligheid en Justitie. University of Amsterdam. Pág. 15.

Recibido el 04 de marzo del 2017 y aceptado para su publicación el 28 de mayo del 2017