Received: 04/11/09 Approved: 30/11/09 Published: 2/12/09

EVALUACION DE DOS METODOS COLORIMETRICOS EN BASE A AMINOFENAZONA Y AMINOANTIPIRINA PARA LA DETECCION DE MUESTRAS DE SANGRE EN DIFERENTES CONDICIONES CON FINES FORENSES

Nelly Coterhuanco Apaza[1], Sergio Quispe Mayta[2], Lily Salcedo ortiz[1]*

[1]Catedra de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra, La Paz- Bolivia, [2]Instituto de Investigaciones Forenses, La Paz - Bolivia

Keywords: *Hemoglobin, Stains of blood, Aminofenazona, Aminoantipirina, Colorimetric Analysis*

ABSTRACT

In this study we evaluate two colorimetric methods based on the aminofenazona and the aminoantipirina, to determine presence of blood in minimum concentrations by means of the hemoglobin, These experiments were carried out on different supports (cloths) exposed to environmental conditions environmental and time in which you/they were exposed. The tests showed high effectiveness in different supports for the sanguine groups O, A, B, AB and OR giving positive for blood until concentrations of 1/10.000. It is find organic interferentes as the juices of citric fruits and green vegetables that you/they can you cause false positive. Also you work with stains washed in which both methods detected blood in invisible stains, and finally the non absorbent supports that were buried by more time you is not able to detect presence of blood. / *Se evaluaron dos métodos colorimétricos en base a pruebas de la aminofenazona y la aminoantipirina, para determinar presencia de sangre en concentraciones mínimas. Las pruebas se llevaron a cabo sobre diferentes soportes (telas) expuestos a diferentes condiciones ambientales y de tiempo, a las cuales fueron expuestas. Las pruebas mostraron alta sensibilidad en diferentes soportes para los grupos sanguíneos A, B, AB y O dando positivo para sangre hasta concentraciones de 1/10.000. En las manchas lavadas, ambas pruebas mostraron sensibilidad hasta el quinto lavado con diferentes detergentes. Se encontraron interferentes orgánicos como los jugos de frutas cítricas y vegetales verdes que pueden ocasionas falsos positivos. Finalmente en los soportes no absorbentes que fueron enterrados por mayor tiempo las pruebas fueron negativas.*

Corresponding author: adri-nelly@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La biología forense involucra la identificación y comparación de seres vivos mediante el análisis de fluidos, tejidos y estructuras biológicas de las muestras forenses en la resolución de casos criminales.[1] El reconocimiento, identificación, individualización y evaluación de la evidencia empleando métodos científicos para la resolución de aspectos relacionados con la ley es de vital importancia. Una de las evidencias mas importantes y mas común en una escena de crimen son las manchas de sangre que se pueden encontrar en diferentes soportes o sometidas a condiciones ambientales lo cual es importante para la resolución de aspectos relacionados con la ley.[2] Las muestras sanguíneas tienen un alto contenido de eritrocitos y estos a su vez de hemoglobina, los métodos de detección de muestras sanguíneas se basa en detectar este ultimo elemento. En los países desarrollados se utiliza el luminol que requiere muestras concentradas y cuyo reactivo es de alto costo.[3] En el presente estudio de orientación se ha evaluado la sensibilidad y especificidad de dos métodos colorimétricos en la detección de muestras sanguíneas sobre diferentes soportes y en diferentes condiciones ambientales, para ello se han utilizado dos sustratos (aminofenazona y aminoantipirina), para implementarlos en forma rutinaria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la Tabla 1, el método de la aminofenazona mostró mayor sensibilidad en la detección de sangre sobre diferentes soportes, dando positivo *hasta 1/10.000* para los grupos sanguíneos A, B y O con factores Rh (+) e incluso hasta *1/50.000* para el grupo AB sobre el soporte de algodón, en relación al test de la Aminoantipirina que

Received: 04/11/09 Approved: 30/11/09 Published: 2/12/09

mostró positividad hasta *1/5000* para grupos sanguíneos A;B;AB y O con factores Rh (+) e incluso menor para el grupo AB *(hasta 1/1000)*. En el estudio de detección de sangre en muestras lavadas, como se observa en la Tabla Nº2, las pruebas fueron positivas hasta el décimo lavado para agua, agua y aceite, siendo las lavadas con jabón, detergente en polvo y lavandina positivas hasta el quinto lavado. Estos resultados son importantes por que las *ropas manchadas* de sangre durante un acto violento son generalmente lavadas para tratar de eliminar los vestigios.[6]

Tabla 1 : *Sensibilidad de los test de aminofenazona y aminoantipirina en la detección de sangre diluida sobre diferentes soportes*

DILUCION SANGRE		GRUPO A			GRUPO B			GRUPO AB			GRUPO O		
		Gasa	algodón	Papel filtro	Gasa	algodón	Papel filtro	Gasa	algodón	Papel Filtro	Gasa	algodón	Papel filtro
AMINOFENAZONA	1//10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/5000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/10000	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	1/50000	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
AMINOANTIPIRINA	1//10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/5000	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
	1/10000	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	1/50000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) = *positivo* (-) = negativo

Tabla 2. *Test de aminofenazona y aminoantipirina sobre manchas sanguineas sometidas a lavados*

LAVADOS	NUMERO DE LAVADOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AGUA	Estado de la mancha*	v	v	v	v	v	v	v	pv	pv	pv
	Aminofenazona	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Aminoantipirina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DETER-GENTE EN POLVO	Estado de la mancha*	v	v	v	pv	pv	i	i	i	i	I
	Aminofenazona	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	Aminoantipirina	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
JABON	Estado de la mancha*	v	v	pv	pv	i	i	i	i	i	I
	Aminofenazona	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	Aminoantipirina	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
LAVAN-DINA	Estado de la mancha*	v	v	pv	pv	i	i	i	i	i	I
	Aminofenazona	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	Aminoantipirina	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AGUA Y ACEITE	Estado de la mancha*	v	v	v	pv	pv	pv	pv	pv	i	I
	Aminofenazona	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Aminoantipirina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*v =visible pv = poco visible i = invisible
(+) = test positivo *(-) = test negativo*
*v =visible pv = poco visible i = invisible
(+) = test positivo *(-) = test negativo*

Received: 04/11/09 Approved: 30/11/09 Published: 2/12/09

***Tabla 3**: Test de Aminofenazona /Aminoantipirina en manchas de sangre sobre diferentes soportessometidas a diferentes condiciones (temperatura, tiempo, ambiente abierto, cerrado y enterrado)*

TIEMPO	SOPORTE	CONDICION															
		TEMPERATURA										AMBIENTE					
		20 ºC		4 ºC		16 ºC		37 º C		60 º C		ABIERTO		CERRADO		ENTERRADO	
		AF	AA	AF	AA	AF	AA	AF	AA	AF	AA	AF	AA	AF	AA	AF	AA
24 HORAS	TELA ALGODÓN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	**m**	**m**	+	+	**M**	**m**
	LANA ALGODÓN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	SEDA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	POLIESTER	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	**m**	+	+	+	-	-
	LINO	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
	TELA JEAN DELGADO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	TELA JEAN GRUESO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	TEXTIL ARTESANAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
UNA SEMANA	TELA ALGODÓN	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	**m**	+	+	-	-
	LANA ALGODÓN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SEDA	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
	POLIESTER	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	LINO	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
	TELA JEAN DELGADO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	TELA JEAN GRUESO	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	TEXTIL ARTESANAL	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
UN MES	TELA ALGODÓN	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+		-
	LANA ALGODÓN	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
	SEDA	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
	POLIESTER	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	LINO	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
	TELA JEAN DELGADO	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
	TELA JEAN GRUESO	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	TEXTIL ARTESANAL	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

AF = Aminofenazona *AA = Aminoantipirina* (+) = *Positivo* (-) =Negativo

Para las manchas de sangre sobre soportes sometidas a tiempos variables nuestro estudio mostró que ambos métodos detectan presencia de sangre hasta las 24 horas para todos los soportes, siendo la prueba de aminoantipira de mayor sensibilidad a mayor temperatura y condiciones mas drásticas (enterrado), a la vez se observa que a mayor tiempo menor capacidad de detección para ambas pruebas en especial a 37 ^{o}C, 60 ^{o}C y enterrado (Tabla 3). También es evidente que el tipo de soporte influye en la prueba.

En una escena de crimen suele existir contaminación de las evidencias o manchas de sangre. Por lo que se procedió a realizar un estudio con diferentes contaminantes (restos de frutas, restos de verduras, líquidos biológicos y otros contaminantes), estos resultados se encuentran en la *tabla 4.* Estos resultados indican que a mayor tiempo (1mes) de exposición al contaminante menor es la sensibilidad de ambas pruebas (aminofenazona y aminoantipirina), esto posiblemente al deterioro de las muestras en estudio. Con la mayoria de los contaminantes hasta la semana se observa con ambas pruebas resultados positivos a 37ºC y 4ºC, la excepción se da con el alcohol yodado que casi en todas las condiciones dio negativo esto sin duda se debe a que el hierro (Fe^{+3}) del hemo es quelado como yoduro ferrico, evitando la reacción. También se debe tomar en cuenta que en algunos casos el contenido intrínseco de antioxidantes como la presencia de vitamina C (ácido ascórbico) puede interferir en la reacción consumiendo el oxigeno liberado por el peroxido de hidrogeno e impidiendo que este sea captado por la aminofenazona o la aminoantipirina y no se observa el cambio de coloración dando lugar a falsos negativos.[7]

Received: 04/11/09 Approved: 30/11/09 Published: 2/12/09

Tabla 4 *: test de aminofenazona y aminoantipirina sobre muestras preparadas con sangre y contaminantes expuestas a* diferentes tiempos y condiciones

		EXPOSICION CON CONTAMINANTE	*TEMPERATURA*				*AMBIENTE*			
			AMINOFENAZONA		*AMINOANTIPIRINA*		*AMINOFENAZONA*		*AMINOANTIPIRINA*	
FRUTAS		MORA								
		FRESA								
		UVA ROJA								
		NARANJA								
		LIMON								
		PLATANO								
		PAPAYA								
		ZANAHORIA								
		ACE								

Received: 04/11/09 Approved: 30/11/09 Published: 2/12/09

(+) Positivo a las 24 Hrs *(-) Negativo a las 24 Hrs* *(m) Positivo tenue*
(+) Positivo a la semana* *(-*) Negativo a la semana*
(+º) Positivo al mes *(-º) Negativo al mes*

SECCION EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Fundamento teórico

La hemoglobina es una metaloproteina cuyo grupo prostético es el grupo Hem actúa como una peroxidasa gracias al Ion ferrico (Fe^{+3}) que cataliza reacciones de descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxigeno, este oxigeno actúa como oxidante de un sustrato que es la aminofenazona o la aminoantipirina (Figura Nº 1) promoviendo la formación de color.[4]

Procesamiento de las muestras

Manchas de sangre

a) Se recolectó muestra de sangre por venopunción en tubo vacutainer (Linea VACUETTE) con EDTA al 5% de paciente que refería grupo sanguíneo "O " factor Rh (+)

b) Se realizó manchas con aproximadamente 50 µl de sangre sobre los diferentes soportes que son :tela de algodón, lana de algodón**,** seda, poliéster, lino, Jean delgado y Jean grueso, textil artesanal

c) Las manchas de sangre en los soportes se sometieron a condiciones :
- Ambientales: Se expone abierto (al aire libre), cerrado (bajo sombra) y enterrado.
- Temperatura : Se expone a -20°, 4°,17º**,** 37° y 60° C. en diferentes equipos.

d) Tiempo fue de 24 horas, una semana y un mes.

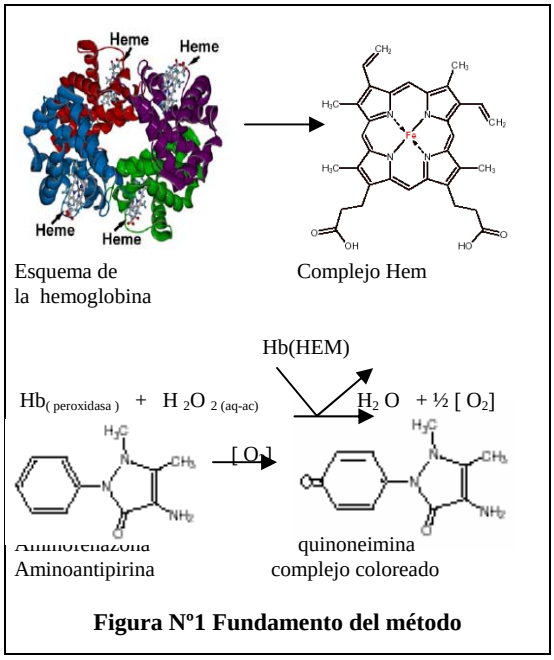

Figura Nº1 Fundamento del método

Manchas de sangre con interferentes

a) Con el fin de evaluar la interferencia de sustancias que puedan generar resultados falsos positivos en la técnica se hicieron manchas sobre las prendas de tela de algodón. con:
- Frutas: Mora , fresa, uva roja, naranja ,plátano y papaya
- Vegetales: Rábano, espinaca, acelga, apio, zanahoria, tomate, zapallo, remolacha y pimentón.
- Otras sustancias: Vino tinto, salsa de tomate, café, gelatina, alcohol yodado, coca cola.
- Fluidos biológicos: liquido ascítico, liquido biliar, saliva y orina.

b) Para realizar las manchas se tomó 1 parte de muestra de sangre con una parte de interferente y se hicieron manchas con 50 µl de la mezcla.

c) Estas manchas se sometieron a: Calor (37 ^{o}C); Frío (4 ^{o}C); Ambiente abierto al aire y enterrado.

d) El tiempo al cual fueron expuestas fue de: 24 horas, 1 semana y 1 mes respectivamente.

Manchas de sangre lavadas

a) Se realizaron 10 manchas de sangre de aproximadamente 1 cm. sobre tela sintetica de 20 cm de largo por 4 de ancho .

b) Estas manchas fueron lavadas con :
- Agua únicamente

Received: 04/11/09 Approved: 30/11/09 Published: 2/12/09

- Agua y jabón
- Agua con detergente en polvo (ACE)
- Agua con aceite
- Agua con lavandina.

c) Se lavaron a mano y en cada lavado se procedió a cortar dos pedazos de tela de 0.5 por 0.5 cm del sitio donde se observo la mancha.

Prueba de sensibilidad

a) Se recolecto muestra de sangre con EDTA al 5% por venopunción de 4 pacientes que referían grupo sanguíneo A, B, AB y O.
b) Se realizó hemoclasificación de los grupos sanguíneos del sistema ABO (A , B, AB y O) por el método de aglutinación utilizando sueros anti-A , anti-B y anti D. (PLASMATEC LAB).
c) Se realizaron diluciones seriadas base 10 con solución fisiológica al 0.85% a partir de 1/10 hasta 1/1.000.000 e cada uno de los grupos.
d) De estas diluciones se hicieron manchas por triplicado sobre : Algodón, Gasa y Papel filtro

Pre-tratamiento de las muestras y detección

En tubos de ensayo se colocó un fragmento de la mancha de 0,5 x 0,5 cm de cada experimento se agregó 1 ml de solución salina al 0.85%. Después de 30 minutos a temperatura del laboratorio o 24 horas en refrigerador hasta que las manchas sean extraídas del soporte. [5]

a) La reacción se llevo a cabo en soporte de vidrio de 12 concavidades para muestras pre-tratadas. y directamente sobre la muestra en el soporte de tela, algodón, gasa y papel filtro sobre una base de vidrio.

b) Las cantidades que se utilizaron de muestras y reactivos fueron: Una suspensión de la mancha a examinar (50 ul), solución de aminofenazona o aminoantipirina (50 ul), solución acidificante de acido acético glacial (20 ul) y un volumen de perhidrol (50 ul) en el orden respectivo.
c) En ambos métodos se observo un cambio de violeta con la aminofenazona en las muestras negativo (-) directamente.

coloración: roja con la aminoantipirina y positivas. Reportando como positivo (+) o

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se determino que el método presuntivo o de orientación basado en el sustrato aminofenazona, es mas sensible en la detección de manchas de sangre con fines forenses, independientemente de los grupos sanguíneos A, B, AB y O. Se detectó presencia de sangre en manchas secas sobre soportes absorbentes hasta un mes de exposición en ambientes cerrados a temperaturas inferiores a 4^{o}C. Si las manchas han sido expuestas a temperaturas altas, ambientes húmedos o enterrados y abiertos la antigüedad de la mancha se ve afectada en su detección por ambos métodos de orientación. Se demostró que tanto la aminofenazona como la aminoantipirina tienen una capacidad de detectar muestras mínimas casi invisibles cuando fueron sometidas a lavados. Se observó que los tests de aminofenazona y aminoantipirina en presencia de vegetales verdes y frutas cítricas en las muestras pueden interferir en su detección. Los métodos de orientación en base a aminofenazona y aminoantipirina resultan adecuados y economicos en su implementación con fines forenses.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece la colaboración del Instituto de Investigaciones Forenses por el impulso a la realización de este trabajo, a la Dra. Patricia Mercado Flores de Inmunoserologia perteneciente al Laboratorio Central del Hospital de Clínicas Universitario por su apoyo en las pruebas que se realizaron.

REFERENCIAS

1. Gaensslen R; Lee C. “Forensic Science An Introduccion to Criminalistics De Forest P.R”, New York: McGraw –Hill, **1983**, 632-643.
2. Bonnet E. “Medicina Legal” .2 ed Buenos Aires: López Libreros Editores. **1978**.
3. Sheehan F. X.; Kobilinsky, L. “Identificación de Sangre Humana” *J. Of Chemical Education*, **61**, **1994**, 1,2.

Received: 04/11/09 Approved: 30/11/09 Published: 2/12/09

Perutz M. F.; Luzzatto, L.; Notaro, R. "Structure and mechanism of haemoglobin" *Br Med Bull*, **32**, **1976**, 9195-208.

4. Negre, M. A.; Castelló, P. P.; Gil, F. A.; Verdú P. "Manchas de Sangre-: Seguridad en pruebas de orientación" *Cuadernos de Med.* (México) **2003**, **34**, 29-34.

5. Cox, M. "Effect of Fabric Washing on the Presumptive Identification of Bloodstains" *J. of For Cs* **1990**, **35**, 81-99.

6. Patricia, M. C. "Manual de Química Forense". 1ª Edic. Buenos Aires, Argentina. Ed. La Roca, **2004**.