

---

**1**

**INTRODUCCION**

---

---

## 1.- INTRODUCCION

La Criminalística, como parte de la Medicina Legal, y en particular el estudio de las manchas, abre un campo muy interesante no sólo para los especialistas en esta disciplina, sino para otros profesionales, biólogos, físicos, químicos, etc., cuya ayuda puede ser fundamental a la hora de desarrollar métodos sencillos, sensibles y específicos, que permitan determinar la naturaleza de las manchas y extraer toda la información posible de las mismas.

Así pues, aunque en un principio las investigaciones se basaban fundamentalmente en la observación e interpretación de pruebas físicas<sup>(1)</sup>, a partir de la segunda mitad del siglo XIX, y gracias a los avances científicos y tecnológicos que estaban teniendo lugar, se plantea la posibilidad de la colaboración de especialistas en diferentes campos científicos con los expertos en Medicina Legal. El fin perseguido es extraer la mayor información posible de los indicios hallados en el lugar de un suceso que es motivo de investigación.

Este punto marcó el inicio del trascendental concepto de CIENCIAS FORENSES.

Así, en Criminalística, es fundamental la colaboración coordinada de físicos, biólogos, químicos, especialistas en tratamiento de imágenes, es decir un amplio grupo de expertos cuyo trabajo conjunto permite que los indicios pasen a ser considerados como pruebas y se puedan presentar como tales en un procedimiento civil o penal.

Y es el desarrollo progresivo de las Ciencias Forenses, lo que ha dado lugar a la moderna Criminalística.

---

---

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.

El estudio de la sangre y otros fluidos corporales, tiene un papel relevante en las Ciencias Forenses, y ha sido, probablemente, uno de los temas más estudiado en Criminalística, ya que en él se basan la mayor parte de las pruebas científicas. Según la bibliografía revisada, desde un punto de vista estadístico<sup>(2)</sup>, las manchas que con mayor frecuencia aparecen en la escena del crimen son las de sangre.

Es bien sabido que el estudio de los aspectos físicos, químicos y serológicos de las manchas de sangre puede llevar a conseguir demostrar uno o más de los siguientes aspectos: la participación de personas y objetos en una acción criminal; aproximarnos a la forma en que se llevó a cabo un determinado suceso; identificar un cuerpo desconocido; determinar, por análisis toxicológico, la causa de una muerte; finalmente, en otros, saber si se trata de una muerte por homicidio, suicidio, accidente o por causas naturales.

Aunque, en un principio, pueda pensarse que las manchas de sangre son fáciles de reconocer a simple vista, no siempre es así ya que, según el color y el tipo de material donde se encuentre la mancha, o por la antigüedad de la misma, se pueden confundir con otras de procedencia distinta como serían las de herrumbre, vino, zumos de frutas, etc. Además el color de las manchas hemínicas puede ser también variable dependiendo de distintas circunstancias. Así, aunque una mancha de sangre relativamente fresca tiene un color castaño rojizo, si se encuentra en capas muy finas puede aparecer de color verde grisáceo<sup>(3)</sup>. Tampoco es difícil encontrar manchas sanguíneas que por acción del sol, el calor, el viento o como resultado de algún intento de hacerlas desaparecer mediante el lavado, hayan adquirido un color que puede variar desde el rojo-castaño al negro, o incluso pueden aparecer de color verde, azul o blanco-grisáceas. También el tipo y el color del soporte, sobre el que aparece la mancha, puede hacernos dudar sobre la naturaleza sanguínea de la misma, por ejemplo, en algunos tipos de tela, la sangre penetra en las fibras y en otros no. Por otra parte, a veces son tan pequeñas que resulta muy difícil asegurar su naturaleza mediante la observación.

En cualquier caso, y aunque no hubiera ninguna dificultad en reconocer una mancha como sangre simplemente por observación, siempre es necesaria una verificación de su naturaleza sanguínea en el momento de la reconstrucción de un caso o de ser presentadas como pruebas en un procedimiento legal.

A grandes rasgos, son cuatro las cuestiones que se plantean en el laboratorio a la hora de identificar manchas<sup>(4)(5)</sup>:

1. ¿La mancha que estudiamos es de sangre?. Esta parte de la investigación implica la realización de una serie de procedimientos que reciben el nombre conjunto de diagnóstico genérico. Existen dos tipos de pruebas a aplicar:

---

---

- Pruebas de orientación. 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, por lo que sólo se puede valorar un resultado negativo.

- Pruebas de certeza, que son muy específicas y de menor sensibilidad. Se basan en comprobar la presencia en la muestra de alguno de los componentes de la sangre. Estas pruebas no permiten determinar si la sangre analizada es o no humana. Las técnicas más utilizadas son:

a) Pruebas microscópicas. Consisten en la observación de la mancha por microscopio. Se pueden realizar por examen directo de la muestra, o también sometiéndola previamente a un proceso de aislamiento y tinción de los hematíes y leucocitos.

b) Métodos cristalográficos o microquímicos. En estas pruebas, se somete a la mancha a la acción de distintos reactivos, para obtener determinados derivados de la Hemoglobina. Estos derivados forman cristales de colores y formas característicos que pueden ser identificados por observación con un microscopio y permiten asegurar la naturaleza sanguínea de la muestra que se está analizando. Las dos técnicas más utilizadas son la de TEICHMANN para obtener cristales de clorhidrato de hematina, y el método basado en la obtención de cristales de hemocromógeno, utilizando el reactivo de TAKAYAMA.

c) Examen luminiscente<sup>(6)</sup>: En esta técnica se estudia la mancha que se quiere identificar con la luz de WOOD. En un primer paso se ilumina la muestra directamente. A continuación, se le añade unas gotas de ácido sulfúrico concentrado y se vuelve a examinar a la luz de WOOD. Se puede decir que la mancha que estudiamos es de sangre siempre que en la observación directa no se observe luminiscencia, pero al volver a realizar el examen con la luz de WOOD después de haber tratado la muestra con ácido sulfúrico, se pueda ver una luminiscencia roja.

c) Técnicas espectroscópicas, que consisten en confirmar la presencia de sangre en una mancha, mediante la obtención del espectro de absorción de la Hemoglobina y de sus derivados, obtenidos por la adición de diferentes reactivos.

d) Técnicas cromatográficas. Se identifica la muestra de sangre mediante cromatografía en papel Whatmann nº 1 o sobre capa fina de gel de sílice utilizando como solvente metanol, ácido acético y agua en proporción 90:3:7

2. ¿Se trata de sangre humana?. A las pruebas que se realizan para determinar si la sangre es o no humana, se les denomina en general, diagnóstico de especie. Los métodos utilizados se basan en la reacción de precipitación que se produce entre los antígenos y los anticuerpos. Las técnicas más comunes son: la reacción de UHLENHUT, el Test de OUCHTERLONY y la técnica de SCHEIDEGER.

3. Una vez se ha comprobado que la sangre es humana, se intenta determinar a qué grupo pertenece. En algunos casos, se podría conseguir la identificación del individuo del que procede. En principio las

---

---

pruebas que se realizaban estaban basadas en la obtención del grupo sanguíneo al que pertenece la sangre a analizar. Las técnicas más utilizadas eran la técnica de LATTES y la de absorción-elución. Actualmente el diagnóstico individual está basado en el estudio del ADN.

4. Otras problemas de importancia médico-legal en relación con las manchas de sangre son los siguientes:

- Diagnóstico del sexo del individuo de quién procede: Se aplica la técnica descrita por ZECH en 1969 y que se basa en la tinción con quinacrina de la porción distal del cromosoma Y, con lo que se consigue una fluorescencia característica. PHILLIPS y GATEN, en 1971, utilizaron este procedimiento con fines forenses. Sin embargo, posteriormente se ha comprobado que existen casos de cromosomas Y que no presentan luminiscencia, por lo que la técnica no permite afirmar con seguridad el sexo del individuo, ya que se puede obtener un resultado negativo falso en el caso de que la sangre sea antigua, o, como ya hemos indicado, cuando pertenezca a un individuo con fluorescencia Y negativa.

- Determinación de la región anatómica de donde procede la sangre analizada: Se realiza mediante un estudio citológico de las células que, en su caso, pudiera contener la mancha.

- Estudio de la data: No es posible hacer un diagnóstico preciso del momento en que se produjo la mancha, tan sólo determinar si es antigua o reciente. Aun en este caso debemos tener en cuenta que en el proceso de envejecimiento intervienen muchos factores que podrían llevarnos a confundir una mancha reciente con una antigua. Algunos de los métodos empleados para el estudio de la data son: la valoración de la velocidad de elución de la mancha en un solvente apropiado, el test de difusión de cloruros, propuesto por GISBERT e IBORRA en 1957, y el estudio de la degradación de las fracciones proteicas que contiene la mancha.

En la práctica habitual, como es bien sabido, al descartar que una mancha pueda ser de sangre, se detiene la cadena de investigación. Por la importancia de este hecho, en el estudio que nosotros nos proponemos realizar, vamos a ocuparnos de la primera de las cuestiones médico-legales que se han indicado poco más atrás.

Hemos hecho una revisión de los métodos que se utilizan para identificación genérica de las manchas de sangre, lo que todos los autores coinciden en denominar como diagnóstico genérico de las mismas, y dentro de este tema, nos hemos centrado en las pruebas de orientación: tienen como objetivo el poder afirmar que la mancha que estamos estudiando no es de sangre, aunque en ningún caso permiten identificar sin lugar a dudas la naturaleza sanguínea de la misma.

En cualquier investigación que se lleve a cabo en un laboratorio de Criminalística con el fin de determinar la naturaleza de una mancha, es fundamental disponer de un método sencillo, rápido y sensible que nos permita determinar si la mancha que es motivo de nuestro estudio es o no sangre. Mediante la aplicación de las

---

---

pruebas de orientación, se puede determinar si la mancha que se ha encontrado en el lugar de un suceso que se está investigando no es de sangre, lo que, insistimos, es motivo en muchas ocasiones de que la investigación se de por terminada o, en otros casos, de que no se inicie. Por ello las pruebas de orientación han sido muy estudiadas intentando eliminar las dificultades y posibles interferencias en la aplicación de los distintos métodos propuestos.

Como es bien sabido, existen sustancias que simulan el color de la sangre<sup>(7)</sup>, por ejemplo, determinadas frutas y verduras, pinturas, anilinas, herrumbre, y, además, algunas de ellas contienen componentes capaces de dar un resultado positivo en los test de orientación, dando lugar a lo que llamamos un falso positivo.

El estudio de las manchas de sangre ha sido considerado desde el siglo XIX, como fundamental en cualquier investigación criminal. Se han ido proponiendo distintos métodos para determinar la naturaleza de las manchas, y en todos ellos están implicadas diferentes reacciones químicas.

Cuando se trata de diseñar un método que permita determinar su naturaleza sanguínea, se debe tener en cuenta que se pueden presentar los siguientes problemas:

#### **A) Problemas de la mancha y su ambiente:**

La mancha motivo de estudio está sujeta a muchos condicionantes como son: el tiempo desde que se produjo, su posible estado de putrefacción o de calcinación, o también la mezcla con otras sustancias; por ejemplo, al intentar limpiar la mancha se puede haber utilizado cualquier sustancia que altere las características de la misma.

#### **B) Problemas del método investigador:**

Existen otros factores de origen físico-químico que se deben tener en cuenta ya que muchas de las técnicas estudiadas tienen como fundamento diferentes reacciones químicas, que están a su vez sujetas a distintas variables como: la temperatura, pH del medio, concentración, velocidad de la reacción, etc., de forma que, una reacción que en determinadas condiciones se produce según un mecanismo conocido, si se varían algunos factores, se puede alterar de tal forma que nos dé resultados no esperados, conduciendo a falsas conclusiones.

Los diferentes métodos propuestos han ido intentando eliminar todos estos problemas. En cualquier caso, en las pruebas de orientación, e independientemente del método utilizado, el resultado positivo es poco valorable, puesto que hay sustancias que pueden dar este resultado sin ser sangre.

Antes de entrar con más detalle en la descripción de los métodos de orientación, nos parece interesante hacer una breve revisión histórica sobre cómo se han ido desarrollando las diferentes pruebas de investigación de manchas de sangre, haciendo la consideración previa de que todos los métodos descritos están basados en la composición de las células y fluidos componentes de la sangre.

---

---

Según la bibliografía revisada<sup>(8)(9)</sup>, ya en el año 1829, BARRUEL, ideó un método que permitía distinguir la sangre humana de la animal. Consistía en hervir la sangre que se quería identificar en ácido sulfúrico. El autor propuso que el olor que se desprendía cuando la sangre era humana, era distinto que el que se podía percibir cuando la sangre procedía de animales; incluso, señalaba, por el olor desprendido, era posible deducir si la sangre era de hombre o de mujer. Este método, pese a su falta de rigor, fue considerado importante durante bastante tiempo.

Unos años más tarde, LUDWIG TEICHMANN-STAWLARSKY, describió el método conocido como prueba de TEICHMANN y que consiste en disolver la mancha de sangre seca, colocar unas gotas en un cristal junto con una pequeña cantidad de sal común y ácido acético cristalizado y calentar hasta la ebullición de la mezcla. Aparecen unos cristales característicos de la sangre que llamó cristales hemínicos y que se forman a partir de la Hemoglobina. El método es aplicable cuando la mancha de sangre se encuentra sobre metales oxidados o cuando se ha sometido a altas temperaturas; se admite desde entonces que si se observa la formación de los cristales, la mancha es, con toda seguridad, de sangre, existiendo dudas si la prueba resulta negativa.

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

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

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

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

La hemoglobina tiene un espectro de absorción característico que permite su identificación. Si se trata de sangre fresca, se puede obtener tratándola sólo con sal común; si se analiza sangre seca, se disuelve la

---

---

mancha con ácido acético, ácido sulfúrico o alcohol. Las pequeñas alteraciones que se provocan en la hemoglobina por la acción de los disolventes, no impiden su identificación.

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

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

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

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

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

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

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

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

Aunque no van a ser motivo de nuestro estudio, señalaremos como muy importantes, la posibilidad de detectar los antígenos de la sangre en otros fluidos corporales como saliva y semen, descrita por LANDSTEINER y LEVINE. y, simultáneamente, por YAMAKAMI. Destacaremos también el descubrimiento en 1940, de LANDSTEINER y WEINER de la existencia del factor RH en la sangre y, en 1945, la descripción del Test de COOMBS, propuesto por COOMBS, MOURANT y RACE, para la detección de anticuerpos antiRh.

---



---

En 1949, OUCHTERLONY, propuso una técnica basada en la reacción antígeno-anticuerpo y en 1960, STUART KIND utilizó un nuevo procedimiento basado en la técnica de absorción-dilución, que se podía aplicar a sangre seca.

A partir de 1962, se introdujeron técnicas basadas en la luminiscencia.

Las técnicas espectroscópicas adquirieron un gran desarrollo entre los años 1970 y 1980.

Un paso definitivo, que en este momento se encuentra en plena expansión, se dio en 1987 cuando JEFFREYS propuso el proceso basado en la obtención de lo que se llamó la "huella genética".

Por las características de nuestro trabajo, debemos centrarnos ya en los métodos empleados en las pruebas de orientación de las manchas de sangre, y para ello, haremos una revisión de los más conocidos y discutiremos su fiabilidad.

Las primeras pruebas que se propusieron eran poco sensibles. A continuación, pasamos a describir algunas de ellas<sup>(7)(10)(11)(12)</sup>:

#### **Técnicas basadas en características químicas de la sangre:**

**COMPORTAMIENTO AL CONTACTO CON AGUA DESTILADA:** La sangre desecada se diluye en agua destilada dándole un tinte rojizo y formando unas estrías características cuando asciende por un tubo capilar.

**COMPORTAMIENTO AL CONTACTO CON POTASA:** Si se añade potasa a un recipiente con sangre diluida en agua, aparece un tinte dicrómico rojo al trasluz y verde con luz reflejada. Esta propiedad de la sangre se debe a la transformación de la hemoglobina en hematina alcalina.

**COMPORTAMIENTO AL CONTACTO CON AMONIACO:** El amoniaco no cambia el color de la sangre, pero sí el de otros compuestos que pueden confundirse con ella.

**COMPORTAMIENTO AL CONTACTO CON ACIDO HIPOCLOROSO:** Al añadirlo a la sangre, produce un oscurecimiento de la misma, mientras que si se trata de otra sustancia orgánica, la aclara. En el caso de que la mancha de sangre esté muy extendida, podría aclararse pero muy lentamente. Este método es muy poco fiable, puesto que además hay otras sustancias que se comportan como la sangre.

**BUSQUEDA DE ALBUMINA Y FIBRINA:** Si se calienta una solución de sangre muy lentamente, adquiere un color grisáceo, debido a la coagulación de la albúmina. Aparece también un coágulo muy lábil, que se puede desestructurar con potasa, dando lugar al tinte dicrómico que se describió anteriormente.

---

---

**BUSQUEDA DE NITROGENO:** Al calentar trozos de sangre desecados, se desprenden vapores amoniacales que se pueden identificar por el olor, o también, observando el viraje del papel tornasol a color azul. El nitrógeno es el único gas capaz de producir este cambio.

**REACCION CON EL HIPOBROMITO DE SODIO:** Esta prueba fue ideada por FLORENCE. Consiste en poner sobre un portaobjetos una gota de solución sanguínea o unos filamentos de tejido manchados con sangre y que, a continuación, se tapan con el cubreobjetos. En los bordes del cubre, se añaden unas gotas de hipobromito de sodio que penetra por capilaridad. Si la muestra es sangre, se observa la formación de burbujas de gas.

**REACCION CON SULFATO DE HIDRACIDA:** Se trata de obtener hemocromógeno o hematina alcalina. La coloración se pierde al agitar porque el hemocromógeno se oxida. El reactivo se prepara a partir de un litro de solución de potasa al que se le añaden 100 ml de alcohol de 95 y 5 g de sulfato de hidracida. A continuación se filtra. El método consiste en añadir a un ml de la solución problema, 10 ml de reactivo. Si la muestra contiene sangre, se observa la aparición de un color rosa. Esta técnica es muy poco específica. Además es una reacción muy poco estable, por lo que en ocasiones resulta difícil valorar si el resultado ha sido positivo o negativo.

A continuación describiremos un conjunto de pruebas que tienen todas ellas un mismo fundamento químico: la presencia en la sangre de enzimas que catalizan la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno.

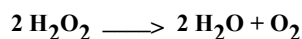
Estos enzimas forman parte del sistema de defensa que los organismos han ido desarrollando, con el fin de protegerse de la acción tóxica de los productos intermedios que se pueden producir durante el proceso de reducción del oxígeno.

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

### **CATALASAS**

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

Estos catalizadores utilizan dos moléculas de peróxido de hidrógeno, una de ellas actúa como sustrato dador de electrones y la otra como oxidante o receptor de electrones. La reacción que se produce se puede escribir de la siguiente forma:



---

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

En 1863, SCHÖNBEIN, propuso una técnica para identificación de manchas de sangre que se basaba en la existencia de catalasas en la muestra. El método es el siguiente:

#### REACCION DEL AGUA OXIGENADA:

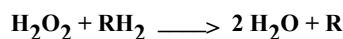
Al añadir agua oxigenada a una muestra que contenga catalasas, se produce un aumento de la temperatura de la solución y la formación de burbujas. El procedimiento consiste en agregar a la muestra de sangre previamente alcalinizada con potasa o amoníaco, unas gotas de agua oxigenada. Inmediatamente aparecen burbujas que ascienden hacia la superficie. Esta reacción se produce más débilmente cuando se realiza con sangre putrefacta, y también si la muestra ha sido sometida a altas temperaturas o tratada con ácidos minerales, ya que éstos destruyen las catalasas. Por otra parte es una prueba poco específica puesto que existen numerosos productos que poseen catalasas y que por lo tanto darían positiva la reacción.

#### **PEROXIDASAS:**

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

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

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



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

---

---

Las técnicas consisten en mezclar el reactivo con la muestra que se quiere identificar, y añadir a continuación, peróxido de hidrógeno. Las peroxidasa presentes en la muestra catalizan la descomposición del peróxido, liberándose oxígeno, que a su vez oxida al reactivo, provocando un cambio de color en la disolución. Algunos autores llaman a estas pruebas, métodos catalíticos. Entre ellos destacan:

#### REACCION CON TINTURA DE GUAYACO:

Fué descrita en 1861 por VAN DEEN, pero fué TAYLOR el que la aplicó a la determinación de manchas de sangre, en 1871.

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

El método experimental fue descrito por FLORENCE y TAYLOR, y es el siguiente: preparar extemporáneamente la tintura de guayaco, para lo que se disuelven 5 g de resina de guayaco en 100 ml de alcohol de 95 y se filtra. Se obtiene un líquido de color ambarino que es la tintura de guayaco. Simultáneamente, se deja durante varios días un frasco de esencia de trementina abierto para que capte oxígeno. Se comprueba que la preparación es buena cuando es capaz de decolorar una solución de índigo.

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

Algunos autores como DAY, recomiendan el empleo de eter ozonizado o eter sulfúrico metilado, así como esencias de eucalipto, limón o espliego. Sin embargo, la utilización de estos compuestos no mejora el método.

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

Esta reacción es muy sensible; según la bibliografía consultada daría positivo en soluciones al 1/25000. No se puede utilizar en el caso de que tengamos sangre antigua, putrefacta o carbonizada. Es una técnica muy poco específica, ya que da reacción positiva con casi todos los derivados metálicos, peróxidos de metales, goma arábica, gluten, leche, cuero, etc. Sin embargo, en estos casos, se observa el viraje de la tintura de guayaco antes de añadir la esencia de trementina, lo que no ocurre nunca cuando se

---

---

trata de sangre. Hay que tener en cuenta además, que para considerar que la reacción es positiva, el cambio de color debe producirse en pocos segundos, ya que, con el tiempo, se produciría igualmente, aun en ausencia de peroxidasas.

#### REACCION CON TINTURA DE ALOINE:

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

#### REACCION DE LA BENCIDINA:

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

En el caso de la *prueba de Adler*, el reactivo se obtiene a partir de la bencidina. Se han descrito diferentes formas de prepararlo. En un principio se utilizaba una disolución de bencidina en alcohol. Posteriormente se propuso un procedimiento alternativo, que consiste en disolver a saturación la bencidina en ácido acético glacial. También se ha utilizado como reactivo una disolución de bencidina en ácido hidrocórico, aunque, según la bibliografía consultada<sup>(13)</sup>, este reactivo presenta más inconvenientes que el preparado con ácido acético glacial.

Como donante de oxígeno lo más habitual es utilizar el agua oxigenada. Algunos autores proponen la aplicación de otros compuestos como la trementina ozonizada y el perborato de sodio<sup>(13)</sup>. Este último se ha estudiado como sustituto del peróxido de hidrógeno. Es bien sabido que el agua oxigenada es un compuesto bastante inestable, lo que podría traducirse en posibles variaciones en la efectividad del método. Para evitar este problema se experimentó con un reactivo compuesto por 0,2 g de perborato de sodio y 0,1 g de bencidina disueltos en 10 ml de ácido acético glacial.

La prueba puede realizarse con muestra en disolución, y también sobre manchas secas directamente, o obteniendo antes la *huella de Taylor*.

La técnica consiste en añadir 1 ó 2 gotas del reactivo y esperar unos segundos para ver si hay un cambio de color en la disolución como consecuencia del viraje del reactivo. Si éste se produce, la oxidación de la bencidina es inespecífica y la prueba no tiene valor. Si no ha habido viraje, se añaden 1 ó 2 gotas de agua oxigenada concentrada. Cuando la muestra contiene peroxidasas, se observa inmediatamente el viraje del reactivo y la solución adquiere un color azul intenso. Para considerar el resultado del test como positivo, el viraje se debe observar en menos de 10 segundos.

---

---

Esta prueba es muy sensible. Sin embargo a la hora de dar un valor orientativo del grado de sensibilidad de la reacción, nos encontramos con bastantes discrepancias entre los distintos autores; así hemos encontrado que según algunos investigadores, se considera que la prueba de la bencidina es efectiva para concentraciones de sangre de 1/200000, otros, entre los que se encuentra FERREIRA, proponen que es sensible para disoluciones 1/300000, y, posteriormente se ha admitido sensibilidad entre 1/300000 y 1/500000<sup>(9)</sup>. En la revisión de distintos trabajos que consultamos con el fin de conocer hasta qué concentraciones de sangre es sensible la prueba de la bencidina, encontramos que, en general, al indicar un valor, se omite las condiciones en las que se ha determinado el valor propuesto<sup>(13)</sup>. Así pues, si la determinación se ha realizado a partir de muestras líquidas, los resultados, en principio no pueden ser comparables a los que se obtienen a partir de manchas secas. Esto se debe a que al añadir el reactivo a la muestra, éste sufre a su vez el efecto de la dilución, y por lo tanto no es tan efectivo como en los casos en los que se añade a manchas secas. Por esta razón, la prueba puede dar negativa para una disolución de sangre de una concentración determinada, y, sin embargo, si se realiza la misma prueba obteniendo previamente una mancha de esa disolución, puede obtenerse un resultado positivo. Un primer estudio acerca de las variaciones en los valores de la sensibilidad de la prueba por diferentes factores, fue abordado por COX<sup>(14)</sup>

La reacción de ADLER, se puede utilizar con sangre hervida durante un tiempo prolongado, es decir, sometida a altas temperaturas, sangre antigua y también con sangre que haya sido tratada con sosa. Sin embargo, es poco específica ya que da positiva con algunos compuestos químicos, como los sulfocianuros, derivados del hierro, el formol, la piedra pómez, el talco, la albúmina, la arena, y ciertos líquidos coloidales. Según BORDAS, también el pus, el zumo de ciertas frutas ácidas y algunas plantas como las espinacas, las acederas y las zanahorias dan positivo la *prueba de Adler*. En definitiva, cualquier sustancia que contenga peroxidasa dará positiva la reacción. Por esta razón, sólo se debe valorar el resultado negativo de la prueba.

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

#### REACCION DE LA O-TOLIDINA:

Se ha utilizado como una alternativa a la reacción con bencidina. El reactivo se prepara a partir de 1,6 g de O-Tolidina y 40 ml de etanol. Se añaden 30 ml de ácido acético glacial y 30 ml de agua destilada. Esta solución se puede guardar en el frigorífico. También se debe preparar una solución de peróxido de hidrógeno al 3%.

La técnica consiste en añadir 1 ó 2 gotas del reactivo a la muestra a analizar, y a continuación 1 ó 2 gotas de la disolución de peróxido de hidrógeno. Si el resultado es positivo, se verá inmediatamente un color

---

---

azul. Como en el caso de la prueba de la bencidina, para poder considerar la reacción positiva, el viraje debe tener lugar en menos de 10 segundos. La sensibilidad del método es similar a la de la bencidina.

#### REACCION DE LA LEUCOMALAQUITA VERDE:

También se le llama reacción de MEDINGER. El reactivo se puede preparar de dos formas: La primera consiste en mezclar 0,32 g de perborato de sodio con 0,1 g de leucomalaquita verde. Este reactivo se puede guardar a temperatura ambiente. Se prepara una disolución con 8 ml de ácido acético glacial en 4 ml de agua destilada, que se añadirá al reactivo obtenido anteriormente, en el momento de realizar la prueba, con la proporción siguiente: 0,14 g de reactivo leucomalaquita/perborato en 4 ml de solución de ácido acético. Otra forma de obtener el reactivo consiste en mezclar 10 mg de leucomalaquita verde en 8 ml de una disolución que se prepara a partir de 8 ml de ácido acético glacial y 4 ml de agua destilada. También es necesario disponer de una disolución de peróxido de hidrógeno al 3%.

La técnica, si se utiliza el primer reactivo, consiste en añadir 1 ó 2 gotas del mismo a la muestra. Si se utiliza el segundo, se añaden 1 ó 2 gotas del reactivo y a continuación 1 ó 2 gotas de la solución de peróxido de hidrógeno. Para que la reacción sea considerada como positiva se debe observar en menos de 10 segundos un color azul-verdoso. La sensibilidad del método es de 1/100000

#### REACCION CON PARAFENILDIAMINA:

En este caso, el compuesto que será oxidado es la parafenildiamina.

La técnica consiste en preparar una solución 1/200 de clorhidrato de parafenildiamina en agua destilada. A la muestra se le añaden 4 ó 5 gotas del reactivo y 2 ó 3 gotas de agua oxigenada. Si hay peroxidasas aparece, tras agitar, un color verde que cambia a violeta y más tarde a violeta oscuro.

También se puede aplicar sobre una *huella de Taylor*. Es una técnica poco sensible y que no se puede utilizar con sangre antigua o putrefacta.

#### REACCION DE LA FENOLFTALEINA:

Esta reacción fue descrita por KASTLE y SCHEEDE y posteriormente por MEYER, por lo que también se le conoce con el nombre de reacción de KASTLE-MEYER. Fue introducida en el campo de la Medicina

---

---

Legal por BALTHAZARD y LAMBERT. En esta reacción, el reactivo se obtiene a partir de la fenoltaleina y como dador de oxígeno se utiliza el peróxido de hidrógeno.

El reactivo de KASTLE-MEYER, se prepara a partir de 2 g de Taleina de fenol, 30 g de potasa anhidra, 100 g de agua destilada y 20 g de polvo de zinc. A continuación se hierve la mezcla, que en este momento es de color rojo, hasta que se decolora totalmente. Esto ocurre porque la Taleina de fenol se reduce a fenoltaleina. Después se filtra en caliente y la solución obtenida, se conserva en frascos oscuros y cerrados herméticamente. El reactivo es muy inestable, y se oxida con mucha facilidad. Poco a poco va retomando un color rosado hasta que vira totalmente. Esta oxidación se puede retrasar, si, como aconsejan DELARDE y BENOIT, se pone una pequeña cantidad de polvo de zinc dentro del frasco. También se puede colocar una capa de vaselina por encima del reactivo para disminuir el contacto con el aire.

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

1.- La temperatura debe ser menor de 30°C, porque a temperaturas superiores, el reactivo se oxida aunque no haya sangre.

2.- Debemos controlar también el pH de la muestra, y solamente debemos considerar el resultado de la prueba como positivo, si el viraje se produce inmediatamente.

Se han propuesto algunas modificaciones al método:

1. SARDA propone añadir 2 ml de alcohol y de ácido acético cristalizante para mejorar la hemólisis. Esto es útil en las determinaciones de sangre en orina.

2. BALTHAZARD y LAMBERT aconsejan disolver la mancha a estudiar, someterla a ebullición lenta y repartir el líquido en dos alícuotas. A una de ellas se le aplica la *prueba de Adler*, y a la otra la de la fenoltaleina, de esta forma el reactivo de ADLER actúa como testigo del buen estado del reactivo que hemos preparado.

Esta reacción es la más sensible de todas. DELARDÉ y BENOIT obtuvieron resultados positivos en diluciones 1/1000000, y LAMBERT comprobó que se producía la reacción incluso en diluciones de 1/10000000. Otros autores han indicado que la sensibilidad es de 1/5000000. Por otra parte, se ha demostrado que la reacción es válida para la identificación de sangre antigua y también sangre hervida, y algunos autores indican que también da positiva las muestras que han sido sometidas a la acción de ácidos o álcalis.

---



---

#### REACCION DE LA FLUORESCINA:

Es una derivación del método anterior propuesta por FLEIG. Consiste en sustituir la fenolftaleína por fluoresceína reducida por hidrogenación en medio alcalino.

La técnica es igual a la descrita anteriormente y, si la muestra contiene oxidasas, se observa la aparición en el tubo de ensayo de una fluorescencia cuya intensidad depende de la concentración de oxidasas en la muestra.

Otras pruebas de orientación, menos utilizadas, pero cuyo fundamento es el mismo que el que hemos detallado para las pruebas anteriores son:

#### REACCION DE THEVENON Y ROLAND:

El reactivo se prepara a partir del piramidón. Y la coloración obtenida es violeta.

#### REACTIVO DE KOHN-O'KELLY:

Utiliza la 0-Toloudina que vira a verde azul.

En todas estas pruebas se debe dudar de la presencia de sangre si se observa que la reacción tiene poco color, o si tarda en desarrollarse más de 10 segundos. También si se observa que el color se concentra en un punto de la muestra y no está difundido por toda ella o cuando la coloración no es del tono correcto<sup>(9)</sup>.

#### PRUEBA DEL LUMINOL (3-ANIMOFTALHIDRACIDA):

El luminol es un compuesto quimioluminiscente y, por ello, el método consiste en provocar la producción de luz por parte de las peroxidasas presentes en la muestra.

El reactivo se prepara mezclando 0,5 g de luminol con 25 de carbonato de sodio. Esta mezcla es estable y se puede guardar. Cuando se vaya a hacer la prueba se prepara una disolución con 3,5 g de perborato de sodio en 50 ml de agua destilada y se añade a la mezcla anterior.

La técnica consiste en aplicar el reactivo, con un pulverizador, sobre los objetos o zonas donde se encuentren las manchas que queremos investigar.

Si el test es positivo, se ve una luminiscencia blanco-azulada, que debe ser observada en la oscuridad. Esta prueba es muy útil cuando las manchas son difíciles de ver, cuando se encuentran en superficies oscuras, en grietas o hendiduras o zonas que han sido lavadas. El luminol no destruye la mancha y no interfiere en el caso de que se realicen después otras pruebas de confirmación o serológicas.

---

---

La sensibilidad es de 1/5000000 y es más efectivo con sangre antigua que con sangre fresca. Se puede aumentar la efectividad rociando previamente la mancha con ácido hidroclicórico al 2% para descomponer la hemoglobina.

Todos los métodos revisados hasta el momento tienen dos características en común:

1. Son muy sensibles, capaces de detectar trazas de sangre
2. Son poco específicos, es decir, pueden dar un resultado positivo para gran cantidad de sustancias además de la sangre; por ello, sólo se puede valorar un resultado negativo de la prueba.

Los falsos positivos obtenidos en la aplicación de las pruebas de orientación han sido motivo de estudio por diferentes autores, que han intentado encontrar métodos para poder identificar los compuestos capaces de interferir en la reacción que se aplica y la forma de evitar la interferencia de los mismos<sup>(15)</sup>.

Así, PINKER realizó un estudio sobre las sustancias que son capaces de interferir en la *prueba de Adler*, la reacción de la leucomalaquita verde, y el reactivo de KASTLE-MEYER. Para esto, eligió 95 productos químicos, capaces de interferir en las pruebas que hemos mencionado, y realizó las tres pruebas con cada uno de ellos. El resultado de la experiencia fue que sólo uno de los compuestos analizados daba positivo en las tres pruebas. Posteriormente, realizó la misma investigación a partir de 50 manchas obtenidas a partir de frutas, tintes, productos fisiológicos, etc. Comprobó que ninguna de las muestras daba positivo en todos los test. Según estos resultados, se puede concluir que una forma de detectar los falsos positivos, es realizar más de un test sobre la muestra a analizar.

Centrándonos en la prueba de la bencidina, también se han estudiado con detenimiento las posibles causas de falsos positivos<sup>(13)</sup>.

Así, se ha comprobado que la oxidación de la bencidina por el peróxido de hidrógeno, no se produce si no existen peroxidases, pero sí se ve afectada por la presencia en la muestra de agentes oxidantes químicos en solución ácida y por distintos catalizadores. Según esto, existe posibilidad de obtener falsos positivos en las siguientes circunstancias:

a) Por contaminación causada por agentes ajenos a la muestra:

La sensibilidad de la prueba es muy alta, por lo que se deben realizar pruebas de control para asegurarse de que se obtiene un positivo verdadero, comprobando que no se debe a ningún contaminante que se encuentre en el soporte de la mancha, al mal estado de los reactivos o a haber seguido un procedimiento no correcto al realizar la prueba. De forma que si inesperadamente, se encuentra un resultado positivo en un caso en el que debe obtenerse un negativo, se debe intentar encontrar el motivo antes de realizar la prueba sobre la muestra.

---

---

b) Presencia de oxidantes químicos y catalizadores:

Aunque los oxidantes químicos pueden dar lugar a un resultado positivo de la prueba de la bencidina, su comportamiento es distinto al de la sangre. Se pueden distinguir porque el color obtenido generalmente es intenso, pero distinto al que se observa si la muestra contiene sangre. Sin embargo, el color desarrollado por el contaminante, puede impedir la correcta valoración del resultado del test. Debemos señalar que cuando se realiza la *prueba de Adler*, en una muestra que contiene oxidantes químicos, al añadir el reactivo se observa una decoloración de la misma, lo que no ocurre cuando se aplica sobre una muestra que sólo contiene sangre. Si se produce la decoloración, se debe sospechar que existen contaminantes en la mancha a estudiar y se debe tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos. Además, es importante detectar la existencia de estas interferencias, para intentar eliminarlas antes de someter a la muestra a otras pruebas de identificación.

Los catalizadores químicos dan una reacción positiva en la *prueba de Adler*. Los más estudiados como posibles interferencias en la reacción de la bencidina, han sido las sales de cobre y níquel. Sin embargo, también en este caso la reacción se desarrolla de forma distinta que cuando se realiza con sangre. Al añadir el reactivo a una muestra que contiene catalizadores, aparece una débil coloración. Si a continuación se agrega el peróxido de hidrógeno, esta coloración desaparece inmediatamente y después, muy lentamente, se va observando el desarrollo de la coloración azul característica de la prueba de la bencidina. Si la técnica se aplica sobre la *huella de Taylor* de la mancha, la coloración azul comienza formando un anillo alrededor del área humedecida del papel de filtro y se va extendiendo gradualmente. La reacción no se completa hasta que han transcurrido por lo menos 15 minutos.

Con este tipo de contaminantes también se ha comprobado que los catalizadores, cuando se someten a la *prueba de Adler* utilizando muestras secas, no dan un resultado positivo. En el caso de oxidantes químicos, si se realiza la reacción sobre cristales del producto contaminante, se obtiene un resultado negativo.

Además, debido a su alta sensibilidad, la reacción de la bencidina permite detectar trazas de sangre no visible. Esto no ocurre en el caso de los agentes químicos oxidantes, ni cuando se trata de determinar trazas de catalizadores.

c) Presencia de peroxidasas vegetales:

Es el grupo más importante de compuestos que pueden interferir en la *prueba de Adler*. Se ha comprobado que muchos tejidos vegetales dan una reacción intensa con la bencidina que induce a error. Sin embargo se debe tener en cuenta diversos factores; en primer lugar, se debe observar el color de la mancha que se va a identificar. El color blanco y el verde son los que, generalmente, están asociados

---

---

a productos vegetales. Por otra parte, hay que señalar que las peroxidasas vegetales se encuentran en las células de los tejidos, por lo que el jugo que procede del vegetal da una reacción negativa o muy tenue. CULLIFORD y NICKOLS señalan, en un estudio que analiza las posibles interferencias en la reacción de la bencidina, que según afirma NICKOLS, para obtener una reacción intensa, sería necesaria la presencia de tejidos o fragmentos de tejidos. Estos fragmentos serían fácilmente identificables examinando la mancha con un microscopio. Los trabajos experimentales que estudian el resultado de la reacción de la bencidina cuando se aplica a peroxidasas vegetales, se han diseñado obteniendo una huella del tejido vegetal que se va a analizar sobre papel de filtro, o, en otros casos, se ha realizado la prueba directamente sobre el vegetal fresco.

Para evitar confundir las manchas que son de sangre, con las que proceden de vegetales, se ha estudiado las diferencias que existen entre las peroxidasas vegetales y las animales. Las conclusiones son las siguientes:

### 1. Efecto del calor:

Las peroxidasas de origen vegetal se inactivan con el calor. A una temperatura de 100°C, todas ellas se inhiben rápidamente. A esa misma temperatura, las peroxidasas animales son relativamente estables, de forma que se ha propuesto que calentando la muestra que se va a identificar, durante un periodo corto (5 minutos), a una temperatura de 100°C, se consigue eliminar la interferencia por la posible presencia de peroxidasas vegetales.

### 2. Efecto del tiempo:

Las peroxidasas de origen animal son muy estables al paso del tiempo. Las manchas de sangre antiguas dan una reacción positiva en la prueba de la bencidina. En el caso de las peroxidasas vegetales, se comprueba que la antigüedad de la muestra influye en el resultado de la prueba. En experiencias realizadas a partir de huellas de las manchas obtenidas en papel de filtro, extractos acuosos de las manchas, o haciendo el estudio directamente sobre el soporte en que se encuentran, se observa que, a partir de los 5 días de antigüedad, ninguna prueba da un resultado positivo, excepto las realizadas directamente sobre las manchas, en las que es posible ver una reacción positiva muy débil, y sólo en los casos en los que ésta es muy intensa.

### 3. Efecto del pH:

La actividad de las peroxidasas vegetales se potencia en medio fuertemente ácido, sin embargo a pHs básicos, no son reactivas. Es por esta razón por la que se ha apuntado que la reacción de la fenoltaleina es más específica que la *prueba de Adler*. Sin embargo también se debe tener en

---

---

cuenta que en el caso de la reacción de la fenoltaleína, el reactivo es más complicado de preparar, conservar y usar.

Como podemos comprobar, el estudio de los falsos positivos en la prueba de la bencidina, ha sido considerado fundamental, y todas las investigaciones se dirigen a intentar conocer los compuestos capaces de actuar como interferencias en la reacción y la forma de evitarlas. De esta forma se conseguiría aumentar la especificidad del test.

Actualmente, según la bibliografía revisada, todos los autores coinciden en afirmar que un resultado positivo en la *prueba de Adler*, en general, no se puede considerar concluyente y no es posible, a partir de ese resultado, asegurar que la mancha que se está estudiando es de sangre.

Sin embargo, hasta el momento, lo que se acepta es que si se obtiene un resultado negativo, la mancha no es de sangre<sup>(4)(16)(17)</sup>.

Así, en obras consideradas como fundamentales en la Medicina Legal podemos encontrar las siguientes afirmaciones:

*"A green or blue color indicates the presence of blood. Should this color fail to appear, repeat the test. If no color appears, the stain was not derived from blood and the test is terminated"*, en la obra de R.B.H. Grandwohl "Legal Medicine", edición de 1954

*"As stated, all red or brownish stains are not blood. the first task of the laboratory is to verify or exclude the hematologic origin of the stain, and a number of highly sensitive presumptive tests exist than can detect minute traces. Most of these are not absolutely specific and may give false-positive reactions with a number of other substances, especially of vegetable or nonblood biologic origin.*

*However, screening test are useful, even if they are negative, since no further action need be taken. In other words, they are exclusionary screening test."*, en "Introduction to Forensic Sciences", de W G.Eckert, en1980.

*"La prueba tiene valor exclusivamente cuando es negativa, sirviendo entonces para ratificar la negatividad de las pruebas de certeza; su gran sensibilidad permite excluir que la negatividad de las pruebas de certeza se deba a la escasez de material sanguíneo de la mancha sospechosa."*, en la edición de 1991 de la obra "Medicina Legal y Toxicología", del profesor Gisbert Calabuig.

---

---

"A negative test indicates the absence of blood, but a positive reaction, though strongly suggestive, is not conclusive.", en la recientísima edición, 1997, del "Simpson's Forensic Medicine", de B. Knight.

La exhaustiva revisión bibliográfica realizada ha mostrado la práctica coincidencia en la inexistencia de falsos negativos ya que tan solo uno de los autores apunta alguna discrepancia<sup>(9)</sup>

En el laboratorio de Criminalística de la Unidad Docente de Medicina Legal de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València, se planteó la posibilidad de demostrar experimentalmente la existencia de falsos negativos en la *prueba de Adler*<sup>(18)</sup> y, para alcanzar dicho objetivo, se realizaron distintas experiencias que permitieron comprobar dicha posibilidad.

A partir de los resultados hallados, se ha abierto una interesante línea de investigación de la que este proyecto de tesis es sólo el comienzo, una pequeña parte del trabajo que queremos desarrollar, intentando obtener resultados útiles, que nos permitan conocer y resolver los distintos problemas que surgen en la identificación de las manchas de sangre.

---