

Químicas

428

T.D

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

**Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Bromatologia,
Toxicologia i Medicina Legal**

UNITAT DOCENT DE MEDICINA LEGAL



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**Revisión crítica del diagnóstico de orientación
en el estudio de las manchas de sangre: falsos
negativos en la prueba de Adler.
Una aportación de la Química Legal**

TESIS DOCTORAL

Ana Castelló Ponce

DIRECTOR

Fernando A. Verdú Pascual

UMI Number: U607186

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607186

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Fac. Químicas

Nº Registre 10401

DATA 10-7-97

SIGNATURA

T.D 428

Nº LIBIS: Pi.12630418



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE MEDICINA
Avinguda Blasco Ibáñez, 17
46010 VALÈNCIA

FERNANDO ALEJO VERDU PASCUAL, Profesor Titular de Toxicología y Legislación Sanitaria del Departamento de Medicina Preventiva i Salut Pública, Bromatologia, Toxicología i Medicina Legal, de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València *Estudi General*, en cumplimiento de la normativa vigente,

C E R T I F I C O

que la Tesis Doctoral titulada "Revisión crítica del diagnóstico de orientación en el estudio de las manchas de sangre: falsos negativos en la prueba de Adler. Una aportación de la Química Legal" ha sido realizada por la Licenciada en Ciencias Químicas Doña Ana Castelló Ponce, bajo mi dirección. En el trabajo se reflejan de forma veraz tanto la metodología general y específica aplicadas, como los resultados obtenidos.

A su conclusión, ha sido revisada por mi y la encuentro conforme para que sea presentada, para aspirar al Grado de Doctor, ante el Tribunal que en su día se designe.

En Valencia, el veintiuno de febrero de mil novecientos noventa y siete.

Fdo.:F.A. Verdú

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⁽¹⁾, 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⁽²⁾, 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⁽³⁾. 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⁽⁴⁾⁽⁵⁾:

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⁽⁶⁾ : 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 producen entre los antígenos y los anticuerpos. Las técnicas más comunes son: la reacción de UHLENHUT, el Test de OUCHTERLON y la técnica de SCHEIDEGER.

3. Una vez se ha comprobado que la sangre es humana, se intenta determinar a que 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 las 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 quiacrina 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 GIBBERT 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 hemos realizado 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⁽⁷⁾, 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 está 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 muchos 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 de 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 el resultado positivo 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 los 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⁽⁸⁾⁽⁹⁾, 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 peroxidasas en la muestra a analizar, provocando la oxidación de la tintura de guayaco por el oxígeno.

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

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

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

La hemoglobina tiene un espectro de absorción característico que permite su identificación. Si se trata de sangre fresca, se puede obtener tratándola sólo con sal común; si se analiza sangre seca, se disuelve la mancha con ácido acético, ácido sulfúrico o alcohol. Las pequeñas alteraciones que se provocan en la hemoglobina por la acción de los disolventes, no impiden su identificación.

Aplicando las técnicas de análisis espectral, MAGNANINI, en 1898, propuso un método para distinguir la sangre humana de la 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 UHLENHUTH, 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 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⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾.

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 gr 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.

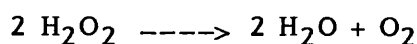
Estos enzimas forman parte del sistema de defensa que los organismos han ido desarrollando, con el fin de protegerse de la acción tóxica de los productos intermedios que se pueden producir durante el proceso de reducción del oxígeno.

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

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

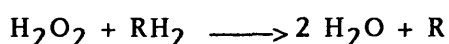
ácidos minerales, ya que éstos destruyen las catalasas. Por otra parte es una prueba poco específica puesto que existen numerosos productos que poseen catalasas y que por lo tanto darían positiva la reacción.

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 peroxidasas 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 oxidasas de la sangre provocan la liberación de oxígeno por parte de la trementina alcanzándose la oxidación de la resina de guayaco. Esta reacción es fácilmente detectable ya que la forma oxidada de la resina de guayaco es de color azul.

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 arábiga, 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 peroxidases.

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 hidroclicórico, aunque, según la bibliografía consultada⁽¹³⁾, 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⁽¹³⁾. 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⁽⁹⁾. 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⁽¹³⁾. 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⁽¹⁴⁾

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 reactivo, se añaden 1 ó 2 gotas del mismo 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 fenolftaleina 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 FLUORESCEINA:

Es una derivación del método anterior propuesta por FLEG. 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 pirimidón. Y la coloración obtenida es violeta.

REACTIVO DE KOHN-O'KELLY :

Utiliza la O-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⁽⁹⁾.

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⁽¹⁵⁾.

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⁽¹³⁾.

Así, se ha comprobado que la oxidación de la bencidina por el peróxido de hidrógeno, no se produce si no existen catalizadores, 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 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 fenolftaleina 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 fenolftaleina, 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⁽⁴⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾.

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⁽⁹⁾

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*⁽¹⁸⁾ 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.

2

Hipótesis

2.- HIPOTESIS

Como paso previo a una investigación que nos lleve a conocer mejor la aplicación de la *prueba de Adler* en el diagnóstico genérico de las manchas de sangre, haremos una revisión de los compuestos que intervienen en la misma y del tipo de reacción que se produce.

La *prueba de Adler*, como todos los demás métodos que hemos llamado catalíticos, tiene como fundamento químico una reacción de oxidación-reducción que, aunque es un concepto bien conocido, presenta algunas peculiaridades no tan difundidas. Por ello consideramos conveniente hacer un breve repaso de lo que conocemos por oxidación y reducción.

Los términos oxidación y reducción⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾ han sido utilizados por los químicos desde hace casi un siglo. Inicialmente se entendía por oxidación procesos tan diversos como la combustión, la oxidación de los metales y la respiración de los organismos vivos. Por otro lado, se utilizaba el término reducción para describir la fusión de los minerales para obtener metales.

Poco a poco se fue ampliando el concepto, por lo que se llamó oxidación a la combinación de un elemento con el oxígeno y al consiguiente aumento de oxígeno en la composición centesimal de un cuerpo, es decir, a la introducción de átomos de oxígeno en la molécula.

De la misma forma, por reducción se entiende el proceso contrario, es decir, es una reacción por la cual un compuesto pierde átomos de oxígeno.

Posteriormente, se consideró también como oxidación, una pérdida de átomos de Hidrógeno, mientras que la reducción implicaba ganancia de hidrógeno.

Sin embargo, es bien sabido, existen reacciones en las que no intervienen, ni el oxígeno, ni el hidrógeno y que se explican también mediante un mecanismo de oxidación-reducción. Por ejemplo, la combustión del hierro en atmósfera de cloro no implica la presencia de oxígeno, aunque, durante el proceso, el hierro se oxida.

Considerando este tipo de reacciones, se amplió el concepto de oxidación-reducción, de forma que, actualmente, se considera que una reacción redox es aquella en la que varía el número de oxidación de dos o más elementos de los reactivos.

Según esta definición, una oxidación implica un aumento del número de oxidación de un elemento, y una reducción una disminución del mismo; dicho de otra forma, una oxidación es una pérdida de electrones y una reducción una ganancia, por lo que a este tipo de reacciones se les llama también reacciones de transferencia de electrones.

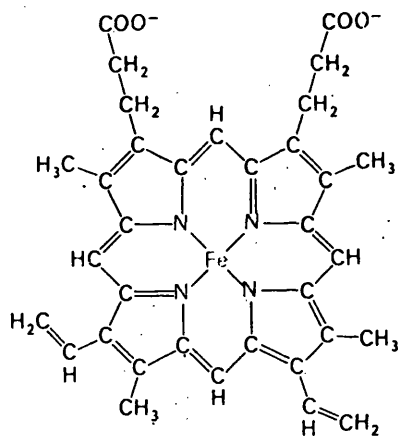
Un agente oxidante es, por lo tanto, una especie química capaz de captar electrones, reduciéndose y un agente reductor es, pues, una especie química capaz de cederlos, oxidándose. Un par redox es el conjunto formado por la forma oxidada y la reducida de una sustancia.

Traslademos ahora este proceso al marco investigador de las pruebas de orientación:

Las técnicas implicadas se basan en la presencia en la sangre de peroxidasa, es decir, enzimas que catalizan reacciones en las que el peróxido de hidrógeno actúa como oxidante de un sustrato.

Se trata de metaloproteínas⁽²¹⁾ cuyo grupo prostético es el grupo hemo. Su estructura consta de una cadena polipeptídica (apoproteína), y un grupo hemo (grupo prostético) formado a su vez por un isómero de la porfirina, la protoporfirina IX, unida a un ión metálico, que es el Fe(III), a diferencia de la hemoglobina que contiene Fe(II).

El átomo de Fe puede formar seis enlaces, cuatro de ellos los forma con los N de la protoporfirina. La quinta y sexta posiciones de coordinación las emplea en un enlace con un nitrógeno de un aminoácido histidina y con una molécula de agua respectivamente.



Cuando se produce el contacto, el peróxido de hidrógeno se une a la proteína a través del hierro, desplazando a la molécula de agua. El sustrato que será oxidado, también debe quedar unido al enzima para que tenga lugar la reacción.

El mecanismo de reacción implica la formación de especies intermedias de la proteína -un peroxocomplejo de Fe(III)- y, durante el proceso, no existe un contacto directo entre el agua oxigenada y el sustrato que será oxidado.

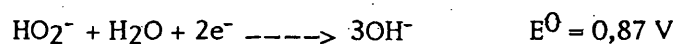
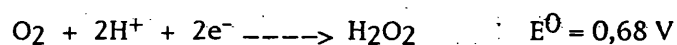
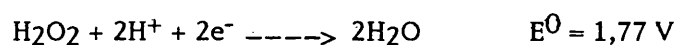
La efectividad del enzima se explica porque permite tener Fe(III) a grados de pH altos en los que, en disolución o formando complejos simples, no es

estable. Solamente a grados de pH altos el agua oxigenada (por ser un ácido débil), existe como OOH⁻ y permite la formación del peroxocomplejo intermedio.

El enzima, la peroxidasa en definitiva, lo que hace es *corregir* las propiedades antagónicas del Fe(III) y el agua oxigenada.

Por otra parte, debemos indicar que la efectividad de las peroxidases es independiente del pH. Esto es ciertamente importante, dado que existen otros compuestos capaces de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno, pero su acción catalítica sí varía con el pH del medio.

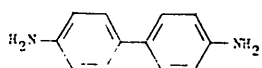
La química redox del agua oxigenada en solución acuosa⁽²²⁾, se puede resumir mediante los siguientes potenciales:



Como fácilmente se colige, el peróxido de hidrógeno, es un agente oxidante fuerte en disolución ácida o básica. Sólo se comporta como reductor frente a oxidantes muy fuertes como el permanganato.

Habitualmente, las reacciones de oxidación con el peróxido de hidrógeno, se producen rápidamente en medio básico y de forma muy lenta si el pH es ácido. Pero debemos hacer notar que, en presencia de peroxidases, el peróxido de hidrógeno puede actuar como oxidante de diferentes sustratos independientemente del pH imperante en el medio.

Ya hemos recordado que en la reacción de ADLER, el sustrato que interviene es la bencidina. Este compuesto es una amina aromática, cuya fórmula es la siguiente:



La bencidina, cuando pasa a su forma oxidada cambia de color. Esta característica se aprovecha para poder comprobar la presencia de peroxidasas en una muestra, puesto que la reacción no se produciría si no existe catalizador. Por lo tanto, el cambio de color indica la posibilidad de que la mancha estudiada sea sangre.

En principio se puede suponer que cualquier compuesto cuyo potencial redox sea menor que el del peróxido de hidrógeno, podría actuar como sustrato en una reacción similar a la descrita para la *prueba de Adler*.

Tras este breve y superficial, quizá innecesario, recuerdo de la química redox, retomamos la línea de la investigación.

A grandes rasgos, el trabajo se estructura partiendo de una comprobación específica de la *prueba de Adler* para, a renglón seguido, comprobar qué es lo que ocurre, en una serie de situaciones, si además de la bencidina, existe en la misma muestra, otro posible sustrato, es decir, otro compuesto capaz de ser oxidado por el peróxido de hidrógeno. El último paso trata de esclarecer algunos aspectos del mecanismo íntimo de la prueba.

Todo ello se contempla en una serie de proposiciones que se desarrollan a continuación.

PRIMERA HIPOTESIS:

En un primer paso de nuestro trabajo plantearemos una hipótesis que parte de la afirmación hecha por BORDAS en 1910, que señala que la *prueba de Adler* es sensible para concentraciones de sangre de 1/200000. Desde entonces, se han ido proponiendo diferentes valores de concentración de sangre para los que la prueba da un resultado positivo.

Según hemos comprobado en la revisión bibliográfica, se admite que la sensibilidad de la reacción de ADLER oscila entre 1/200000 y 1/500000, variando según los distintos autores consultados.

Estudiaremos la sensibilidad de la *prueba de Adler*, sobre los diferentes soportes en los que se puede encontrar la mancha que se va a identificar, de forma que podamos conocer si existen o no diferencias en la efectividad de la reacción, y también contrastar los resultados obtenidos con los que se indican en la bibliografía revisada.

SEGUNDA HIPOTESIS:

Ya hemos apuntado anteriormente, al describir la reacción en que se basa la *prueba de Adler*, que, en presencia de peroxidasa, cualquier compuesto cuyo potencial sea menor que el del peróxido de hidrógeno, puede actuar como sustrato en la reacción de descomposición del peróxido, siendo oxidado.

Si es cierto, podremos deducir qué ocurrirá si, en la muestra de sangre que estamos analizando, existe un compuesto capaz de actuar como sustrato, y que por lo tanto pueda competir con la bencidina por el peróxido de hidrógeno, o bien alterar de alguna forma el mecanismo de catálisis, impidiendo la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno.

Según esta afirmación, pueden existir compuestos que actúen como contaminantes, dando lugar a falsos negativos en el *Test de Adler*, al impedir la oxidación de la bencidina.

Ya que hemos podido comprobar experimentalmente que al añadir zumo de limón a una muestra de sangre, no se obtiene el resultado positivo que indica la existencia de sangre en la mancha, planteamos pues la hipótesis de que deben existir diferentes sustancias que, añadidas a la sangre impiden la reacción de la bencidina dando lugar a falsos negativos en la *prueba de Adler*.

Estudiaremos en qué condiciones de concentración de la muestra y el contaminante se producen la interferencia en la reacción, y también la influencia del tipo de soporte sobre el que se aplican las pruebas de identificación de la mancha de sangre.

TERCERA HIPOTESIS:

Una vez que hayamos verificado la hipótesis anterior, continuaremos nuestra investigación centrándonos en el estudio de qué componente del contaminante (zumo de limón), es el causante de la interferencia.

La composición del zumo de limón es la siguiente: agua, proteínas, grasas, azúcar, minerales, caroteno, vitamina B1, vitamina B2, nicotinamida, ácido fólico, vitamina C, ácido málico y ácido cítrico.

En nuestra hipótesis de trabajo suponemos que el ácido ascórbico puede ser el causante del falso negativo que se ha obtenido en la *prueba de Adler*⁽¹⁸⁾.

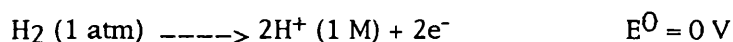
Para hacer esta propuesta, nos basamos en que la reacción de la bencidina implica un mecanismo de oxidación-reducción.

Recordemos brevemente algunos conceptos que ayuden a plantear la hipótesis:

En las reacciones redox, el valor del potencial estándar (ΔE°), nos dará la medida cuantitativa de la tendencia de la reacción a producirse. Este potencial se mide para reaccionantes y productos en estado estándar, es decir, concentración 1 M para materiales solubles, presión de 1 atm. para gases y para sólidos su forma más estable a 25°C. Una variación de potencial positiva indica que la reacción se

produce espontáneamente de izquierda a derecha. Cuando mayor es dicha diferencia de potencial, más fácilmente se produce la reacción.

El potencial estándar es el resultado de la suma de los potenciales de cada una de las dos semirreacciones que intervienen en la reacción redox. Para obtener valores de potencial absolutos para cada una de las semirreacciones, se ha asignado arbitrariamente el valor cero a la semirreacción del ión hidrógeno-gas hidrógeno :



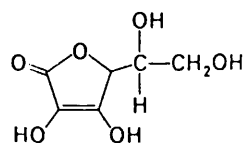
Comparando cada par redox con el par ión hidrógeno-gas hidrógeno, podremos calcular los potenciales absolutos.

Todas las semirreacciones se escriben como reducciones, y su potencial es la medida de la tendencia de la reacción a producirse de izquierda a derecha (reducción), cuando más positivo sea el potencial de un par redox, más tendencia tendrá a reducirse (es más oxidante). Si se invierte el sentido de una reacción, se debe cambiar el signo del potencial.

Comparando los potenciales de dos pares redox, podremos saber cuál de ellos será el oxidante y cuál el reductor.

Por otra parte, sobre el compuesto que estudiaremos como contaminante de la muestra, podemos indicar lo siguiente:

El ácido ascórbico o vitamina C⁽²³⁾⁽²⁴⁾, es la forma enólica del 3-ceto-1-gulofuranolactona, su fórmula es:



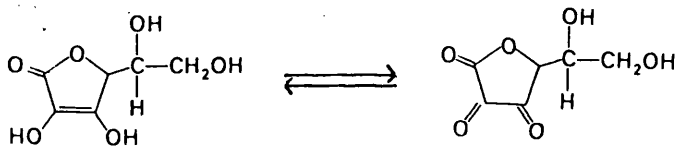
Se trata de un compuesto formado por cristales blancos de sabor ácido, hidrosolubles y poco solubles en etanol. Es fuertemente reductor, y aunque la forma cristalizada es estable al aire, en solución acuosa es sensible a la luz y al oxígeno, y

llábil al calentamiento en presencia de oligometales como el cobre. Por otro lado, es estable a la congelación.

Se encuentra principalmente en las frutas cítricas, las moras, el melón, la col cruda, los pimientos verdes y los vegetales verdes.

Su estructura es semejante a la de un monosacárido pero contiene un grupo enol en el segundo y tercer átomos de carbono. Este grupo es sensible a la oxidación y, por eliminación de hidrógeno, se convierte en un grupo diceto formando el ácido dehidroascórbico.

Como ya hemos indicado, el ácido ascórbico se oxida espontáneamente al contacto con el aire, y es, probablemente, la menos estable de todas las vitaminas hidrosolubles. Sin embargo, tanto la forma oxidada como la reducida son funcionalmente activas. El sistema redox formado por los ácidos ascórbico y dehidroascórbico tiene un potencial de 0,08 V.



En una reacción redox entre el ácido ascórbico y cualquier otro par redox con un potencial mayor de 0,08, el ácido ascórbico será oxidado. El agua oxigenada tiene un potencial de 1,77 V, luego, en principio puede actuar como oxidante frente al ácido ascórbico.

En nuestra hipótesis de trabajo proponemos que el ácido ascórbico puede actuar como contaminante provocando falsos negativos en la *prueba de Adler*, y que la interferencia se debe producir tanto para muestras líquidas, como para manchas o huellas de manchas.

En principio, y aunque este punto lo estudiaremos más adelante, podemos apuntar que la interferencia se puede producir por dos caminos distintos: bien por alteración de la peroxidasa, bien por modificar la reacción de oxidación-reducción al existir, en la muestra, un compuesto muy reductor que puede intervenir alterando los resultados.

CUARTA HIPOTESIS

La experiencia que inició nuestra investigación, fue realizada a partir de sangre fresca recién extraída. Ahora estudiaremos la presencia de falsos negativos en muestras que proceden del banco de sangre y que por lo tanto han sido sometidas a un proceso de conservación.

Para conocer en que condiciones se encuentran estas muestras, hemos recurrido al Real Decreto 1854/1993 del 22 de octubre en el que se determina con carácter general los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y bancos de sangre, del que extraemos la siguiente información:

"La sangre total y todos los componentes eritrocitarios líquidos deben ser almacenados de forma continuada a una temperatura comprendida entre 1-6°C. La sangre total y los componentes eritrocitarios separados en circuito cerrado, utilizando un método que garantice un hematocrito final inferior al 80 por 100, tendrán una fecha de caducidad no superior a veintiún días a contar desde la fecha de extracción si el anticoagulante empleado es ACD o CPD, y de treinta y cinco días si el anticoagulante es CPD-Adenina. Cuando se utilizan soluciones aditivas la fecha de caducidad será la adecuada para esa solución".

Al realizar pruebas con muestras que proceden del banco de sangre, utilizamos sangre sometida a conservantes, y a bajas temperaturas durante un tiempo mínimo de 35 días. Suponemos que en estas condiciones los resultados al aplicar la prueba de Adler pueden variar con respecto a la sangre fresca recién extraída.

En este punto de la investigación también veremos si las pruebas realizadas conducen a los mismos resultados tanto si se utiliza muestra en tubo de ensayo, como si se aplica directamente sobre manchas o mediante la obtención de la *huella de Taylor*.

QUINTA HIPOTESIS

Suponemos que el tiempo que haya transcurrido desde que se produjo la mancha, hasta que se sometió a las pruebas de identificación, puede influir sobre el resultado de la *prueba de Adler*. Estudiaremos muestras con contaminante que dejaremos almacenadas durante periodos determinados.

Está generalmente admitido⁽¹⁵⁾ que la antigüedad de una mancha de sangre no impide su identificación por la *prueba de Adler*, y que tampoco afecta a la sensibilidad de la misma.

Es predecible que si la muestra contiene contaminantes, el tiempo puede variar sus propiedades alterando su capacidad de interferencia en la reacción de identificación. Como ya se ha indicado, el ácido ascórbico es poco estable, y sensible a la luz y el oxígeno. También la temperatura puede variar sus propiedades. En teoría, y si admitimos que la antigüedad de la sangre no influye en el resultado del test, cualquier diferencia con respecto a los resultados obtenidos en experiencias correspondientes a hipótesis anteriores, se deberán a la alteración del contaminante. Para confirmar estas hipótesis, realizaremos pruebas con sangre con y sin ácido ascórbico. Los resultados obtenidos nos permitirán determinar el posible efecto de la edad de la muestra y/o del contaminante sobre la sensibilidad de la *prueba de Adler*.

SEXTA HIPOTESIS

Si hemos llegado a comprobar que la reacción de ADLER puede verse afectada por la presencia en la muestra de ácido ascórbico, nos podemos preguntar ahora de qué forma actúa el contaminante.

En principio, como ya hemos apuntado anteriormente, podemos pensar que una posibilidad sería que el ácido ascórbico inhibe al enzima que cataliza la reacción, impidiendo su acción, por lo que la descomposición del peróxido de hidrógeno no tendría lugar, y por lo tanto, no se produciría la reacción de oxidación de la bencidina.

Por otra parte, y si tenemos en cuenta que el ácido ascórbico es un compuesto muy reductor, podría ocurrir que tuviera mayor capacidad para oxidarse que la bencidina, consumiendo el oxígeno liberado por el peróxido de hidrógeno, e impidiendo que se invirtiera en la oxidación de la bencidina. Por lo tanto, no se observaría el positivo de la *prueba de Adler*.

Una tercera posibilidad sería que el ácido ascórbico actuara reduciendo a la bencidina que previamente había sido oxidada por el peróxido de hidrógeno, de forma que impidiera que se pusiera de manifiesto el color azul característico porque desaparece rápidamente al ser reducida la bencidina.

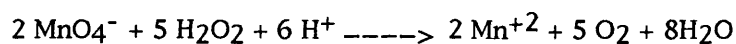
Para trabajar sobre estas hipótesis, tendremos que diseñar un método que nos permita conocer el posible mecanismo de actuación del contaminante. Este método implicará la realización de pruebas sencillas, en las que comprobaremos las propiedades redox de los compuestos implicados en la reacción. Como punto de partida,

vamos a estudiar distintos procedimientos para conseguir descomponer el peróxido de hidrógeno. De todos ellos los más usuales son:

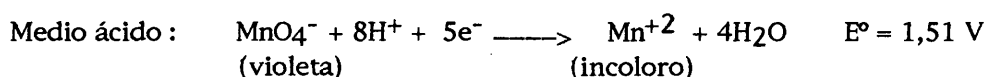
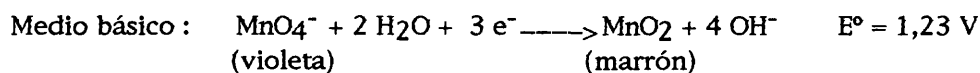
1. Reacción con el permanganato potásico⁽²⁵⁾:

Este método se suele utilizar para comprobar la presencia de peróxido de hidrógeno en una muestra. Para ello, se pone una pequeña cantidad de permanganato de concentración 0,1 N en un tubo de ensayo, y se añade unas gotas de ácido sulfúrico 2 N. La solución tiene un color violeta oscuro.

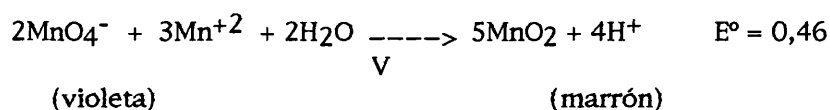
Si a continuación se agrega peróxido de hidrógeno, se observa como inmediatamente, la disolución se decolora pasando a ser transparente, a la vez que se desprenden burbujas de oxígeno elemental, que verifican la descomposición del peróxido. el cambio de color se debe a la reducción del permanganato, que como Mn(II), es incoloro. Esta reacción es sencilla, rápida y se produce sin necesidad de calentar la muestra. Tiene el inconveniente que el permanganato interviene directamente en la misma, lo que puede plantearnos problemas a la hora de utilizarla para nuestro trabajo. La reacción que se produce es la siguiente:



El permanganato potásico es un reactivo importante en la Química Analítica. Es un oxidante fuerte tanto en medio ácido como en básico, como podemos comprobar por los valores del potencial redox en los dos casos:



Como el MnO_4^- , puede oxidar al Mn^{+2} , si existe un exceso de permanganato, se produce la reacción siguiente:



Las propiedades redox del permanganato, se pueden aplicar para el estudio que nos proponemos realizar, comprobando lo que ocurre cuando hacemos reaccionar el reactivo de ADLER y el ácido ascórbico con el permanganato.

2. Descomposición catalizada por catalizadores químicos:

Existen distintos compuestos químicos, como son los óxidos de Cu(II), Ni, Zn y el de Mn(IV), que son capaces de catalizar la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno. De todos ellos, el más efectivo es el óxido de Mn(IV)⁽²⁶⁾. El dióxido de Manganeso⁽²⁷⁾, es un sólido cuyo color oscila entre el gris y el negro. Es un compuesto no estequiométrico y que presenta siempre deficiencia en oxígeno. En medio ácido, es un agente oxidante muy fuerte, con un potencial redox de 1,23 V. A semirreacción es la que indicamos a continuación:



Sin embargo, en medio básico es muy poco oxidante, tal como queda reflejado en el valor del potencial, que es de -0,50 V. Es decir, que, a diferencia de la peroxidasas, su poder como catalizador, varía con el pH del medio.

La reacción en la que el dióxido de manganeso actúa catalizando la descomposición del peróxido de hidrógeno, se lleva a cabo de la forma siguiente⁽²⁸⁾: se pone en un tubo de ensayo 1 g de dióxido de manganeso, se añade 50 ml de agua destilada y 2 ml de peróxido de hidrógeno de 20 volúmenes. Se puede comprobar que el peróxido se ha descompuesto porque se observa la aparición de burbujas de oxígeno. Es importante recordar que los compuestos que actúan como catalizadores quedan inalterados al finalizar la reacción.

Podemos realizar otra serie de pruebas a partir de este óxido, comprobando lo que ocurre cuando se le añade reactivo de ADLER y ácido ascórbico.

Para estudiar el efecto de los contaminantes sobre la reacción de ADLER, proponemos un procedimiento que consiste en comprobar lo que ocurre si hacemos reaccionar el reactivo de ADLER y el ácido ascórbico con un agente oxidante. Veremos si la interferencia del contaminante se produce también en este caso. Y en cualquier caso a la vista de los resultados intentaremos dar una explicación a los falsos negativos que obtenemos al aplicar la *prueba de Adler*.

3

Objetivos

3.- OBJETIVOS

La realización de la investigación planteada tiene como fin alcanzar los objetivos siguientes:

PRIMER OBJETIVO

- a) Obtener experimentalmente datos que nos permitan conocer hasta qué valores de la concentración en sangre, es sensible la *prueba de Adler*.
- b) Analizar las diferencias de efectividad debidas al tipo de soporte sobre el que se realizan las pruebas de identificación de la muestra.

- c) Contrastar los resultados obtenidos con los que se han encontrado en la bibliografía revisada.

SEGUNDO OBJETIVO

- a) Demostrar que es posible obtener falsos resultados negativos al aplicar la *prueba de Adler*.
- b) Comprobar que el zumo de limón mezclado con la muestra de sangre que se va a identificar, puede actuar impidiendo que la reacción de ADLER de un resultado positivo, llevando a la conclusión de que la muestra analizada no contiene sangre.
- c) Estudiar en qué condiciones de concentración de la muestra y del contaminante se produce la interferencia, así como las diferencias en el grado de influencia del contaminante dependiendo de si la muestra sobre la que se realizan las pruebas es líquida, se trata de una mancha, o una *huella de Taylor*.

TERCER OBJETIVO

- a) Conocer qué efecto produce el ácido ascórbico cuando se añade a una muestra de sangre sobre el resultado de la *prueba de Adler*.
- b) Comprobar que actúa dando lugar falsos negativos.
- c) Determinar, para los diferentes tipos de muestras sobre las que trabajamos (líquida, mancha y *huella de Taylor*), y a diferentes diluciones de sangre, qué concentración de ácido ascórbico es capaz de impedir que se observe el resultado positivo de la prueba.

CUARTO OBJETIVO

- a) Estudiar muestras de sangre que se han sometido a un proceso de conservación.
- lb) Obtener datos que nos indiquen posibles diferencias con respecto a la sensibilidad de la prueba, por comparación con los que se han determinado en el primer objetivo.
- cc) Comprobar si el hecho de utilizar conservantes y haber mantenido a la muestra a bajas temperaturas durante un determinado periodo de tiempo, influye en los resultados de la prueba.
- cd) Estudiar también sobre estas muestras la capacidad de interferencia del ácido ascórbico.
- ee) Repetir las experiencias realizadas para muestras de sangre recién extraída a las que se les ha añadido contaminante, con las muestras procedentes del banco de sangre.
- ff) Comprobar si existen diferencias en los datos que se obtienen en los dos casos y analizar las causas.

QUINTO OBJETIVO

- a) Determinar si la antigüedad de la muestra que se somete a las pruebas de identificación, influye en la sensibilidad de la reacción de ADLER.
- b) Estudiar también, en el caso de que la muestra contenga contaminantes, el efecto del tiempo transcurrido desde que se obtuvo la muestra, hasta que se analizó.

- c) Si se demuestra que existen diferencias con respecto a los resultados obtenidos en las experiencias que se han realizado para verificar los objetivos anteriores, comprobar si se deben a la alteración de la sangre que contiene la muestra, o al deterioro del contaminante.

- d) Obtener los resultados para muestras líquidas, manchas y huellas, llegando a conclusiones que nos indiquen de qué forma se debe realizar la prueba, cuando se trata de sangre antigua, para conseguir una mayor efectividad e impedir la acción de los posibles contaminantes de la muestra

SEXTO OBJETIVO

- a) Conocer como actúa el ácido ascórbico en la *prueba de Adler*.

- b) Realizar diferentes reacciones redox sencillas en las que intervengan el reactivo de ADLER y el ácido ascórbico junto con un agente oxidante fuerte.

- c) Comparar los resultados obtenidos con los correspondientes a las pruebas realizadas con muestras de sangre.

- d) Determinar si la acción del ácido ascórbico como interferencia en la reacción se debe a una alteración del enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno, o a su intervención en la reacción de oxidación-reducción que debería conducir a la oxidación de la bencidina, por ser un agente reductor fuerte, bien impidiendo directamente la oxidación de la bencidina al consumir el oxígeno liberado por el peróxido, o, reduciendo rápidamente a la bencidina una vez ha sido oxidada impidiendo que se pueda observar el color azul característico de la reacción positiva en la *prueba de Adler*.

4

Material y Método

4.1.- MATERIAL

Para la realización de las diversas experiencias y elaboración formal del trabajo, se han utilizado los siguientes materiales:

I.- REACTIVOS:

Bencidina ($(C_6H_4NH_2)_2$) de un 99% de riqueza

Peróxido de hidrógeno de 110 volúmenes

Acido acético glacial (CH_3COOH) de un 99,7% de riqueza

Acido Ascórbico ($C_6H_8O_6$) de un 100% de riqueza

Dióxido de Manganeso (MnO_2) de un 80% de riqueza

Agua destilada

II.- MATERIAL FUNGIBLE:

Probetas de 25 ml
Vasos de precipitados de 200 ml
Vasos de forma alta
Pipetas de 1 ml
Pipetas de 10 ml.
Pipetas de Pasteur
Cuentagotas
Fracos cuentagotas
Tubos de ensayo
Gradillas
Vidrios de reloj
Espátula
Matraces aforados de 10 ml
Matraces aforados de 50 ml
Matraces aforados de 100 ml
Papel de filtro
Embudos
Etiquetas
Varillas de vidrio
Tubos de ensayo preparados con anticoagulante
Material para la extracción de sangre
Cuaderno de laboratorio

III.- MATERIAL NO FUNGIBLE

Balanza analítica Mettler AE50. Precisión 10^{-4} g
Centrífuga Heraeus Sepatech. Labofuge 200
Estufa
Refrigerador
Cámara de observación
Rodillete de presión

IV.- MATERIAL INFORMATICO

EQUIPOS:

Ordenador Macintosh Performa 630

Ordenador PC 486 DX2 66 MHZ

Ordenador Macintosh Power Book 145 B

APLICACIONES

Microsoft Word ver. 5.1

Microsoft Excel ver. 5.0

Microsoft Publisher para Windows 95 ver. 3.0

4.2.- MÉTODO

En la descripción de los métodos que aplicamos, existen algunos puntos comunes como son: la preparación de los reactivos que se van a utilizar, la obtención de los diferentes tipos de muestras en soportes distintos, y los pasos a seguir para realizar la *prueba de Adler*.

Para evitar repeticiones innecesarias, los describiremos previamente y, al explicar detalladamente cada uno de los procedimientos, nos referiremos a ellos de forma escueta.

I.- Preparación del reactivo

El reactivo de ADLER se debe preparar extemporaneamente según el método siguiente:

Poner en un vaso de precipitados limpio y seco, 10 ml de ácido acético glacial, que medimos en una probeta. A continuación, vamos añadiendo pequeñas cantidades de bencidina, agitando hasta que se disuelva totalmente. Seguiremos

añadiendo bencidina hasta que no sea posible disolverla más, obteniendo al final una solución de color caramelo.

Si fuera necesario, filtraremos el reactivo para eliminar el exceso de bencidina que puede quedar sin disolver.

La disolución saturada de bencidina en ácido acético es lo que conocemos como reactivo de ADLER. Llenamos un frasco cuentagotas con reactivo y le ponemos una etiqueta que indique su composición y la fecha de preparación.

II.- Preparación de las disoluciones de sangre

En un tubo de ensayo, ponemos 1 ml de la muestra de sangre que hemos obtenido previamente. Para medir el volumen de muestra utilizamos una pipeta de 1 ml. A continuación añadimos 9 ml de agua destilada, para obtener una disolución de concentración 1/10 en sangre.

La concentración de las muestras las medimos en ml de sangre por ml totales. Con 1 ml de la disolución 1/10 y diluyendo hasta 10 ml, preparamos la disolución de concentración 1/100, y siguiendo el mismo procedimiento, es decir pipeteando 1 ml de una disolución y añadiendo 9 ml de agua destilada, obtenemos disoluciones de concentración 1/1000, 1/10000, y 1/100000. Después preparamos cuatro tubos de ensayo en los que ponemos, en cada uno de ellos, 2 ml de la disolución de concentración 1/100000. A continuación añadimos 2 ml de agua destilada al primer tubo, 4 ml al segundo, 6 al tercero y 8 al cuarto para obtener disoluciones de concentración 1/200000, 1/300000, 1/400000 y 1/500000 respectivamente.

Preparamos además un tubo de ensayo con sangre sin diluir, que utilizamos para realizar las pruebas de control. Todos los tubos deben llevar una etiqueta en la que se indica la concentración y la fecha de preparación de la muestra.

III.- Preparación de las muestras

1.- Muestras de sangre en tubo de ensayo:

Para cada dilución sobre la que trabajamos, preparamos 3 tubos que contengan cada uno 1 ml de la muestra de sangre. De esta forma, cada prueba la realizaremos 3 veces, para confirmar los resultados obtenidos.

2.- Manchas en papel:

Utilizamos papel de filtro como soporte. Cortamos varias tiras de papel de un tamaño aproximado de 3 por 12 cm, sobre las que obtenemos las manchas. Para esto, necesitamos un cuentagotas, de forma que podemos controlar que cada mancha consta de 5 gotas de la muestra de sangre que estamos estudiando.

Para cada dilución formamos 6 manchas. Utilizamos 3 de ellas para aplicar la *prueba de Adler* directamente y las otras 3 para obtener la *huella de Taylor* y comprobar la sensibilidad de la prueba sobre ella.

De la muestra de sangre sin diluir, también hacemos manchas que a su vez sirven para realizar las pruebas de control que describiremos más adelante. Debemos indicar sobre el papel de filtro las concentraciones de las manchas y la fecha de preparación de las mismas.

3.- Obtención de la huella de Taylor:

La *prueba de Adler* la realizamos también sobre la *huella de Taylor*. Para obtenerla, tomamos un trozo de papel de filtro humedecido con agua destilada y lo ponemos sobre la mancha que vamos a estudiar presionando ligeramente mediante un rodillito de presión. Sobre la huella que queda en el papel aplicamos las pruebas correspondientes.

IV.- Práctica de la prueba de ADLER:

Añadimos a la muestra con la que estamos trabajando, 2 gotas del reactivo que hemos preparado según el procedimiento descrito en el punto I del método experimental. Si no se produce cambio de color, ponemos 2 gotas de peróxido de hidrógeno. Si la prueba es positiva, la disolución adquiere rápidamente un color azul intenso como consecuencia del viraje del reactivo.

Tenemos que recordar que el cambio de color se debe observar antes de que pase un tiempo de 10 segundos desde que añadimos el peróxido de hidrógeno.

V.- Consideraciones Generales:

Debemos señalar que como nuestro trabajo tiene como objetivo el estudio de la identificación de una sustancia, es imprescindible evitar toda posible contaminación, tanto de la muestra. como de los reactivos, por agentes que puedan interferir en el análisis. De aquí que se extremen las precauciones a la hora de preparar el material que vamos a utilizar. Elegiremos pipetas y cuentagotas distintos para cada reactivo y muestra. No debemos poner nunca las pipetas y cuentagotas sobre la mesa, sino en un vaso alto que contiene agua destilada, y una vez utilizados, los dejaremos en otro vaso distinto también con agua.

Todo el material de vidrio lo limpiaremos con agua y jabón, enjuagándolo posteriormente con agua corriente y después con agua destilada. También recordaremos que cuando se añaden los reactivos a la muestra, es importante no introducir las pipetas y cuentagotas en los tubos de ensayo donde se encuentra la misma para evitar que puedan contaminarse.

Con todo esto intentamos evitar resultados erróneos, y que nuestras experiencias sean reproducibles si se mantienen las condiciones indicadas con respecto a la preparación de muestras y reactivos.

VI.- Cuaderno de Laboratorio:

El cuaderno que utilizamos durante la realización de las experiencias propuestas, lo consideramos como un instrumento más de trabajo, puesto que si tenemos anotados todos los procedimientos, incidencias y resultados que se desarrollan durante la sesión de laboratorio, reflejado incluso aquellos hechos que, en principio, parece que no son importantes, podemos tener una ayuda importante en el momento de encontrar la explicación a posibles errores, o cuando debemos interpretar los resultados.

Además tendremos la posibilidad de repetir un ensayo de la misma forma en que se realizó en su momento, ya que tenemos una descripción de cada uno de los pasos que se han seguido, así como de las posibles modificaciones que hayamos hecho sobre la marcha a la vista de los resultados obtenidos, sin que estuvieran previstas en un principio.

Una vez expuestos los pasos comunes que se van a repetir en la investigación, pasamos a describir los métodos experimentales correspondientes a los objetivos propuestos, incluyendo al final de cada uno de ellos un esquema de los pasos fundamentales.

Primer objetivo. Método experimental:

OBJETIVO: Estudiar la sensibilidad de la *prueba de Adler*

- 1.- Obtener la muestra de sangre: realizamos las pruebas a partir de sangre recién extraída por punción venosa. La muestra la guardamos en un tubo de ensayo preparado con heparina como anticoagulante.
- 2.- Preparar el reactivo de ADLER
- 3.- Llenar un frasco cuentagotas con peróxido de hidrógeno.
- 4.- Preparación de las disoluciones de sangre.
- 5.- Obtener las manchas en papel
- 6.- Estudiar la *prueba de Adler* en muestras de sangre líquidas:

6.1.- Prueba de control : Ponemos en un tubo de ensayo, 1 ml de muestra de sangre que contiene el tubo de control que hemos preparado anteriormente según el procedimiento descrito en el punto II. A continuación realizamos la *prueba de Adler* sobre la muestra. Con esta prueba nos aseguramos de que los reactivos que hemos preparado funcionan correctamente y por lo tanto podemos pasar a comprobar la validez de la prueba en las muestras correspondientes a distintas diluciones de sangre. Además es importante tener un control del color que se obtiene si la reacción es positiva, para evitar errores por aparición de tonalidades que no corresponden exactamente al que se obtiene por la oxidación de la bencidina.

6.2.- *Prueba de Adler* en muestras de sangre diluida : Preparamos en una gradilla 3 tubos de ensayo que contienen cada uno 1 ml de la muestra de sangre de concentración 1/10. A cada uno de ellos le aplicamos la *prueba de Adler*. Si la prueba es negativa, como conclusión debemos decir que la reacción de ADLER no es sensible para la concentración que estamos estudiando. Los resultados los reflejamos en la tabla 1.

Repetimos el mismo procedimiento utilizando las diferentes diluciones que tenemos preparadas.

7.- Pruebas realizadas sobre manchas en papel:

7.1.- Prueba de control : Realizamos la *prueba de Adler* sobre las manchas correspondientes a la muestra de sangre sin diluir. Con esta experiencia previa, podemos comprobar que las manchas que vamos a estudiar y los reactivos son fiables. También tendremos un modelo del color que indica una reacción positiva.

7.2.- *Prueba de Adler* en manchas de sangre sobre papel: Tenemos preparadas 3 manchas para cada una de las diluciones que queremos estudiar. Aplicamos sobre cada una de ellas la *prueba de Adler*.

8.- Pruebas realizadas sobre una huella de Taylor:

8.1.- Prueba de control : Obtenemos la *huella de Taylor* de la mancha que preparamos a partir de la muestra de sangre sin diluir. A

continuación, sobre la huella que se ha obtenido realizamos la *prueba de Adler*. Como en los casos anteriores, consideramos que este paso previo es importante para comprobar la validez de los reactivos y de la técnica que vamos a aplicar a las muestras a estudio, así como para tener un patrón de la coloración que indica el resultado positivo de la prueba.

8.2.- *Prueba de Adler sobre la huella de Taylor*: Nos quedan 3 manchas de cada dilución que son las que utilizamos en esta experiencia. De cada una de ellas obtenemos la *huella de Taylor* tal como hemos descrito anteriormente (punto III del método), y comprobamos qué resultado se obtiene al realizar la prueba sobre ellas.

1ER OBJETIVO

ESTUDIAR LA SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA DE ADLER

MÉTODO EXPERIMENTAL

OBTENER LA
SANGRE

PREPARAR
REACTIVOS

PREPARAR DISOLUCIONES
DE SANGRE A
CONCENTRACIONES
DECRECIENTES

MUESTRAS EN
TUBO DE
ENSAYO

MANCHAS EN
PAPEL DE
FILTRO

OBTENER LA
HUELLA DE
TAYLOR

REALIZAR LA PRUEBA DE
ADLER

Segundo objetivo. Método experimental:

OBJETIVO: Comprobar la interferencia del zumo de limón en la *prueba de*

Aidler

- 1.- Obtener la muestra de sangre: Realizaremos las pruebas a partir de sangre recién extraída por punción venosa que guardamos en un tubo de ensayo preparado con heparina como anticoagulante.
- 2.- Preparar el reactivo de ADLER.
- 3.- Llenar un frasco cuentagotas con peróxido de hidrógeno.
- 4.- Preparación de las disoluciones de sangre.
- 5.- Preparar las disoluciones de zumo de limón: A partir de zumo de limón puro, que hemos sometido a un proceso previo de centrifugado, preparamos disoluciones de distintas concentraciones. El método es el siguiente: en un tubo de ensayo, ponemos 1 ml de zumo de limón. A continuación añadimos 9 ml de agua destilada, de manera que tenemos una disolución de concentración 1/10 en zumo de limón. A partir de 1 ml de la disolución 1/10 y diluyendo hasta 10 ml, preparamos la disolución de concentración 1/100, y siguiendo el mismo procedimiento, es decir pipeteando 1 ml de una disolución y diluyendo hasta un volumen de 10 ml, obtenemos disoluciones de concentración 1/1000, 1/10000, y 1/100000. Para conseguir las disoluciones comprendidas entre 1/1 y 1/10, también partimos de la solución base, así, por ejemplo para la disolución 1/2, separamos 5 ml de zumo y

diluimos hasta 10 ml. Preparamos además un tubo de ensayo con 1 ml de zumo sin diluir. Todos los tubos llevan una etiqueta que indica la concentración y la fecha de preparación de la muestra.

6.-Preparar las muestras en tubo de ensayo: Para empezar nuestra experiencia elegimos la muestra de sangre sin diluir y, en un primer paso, comprobamos si el zumo de limón puro es capaz de impedir la reacción positiva de la bencidina. Así pues, de la muestra de sangre sin diluir, preparamos 4 tubos de ensayo con 1 ml de muestra de sangre en cada uno. A continuación, añadimos en cada tubo 1 ml de zumo de limón sin diluir. Todos ellos llevan una etiqueta que indica la concentración en sangre, la concentración en zumo de limón y la fecha de preparación de la muestra. De los 4 tubos que hemos preparado, 3 de ellos nos sirven para comprobar la validez de la *prueba de Adler* con muestras líquidas, y el cuarto lo utilizamos para preparar manchas en papel, con el fin de realizar la experiencia en dicho soporte, y también mediante la obtención de la *huella de Taylor*.

7.- Preparar las manchas en papel: Obtenemos las manchas correspondientes a la muestra que tenemos preparada en tubo de ensayo, tal como hemos indicado en el punto 6.

8.- Estudiar la *prueba de Adler*:

8.1.- Prueba de control: Comprobamos previamente que la reacción de ADLER no da positiva si se aplica sobre zumo de limón. Preparamos un tubo de ensayo con 1 ml de contaminante y realizamos la *prueba de Adler*. Para poder continuar con nuestra experiencia, la reacción debe ser negativa necesariamente. Se repite la prueba sobre una mancha en papel y su correspondiente *huella de Taylor*. Con estas experiencias nos aseguramos de que en ningún caso, una reacción positiva se deba al contaminante.

8.2.- Prueba de Adler en muestras de sangre líquida que contiene contaminante: Como hemos indicado anteriormente (punto 6), tenemos preparados 3 tubos de ensayo que contienen cada uno de ellos 1 ml de sangre sin diluir y 1 ml de zumo de limón puro. Comprobamos el

resultado de la *prueba de Adler* en cada uno de ellos. Si es negativo, como conclusión debemos decir que el contaminante interfiere la reacción de ADLER. En el caso de que la reacción resulte positiva, no realizamos más pruebas con la dilución que estamos estudiando, y pasamos a repetir la experiencia utilizando una muestra de sangre menos concentrada. Si la prueba resulta negativa, repetimos la experiencia a partir del punto 6, utilizando la misma muestra de sangre, pero una solución de contaminante de concentración inmediatamente inferior a la que hemos estudiado; así pues, si estamos trabajando con la muestra que contiene sangre más zumo de limón sin diluir, y obtenemos un resultado negativo, pasamos a trabajar con la muestra que contiene sangre sin diluir y contaminante a una concentración 1/10. Seguiremos disminuyendo la concentración del contaminante hasta conseguir un resultado positivo de la *prueba de Adler*. Los resultados de la prueba los reflejaremos en una tabla.

Como ya hemos indicado, si la reacción da positiva, repetimos la experiencia a partir del punto 6, preparando previamente una muestra de sangre de menor concentración, así pues pasamos a estudiar una muestra que contiene una concentración de 1/10 en sangre, aplicando el mismo procedimiento.

Con el proceso que hemos seguido, comprobamos que si a una muestra de una concentración determinada de sangre, se le añade 1 ml de una disolución de zumo de limón de concentración conocida, y se somete a la *prueba de Adler*, no se obtiene el resultado positivo, que indica que la muestra contiene sangre. Es decir, la presencia de contaminante inhibe la reacción de ADLER dando lugar a un falso negativo.

8.3.- *Prueba de Adler en manchas de sangre sobre papel que contienen contaminante:* Tenemos preparadas 3 manchas para la muestra que queremos estudiar sobre las que realizamos la *prueba de Adler*. Si el resultado de la prueba es negativo, optamos por continuar nuestra experiencia sin variar la concentración de la muestra de sangre, pero disminuyendo la de contaminante, en el caso de que el resultado fuera

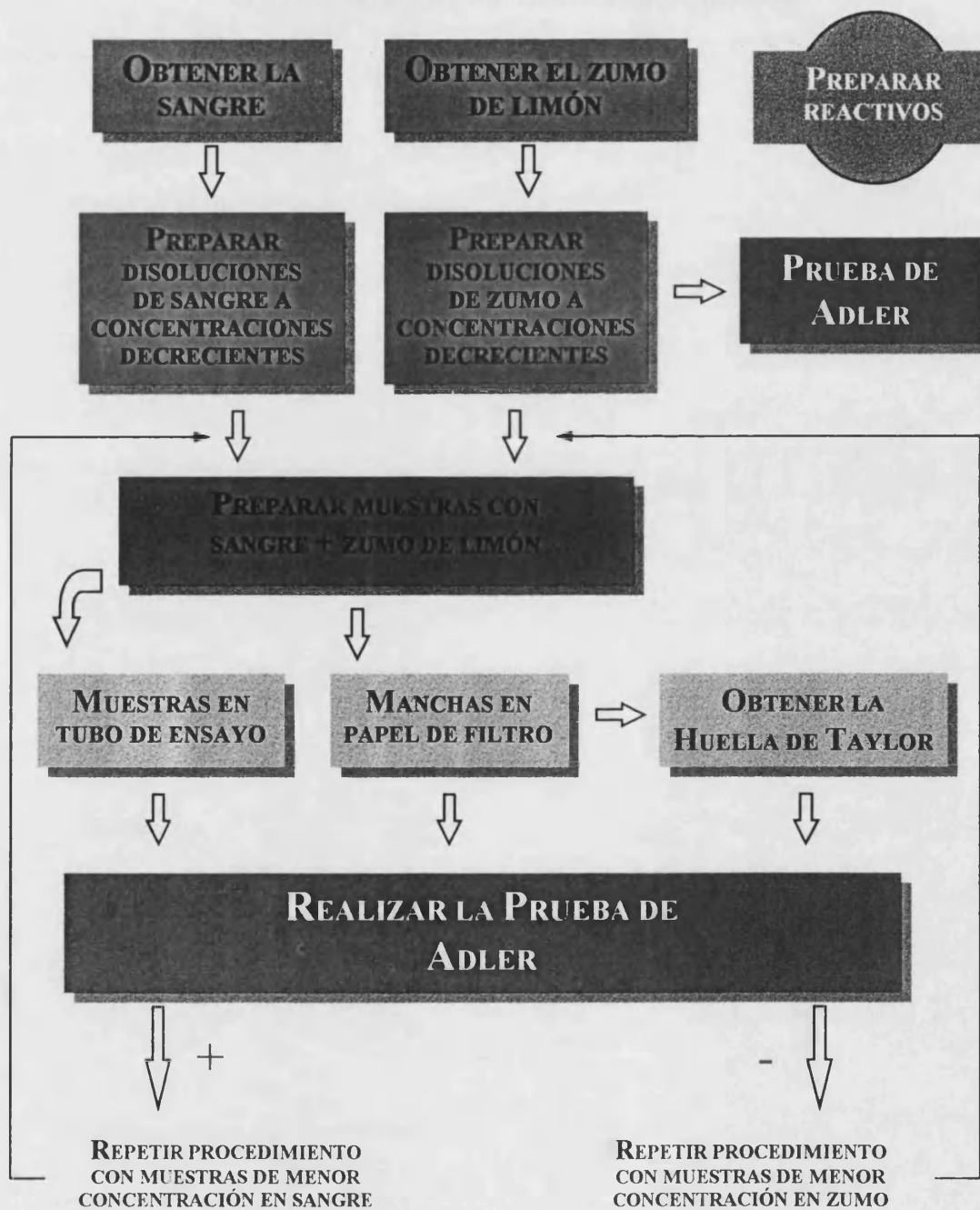
positivo, pasamos a estudiar una muestra de sangre menos concentrada, tal como hemos descrito en el punto 8.2.

8.4.- Prueba de Adler sobre la huella de Taylor. De la muestra que estamos estudiando, nos quedan 3 manchas de las que preparamos según se describió en el punto III del método. De cada una de ellas obtenemos la *huella de Taylor* sobre la que realizamos la prueba. Seguiremos el mismo procedimiento que hemos indicado en el punto 8.2

2º OBJETIVO

COMPROBAR LA INTERFERENCIA DEL ZUMO DE LIMÓN EN LA PRUEBA DE ADLER

MÉTODO EXPERIMENTAL



Tercer objetivo. Método experimental:

OBJETIVO: Comprobar la interferencia del ácido ascórbico en la *prueba de Adler*. Ajustar la concentración de ácido ascórbico que es capaz de impedir la reacción de ADLER.

- 1.- Obtener la muestra de sangre: Realizamos las pruebas a partir de sangre recién extraída por punción venosa. Como anticoagulante utilizaremos la heparina.
- 2.- Preparar el reactivo de ADLER.
- 3.- Llenar un frasco cuentagotas con peróxido de hidrógeno.
- 4.- Preparación de las disoluciones de sangre
- 5.- Preparar las disoluciones de ácido ascórbico : Según la bibliografía revisada, el zumo de limón puro contiene una cantidad de ácido ascórbico de 0,38 mg/ml. Preparamos una disolución base de ácido ascórbico de esa misma concentración, que utilizamos para realizar las pruebas con las muestras de sangre y además para obtener, por dilución, soluciones menos concentradas de contaminante. El método es el siguiente: Utilizando una balanza analítica, pesamos 38 mg de ácido ascórbico sobre un vidrio de reloj. Para preparar la disolución, pasamos el reactivo a un vaso de precipitados. Como precaución, para no perder reactivo, es conveniente dejar caer una pequeña cantidad de agua destilada sobre el vidrio de reloj, recogéndola en el vaso de precipitados. A continuación, añadimos un poco más de agua destilada

para disolver totalmente el ácido ascórbico. Después, pasamos el contenido del vaso a un matraz aforado de 100 ml y enrasamos con agua destilada. En el matraz pegamos una etiqueta en la que se indica el reactivo, su concentración y la fecha de preparación del mismo. Esta disolución es la equivalente a la de concentración 1/1 en zumo de limón que utilizamos en la segunda experiencia.

Las disoluciones de menor concentración las obtenemos a partir de nuestra disolución base, separando con una pipeta el volumen necesario y diluyendo con agua destilada. Por ejemplo, la solución equivalente a la de concentración 1/5 en zumo de limón, es decir 0,076 mg/ml en ácido ascórbico, la obtenemos a partir de 2 ml de la disolución 1/1 que ponemos en un matraz aforado de 10 ml y enrasando con agua destilada. Como en todas nuestras experiencias, ponemos una etiqueta en el matraz que indique el reactivo que contiene, su concentración y la fecha de preparación.

Siguiendo el mismo método podemos, si es necesario, seguir preparando disoluciones menos concentradas de ácido ascórbico a partir de otras de mayor concentración .

6.-Preparar las muestras en tubo de ensayo: Empezamos a partir de la muestra de sangre sin diluir y, en un primer paso comprobamos si al añadirle ácido ascórbico de la disolución base que tenemos preparada (punto 5), se puede impedir la reacción de la bencidina. Así pues, de la muestra de sangre sin diluir, preparamos 4 tubos de ensayo con 1 ml de muestra de sangre. A cada uno de ellos, le añadimos a continuación 1 ml de la disolución de ácido ascórbico de concentración 0,38 mg/ml (1/1) . Todos los tubos deben llevar una etiqueta que indique la concentración en sangre, la concentración en contaminante y la fecha. Con tres de estos tubos, realizamos la *prueba de Adler*, y el cuarto nos servirá para preparar manchas y comprobar el resultado de la prueba cuando la mancha se analiza en papel o mediante la obtención previa de la *huella de Taylor*.

7.- Preparar las manchas en papel: Obtenemos las manchas a partir de la muestra que hemos preparado según se describe en el punto 6 del método

8.- Estudio de la *prueba de Adler*:

8.1.- Prueba de control: Tal como hicimos en la segunda experiencia, antes de comenzar el estudio de la capacidad de interferencia del ácido ascórbico en la *prueba de Adler*, comprobamos que la reacción no se produce si se aplica directamente sobre ácido ascórbico. Para esto, preparamos un tubo de ensayo con 1 ml de contaminante y sobre esta muestra comprobamos si la reacción de ADLER da un resultado positivo o negativo. Se repite la prueba sobre una mancha en papel y obteniendo la *huella de Taylor*. Con estas controles previos comprobamos que en ningún caso una reacción positiva se debe al contaminante.

8.2.- Prueba de Adler en muestras de sangre líquida que contiene ácido ascórbico como contaminante: Tenemos preparados 3 tubos de ensayo que contienen cada uno de ellos 1 ml de sangre sin diluir y 1 ml de ácido ascórbico de la disolución base que preparamos anteriormente, de concentración 0,38 mg/ml. Aplicaremos la *prueba de Adler* a cada una de las muestras. Un resultado negativo de la prueba, nos indica que la presencia del contaminante impide que tenga lugar la reacción de la bencidina. En este caso, pasamos a repetir la experiencia a partir del punto 6, pero preparando nuevas muestras a partir de la misma concentración de sangre, y utilizando una solución de contaminante de concentración inmediatamente inferior a la que hemos estudiado; de esta forma si estamos trabajando con la muestra que contiene sangre más ácido ascórbico de concentración 0,38 mg/ml, y la prueba resulta negativa, pasamos a trabajar con una muestra que contiene sangre sin diluir y contaminante a una concentración inmediatamente inferior. Se sigue la disminución de la concentración del contaminante hasta observar un resultado positivo de la *prueba de Adler*. Los resultados de esta experiencia los indicamos en una tabla.

Por otra parte, si el resultado es positivo, pasamos a realizar la misma experiencia, pero utilizando una muestra de sangre menos

concentrada. Es decir, repetimos el procedimiento descrito a partir del punto 6 del método, sin variar la concentración de contaminante y bajando la de sangre.

Con el proceso que hemos seguido, llegamos a conocer que, si tenemos una muestra de una concentración determinada de sangre, y le añadimos 1 ml de una disolución de ácido ascórbico de concentración conocida, conseguimos inhibir la reacción de ADLER. Cuando llegamos a este punto, intentaremos ajustar más los resultados obtenidos. Para esto, preparamos varios tubos de ensayo con 1 ml de muestra de sangre de la dilución que estamos estudiando, y a continuación, añadimos a cada uno de ellos cantidades diferentes de la disolución de contaminante, de la concentración que estemos utilizando en este punto de nuestra experiencia. Así, tenemos muestras en las que ponemos desde 0,9 ml de ácido ascórbico hasta 0,1 ml, de forma que cada una de ellas contiene 0,1 ml menos que la anterior. Aplicamos la *prueba de Adler* y de esta forma, podemos comprobar para qué volumen de contaminante la reacción pasa de ser negativa a dar un resultado positivo. Para calcular correctamente la concentración de ácido ascórbico en la muestra, tendremos que tener en cuenta el factor de dilución, es decir, calcular cuál será la concentración real del contaminante en la muestra, conociendo el volumen total de la misma. Los resultados de esta experiencia los indicaremos en una tabla .

8.3.- Prueba de Adler en manchas de sangre sobre papel que contienen ácido ascórbico como contaminante: . Para esta prueba utilizamos 3 de las manchas que hemos preparado anteriormente (punto 7) sobre las que aplicamos la *prueba de Adler*. Si el resultado de la prueba es negativo, continuamos la investigación repitiendo la experiencia sin variar la concentración de la muestra de sangre, pero disminuyendo la de contaminante. En el caso de que el resultado de positivo, estudiamos una muestra de sangre de menor concentración , tal como hemos descrito en el punto 8.2.

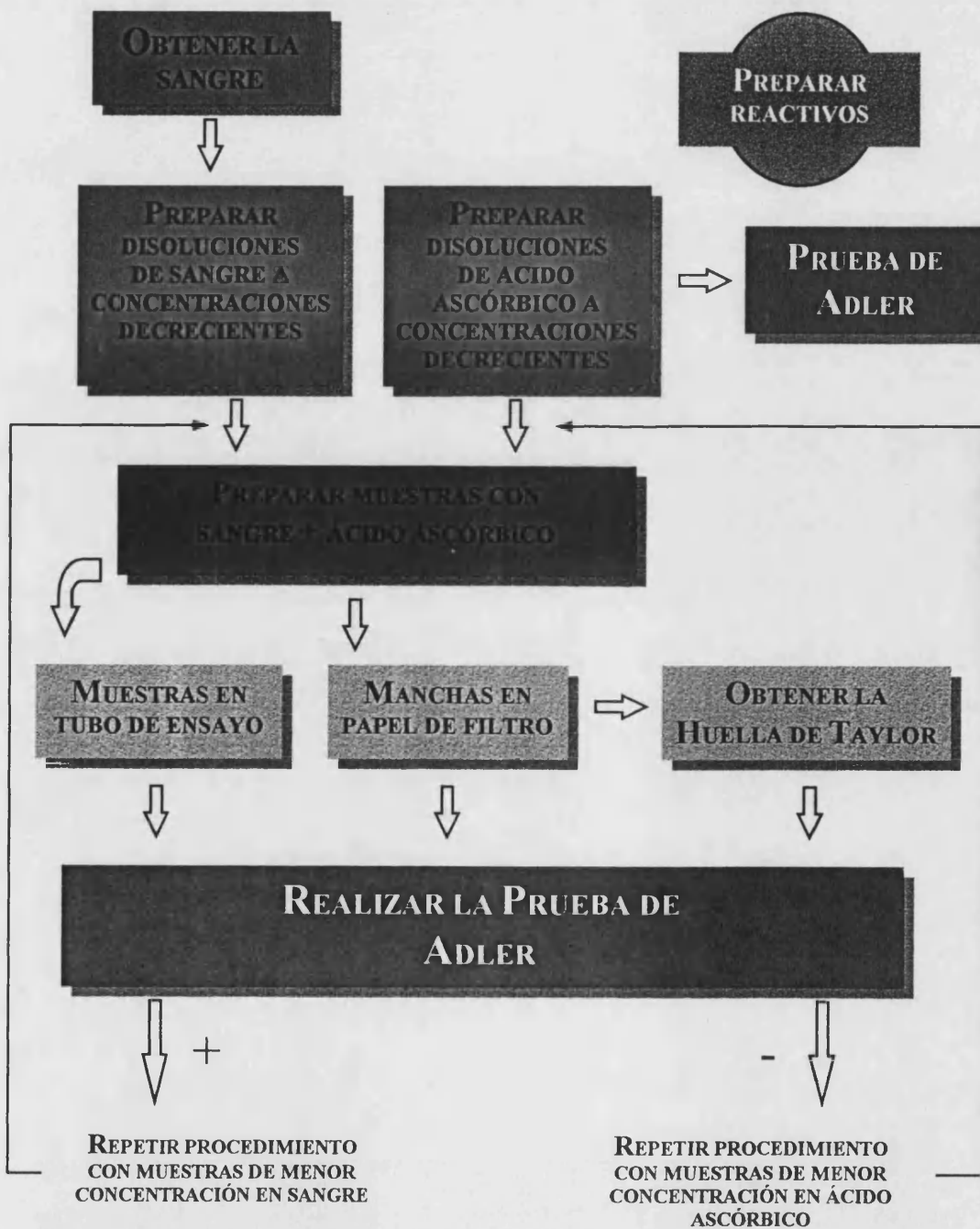
8.4.- Prueba de Adler sobre la huella de Taylor: Nos quedan tres manchas correspondientes a la muestra que estamos estudiando. De cada una de

ellas obtenemos la *huella de Taylor*, realizando a continuación la *prueba de Adler* sobre la misma, tal como se indica en el punto 8.2

3ER OBJETIVO

COMPROBAR LA INTERFERENCIA DEL ACIDO ASCÓRBICO EN LA PRUEBA DE AD-

MÉTODO EXPERIMENTAL



3ER OBJETIVO (CONT)

AJUSTAR LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO QUE ES CAPAZ DE IMPEDIR LA REACCIÓN DE ADLER

MÉTODO EXPERIMENTAL

PREPARAR MUESTRAS A PARTIR DE DISOLUCIONES DE SANGRE + DISTINTOS VOLÚMENES DE ÁCIDO



REALIZAR LA PRUEBA DE ADLER

Cuarto objetivo. Método experimental:

OBJETIVO: Comprobar posibles diferencias en los resultados obtenidos anteriormente, si se trabaja con muestras de sangre que han sido sometidas a un proceso de conservación.

- 1.- Obtener la muestra de sangre: Analizamos muestras de sangre que nos proporciona el banco de sangre del Hospital Clínico. Según consta en la etiqueta del envase que contiene la sangre que vamos a utilizar, el conservante que se ha añadido es CPDA-1 y ha estado 35 días en frigorífico a una temperatura de 4-6°C..
- 2.- Preparar el reactivo de ADLER.
- 3.- Llenar un frasco cuentagotas con peróxido de hidrógeno.
- 4.- Preparar las disoluciones de sangre: Según los resultados que refleja la tabla correspondiente a la primera experiencia, en la que se realiza el estudio la sensibilidad de la *prueba de Adler* con muestras de sangre fresca, preparamos disoluciones de concentración 1/10000, 1/100000, 1/200000, 1/300000, 1/400000 y 1/500000 ya que son las que nos permitirán determinar si existe variación con respecto a la sensibilidad de la prueba.
- 5.- Obtener las manchas en papel.
- 6.- Estudiar la sensibilidad de la *prueba de Adler*: Repetir el método que se realizó en la primera experiencia con las muestras que se han preparado.

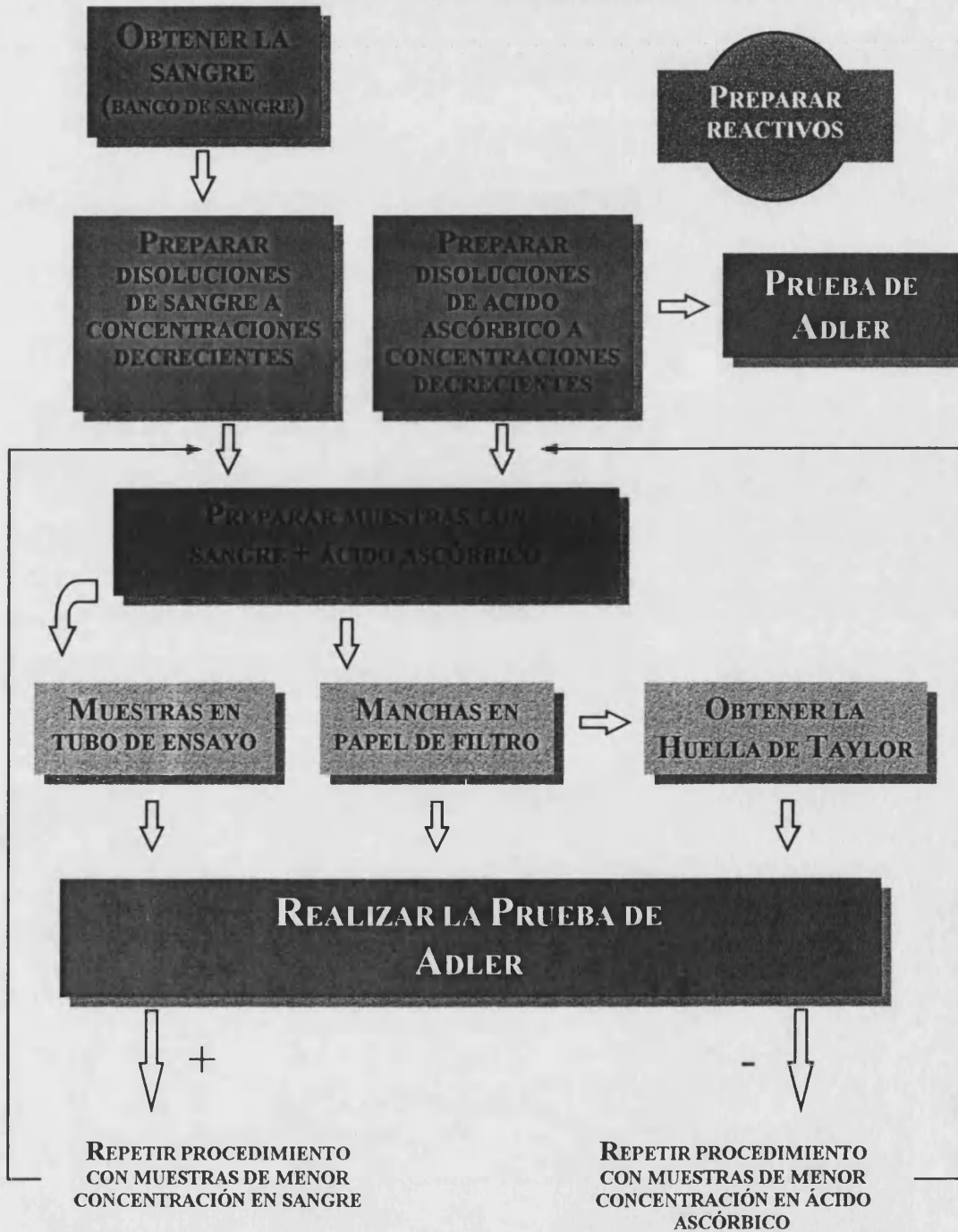
7.- Comprobar la interferencia del ácido ascórbico: Volvemos a desarrollar todo el método descrito en la tercera experiencia, utilizando la muestra que hemos descrito en el punto 1.

8.- Los resultados que obtenemos los reflejamos en tablas iguales a las que diseñamos para las experiencias 1 y 3,. De esta forma podemos comparar los resultados de la prueba con los dos tipos de muestra, y estudiar la influencia de los conservantes y la temperatura en la sensibilidad de la *prueba de Adler*, comprobando si estos factores afectan a la capacidad de interferencia del ácido ascórbico.

4º OBJETIVO

COMPROBAR POSIBLES DIFERENCIAS EN LOS RESULTADOS OBTENIDOS ANTERIORMENTE, SI SE TRABAJA CON MUESTRAS DE SANGRE QUE HAN SIDO SOMETIDAS A UN PROCESO DE CONSERVACIÓN

MÉTODO EXPERIMENTAL



Quinto objetivo. Método experimental:

OBJETIVO: Determinar, tanto con sangre pura, como con contaminante, si la antigüedad de la muestra influye en el resultado de la *prueba de Adler*.

- 1.- Obtener la muestra de sangre: Realizamos las pruebas a partir de sangre recién extraída por punción venosa. Utilizaremos como anticoagulante la heparina.
- 2.- Preparar el reactivo de ADLER.
- 3.- Llenar un frasco cuentagotas con peróxido de hidrógeno.
- 4.- Preparar las disoluciones de sangre:
 - 4.1.- Preparar las muestras de sangre: Basándonos en los resultados que se han obtenido en la primera experiencia, en la que se analiza la sensibilidad de la *prueba de Adler* con muestras de sangre fresca, preparamos disoluciones de concentración 1/10000, 1/100000, 1/200000, 1/300000, 1/400000 y 1/500000 que son las correspondientes a los límites de sensibilidad de la prueba.
 - 4.2.- Preparar las muestras de sangre a las que añadiremos ácido ascórbico: Según las experiencias que ya hemos realizado, la reacción de ADLER se inhibe por el ácido ascórbico a partir de diluciones de sangre de 1/100 ml de sangre/ml totales de disolución. Preparamos una solución de sangre de esa misma concentración, a partir de la muestra que hemos obtenido según se especifica en el punto 1. Siguiendo el mismo

procedimiento descrito anteriormente, preparamos disoluciones de menor concentración a partir de las más concentradas.

5.- Preparar la disolución de ácido ascórbico: Obtenemos una disolución base con una concentración de 0,38 mg/ml en ácido ascórbico que utilizamos para realizar las pruebas con las muestras de sangre y además para obtener por dilución, soluciones menos concentradas. El método es el mismo que ya describimos con detalle en la experiencia número 3.

6.- Preparar las muestras que contienen sangre con ácido ascórbico en tubo de ensayo: Basándonos en los resultados obtenidos en la experiencia 3, preparamos muestras de distintas concentraciones de sangre a las que añadimos ácido ascórbico. La concentración del contaminante, la seleccionamos según la tabla correspondiente a la experiencia 3, para poder comprobar si varía o no la capacidad de interferencia con el tiempo. Como en los casos anteriores, preparamos la suficiente cantidad de muestra que nos permita repetir las pruebas para los periodos determinados, el número de veces suficientes, y preparar las manchas necesarias. Todos los tubos llevan una etiqueta indicando la concentración en sangre, la concentración en contaminante y la fecha.

7.- Preparar las manchas en papel:

7.1.- Preparar las manchas que corresponden a las muestras de sangre sin ácido ascórbico: Obtenemos 24 manchas de cada disolución, 12 de ellas para aplicar la *prueba de Adler* sobre ellas y otras 12 para obtener la *huella de Taylor*.

7.2.- Preparar las manchas correspondientes a las muestras que contienen contaminante : En esta experiencia, a partir de la muestra que hemos preparado en el punto 6.2, obtenemos 24 manchas. Utilizamos la mitad de ellas para realizar la *prueba de Adler* directamente, y la otra mitad, para obtener la *huella de Taylor* y comprobar el resultado de la prueba sobre la huella.

Es importante indicar sobre el papel de filtro que contiene las muestras, las concentraciones de las manchas y la fecha de preparación.

8.- Estudio de la *prueba de Adler*:

El objetivo que queremos conseguir con esta experiencia es conocer la influencia de la antigüedad de la muestra de sangre con y sin contaminante, sobre el resultado de la *prueba de Adler*. El método que proponemos consiste en guardar las muestras, para someterlas a la *prueba de Adler* después de transcurridas 1 semana, 2 semanas, 1 mes, y 3 meses desde la fecha de su obtención. Así pues, después de una semana realizamos las siguientes experiencias:

8.1.- *Prueba de Adler en muestras de sangre diluida*: Realizaremos la prueba sobre las muestras de sangre pura y también con las que contienen ácido ascórbico. El procedimiento que seguimos para cada muestra de las que disponemos es el siguiente: Ponemos en una gradilla 3 tubos de ensayo y añadimos a cada uno de ellos, 1 ml de la muestra que vamos a estudiar, y que tiene una antigüedad de una semana. Con cada uno de ellos, realizamos la *prueba de Adler*.

8.2.- *Prueba de Adler en manchas de sangre sobre papel*: Aplicaremos la prueba sobre las manchas correspondientes a las distintas diluciones de sangre y a las que se obtuvieron a partir de muestras que contienen ácido ascórbico. Para esto, separamos 3 de las manchas que tenemos preparadas para cada muestra según se describe en el punto 7 y comprobamos el resultado de la *prueba de Adler*.

8.3.- *Prueba de Adler sobre la huella de Taylor*: También hacemos las pruebas con los dos tipos de muestras que hemos preparado, es decir sangre sin contaminantes y sangre que contiene ácido ascórbico. El método consiste en separar 3 manchas correspondientes a cada muestra, y de cada una de ellas, obtenemos la *huella de Taylor*. Sobre las huellas, comprobamos si se produce la reacción de ADLER.

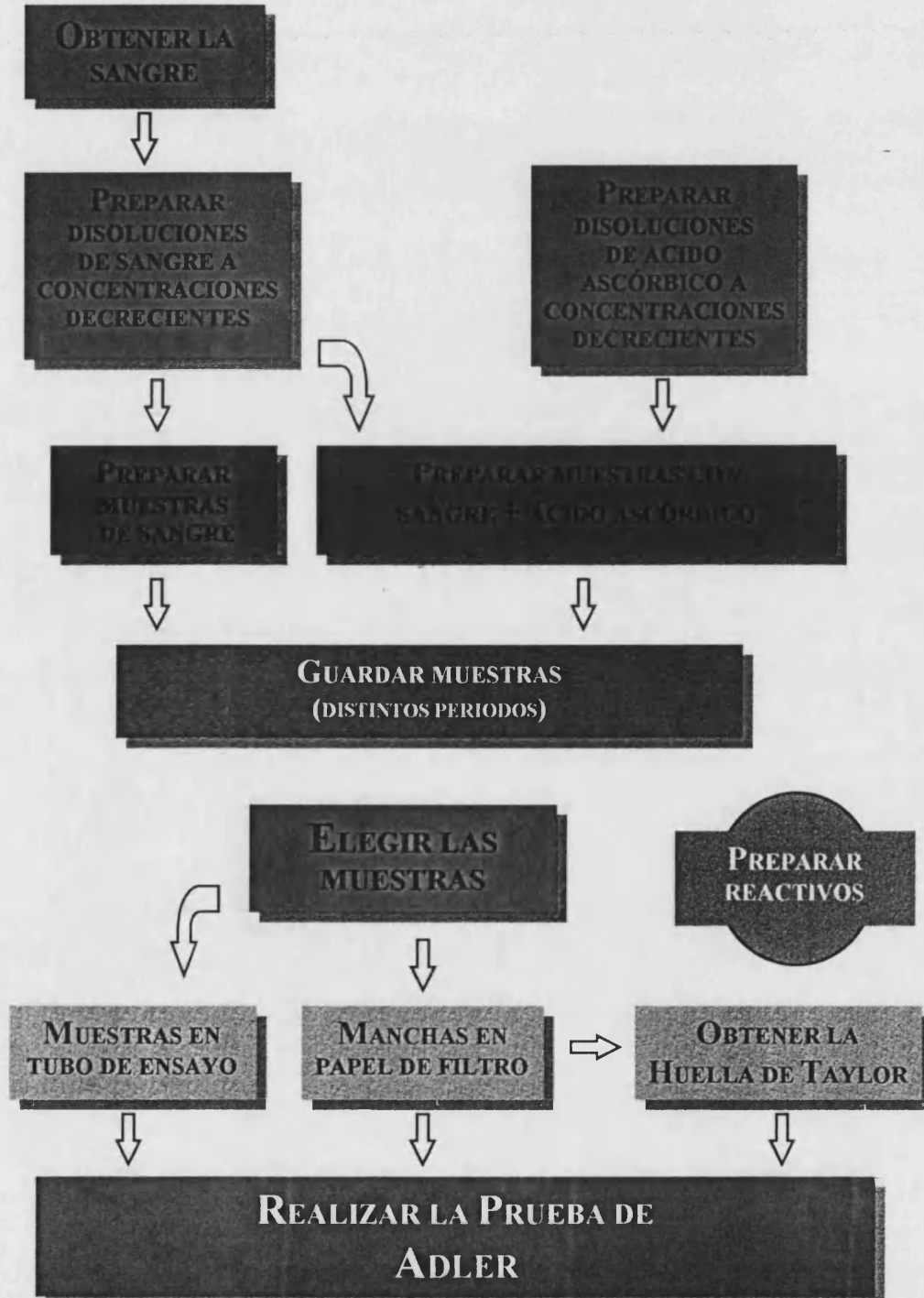
9.- Repetimos las experiencias descritas en el punto 8, después de transcurridas 2 semanas desde que se preparó la muestra. Guardamos

uno de los tubos que analizamos cuando ha pasado 1 mes, y con el último realizaremos las pruebas cuando pasen 3 meses desde la fecha de preparación.

5º OBJETIVO

DETERMINAR SI LA ANTIGÜEDAD DE LA SANGRE EN MUESTRAS CON Y SIN CONTAMINANTE INFLUYE EN EL RESULTADO DE LA PRUEBA DE ADLER

MÉTODO EXPERIMENTAL



Sexto objetivo. Método experimental:

OBJETIVO: Conocer como actúa el ácido ascórbico en la *prueba de Adler*.

- 1.- Preparar la disolución de dióxido de manganeso: Preparamos una disolución a partir de 2 gramos de dióxido que disolvemos en 100 ml de agua destilada. Si es necesario, se puede calentar la mezcla para conseguir que el reactivo se disuelva por completo. La concentración de la disolución que se obtiene es 0,2 M.
- 2.- Preparar la disolución de permanganato potásico. Elegimos la concentración 1 M como disolución base. Para obtenerla, pesamos 1,58 g de permanganato que se disuelven en 10 ml de agua destilada. A partir de esta disolución base, prepararemos otras más diluidas si los resultados que vamos obteniendo al realizar las pruebas así lo requieren.
- 3.- Preparar la disolución de ácido ascórbico: Como en las pruebas realizadas con sangre, obtenemos una disolución de concentración 0,38 mg/ml.
- 4.- Preparar el reactivo de ADLER.
- 5.- Preparar un frasco cuentagotas con peróxido de hidrógeno.
- 6.- Obtener una muestra de sangre de concentración 1/1000. Preparar un tubo de ensayo con 1 ml de la solución, y varias manchas para realizar las pruebas sobre la mancha directamente y también a partir de la *huella de Taylor*.

I.- PRUEBAS CON OXIDANTES QUIMICOS.

1.- Pruebas a realizar con el dióxido de manganeso:

- 1.1.- Pruebas previas: Preparamos un tubo de ensayo con un ml de la disolución de dióxido de manganeso y ponemos dos gotas del reactivo de ADLER. Comprobamos si se produce la oxidación del reactivo sin añadir peróxido de hidrógeno. En el caso de que esto suceda, no utilizaremos el peróxido en las pruebas siguientes.
- 1.2.- En un tubo de ensayo, preparamos un ml de la disolución de dióxido de manganeso. Añadimos ácido ascórbico y a continuación el reactivo de ADLER. Comprobamos si se produce la oxidación de la bencidina.
- 1.3.- En un tubo de ensayo ponemos un ml de dióxido de manganeso y dos gotas del reactivo de ADLER. A continuación añadimos 1 ml de ácido ascórbico.
- 1.4.- Preparamos un tubo de ensayo con dos gotas del reactivo de ADLER y un ml de ácido ascórbico (reactivo neutralizado). En otro tubo ponemos 1 ml de dióxido de manganeso y, a continuación añadimos el contenido del primer tubo.

2.- Pruebas a realizar con permanganato potásico:

- 2.1.- Preparamos un tubo de ensayo con un ml de la disolución de permanganato potásico y ponemos dos gotas del reactivo de ADLER. Comprobamos si se produce la oxidación del reactivo.
- 2.2.- En un tubo de ensayo, preparamos un ml de la disolución de permanganato. Añadimos 1 ml de ácido ascórbico y a continuación dos gotas del reactivo de ADLER. Comprobamos si se produce la oxidación de la bencidina.
- 2.3.- En un tubo de ensayo ponemos un ml de permanganato y dos gotas del reactivo de ADLER. A continuación añadimos 1 ml de ácido ascórbico.

2.4.- Preparamos un tubo de ensayo con dos gotas del reactivo de ADLER y un ml de ácido ascórbico (reactivo neutralizado). En un segundo tubo ponemos 1 ml de permanganato y, a continuación, añadimos el contenido del primer tubo.

Estas pruebas las realizaremos en principio con la disolución base de permanganato (1 M), que hemos preparado. A la vista de los resultados que obtengamos, podemos planteárnos el repetir las utilizando soluciones de oxidante menos concentradas.

II.- PRUEBAS A REALIZAR CON SANGRE:

2.1.- En un tubo de ensayo ponemos una pequeña cantidad de una muestra de sangre de concentración 1/1000, y realizamos la *prueba de Adler*. A continuación añadimos un ml ácido ascórbico.

2.2.- Realizamos la misma prueba utilizando una mancha de sangre.

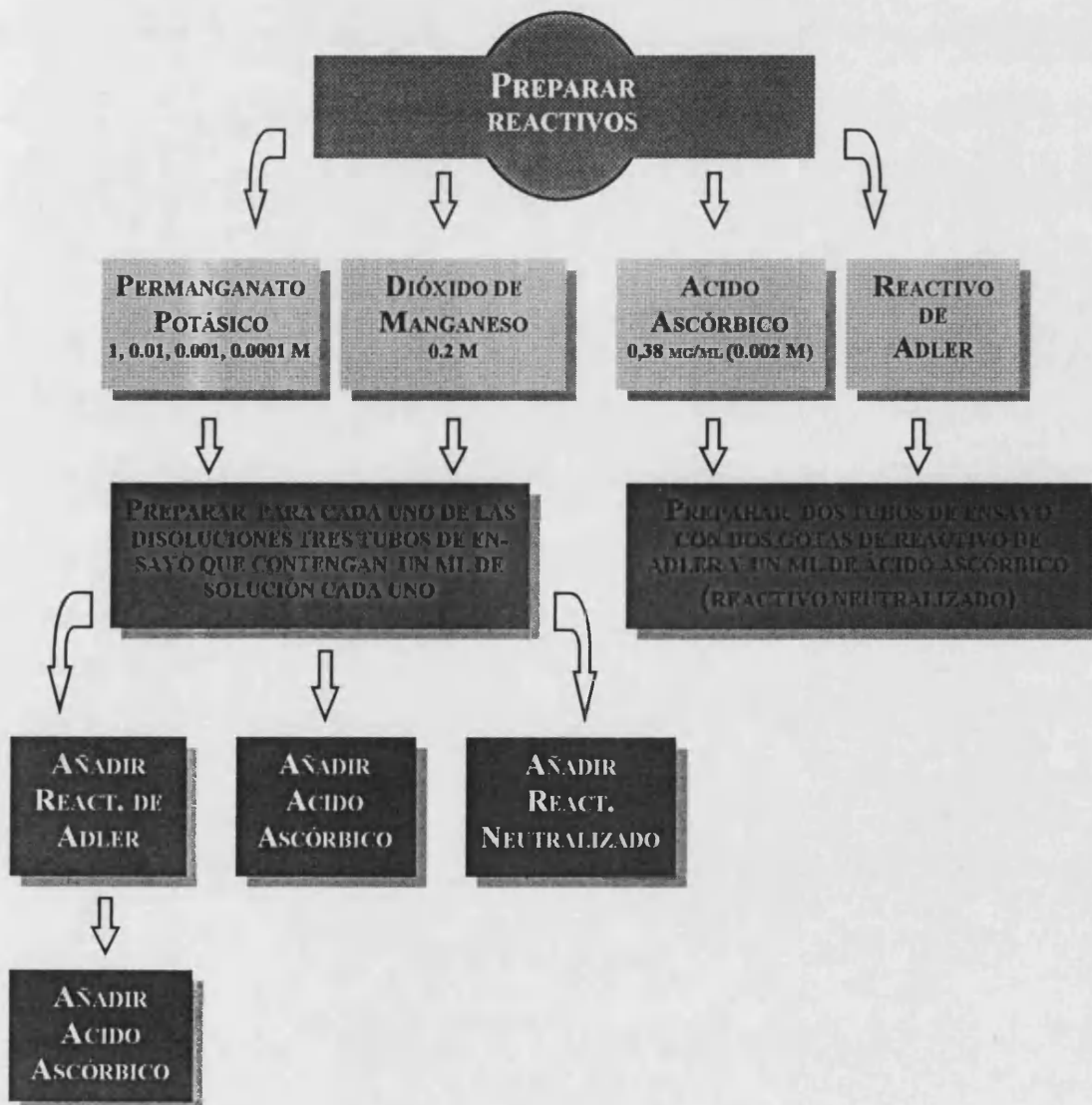
2.3.- Repetimos el ensayo anterior sobre una *huella de Taylor*

6º OBJETIVO

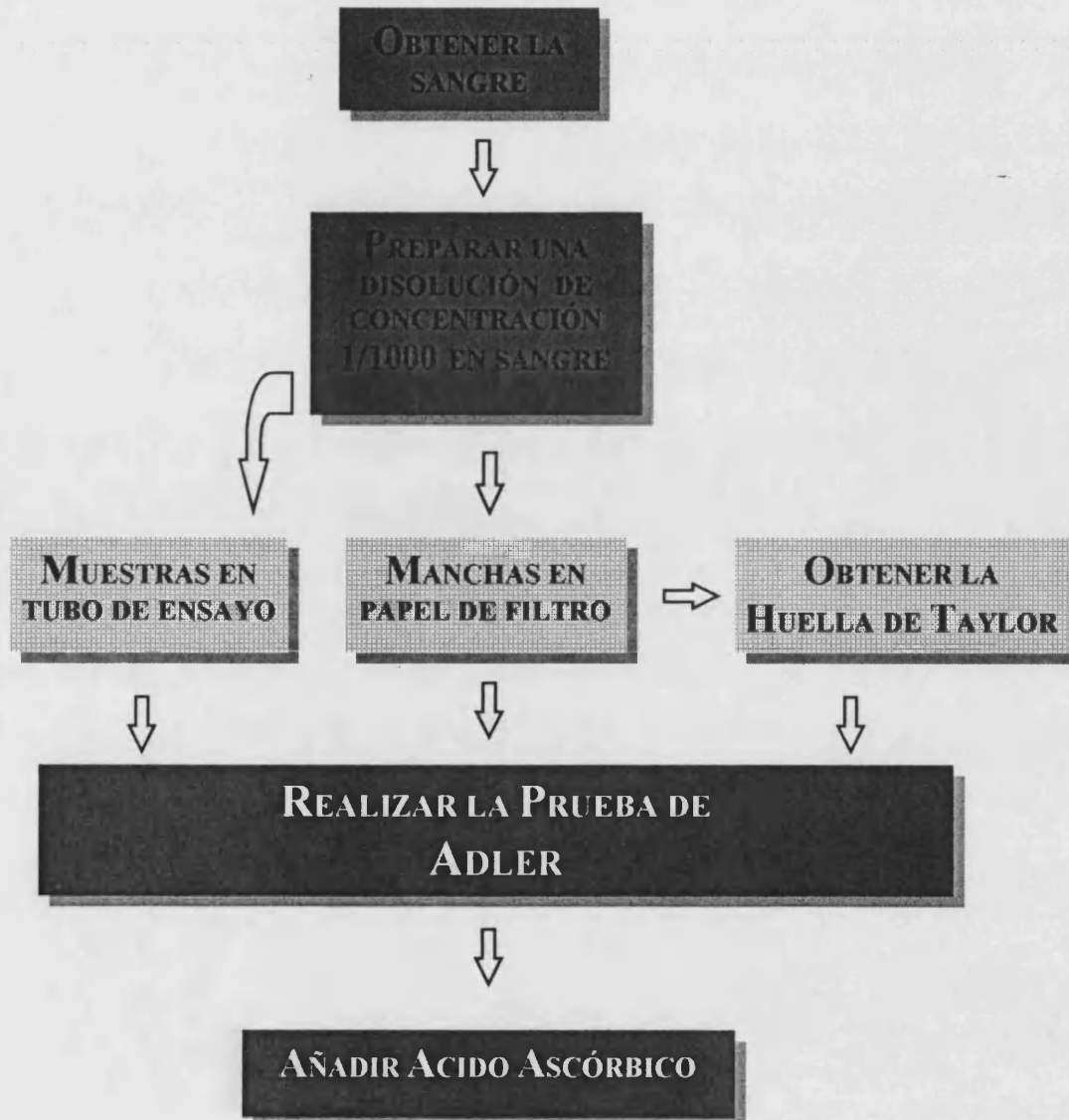
CONOCER CÓMO INTERFIERE EL ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA PRUEBA DE ADLER

MÉTODO EXPERIMENTAL

I.- PRUEBAS CON OXIDANTES QUÍMICOS



II. PRUEBAS CON SANGRE.



5

Resultados y Discusión

5.- Resultados y Discusión

OBJETIVO 1

Los resultados que hemos obtenido en la experiencia realizada para estudiar hasta qué valor de la concentración en sangre es efectiva la *prueba de Adler*, los reflejamos en la tabla 1.

En ella contemplamos en la primera columna la concentración en sangre de las muestras que vamos a estudiar, utilizando como unidad de medida los ml de sangre por ml totales de muestra. En la fila superior, indicamos los distintos soportes sobre los que hemos trabajado, analizando posibles diferencias en el resultado de la prueba. Como se ha adelantado, disponemos de 3 muestras por cada concentración y soporte. Completamos el resto de filas indicando si la reacción tiene o no lugar, para esto, representamos convencionalmente el resultado positivo con el signo + y el negativo con el -.

Según vemos en la tabla, la sensibilidad varía no sólo con la concentración, como es lógico, sino también según el soporte utilizado.

PRUEBAS CON MUESTRAS LIQUIDAS

Al realizar las pruebas con muestras líquidas, encontramos que desde una concentración 1/10, hasta 1/1000 en sangre, la reacción se produce según las pautas que se indicaron en la descripción del método, es decir:

- Al poner el reactivo en la muestra, no se produce ninguna alteración del color.
- Al añadir el peróxido de hidrógeno, se produce inmediatamente el cambio de color de la muestra. Se puede ver al color azul intenso indicativo de la reacción positiva por la oxidación de la bencidina, y el tiempo necesario para observar el desarrollo del color es inferior a 10 segundos.
- El color es uniforme. Por comparación con la muestra que utilizamos como control, comprobamos que es el color característico indicativo del resultado positivo del test.

Cuando hacemos la prueba para las diluciones 1/10000 y 1/100000, encontramos que, aunque se puede considerar que el resultado es positivo, el color tarda algo mas de 10 segundos en aparecer. El tiempo que transcurre desde que se añade el peróxido de hidrógeno, hasta que se observa el color indicativo del resultado positivo es, aproximadamente, de 30 segundos.

También hay que señalar, que la coloración es más tenue que la que se ha podido observar en las pruebas correspondientes a diluciones de menor concentración. En cualquier caso, se puede considerar el resultado como positivo, puesto que se puede ver el color azul característico de la oxidación de la bencidina, y la diferencia de tiempo con respecto las diluciones menos concentradas, no es muy alta.

Debemos señalar también que, con el tiempo, el color de la disolución pasa a violeta.

Para una disolución de concentración 1/100000, comprobamos que al añadir el reactivo, la muestra, que es transparente, pasa a color blanco. Al agregar agua oxigenada, aparece un color azul pálido después de esperar 1 minuto. Pese a ello, consideramos el resultado positivo

A partir de diluciones de concentración 1/200000, comprobamos que al igual que ocurre con las muestras anteriores, al añadir el reactivo, la disolución pasa de ser transparente, a tener color blanco, pero posteriormente no varía cuando se añade el peróxido de hidrógeno. El color en este caso tampoco cambia con el tiempo. El resultado de la *prueba de Adler* es, pues, negativo.

PRUEBAS CON MANCHAS EN PAPEL DE FILTRO

Las manchas correspondientes a diluciones de concentraciones comprendidas entre 1/10 y 1/10000, dan positiva la *prueba de Adler* siguiendo las pautas que indicamos anteriormente.

Se observa cómo, al añadir los reactivos, se forma rápidamente una mancha de color azul que se extiende por toda la superficie de la muestra. Para estas concentraciones, no se puede dudar del resultado positivo de la prueba.

Cuando realizamos el test sobre manchas que hemos obtenido a partir de muestras de sangre de concentración 1/100000 y 1/200000, vemos que, al añadir el peróxido de hidrógeno, no se desarrolla el color uniformemente por toda la superficie de la mancha, sino que se forman trazos de color azul.

El tiempo necesario para que el color se ponga de manifiesto, es inferior a 10 segundos. Consideramos el resultado de la prueba positivo, ya que estamos estudiando muestras muy diluidas y, por lo tanto, no cabe esperar que toda la mancha cambie de color.

Para manchas que se han formado a partir de disoluciones de sangre de concentración 1/300000 hasta 1/500000, comprobamos que, al agregar peróxido de

hidrógeno, se puede observar como aparecen puntos azules sobre la muestra, indicativos de que ha tenido lugar la reacción de oxidación de la bencidina.

Estos puntos aparecen en menos de 10 segundos. En estas pruebas, como la concentración de sangre es muy baja, puede darse el caso que en alguna de las 3 manchas que utilizamos, no se vea claramente el resultado positivo. En este caso hemos repetido el ensayo con nuevas manchas.

PRUEBAS CON LA HUELLA DE TAYLOR

Desde una dilución 1/1, hasta 1/100, se observa claramente el resultado positivo de la *prueba de Adler*, es decir, se puede comprobar la aparición de una mancha de color azul que se extiende por toda la superficie de la huella, y que indica el positivo en la prueba en un tiempo inferior a 10 segundos.

Para la huella que obtenemos a partir de la mancha que corresponde a una concentración 1/1000 en sangre, también el resultado es positivo, aunque en este caso, no se puede ver una mancha azul, sino trazos azules, quedando sobre la muestra zonas en las que no se observa cambio de color.

Cuando realizamos la prueba sobre la huella que corresponde a una concentración 1/10000, se observa lo mismo que en el caso de la concentración 1/1000, pero la cantidad de trazos es menor.

A partir de la dilución 1/100000, el resultado que obtenemos cuando aplicamos la *prueba de Adler* sobre las huellas es negativo.

Hemos comprobado que en estas experiencias, igual que ocurre en las pruebas realizadas con muestras líquidas, la sensibilidad es menor. En este caso, la menor efectividad se puede ser debida a que la huella no recoge toda la sangre que se encuentra en la mancha, por lo que la concentración es menor que la esperada. Además el papel de filtro que utilizamos, se debe humedecer con agua destilada, por lo que el reactivo estará más diluido y su fuerza es menor.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

Hemos podido comprobar que la sensibilidad de la *prueba de Adler* varía según el tipo de soporte utilizado para la muestra. La eficacia es mayor cuando se aplica sobre manchas. Esto se puede explicar considerando que en muestras líquidas, el reactivo sufre el efecto de la dilución, por lo que su fuerza es menor, lo que no ocurre si obtenemos una mancha de la muestra líquida.

En el caso de las *huellas de Taylor*, debemos tener en cuenta que, en principio la concentración de sangre en la huella no debe ser la que existe en realidad en la mancha, sino que será menor. A esta circunstancia se le puede sumar el efecto de dilución del reactivo por estar el papel de filtro humedecido. De todos estos resultados, podemos apuntar que en cualquier valoración de la sensibilidad de la *prueba de Adler*, es imprescindible indicar las condiciones en que se ha obtenido el valor propuesto, o, dicho de otra forma, en qué circunstancias se puede esperar encontrar ese valor de sensibilidad, puesto que hemos podido comprobar que, sobre soporte sólido, la prueba es cinco veces más efectiva que cuando se aplica sobre disoluciones de sangre.

concentración (ml sangre/ml totales)	soporte								
	tubo de ensayo			mancha en papel			huella de Taylor		
1/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/100	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10000	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/100000	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1/200000	-	-	-	+	+	+	-	-	-
1/300000	-	-	-	+	+	+	-	-	-
1/400000	-	-	-	+	+	+	-	-	-
1/500000	-	-	-	+	+	+	-	-	-

TABLA 1 : Resultados de la prueba de Adler para diferentes concentraciones y soportes

OBJETIVO 2

La tabla 2 que recoge los resultados obtenidos en esta experiencia, indica en la primera columna, la concentración en sangre de las muestras, utilizando como unidad de medida los ml de sangre por ml totales de muestra y en la segunda, los soportes sobre los que se estudia la muestra. En la fila superior, las concentraciones de las distintas disoluciones de zumo de limón que hemos preparado, y que medimos en ml de zumo de limón por ml totales de disolución.

Como en la experiencia anterior, para los ensayos preparamos 3 muestras, con el fin de poder confirmar los resultados obtenidos en cada prueba. Completamos la tabla indicando si se ha podido comprobar el resultado positivo de la *prueba de Adler* con un signo +, y, en caso contrario, con un -. Las zonas sombreadas corresponden a pruebas no realizadas por haber obtenido un resultado negativo al realizar la prueba sobre sangre sin contaminante.

Señalemos que, aunque para realizar la experiencia, se han preparado disoluciones de zumo de limón de concentración 1/1 hasta 1/100000 ml zumo/ml de disolución, y se ha realizado la prueba con todas ellas, en la tabla, por motivos de claridad y espacio, hemos omitido algunos resultados. Ello ha sido debido a no ofrecer significación, puesto que nos interesaba, sobre todo, reflejar aquellas concentraciones para las que los resultados pasan de ser positivos a negativos o al contrario.

Las pruebas de control que se han realizado aplicando la *prueba de Adler* sobre el zumo de limón, han dado un resultado negativo para todas las concentraciones. Es decir, el zumo de limón no da, en ningún caso, un resultado positivo.

PRUEBAS CON MUESTRAS LIQUIDAS

Analizando la tabla podemos ver que para concentraciones de sangre 1/1, y 1/10, no obtenemos negativos en la *prueba de Adler*, ni siquiera utilizando zumo de limón sin diluir.

Cuando pasamos a estudiar la concentración 1/100, encontramos que no se observa un resultado positivo hasta llegar a la concentración 1/2 en contaminante.

Para muestras de concentración 1/1000, se obtiene el positivo al llegar a una concentración 1/100 en contaminante. El color que se puede ver es azul claro, y el tiempo que tarda en desarrollarse oscila entre 20 y 30 segundos.

En muestras 1/10000, se obtiene el positivo cuando la concentración de contaminante es de 1/1000, y como ocurre con las muestras 1/1000, el color es tenue, y se necesita de 30 segundos para poderlo observar.

Cuando se aplica la prueba sobre muestras 1/100000, no conseguimos comprobar un resultado positivo en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

<p>PRUEBAS CON MANCHAS EN PAPEL DE FILTRO</p>

En este tipo de muestras, los resultados obtenidos indican que no se produce interferencia del contaminante cuando las concentraciones de sangre varían entre 1/1 y 1/10000. Debemos señalar que en esta última muestra, al aplicar la *prueba de Adler* se observa la aparición sobre la mancha de puntos azules, que consideramos indicativos de un resultado positivo.

Al pasar al estudio de las manchas de sangre correspondientes a una concentración 1/100000, vemos que se obtienen resultados negativos hasta llegar a la disolución de concentración 1/1000 en contaminante.

Para las soluciones de zumo de limón más diluidas, el resultado es positivo y se puede ver como se forman trazos azules sobre la mancha al realizar la prueba.

Para manchas correspondientes a la muestra 1/200000, todos los resultados son negativos.

PRUEBAS CON LA HUELLA DE TAYLOR

No existe interferencia cuando se estudia la *huella de Taylor* para concentraciones de sangre comprendidas entre 1/1 y 1/1000.

Se obtiene resultados negativos al realizar las pruebas con las muestras correspondientes a la concentración 1/10000 en sangre, hasta llegar a la disolución 1/1000 en contaminante.

Para disoluciones menos concentradas en zumo de limón, el resultado de la prueba es positivo y se comprueba la aparición de trazos azules sobre la huella.

No realizamos la experiencia para muestras 1/100000, puesto que al aplicar la prueba sobre un blanco, es decir obteniendo la huella correspondiente a la mancha sin contaminante, el resultado es negativo, confirmando lo que ya se comprobó en la experiencia correspondiente al primer objetivo.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

Las experiencias realizadas nos han permitido demostrar que existen sustancias que añadidas a la muestra de sangre, provocan un resultado negativo de la *prueba de Adler*.

Hemos comprobado que, como cabría esperar, de la misma forma que el soporte utilizado afecta a la sensibilidad de la *prueba de Adler*, esto también ocurre cuando se estudia sobre muestras que contienen contaminante. Se puede demostrar que la efectividad sigue siendo mayor en el caso de que se analicen manchas sobre papel de filtro que para muestras líquidas o huellas de manchas. Se observa que en el caso de muestras líquidas se detecta el efecto del contaminante para concentraciones más altas en sangre, que en el caso de los otros soportes. Así pues, para muestras 1/100 ya se producen interferencias en la reacción. Hay que destacar que la efectividad de la prueba, aún en el caso de que existan contaminantes, es mayor cuando se realiza sobre manchas sobre papel de filtro. Y que, en el caso de las *huellas de Taylor*, aunque la sensibilidad de la prueba es menor, puesto que no da positivo para concentraciones 1/100000, el efecto del contaminante es menor que en caso muestras líquidas, puesto que no se comprueba la aparición de falsos negativos hasta llegar a una concentración 1/10000 en sangre.

		concentracion de zumo (ml zumo/ml totales)																							
conc. muestra (ml sangre/ml tot.)	soporte	0	1/1	1/2	1/5	1/10	1/50	1/100	1/1000	1/10000	1/100000														
0	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	mancha papel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/1	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1/10	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1/100	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1/1000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1/10000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	huella Taylor	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
1/100000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	mancha papel	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1/200000	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	mancha papel	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1/300000	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	mancha papel	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1/400000	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	mancha papel	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1/500000	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	mancha papel	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

TABLA 2
 Prueba de Adler en muestras que contienen sangre y zumo de limón.

OBJETIVO 3

Los resultados que hemos obtenido en estas sesiones de laboratorio quedan reflejados en la tabla 3 que aparece a continuación. Su estructura es igual a la correspondiente a la segunda experiencia, pero sustituyendo las concentraciones de las disoluciones de zumo de limón, por las correspondientes a las disoluciones de ácido ascórbico.

En el método descrito para esta experiencia, indicamos ya que hemos preparado una disolución base de ácido ascórbico que contiene una concentración de 0,38 mg/ml del ácido.

Para obtener la disolución hemos pesado 0,0387 g de ácido ascórbico que han sido disueltos en 100 ml de agua destilada, de forma que tenemos una concentración de 0,3870 mg/ml. Esta disolución sería equivalente a la de concentración 1/1 en zumo de limón pues contiene, aproximadamente, la misma cantidad de ácido ascórbico.

Para poder comparar con más facilidad las tablas que indican los resultados de las experiencias 2 y 3, consideramos que la disolución base como una disolución 1/1, de forma que por ejemplo, la disolución 1/2, corresponde en realidad a una concentración de 0,1935 mg/ml.

También en esta experiencia, realizamos las pruebas sobre 3 muestras iguales para asegurarnos de que obtenemos el resultado correcto. Convencionalmente, en la tabla el signo + representa el resultado positivo de la prueba y el - el negativo.

En la tabla hemos omitido, al igual que en la experiencia anterior algunas de las disoluciones de ácido ascórbico que, aunque las hemos utilizado, no aportan ningún dato de interés a los resultados. De esta forma intentamos que la tabla sea más clara y menos extensa

Previamente hemos comprobado que la *prueba de Adler* no da positiva para ninguna concentración de ácido ascórbico.

PRUEBAS CON MUESTRAS LIQUIDAS:

Según los datos que indicamos en la tabla, podemos ver que no obtenemos resultados negativos al aplicar la *prueba de Adler*, sobre las muestras preparadas a partir de las disoluciones de sangre más concentradas, es decir, 1/1 y 1/10, a las que añadimos 1 ml de la disolución base de ácido ascórbico. La concentración de la disolución base aparece en la tabla como 1/1, y corresponde realmente a 0,3870 mg/ml.

Cuando pasamos a estudiar la muestra de sangre de concentración 1/100, obtenemos resultados negativos hasta llegar a la disolución 1/2 (0,1935 mg/ml) en ácido.

Debemos indicar que para todas las pruebas realizadas con disoluciones más concentradas de ácido, el resultado lo consideramos negativo aunque con el tiempo las muestras adquieren un color verde oscuro.

Cuando pasamos a estudiar las muestras que contienen sangre y ácido ascórbico, correspondientes a la concentración 1/1000 en sangre, obtenemos resultados negativos de la prueba hasta llegar a la disolución 1/10 en contaminante. El color que indica el resultado positivo es azul claro.

Para muestras 1/10000 en sangre, obtenemos un resultado positivo para la disolución de contaminante de concentración 1/1000, y al igual que en las pruebas realizadas para la disolución de sangre 1/1000, el color es tenue y en este caso se necesitan 30 segundos para poder observarlo.

Para muestras 1/100000, aunque el resultado de la prueba sobre la muestra sin contaminar es positivo, cuando estudiamos el efecto del contaminante obtenemos resultados negativos en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

**PRUEBAS CON MANCHAS EN PAPEL DE
FILTRO:**

Los resultados obtenidos para estas muestras nos indican que no se produce interferencia del contaminante para concentraciones de sangre entre 1/1 y 1/100000. Sin embargo debemos indicar que en el caso de las muestras 1/10000 y 1/100000, lo que se observa al realizar la prueba, es la aparición sobre la mancha de trazos azules, que consideramos que indican el resultado positivo de la misma.

Para las muestras correspondientes a una concentración 1/200000, determinamos que el resultado de la prueba sobre manchas preparadas sin contaminante, es positivo, y podemos observar cómo aparecen puntos azules sobre la mancha.

Al someter a la *prueba de Adler* a las manchas que contienen contaminante, comprobamos que sólo se obtiene un resultado positivo cuando la concentración de contaminante es de 1/100000, es decir, de $3,87 \cdot 10^{-6}$ mg/ml. También en este caso vemos sobre la mancha puntos azules, que consideramos como indicativos del resultado positivo de la reacción.

Para el resto de las manchas que obtenemos para concentraciones de sangre desde 1/300000 hasta 1/500000, al añadir contaminante no obtenemos resultados positivos para ninguna de las disoluciones de ácido ascórbico.

PRUEBAS CON LA HUELLA DE TAYLOR:

No se observa interferencia en la reacción cuando se estudia la *huella de Taylor* para concentraciones de sangre comprendidas entre 1/1 y 1/1000. Para esta última disolución aparecen sobre la mancha trazos azules.

Se obtiene resultados negativos al realizar las pruebas con las muestras correspondientes a la concentración 1/10000 en sangre, para todas las disoluciones de ácido ascórbico de las que disponemos. Sin embargo sí que da positiva la prueba realizada sobre la huella que se obtiene de la mancha sin contaminante

No realizamos la experiencia para muestras 1/100000, puesto que al aplicar la prueba sobre una mancha de sangre sin contaminante, el resultado es negativo.

AJUSTE DE LA CONCENTRACION DEL CONTAMINANTE

Elegimos para las pruebas la disolución de sangre de concentración 1/1000. Como indicamos en el método preparamos tubos de ensayo con 1 ml de sangre en cada uno. Para esta dilución el ácido ascórbico actúa como contaminante a partir de la concentración 1/10 (es decir, 0,0387 mg/ml).

Añadimos a cada tubo un volumen distinto de ácido ascórbico, desde 0,1 hasta 1 ml. Como en todos los ensayos que realizamos, prepararemos 3 tubos para cada prueba. Los resultados que hemos obtenido al aplicar sobre las muestras la prueba de Adler, se indican en la tabla 4 que sigue:

		Volumen ácido ascórbico 1/10 (ml)									
		1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Resultado Prueba Adler	R	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	P	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Como es evidente, el resultado es positivo para todas las muestras excepto la que contiene 1 ml de contaminante.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

También en esta experiencia podemos comprobar que la sensibilidad de la prueba varía según el soporte utilizado para la muestra, siendo mayor la efectividad cuando se estudian manchas obtenidas sobre papel de filtro.

De igual forma, el efecto del contaminante es de mayor importancia en el caso de muestras líquidas, ya que hemos obtenido interferencias en concentraciones 1/100 en sangre, y la acción del ácido ascórbico es menor en manchas sobre papel e incluso en las huellas correspondientes a las manchas.

Los resultados obtenidos son superponibles a los correspondientes a la segunda experiencia, en la que utilizó el zumo de limón como contaminante. No obstante, encontramos que, para manchas en papel, varía ligeramente, puesto que hemos podido comprobar que la reacción es positiva para concentraciones de sangre de 1/200000, cuando se utiliza la disolución de contaminante 1/100000, ($3,87 \cdot 10^{-6}$ mg/ml). Sin embargo en las pruebas realizadas con zumo de limón no obtenemos resultados positivos en ningún caso.

Con la *huella de Taylor* correspondiente a manchas obtenidas a partir de disoluciones 1/10000 en sangre, los resultados son negativos para todas las soluciones de ácido ascórbico. Resaltemos que, con zumo de limón, obtuvimos un resultado positivo para disoluciones de contaminante de baja concentración.

Con respecto a la segunda parte de la experiencia, podemos decir que, pequeñas variaciones en la concentración de contaminante, producen cambios significativos en el resultado de la prueba.

Así, hemos comprobado que con 0,9 ml de la disolución 1/10 el resultado es positivo, pero, sin embargo, con 1 ml, vemos que pasa a ser negativo. En la primera muestra, la concentración real de ácido ascórbico teniendo en cuenta el factor de dilución es de 0,0174 mg/ml, y en la segunda es de 0,0387 mg/ml.

		concentracion de ácido ascórbico (mg/ml)																													
conc. muestra (ml sangre/ml tot.)	soporte	0			1/1			1/2			1/5			1/10			1/100			1/1000			1/10000			1/100000			1/1000000		
		0	0.3870	0.1935	0.0774	0.0387	0.387E-2	0.387E-3	0.387E-4	0.387E-5	0.387E-6																				
0	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	mancha papel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1/1	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1/10	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1/100	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1/1000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1/10000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	huella Taylor	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1/100000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1/200000	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	mancha papel	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1/300000	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	mancha papel	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1/400000	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	mancha papel	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
1/500000	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	mancha papel	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

TABLA 3
 Prueba de Adler en muestras que contienen sangre y ácido ascórbico.

4° OBJETIVO

Los resultados de esta experiencia los representamos en la tabla 5, cuya estructura es igual a la descrita para la correspondiente al tercer objetivo.

Señalemos también que hemos utilizado la misma disolución base de ácido ascórbico que preparamos para la experiencia 3.

Los resultados son los siguientes:

PRUEBAS CON MUESTRAS LIQUIDAS:

En el estudio de las muestras de concentración 1/10 en sangre más 1/1 en contaminante, el color indicativo del resultado positivo tarda 1 minuto en desarrollarse. Esto no ocurría al utilizar muestras preparadas a partir de sangre recién extraída en las que el viraje del reactivo se producía inmediatamente.

En las muestras que contienen una concentración en sangre de 1/100, la interferencia del ácido ascórbico se detecta a menores concentraciones de contaminante que en las muestras equivalentes de la tercera experiencia, de forma que para las disoluciones de concentración mayor a 3/10 (0,1161 mg/ml), los resultados son negativos.

Además debemos indicar que los positivos que se obtienen en el intervalo de concentraciones 3/10 hasta 1/100, tardan en desarrollarse aproximadamente 1 minuto, dando un color muy poco intenso.

Los positivos obtenidos para las muestras 1/1000 en sangre, dan también un color pálido y necesitan de un tiempo superior a 10 segundos para poder ser confirmados. La interferencia del ácido se produce para la misma concentración que en las muestras estudiadas en la experiencia anterior

Para muestras 1/10000 en sangre, la interferencia del contaminante se produce para todas las disoluciones utilizadas. Esto no ocurría al utilizar muestras preparadas a partir de sangre recién extraída.

Las muestras 1/100000, dan un resultado positivo de la prueba, cuando se aplica sobre la muestra sin contaminar. Sin embargo también en este caso el color es débil y tarda aproximadamente 30 segundos en desarrollarse.

**PRUEBAS CON MANCHAS EN PAPEL DE
FILTRO:**

La interferencia del contaminante se produce para concentraciones 1/10000 en sangre, ya que con estas muestras no obtenemos positivos para ninguna de las disoluciones de ácido ascórbico utilizadas. Para asegurarnos de que los resultados son correctos, hemos repetido las pruebas utilizando hasta 6 manchas correspondientes a esa muestra sin obtener ningún positivo.

Otro aspecto a destacar es que la prueba no es sensible para las muestras 1/400000 y 1/500000. En el caso de la dilución 1/300000, se observa la formación de puntos azules sobre la mancha que indican el resultado positivo.

PRUEBAS CON LA HUELLA DE TAYLOR:

También en estas muestras encontramos algunas diferencias con respecto a los resultados obtenidos en la tercera experiencia de forma que para las huellas correspondientes a la disolución 1/1000 en sangre, la prueba sólo es positiva cuando se aplica sobre la correspondiente a sangre sin contaminar.

No vemos resultados positivos al realizar la prueba sobre huellas obtenidas a partir de muestras 1/10000 en sangre en ausencia de contaminante. Esto indica que para estas muestras la prueba es menos sensible que al utilizar sangre recién extraída.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

Al igual que en las experiencias anteriores, podemos comprobar la influencia del tipo de soporte sobre el que se realiza la prueba en la sensibilidad de la misma, y también en la acción del contaminante.

Podemos indicar también para estas muestras, la sensibilidad de la *prueba de Adler* es menor que cuando se utiliza sangre recién extraída, de la misma forma que es mayor la influencia del contaminante.

Es decir, el tratamiento de conservación al que ha sido sometida la muestra ha influido en la capacidad de la misma para dar positiva la *prueba de Adler*, manteniéndose el efecto del contaminante.

		concentración de ácido ascórbico (mg/ml)																										
conc. muestra (ml sangre/ml tot.)	soporte	0			1/1			3/10			1/5			1/10			1/100			1/1000			1/100000			1/1000000		
		0	0.3870	0.1161	0.0774	0.0387	0.387E-2	0.387E-3	0.387E-5	0.387E-6																		
0	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	mancha papel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1/1	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1/10	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1/100	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1/1000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1/10000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	mancha papel	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1/100000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	mancha papel	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
1/200000	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	mancha papel	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1/300000	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	mancha papel	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1/400000	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	mancha papel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1/500000	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	mancha papel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

TABLA 5
 Resultados correspondientes a muestras que proceden del banco de sangre.

5° OBJETIVO

Los resultados correspondientes a cada uno de los periodos estudiados, los indicamos en tablas de igual estructura a las que fueron descritas en experiencias anteriores

MUESTRAS DE UNA SEMANA DE ANTIGÜEDAD:

Los resultados quedan reflejados en la tabla 6, que sigue:

PRUEBAS CON MUESTRAS LIQUIDAS

Al comparar los resultados que hemos obtenido con los que corresponden a muestras recién preparadas, comprobamos que la sensibilidad de la *prueba de Adler* cuando se estudia sangre sin contaminar es la misma en los dos casos.

Sin embargo con muestras que contienen ácido ascórbico observamos que la interferencia se produce para concentraciones menores de contaminante cuando se analiza la muestra recién preparada. Es decir, el tiempo transcurrido desde que se prepara la muestra, hasta que se somete a la *prueba de Adler*, disminuye la capacidad del ácido ascórbico para impedir la reacción positiva.

Así, por ejemplo, para diluciones 1/1000 en sangre, cuando se trata de muestras recién preparadas, existe interferencia del ácido ascórbico a partir de la concentración 1/10. Esto no ocurre cuando la muestra se estudia después de transcurrida una semana, ya que en este caso no se produce interferencia del contaminante.

**PRUEBAS CON MANCHAS EN PAPEL DE
FILTRO**

Analizando los resultados obtenidos en el estudio de muestras sin contaminar, debemos señalar que la sensibilidad de la prueba es menor para manchas antiguas que para las recientes, de forma que si estas últimas, nos han dado resultados positivos para las muestras correspondientes a diluciones 1/500000 en sangre, para manchas antiguas obtenemos resultados negativos a partir de concentraciones de 1/200000 en sangre.

En el caso de las muestras preparadas a partir de sangre y ácido ascórbico, comprobamos que no se produce interferencia del contaminante en ninguno de los ensayos realizados, si bien, como ya hemos comentado anteriormente, nos hemos tenido que limitar a las manchas correspondientes a concentraciones hasta 1/200000.

PRUEBAS CON LA HUELLA DE TAYLOR

También en este caso, si comparamos los resultados obtenidos con los que ya teníamos para huellas que procedían de manchas recientes sin contaminar, podemos ver que la sensibilidad de la prueba disminuye y es sensible sólo hasta las muestras que corresponden a la dilución 1/1000 en sangre. Es decir la sensibilidad es 10 veces menor que en el caso de muestras recién preparadas.

El efecto del contaminante, que sólo podemos estudiar hasta la concentración de sangre 1/1000, es el mismo que cuando se analizaban huellas correspondientes a manchas recientes.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS:

De los datos obtenidos a partir del análisis de muestras de sangre en los tres soportes estudiados, comprobamos que, la sensibilidad de la prueba se mantiene en caso de muestras líquidas, pero baja sensiblemente cuando se trata de manchas o huellas.

Por otra parte, cuando se realizan los ensayos correspondientes a muestras que hemos preparado a partir de sangre y ácido ascórbico, observamos que, para muestras líquidas, la capacidad de interferencia del contaminante disminuye con el paso del tiempo.

Esto último no lo hemos podido constatar con manchas y huellas, ya que para estos soportes, el efecto del contaminante es menor que en caso de disoluciones y la pérdida de sensibilidad de la prueba no nos ha permitido llegar hasta las muestras obtenidas a partir de diluciones para las que el ácido ascórbico provocaba un resultado negativo de la reacción.

		concentracion de ácido ascórbico (mg/ml)																				
conc. muestra (ml sangre/ml tot.)	soporte	0			1/1			1/2			1/5			1/10			1/100			1/1000000		
		0	0	0	0.3850	0.3850	0.3850	0.1925	0.1925	0.1925	0.0770	0.0770	0.0770	0.0385	0.0385	0.0385	0.385E-2	0.385E-2	0.385E-2	0.385E-6	0.385E-6	0.385E-6
0	muestra líquida				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	mancha papel				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	huella Taylor				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/1	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/100	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1000	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	-	-	-																		
1/100000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	-	-	-																		
1/200000	muestra líquida	-	-	-																		
	mancha papel	-	-	-																		
	huella Taylor	-	-	-																		
1/300000	muestra líquida	-	-	-																		
	mancha papel	-	-	-																		
	huella Taylor	-	-	-																		
1/400000	muestra líquida	-	-	-																		
	mancha papel	-	-	-																		
	huella Taylor	-	-	-																		
1/500000	muestra líquida	-	-	-																		
	mancha papel	-	-	-																		
	huella Taylor	-	-	-																		

TABLA 6
Pruebas realizadas con muestras con antigüedad de una semana.

MUESTRAS DE DOS SEMANAS DE ANTIGÜEDAD:

A partir de los datos obtenidos para estas muestras, y que resumimos en la tabla 7, resaltaremos lo siguiente:

PRUEBAS CON MUESTRAS LIQUIDAS

Hemos comprobado que la sensibilidad de la prueba, cuando se aplica sobre sangre sin contaminante, ha disminuido, puesto que no da positiva para las muestras 1/100000. Las muestras 1/10000, dan positivo después de transcurridos 30 segundos desde que se añade el peróxido de hidrógeno, y el azul que se observa es muy tenue.

Para las muestras correspondientes a sangre con ácido ascórbico, podemos indicar que en las muestras 1/10 y 1/100, aunque el contaminante no interfiere, sí que comprobamos que la reacción positiva tarda más de 10 segundos en producirse (20 segundos).

Las que contienen sangre 1/1000 y 1/10000, nos dan resultados que varían con respecto a los obtenidos para las muestras de una semana de antigüedad. Así, para las muestras 1/1000, se detecta interferencia del contaminante. Esto no ocurría con las de igual concentración y menor antigüedad.

Comprobamos, además que, para muestras que contienen ácido ascórbico a concentración 1/2, podemos ver el viraje del reactivo si dejamos transcurrir 4 minutos desde que se añade a la muestra.

De la misma forma, en el caso de las muestras 1/10000, el ácido ascórbico provoca resultados negativos a menor concentración que en las más recientes.

De estos resultados podemos destacar que la pérdida de sensibilidad nos indica que empezamos a detectar una alteración en las características de la sangre,

que se pone de manifiesto además por la mayor influencia del contaminante, que es capaz de afectar de nuevo a muestras que contienen sangre a concentración 1/1000.

PRUEBAS CON MANCHAS EN PAPEL DE FILTRO

Con respecto a las manchas también comprobamos una pérdida de sensibilidad de la prueba, que no da positiva para 1/100000.

En las pruebas realizadas con el objetivo de estudiar la interferencia del ácido ascórbico, no encontramos diferencia al comparar los datos con los correspondientes a muestras de una semana de antigüedad.

PRUEBAS CON LA HUELLA DE TAYLOR

En el estudio de las muestras mediante la obtención de la *huella de Taylor*, señalaremos que se ha perdido también sensibilidad, de forma que tenemos resultados positivos hasta concentraciones 1/100.

Respecto a las pruebas correspondientes a muestras preparadas con sangre y ácido ascórbico, los resultados no nos permiten observar diferencias al compararlos con los que obtuvimos en experiencias anteriores.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

Tras dejar las muestras durante dos semanas a temperatura ambiente, comprobamos que para los tres soportes sobre los que se ha hecho el estudio, la sensibilidad de la prueba baja con respecto a muestras menos antiguas. Podríamos deducir de este resultado que la sangre se ha alterado por el paso del tiempo.

Por otra parte, la interferencia del ácido ascórbico, aún siendo menor que cuando se estudian muestras recién extraídas, aumenta ligeramente con respecto a las que corresponden a una antigüedad de una semana.

concentración de ácido ascórbico (mg/ml)																					
	concentración muestra (ml sangre/ml tot.)	soporte																			
			0	1/1	1/2	1/5	1/10	1/100	1/100000												
0	0.3850	0.1925	0.0770	0.0385	0.385E-2	0.385E-6															
0	muestra líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	mancha papel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	huella Taylor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/1	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/100	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	-	-	-																	
1/10000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	-	-	-																	
1/100000	muestra líquida	-	-	-																	
	mancha papel	-	-	-																	
	huella Taylor	-	-	-																	
1/200000	muestra líquida	-	-	-																	
	mancha papel	-	-	-																	
	huella Taylor	-	-	-																	
1/300000	muestra líquida	-	-	-																	
	mancha papel	-	-	-																	
	huella Taylor	-	-	-																	
1/400000	muestra líquida	-	-	-																	
	mancha papel	-	-	-																	
	huella Taylor	-	-	-																	
1/500000	muestra líquida	-	-	-																	
	mancha papel	-	-	-																	
	huella Taylor	-	-	-																	

TABLA 7
 Pruebas realizadas con muestras con antigüedad de dos semanas.

MUESTRAS DE CUATRO SEMANAS DE ANTIGÜEDAD:

La tabla 8 recoge los resultados correspondientes a las pruebas realizadas sobre muestras que hemos guardado durante cuatro semanas.

Como se puede comprobar, estos resultados son superponibles a los que se obtienen en la experiencia anterior, para muestras de dos semanas de antigüedad, tanto en lo que se refiere a la sensibilidad de la *prueba de Adler* sobre sangre como en el efecto del contaminante sobre la reacción.

Sin embargo, debemos señalar algunas diferencias en lo que respecta a la valoración del resultado positivo de la prueba. Son las siguientes:

PRUEBAS CON MUESTRAS LIQUIDAS

En las muestras 1/1000 que contienen ácido ascórbico 1/2 (0,1925 mg/ml), obtenemos un resultado positivo de la prueba si dejamos transcurrir 2 minutos desde que se añade el reactivo. Es decir se produce la reacción positiva con menor dificultad que en el caso de muestras de dos semanas de antigüedad.

Con las soluciones 1/10000, la *prueba de Adler* nos da un resultado positivo. Sin embargo resulta difícil de ver por ser una coloración muy tenue (azul pálido-gris), y que puede inducir a error. Hemos considerado positivo este resultado por comparación con el que hemos obtenido para las muestras 1/100000.

De la misma forma, para las pruebas realizadas con sangre y ácido ascórbico, los resultados no nos permiten decir directamente si la prueba es positiva, sino que es necesario comparar con el color obtenido para la muestra de sangre sin contaminar.

PRUEBAS CON MANCHAS EN PAPEL DE FILTRO

En el estudio de las manchas, debemos indicar que para muestras 1/10000, resulta difícil ver el resultado positivo de la reacción.

Hemos realizado la prueba en 6 manchas y sólo en 3 de ellas han aparecido trazas azules indicativas de la reacción de la bencidina. Lo mismo ocurre cuando analizamos manchas que proceden de muestras que contienen ácido ascórbico.

Así pues, la prueba puede dar lugar a conclusiones erróneas porque no da positiva para todas las muestras, y es necesario repetirla para asegurar el resultado.

PRUEBAS CON LA HUELLA DE TAYLOR

También en este caso, para las muestras correspondientes a la concentración 1/100, las pruebas las realizamos con 6 huellas y no obtenemos el positivo en todas ellas. Esto ocurre también cuando se trata de sangre con ácido ascórbico.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

De los datos obtenidos, podemos deducir que el tiempo que transcurre desde que se prepara la muestra hasta que se somete a la *prueba de Adler*, produce una pérdida de sensibilidad que es más acusada en el caso de manchas y huellas que para muestras líquidas. Esta pérdida de sensibilidad se observa en los tres soportes estudiados y aumenta con el tiempo.

Para muestras con contaminante, comprobamos que la capacidad de interferencia del mismo disminuye con respecto a las muestras recién preparadas.

Esto puede explicarse porque el ácido ascórbico en solución acuosa es sensible a la luz y al oxígeno. Esta pérdida en la capacidad de interferencia se detecta en períodos cortos (1 semana). Cuando el tiempo que transcurre es mayor, aumenta ligeramente debido probablemente a que la sangre también sufre alteraciones que se traducen en variaciones en la influencia del contaminante.

		concentracion de ácido ascórbico (mg/ml)																				
conc. muestra (ml sangre/ml tot.)	soporte	0			1/1			1/2			1/5			1/10			1/100			1/100000		
		0	0	0	0.3850	0.3850	0.3850	0.1925	0.1925	0.1925	0.0770	0.0770	0.0770	0.0385	0.0385	0.0385	0.385E-2	0.385E-2	0.385E-2	0.385E-6	0.385E-6	0.385E-6
0	muestra líquida				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	mancha papel				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	huella Taylor				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/1	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/100	muestra líquida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/1000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	-	-	-																		
1/10000	muestra líquida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	mancha papel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	huella Taylor	-	-	-																		
1/100000	muestra líquida	-	-	-																		
	mancha papel	-	-	-																		
	huella Taylor	-	-	-																		
1/200000	muestra líquida	-	-	-																		
	mancha papel	-	-	-																		
	huella Taylor	-	-	-																		
1/300000	muestra líquida	-	-	-																		
	mancha papel	-	-	-																		
	huella Taylor	-	-	-																		
1/400000	muestra líquida	-	-	-																		
	mancha papel	-	-	-																		
	huella Taylor	-	-	-																		
1/500000	muestra líquida	-	-	-																		
	mancha papel	-	-	-																		
	huella Taylor	-	-	-																		

TABLA 8
 Pruebas realizadas con muestras con antigüedad de cuatro semanas.

6° OBJETIVO

I.- PRUEBAS CON OXIDANTES QUIMICOS:

La tabla 9 resume los resultados de las pruebas correspondientes a este punto. En ella indicamos el color de las disoluciones y los cambios que se producen cuando se realizan los diferentes ensayos, lo que nos permite deducir las reacciones que han tenido lugar.

1.- PRUEBAS CON DIOXIDO DE MANGANESO

1.1.- Con el reactivo de ADLER:

Al añadir el reactivo a la disolución de dióxido de manganeso, aparece la coloración azul que indica que se ha producido la oxidación de la bencidina. Esta reacción tiene lugar sin necesidad de añadir peróxido de hidrógeno, por lo que prescindiremos de este reactivo en las siguientes pruebas.

Si a continuación añadimos a la preparación un ml de ácido ascórbico, podemos ver como pierde inmediatamente el color azul. Es decir, el ácido ascórbico reduce al reactivo de ADLER.

1.2.- Pruebas con ácido ascórbico:

Al agregar este reactivo a la solución de dióxido de manganeso, esta pasa de color marrón a marrón más claro. Según este resultado, no podemos afirmar que se produzca la oxidación del ácido ascórbico, puesto que no se produce un cambio significativo que nos permita interpretar si ha tenido lugar alguna reacción.

1.3.- Pruebas con reactivo de ADLER y ácido ascórbico:

Al añadir al dióxido de manganeso el contenido del tubo de ensayo que hemos preparado con reactivo de ADLER y ácido ascórbico, comprobamos que la disolución pasa a color azul, indicando la oxidación de la bencidina. A continuación, lentamente, se pierde el color azul. Esto nos indica que el ácido ascórbico reduce de nuevo a la bencidina.

2.- CON PERMANGANATO POTASICO

2.1.- Pruebas con el reactivo de ADLER:

Cuando añadimos el reactivo a la disolución de permanganato, (color violeta), vemos inmediatamente como se desarrolla la coloración azul que indica la oxidación de la bencidina.

En un segundo paso del ensayo que estamos realizando, agregamos a la preparación anterior 1 ml de ácido ascórbico.

Comprobamos que se la disolución pasa a color marrón-amarillento. Esto indica que en primer lugar el ácido ascórbico ha reducido a la bencidina, puesto que desaparece el color azul.

Por otra parte, el color marrón resultante se puede explicar por la formación de dióxido de manganeso debido a que existe un exceso de permanganato. Debemos suponer además que, probablemente, parte del ácido ascórbico ha sido oxidado por el permanganato. Para poder obtener más datos de este ensayo, haremos la misma prueba utilizando disoluciones menos concentradas de permanganato. los resultados son:

2.1.1.- Con permanganato 0,01 M:

Con el reactivo de ADLER la solución pasa de violeta a azul intenso. Al añadir 1 ml de ácido ascórbico, cambia de color y pasa como en el ensayo anterior a marrón-amarillento.

2.1.2.- Con permanganato 0,001 M:

El color azul que indica la oxidación de la bencidina se atenúa al añadir el ácido ascórbico sin llegar a desaparecer. Esto se puede explicar considerando que parte del ácido ascórbico ha podido ser oxidado también por el permanganato que, a esta concentración se reduce a Mn(II), (incoloro), sin que se produzca oxidación del mismo a dióxido de manganeso, ya que esta segunda reacción sólo tiene lugar cuando existe un exceso de permanganato en la disolución.

2.1.3.- Con permanganato 0,0001 M:

Al añadir el ácido ascórbico desaparece inmediatamente el color azul, y la solución pasa a transparente como consecuencia de la reducción de la bencidina por el ácido.

2.2.- Pruebas con ácido ascórbico:

Al añadir a la solución de permanganato 1 M y 0,01 M un ml de ácido ascórbico, el color cambia de violeta a rojizo.

Podemos explicar este resultado porque se produce la oxidación del ácido por el permanganato que se reduce a Mn(II) (incoloro). Como existe un exceso de permanganato, se produce también la oxidación del Mn(II) que pasa a dióxido de manganeso (marrón).

Cuando repetimos la prueba con concentraciones más bajas de oxidante (0,001 y 0,0001 M), comprobamos que la solución se vuelve transparente inmediatamente. Es decir que se produce la oxidación del ácido ascórbico por el permanganato que se decolora.

2.3.- Pruebas con reactivo de ADLER y ácido ascórbico (reactivo neutralizado):

Al realizar el ensayo a partir de la disolución 1 M en permanganato, comprobamos que cuando añadimos el reactivo neutralizado al oxidante, la solución pasa a color azul intenso inmediatamente. Este

color es permanente y no se atenúa con el tiempo. Repetimos la misma prueba utilizando soluciones de permanganato de concentraciones 0,01 M, 0,001 M, 0,0001 M. Los resultados son los siguientes:

2.3.1.- Para una solución 0,01 M:

Comprobamos que se produce la oxidación de la bencidina, dando lugar al color azul característico de esta reacción.

2.3.2.- Para una solución 0,001 M:

El resultado es superponible.

Sin embargo si el reactivo neutralizado lo preparamos con 2 ml de ácido ascórbico y dos gotas de reactivo de ADLER, es decir, aumentamos la cantidad de ácido ascórbico, el resultado es distinto.

En este último caso la solución adquiere inicialmente el color azul característico de la oxidación de la bencidina, pero a continuación este color se pierde, y la solución queda transparente.

2.3.3.- Para soluciones menores:

Al añadir el reactivo neutralizado, observamos que inmediatamente se produce un color azul muy intenso, que progresivamente va decreciendo en intensidad hasta que la disolución llega a ser transparente.

Esta prueba nos indica que la bencidina es oxidada por el permanganato (color azul), y reducida de nuevo por el ácido ascórbico (transparente).

II.- PRUEBAS CON SANGRE:

1.- Realizamos la *prueba de Adler* sobre 1 ml de la disolución de sangre de concentración 1/1000.

En este caso, la solución adquiere color azul indicativo de la reacción positiva de la prueba.

Al añadir a continuación unas gotas de ácido ascórbico, la muestra pierde rápidamente el color azul. Esto ocurre porque se produce la reducción de la bencidina por el ácido.

2.- Al repetir el mismo ensayo sobre una mancha, obtenemos idéntico resultado, es decir, el color azul indicativo del resultado positivo de la *prueba de Adler*, desaparece al añadir unas gotas de ácido ascórbico sobre la mancha.

3.- La prueba aplicada sobre la *huella de Taylor* nos proporciona el mismo resultado que el obtenido en los dos soportes anteriores.

VALORACION CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

Según los resultados que hemos obtenido, todo apunta a que es muy posible que la interferencia del ácido ascórbico en la *prueba de Adler*, se produzca porque el ácido actúa reduciendo rápidamente la bencidina que fue oxidada por el peróxido de hidrógeno, impidiendo que podamos ver el color azul que demuestra la oxidación del reactivo.

A concentraciones altas de oxidante, este es capaz de oxidar al ácido ascórbico y también al reactivo de ADLER, impidiendo o atenuando la acción del contaminante. Con soluciones menos concentradas, éste actúa sobre la bencidina oxidándola y el ácido ascórbico la reduce inmediatamente, por lo que desaparece el color azul indicativo del resultado positivo de la prueba.

Con estos ensayos hemos intentado dar una explicación química del mecanismo de interferencia del ácido ascórbico en la *prueba de Adler*.

Un mejor conocimiento de cómo se produce esta interferencia, nos permitirá en trabajos sucesivos, buscar una forma de impedir que se produzca, evitando los falsos negativos, y, por otra parte, diseñar pruebas preliminares sencillas que, aplicadas sobre las muestras a analizar, nos indiquen la posibilidad de que exista contaminación de la muestra y que, por lo tanto, puedan darse resultados erróneos.

Agente oxidante		Reactivos			
		React. Adler	Acido Ascórbico	React. Adler + Acido Ascórbico	React. neutralizado
Dióxido de Manganeso (MnO ₂)	0,2 M	azul	marrón claro (no indicativo)	azul vira a incoloro	azul vira a marrón
Permanganato Potásico (KMnO ₄)	1 M	azul	rojizo	azul vira a marrón	azul vira a marrón
	0,01 M	azul	rojizo	azul vira a marrón	azul vira a marrón
	0,001 M	azul	incoloro	azul vira a azul pálido	azul vira a marrón claro
	0,0001 M	azul	incoloro	azul vira a incoloro	azul vira a incoloro

TABLA 9
Pruebas realizadas con oxidantes químicos.

6

Compendio

6.- COMPENDIO

En toda investigación criminal, uno de los indicios de mayor interés médico-legal son las manchas, por su importancia a la hora de la reconstrucción de los hechos y 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 constituye la mayor parte de las pruebas científicas. Según la bibliografía revisada, desde un punto de vista estadístico, las manchas que con mayor frecuencia aparecen en la escena del crimen son las de sangre por lo que su identificación puede aportar datos que ayuden a esclarecer los hechos y proporcionar pruebas necesarias para llevar a buen fin una acción judicial.

A grandes rasgos, son cuatro las cuestiones que se plantean en el laboratorio a la hora de identificar manchas:

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 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.

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.

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

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

- Diagnóstico del sexo del individuo.

- Determinación de la región anatómica de donde procede la sangre analizada.

- Estudio de la data.

Como es bien sabido, al descartar que una mancha es de sangre, se detiene la cadena de investigación. Por la importancia de este hecho, en el estudio que nosotros hemos realizado nos hemos ocupado en la primera cuestión que se ha indicado. 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 centramos en las pruebas de orientación, que 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.

Uno de los reactivos más utilizados, por su alta sensibilidad y fácil preparación, es el reactivo de Adler. Se obtiene disolviendo bencidina a saturación en ácido acético glacial. La prueba está basada en la capacidad de las peroxidasas sanguíneas para descomponer el peróxido de hidrógeno, lo que produce una liberación de oxígeno que actúa a su vez oxidando a la bencidina. La forma oxidada de la bencidina tiene un color azul intenso que nos permite afirmar que en la muestra estudiada existen peroxidasas.

La prueba de Adler dará positiva con cualquier muestra que contenga peroxidasas dando lugar a falsos positivos, lo que nos impide afirmar la naturaleza sanguínea de la muestra estudiada.

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.

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. Así, por ejemplo, en las obras consideradas como fundamentales en la Medicina Legal se dice:

"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". Grandwohl R.B.H. Legal Medicine. 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." Eckert W G. Introduction to Forensic Sciences. 1980.

"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." Gisbert J A. Medicina Legal y Toxicología 4ª Ed. 1991.

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

En el laboratorio de Criminalística de la Unidad Docente de Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, se planteó la posibilidad de demostrar experimentalmente la existencia de falsos negativos en la prueba de *Adler*. Se realizaron distintos estudios que permitieron comprobar que, en determinadas circunstancias, se pueden obtener falsos negativos.

En el trabajo que ahora presentamos, hemos diseñado varias experiencias dirigidas a la obtención de datos que nos permitan demostrar la existencia de falsos negativos y el tipo de compuesto capaz de producirlos. Determinar en qué condiciones se produce la interferencia, y, por otra parte, conocer la influencia de diferentes factores en la sensibilidad de la reacción y en la capacidad del agente contaminante para dar lugar a un falso resultado negativo al realizar la prueba de *Adler*.

Hemos dedicado la última parte de la investigación al estudio de la reacción que se produce al aplicar la prueba de *Adler* y a conocer mejor mecanismo de actuación del agente contaminante. Aunque no ha sido posible hacer un análisis exhaustivo que sería motivo por sí solo de un trabajo independiente, las experiencias realizadas han aportado datos interesantes que nos han permitido llegar a una posible explicación del proceso que tiene lugar cuando se realiza la prueba de *Adler* sobre una muestra de sangre que contiene ácido ascórbico.

A partir de los resultados que hemos obtenido, podemos indicar que existen compuestos con unas características redox determinadas, que si se encuentran junto con la muestra de sangre que se va a someter a la prueba de *Adler*, actúan impidiendo que se obtenga un resultado positivo. Hemos centrado nuestro trabajo en el estudio de ácido ascórbico como contaminante. Comprobamos que actúa impidiendo la reacción de *Adler* a partir de unas determinadas concentraciones de la muestra y del

contaminante. Esto nos permite indicar que existen productos que, por su contenido en ácido ascórbico, pueden actuar como contaminantes de las muestras de sangre. Por ejemplo en los zumos naturales encontramos cantidades de ácido ascórbico que pueden llegar a 40 mg/100 g de porción comestible (zumo de naranja), en los zumos comerciales oscilan entre 0,15 mg./ml (zumo de piña) y 0,40 mg/ml (zumo de pomelo y de naranja). Además existen numerosas bebidas en cuya composición figura distintos contenidos en zumo. Por otra parte, medicinas, productos de limpieza, etc, pueden contener cantidades importantes de ácido ascórbico.

Además de variar con la concentración, la capacidad de interferencia del ácido ascórbico es distinta según el soporte sobre el que se estudia la muestra y también se ve afectado por la antigüedad de la misma. Las experiencias que nos han proporcionado estos datos, las hemos llevado a cabo con muestras preparadas a partir de sangre y contaminante, dejándolas después a temperatura ambiente durante distintos periodos. Los resultados nos indican una pérdida de la capacidad del ácido ascórbico para impedir el resultado positivo de la prueba y que se detecta en los tres soportes estudiados.

En otro de los ensayos realizados, utilizamos sangre procedente del banco de sangre y que ya había sido retirada por haber sobrepasado la fecha de caducidad. Al revisar los resultados obtenidos a partir de estas muestras, comprobamos que la interferencia del ácido ascórbico se detecta para muestras de sangre de mayor concentración y para menor concentración del contaminante que cuando se analizan muestras preparadas con sangre recién extraída. Los factores que pueden explicar estas diferencias son: la antigüedad de la muestra y el tratamiento de conservación al que se ha sometido (temperatura, agentes conservantes).

Las experiencias que hemos propuesto, nos han proporcionado datos sobre la sensibilidad de la prueba de Adler. Estos nos indican que es muy variable dependiendo del tipo de soporte sobre el que se analiza la muestra (tubo de ensayo, papel de filtro, huella de Taylor). Además también se ve afectada por la antigüedad de la sangre. Este último aspecto lo hemos comprobado a partir de muestras que hemos dejado periodos predeterminados a temperatura ambiente y también con otras que nos han proporcionado el banco de sangre. En estas últimas consideramos de nuevo los dos factores que pueden ser responsables de la variación de sensibilidad de la prueba de

Adler, y que son los siguientes: la antigüedad de la muestra y el tratamiento de conservación al que ha estado sometida.

El resultado de los ensayos realizados con el objetivo de conocer el mecanismo químico de actuación del contaminante, nos permiten deducir que la interferencia en los casos que hemos estudiado se produce porque el contaminante actúa reduciendo inmediatamente a la bencidina una vez ha sido oxidada por el peróxido de hidrógeno, por lo que nos impide ver la coloración azul que indica que se ha producido la reacción de Adler. Si la concentración en oxidasas es alta, el oxígeno liberado puede actuar oxidando a la bencidina y además al contaminante total o parcialmente, por lo que la interferencia no se produce o es menor.

Debemos indicar finalmente que de la misma forma que un resultado positivo al aplicar la prueba de Adler sobre una muestra no permite asegurar sin lugar a dudas su naturaleza sanguínea, el resultado negativo de la misma no se debe considerar excluyente y no se puede en ningún caso afirmar sin lugar a dudas que no existe sangre en la muestra estudiada.

7

Conclusiones

7.- CONCLUSIONES

- 1: Existen sustancias que, añadidas a una muestra de sangre provocan un resultado negativo de la *prueba de Adler*.
- 2: Dado que la *prueba de Adler* se fundamenta en una reacción de oxidación-reducción, la contaminación de la muestra por agentes reductores fuertes provoca cambios en los resultados previstos.
- 3: Cualquier compuesto con capacidad de reducir a la bencidina puede actuar impidiendo que se detecte el resultado positivo de la *prueba de Adler*.
- 4: Por todo ello, un resultado negativo obtenido al aplicar la *prueba de Adler* sobre una mancha, no permite descartar definitivamente su naturaleza sanguínea.
- 5: La utilización de pruebas para el diagnóstico de orientación para manchas de sangre, basadas en reacciones de oxidación-reducción debe ser sometida a revisión, con el fin de evitar conclusiones erróneas.

8

Bibliografía

8.1.- Referencias Bibliográficas

- (1) Eckert William G. Introduction to Forensic Sciences. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1980
- (2) Villalaín JD. Apuntes de Medicina Legal Criminalística. Madrid: Dpto de Medicina Legal, 1975
- (3) Svensson A, Wendel O. Métodos modernos de investigación criminal. Barcelona: Ed. A.H.R., 1956
- (4) Gisbert JA. Medicina Legal y Toxicología. 4ª Ed. Barcelona: Salvat, 1991
- (5) De Luís y Turégano JV. Policía Científica II. Técnica policial. Valencia: Universidad de Valencia, 1990
- (6) López Gómez L. Técnica Médico-Legal. Criminalística I. Valencia: Saber, 1953
- (7) Balthazard V. Manual de Medicina Legal. Barcelona: Salvat, 1933
- (8) Thorwald J. el siglo de la investigación criminal. Barcelona: Labor S.A. 1966
- (9) Eckert WG, James SH. Interpretation of bloodstains evidence at crime scenes. New York: Elsevier, 1989

- (10) Ferreira A. A pericia técnica em Criminologia e Medicina Legal. Sao Paulo: E. G. Revista des Tribunais Lda, 1998
 - (11) Thoinot L. Tratado de Medicina Legal vol 2. Barcelona: Salvat S.A, 1928
 - (12) Pérez Argilés V. Prácticas de Medicina Legal y Toxicología. Zaragoza: Librería General, 1940
 - (13) Culliford BJ, Nickols LC. The Benzidine test. A critical review. Journal of Forensic Sciences 1964 January; 9(1): 175-91
 - (14) Cox M. A Study of the sensitivity and specificity of four presumptive test for blood. Journal of Forensic Sciences 1991; 36: 1503-11
 - (15) Grodsky M, Wright K, Kirk PL. Simplified preliminary blood testing. An improved technique and a comparative study of methods. Criminal Police Science 1951; 42: 95-104
 - (16) Grandwohl RBH. Legal Medicine. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1954
 - (17) López Gómez L, Gisbert Calabuig JA. Tratado de Medicina Legal Tomo I. Valencia: Saber, 1970
 - (18) Verdú Pascual FA, Gisbert Grifo MS. Investigation of bloodstains: False negative results of the Benzidine Test. Forensic Science International 1995; 71: 85-6
 - (19) Ariño Montero A, Sebastián Aguilar C. Química Temas Básicos. Valencia: Ed. Librería General, 1978
 - (20) Morcillo J, Fernández, M. Química. Madrid: Anaya, 1984
 - (21) Stryer L. Bioquímica. 2ª Ed. Barcelona: Reverté S A, 1982
 - (22) Mahan BH. Química curso universitario. 3ª Ed. Massachusetts: Fondo Educativo Interamericano, 1977
 - (23) Martin DW, Rodwell VW, Mayes PA. Bioquímica de Harper. 8ª Ed. Méjico: El manual moderno S A, 1982
 - (24) Marks John. Las Vitaminas. Madrid: Productos Roche S.A, 1968
-

- (25) Arribas Jimeno Siro. Análisis Cualitativo inorgánico. 2ª Ed. Oviedo: Autor, 1978
- (26) Nuevo manual de la Unesco para la enseñanza de las Ciencias. Barcelona: Edhasa, 1978
- (27) Cotton FA., Wilkinson G. Química Inorgánica básica. Méjico: Ed. Limusa, 1978
- (28) Nuffield Foundation. Química, colección de experimentos. Barcelona: Reverté S A, 1982

8.2.- Bibliografía General

Adler O, Adler R. Über das Verhalten gewisser organischer Verbindungen gegenüber Blut mit besonderer Berücksichtigung des Nachweises von Blut. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 1904; 41: 59-67

Aznar B. El pelo y la sangre como indicios del delito. Madrid: Escuela de Medicina Legal, 1950

Balthazard V. Manual de Medicina Legal. 4ª Ed. Barcelona: Salvat Editores S.A., 1933

Balthazard V. Manual de Medicina Legal. 6ª Ed. Barcelona: Salvat Editores S.A., 1947

Basile A, Waisman D. Fundamentos de Medicina Legal. Buenos Aires: El Ateneo, 1989

Bonnet EFP. Medicina Legal. Buenos Aires: López Libreros Ed, 1967

Castellanos I. La sangre en Policiología. La Habana: Carasa y Cº, 1940

- Chiodi V, Gilli R, Puccini C, Portigliatti-Bardos M, Fallani M, De Bernardi A. Manuale di Medicina Legale. Milán: Casa Editrice Dr. Francesco Vallardi, 1976
- Clément JL. La mise en evidence des taches de sang par la microphotometrie 1983; 26(5): 549-53
- Derobert L, Hausser G. La pratique Médico-Légale. París: Doin ed, 1938
- Derobert L. Médecine Légale. París: Flammarion Médecina-Sciences, 1974
- Dervieux F, Leclercq J. Le diagnostic des taches en Médecine Légale. París: J B Bailliére ed, 1912
- Documenta Geigy. Tablas Científicas. 7ª Ed. Barcelona: Geigy, 1975
- Fisher BAJ. Techniques of crime scene investigation. Nueva York: Elsevier, 1992
- Garner DD, Cano KM, Peimer RS, Yeshion TE. An Evaluation of Tetremethylbenzidine as a presumptive test of blood. Journal of Forensic Sciences 1976 Oct; 21: 816-21
- Gee DJ. Lecture notes on Forensic Medicine. 2ª Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975
- Gisbert Calabuig JA. Medicina Legal y Práctica Forense. Valencia: Saber, 1957
- Gisbert Calabuig JA. Medicina Legal y Toxicología. 3ª Ed. Valencia: Saber, 1985
- Glaister J. Medical Jurisprudence and Toxicology. 8ª Ed. Edimburgo: Livingstone LTD, 1945
- Gonzales T, Vance M, Helpern M, Umberger C. Legal Medicine Pathology and Toxicology. 2ª Ed. Nueva York: Appleton-Century-Crofts Inc, 1954
- Gonzales TA, Vance M, Helpern M, Umberger CJ. Legal Medicine, Pathology and Toxicology. 2ª Ed. Nueva York: Appleton-Century-Crofts, 1954
- Graham Solomons TW. Química Orgánica. Méjico: Limusa, 1981
-

- Higaki RS, Philp MS. A study of the sensitivity, stability and specificity of phenolphthalein as an indicator test for blood. *Cna. Soc. Forensic Sciences Journal* 1976; 9(3): 97-102
- Jimenez A, Cervera P, Bacardi M. *Tabla de composición de alimentos*. Barcelona, 1994
- Jones DA. Blood samples: Probability of discrimination. *Journal of the Forensic Science Society* 1972 April; 12: 355-9
- Kirk PL. *Crime Investigation*. 2ª Ed. Nueva York: J. Wiley, 1974
- Knight B. *Medicina Forense de Simpson*. Méjico: El Manual Moderno S. A., 1994
- Knight B. *Simpson's Forensic Medicine*. 3ª Ed. Londres: Edward Arnold, 1991
- Knight B. *Simpson's Forensic Medicine*. 11ª Ed. Londres: Edward Arnold, 1997
- Lacassagne A, Martin E. *Précis de Médecine Légale*. París: Masson, 1921
- Lacassagne A. *Compendio de Medicina Legal*. Barcelona: Herederos de Juan Gili, 1912
- Locard E. *Manual de Técnica Policiaca*. 2ª Ed. Baelona: José Montesó editor, 1943
- Lópes C. *Guía de Perícias Médico-Legais*. 3ª Ed. Lopes C(mirar)
- López Gómez L, Gisbert Calabuig J A. *Tratado de Medicina Legal*. 3ª Ed. Valencia: Saber, 1970
- López Gómez L. *Técnica Médico-Legal. Criminalística*. Valencia: Saber, 1953
- Lundquist F. *Methods of Forensic Science*. Nueva York: Interscience, 1962
- March J. *Advanced Organic Chemistry*. 3ª Ed. Nueva York: Wiley-Interscience
- Martín E. *Précis de Médecine Légale*. 2ª Ed. Parás: G. Doin & Cie Ed., 1938
-

- Medinger P. Contribution au diagnostic des traces minimas de sang. Revue Internationale de Criminalistique. 1931; 7
- Mosinger M, Rochette J, Fourcade J. Médecine Légale pratique. Marsella: Maupetit ed, 1937
- Muller P. Recherches médico-legales de laboratoire. Journal de Médecine Légale Droit Medical 1982; 25(6): 632-3
- National Research Council. International Critical Tables of numerical data, Physics, Chemistry and Technology. Nueva York: McGraw- Hill Book Company Inc, 1929
- Owen GW, Smalldon MS. Blood and semen stains on outer clothing and shoes not related to crime: Report of a survey using Presumptive Tests. Journal of Forensic Sciences 1975 April; 20(2): 391-403
- Palmieri VM. Medicina Forense. 4ª Ed. Nápoles: Macri, 1947
- Pellegrini B, Loro A. Compendio di Medicina Legale. 2ª Ed. Pádova: Cedam, 1940
- Pellegrini B, Loro A. Compendio di Medicina Legale. 3ª Ed. Pádova: Cedam, 1947
- Pellegrini R. Medicina Legal. Madrid: Benzal, 1950
- Rojas N. Medicina Legal. 2ª Ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1942
- Saferstein R. Criminalistics. 5ª Ed. New Jersey: Prentice-Hall Inc, 1995
- Sienko MJ, Kane RA. Química. 7ª Ed. Madrid: Aguilar S A, 1967
- Teke Schlicht A. Medicina Legal. Santiago de Chile: Mediterraneo, 1993
- Vasilieva ZG, Granóvskaia AA, Táperova AA. Trabajos de laboratorio de Química General e Inorgánica. Moscú: Mir, 1989
- Vibert Ch. Manual de Medicina Legal y Toxicología. 9ª Ed. Madrid: Espasa Calpe S.A.
-

Whitehead PH, King LA, Werrett DJ. New information from bloodstains.
Naturwissenschaften 1979 September; 66(9): 446-51

Windholz M, Budavari S, Stroumtsos LY, Fertig MN. The Merck Index. 9^a Ed.
Rahway, 1976

Nº 488 del Registro de Facultades

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, y acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de:

D. ANA CASTELLÓ PONCE

la calificación de Apto con laude "maiusculis"

Valencia, a 25 de ABRIL de 1977

El Secretario,

El Presidente



[Handwritten signature]

[Handwritten signature]