



QUIMIOLUMINISCENCIA PARA DETERMINAR LA PRESENCIA ORIENTATIVA DE MANCHAS DE FLUIDOS: UNA REVISIÓN NARRATIVA

CHEMILUMINESCENCE TO DETERMINE THE ORIENTATIONAL PRESENCE OF FLUID STAINS: A NARRATIVE REVIEW

Lady Fernanda Arias Garófalo¹, Francisco Javier Ustáriz Fajardo²

{lady.arias@unach.edu.ec¹, francisco.ustariz@unach.edu.ec²}

Fecha de recepción: 01/05/2025 / Fecha de aceptación: 21/05/2025 / Fecha de publicación: 15/06/2025

RESUMEN: La quimioluminiscencia se ha establecido como una técnica analítica de alta sensibilidad, basada en la emisión de luz visible generada por reacciones químicas catalizadas. Su aplicación ha revolucionado múltiples campos, desde el médico, alimenticio hasta el ambiental. En la investigación forense, esta técnica se destaca por detectar trazas de analitos de fluidos biológicos y analizar su presencia en escenas del crimen, ofreciendo resultados rápidos, económicos con eficiencia y calidad, consolidándola como una herramienta esencial en la labor investigativa forense. Razones por las cuales, resulta importante recopilar información sobre los avances y las aplicaciones de la quimioluminiscencia para determinar la presencia orientativa de manchas de fluidos en la investigación forense. La investigación es de diseño documental con alcance exploratorio descriptivo y retrospectivo, a partir de artículos científicos relacionados con las aplicaciones y avances de las pruebas de quimioluminiscencia para determinar la presencia orientativa de manchas de fluidos en la investigación forense. La investigación permitió la identificación de las técnicas quimioluminiscentes y su destacado aporte en el análisis orientativo efectivo de fluidos en el campo de la investigación forense. Por tanto, La quimioluminiscencia ofrece alta sensibilidad y bajo costo en la detección in situ de fluidos biológicos mediante la emisión de luz catalizada, siendo fundamental en el rastreo forense. Reactivos como Luminol y Bluestar revelan evidencias invisibles al ojo humano, aunque pueden producir falsos positivos y requerir confirmación con métodos adicionales.

Palabras clave: quimioluminiscencia, luminol, bluestar, hematología forense, fluidos biológicos, sangre

ABSTRACT: Chemiluminescence has established itself as a highly sensitive analytical technique based on the emission of visible light generated by catalyzed chemical reactions. Its application has revolutionized multiple fields, from medical, food to environmental. In forensic investigation, this technique stands out for detecting traces of analytes from biological fluids and analyzing their presence at crime scenes, offering fast, economical results with efficiency and quality, consolidating it as an essential tool in forensic

¹ Universidad Nacional de Chimborazo, <https://orcid.org/0009-0004-7560-7445>.

² Universidad Nacional de Chimborazo, <https://orcid.org/0000-0002-6423-9067>.



investigative work. For these reasons, it is important to gather information on the advances and applications of chemiluminescence to determine the indicative presence of fluid stains in forensic investigation. Reasons why it is important to gather information on the advances and applications of chemiluminescence to determine the orientative presence of fluid stains in forensic investigation. The research is of documentary design with a descriptive and retrospective exploratory scope, based on scientific articles related to the applications and advances of chemiluminescence tests to determine the orientative presence of fluid stains in forensic investigation. The research allowed the identification of chemiluminescent techniques and their outstanding contribution in the effective orientative analysis of fluids in the field of forensic investigation. Therefore, chemiluminescence offers high sensitivity and low cost in the in situ detection of biological fluids through the emission of catalyzed light, being fundamental in forensic tracing. Reagents such as Luminol and Bluestar reveal evidence invisible to the human eye, although they may produce false positives and require confirmation by additional methods.

Keywords: chemiluminescence; Luminol; Bluestar; forensic hematology; biological fluids; blood

INTRODUCCIÓN

La luminiscencia consiste en la emisión de fotones que se producen cuando los electrones de una molécula o átomo, previamente excitados, cuando recobran al estado fundamental. Este fenómeno se debe a que, al recibir energía externa, independientemente del tipo, los electrones adquieren energía y pasan a un estado excitado, lo que conlleva un cambio de orbital. La molécula o el átomo busca su estado más estable, por lo que el electrón vuelve al estado fundamental emitiendo luz (1). Este fenómeno, ha sido estudiado ampliamente en los últimos años, lo que ha permitido observar un aumento en el número de nuevas luciferasas, luciferinas y herramientas relacionadas disponibles para la obtención de imágenes de bioluminiscencia (2). Muchas se desarrollaron utilizando métodos clásicos de diseño e ingeniería de sondas ópticas. Los avances recientes más destacados en el descubrimiento y desarrollo de herramientas bioluminiscentes, incluyen aplicaciones en células, tejidos y organismos. Estas herramientas están mejorando las capacidades de obtención de imágenes in vivo e impulsando nuevas líneas de investigación (2). Las sondas bioluminiscentes y quimioluminiscentes se utilizan ampliamente en aplicaciones de imagenología no invasiva debido a su alta sensibilidad y la simplicidad del equipo necesario para realizar la medición 3). En la actualidad, se disponen de sondas sintéticas análogas a la luciferina con un rendimiento de imagenología in vivo superior al obtenido con la luciferina. Además, las sondas bioluminogénicas basadas en luciferina enjaulada se han convertido en una herramienta general para la visualización de diferentes enzimas y analitos in vivo (3).

El fenómeno inicia en el instante en que un agente activador aporta energía y esta es absorbida por la molécula o átomo, lo que produce una transición electrónica desde el estado fundamental (S_0) a un estado excitado (S_1), para luego sufrir una conversión interna rápida



hacia el estado excitado más bajo (S_1). Por tanto, en función del orbital al que acceda el electrón, se dan estados excitados diferentes.

En la fluorescencia, el electrón pasará desde el estado S_1 al S_0 para disipar la energía, emitiendo un fotón con una longitud de onda más larga y energía más corta (4). En este proceso, la absorción de la energía se produce a la vez que la emisión de la luz. El tiempo de duración de la fluorescencia es de 10^{-8} segundos. Desde un punto de vista físico, para que la luminiscencia tenga lugar es necesario que el sólido en cuestión (molécula o átomo) haya absorbido energía (que no necesariamente ha de ser energía de radiación) y que puede ser de varios tipos (4) como se observa en la (Tabla1).

Tabla 1. Tipos de fluorescencia producidos por moléculas o átomos según origen de la energía absorbida

| <i>Tipo de fluorescencia</i> | <i>Origen de la energía de activación</i> |
|---|---|
| <i>Fotoluminiscencia</i> | <i>Electromagnético</i> |
| <i>Electroluminiscencia</i> | <i>Corrientes eléctrica.</i> |
| <i>Catodoluminiscencia</i> | <i>Haz de electrones acelerados</i> |
| <i>Luminiscencia ópticamente estimulada</i> | <i>Luz visible o infrarroja.</i> |
| <i>Radioluminiscencia</i> | <i>Irradiación con rayos α, β o γ.</i> |
| <i>Triboluminiscencia</i> | <i>Energía mecánica</i> |
| <i>Sonoluminiscencia</i> | <i>Ondas sonoras</i> |
| <i>Termoluminiscencia</i> | <i>Temperatura inferior a la de incandescencia</i> |
| <i>Ionoluminiscencia</i> | <i>Impacto de iones en el material</i> |
| <i>Quimiluminiscencia</i> | <i>Reacciones químicas</i> |

Nota. Basado en (1).

La quimioluminiscencia consiste en la emisión de luz visible resultante de reacciones químicas, donde los reactivos, son oxidados por agentes químicos que producen fotones de luz. Sin embargo, esta oxidación no es espontánea pues requiere de la participación de un catalizador(5). A partir de finales de los años setenta la quimioluminiscencia se ha desarrollado como técnica analítica con innumerables ventajas, ya que es, una técnica de alta sensibilidad de detección. Su aplicabilidad abarca el campo de la química y la biología, y los métodos derivados son consideradas potentes herramientas para la detección in vitro e in vivo de una amplia gama de analitos (6).



En las últimas décadas se han desarrollado sistemas automatizados para realizar diferentes determinaciones analíticas; con lo cual, básicamente se pretende abaratar costos, con eficiencia y calidad de resultados (7). La quimioluminiscencia y los tipos de pruebas basadas en este principio resultan cruciales para procesos que engloban diagnósticos médicos, control de calidad de alimentos y aguas de consumo, control de contaminación ambiental o técnicas de investigación forense (8). Con base en los antes mencionado, este estudio de revisión bibliográfica tiene como objetivo establecer las aplicaciones de la quimioluminiscencia para determinar la presencia orientativa de manchas de fluidos en la investigación forense.

METODOLOGÍA

El presente trabajo de investigación es tipo documental, retrospectivo y descriptivo, fundamentado metodológicamente en la búsqueda de literatura en cinco (05) bases de datos en línea: ResearchGate, PubMed, Scielo, Dialnet, Latindex según los ítems propuestos por *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (9), que incluyen la identificación, selección e inclusión de la literatura consultada con la finalidad de obtener datos científicos relevantes sobre aplicaciones de la quimioluminiscencia para determinar la presencia orientativa de manchas de fluidos.

En el estudio se incluyó artículos y material en español, inglés y portugués del periodo comprendido entre 2015-2025 seleccionados mediante términos de búsqueda o descriptores; sin embargo, se incluyeron artículos y material bibliográfico de años previos por su aporte teórico fundamental para el desarrollo de la temática en estudio. Los descriptores utilizados fueron: luminiscencia, quimioluminiscencia, investigación forense, quimioluminiscencia y investigación forense, aplicación de la quimioluminiscencia en investigación forense, compuestos químicos luminiscentes en investigación forense, compuestos químicos quimioluminiscentes en investigación forense, quimioluminiscencia en la determinación de manchas de fluidos en investigación forense, quimioluminiscencia en la determinación de sangre en investigación forense.

Los artículos se seleccionaron teniendo bajo los siguientes criterios de inclusión: estudios sobre la aplicación de técnicas de quimioluminiscencia para determinar la presencia orientativa de manchas de fluidos de diversa naturaleza. En la revisión se identificaron un total de 46 artículos científicos los cuales se evaluaron por a través de la lectura de los títulos y resúmenes. Luego se procedió a descartar los artículos duplicados o que no cumplieran con los requerimientos establecidos. Se seleccionaron 32 artículos los cuales fueron sometidos a revisión de texto completo. Basados en los criterios de inclusión y exclusión, se incluyeron finalmente los 24 artículos científicos. Los resultados la revisión, análisis y síntesis se exponen en diferentes secciones que incluyen: los avances y las aplicaciones de la quimioluminiscencia para determinar la presencia orientativa de manchas de fluidos en la investigación forense.

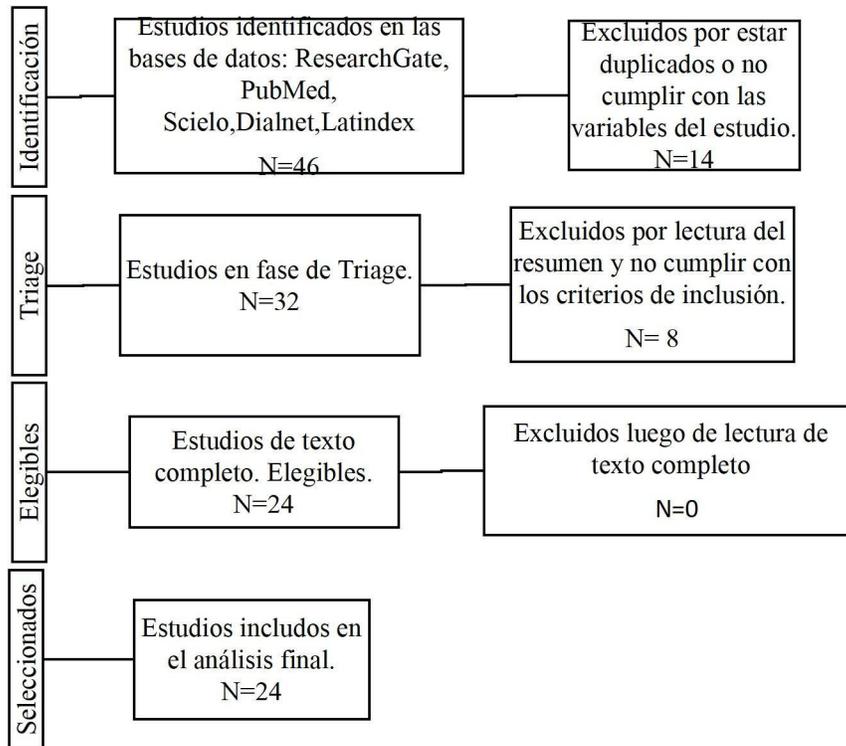


Figura 1. Diagrama de flujo PRISMA del proceso de selección

Fuente: (9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Quimioluminiscencia

Aun cuando, se han publicado muchos reportes sobre la historia de la medicina legal o forense no hay muchas evidencias sobre la evolución del análisis de fluidos biológicos, especialmente la sangre en un contexto forense y médico legal. Los primeros reportes que se tienen sobre el análisis de sangre se remontan a 1250 A.C. en el libro Hsi Yuan Lu o “Tratado para los forenses”, el cual fue compilado en China. En este documento se menciona la posibilidad de detectar una mancha de sangre vieja depositada sobre un cuchillo al calentar la mancha y tratarla con vinagre, observándose una mancha marrón como resultado de la formación de cristales de hematina por la reacción de la hemoglobina presente en la sangre con el ácido acético del vinagre. Aunque estos métodos no se considerarían confiables bajo los estándares actuales, constituyen los primeros antecedentes de pruebas para el estudio de fluidos biológicos, especialmente la sangre, y están basados en los mismos fenómenos que se emplean en la actualidad en algunas pruebas presuntivas o confirmatorias de sangre (10).

La quimioluminiscencia como método de lectura que se basa en el principio de emisión luminosa a través de una reacción (Enzima-Sustrato). Los laboratorios de investigación que han desarrollado los ensayos de quimioluminiscencia han permitido demostrar la excelente



evaluación con los ensayos de referencia, como el radioinmunoanálisis, destacándose la precisión, baja reactividad cruzada, gran sensibilidad analítica incluso con diez veces más sensibilidad que la mayoría de los ensayos disponibles (7).

Por otra parte, los ensayos de quimioluminiscencia, además de gran especificidad también se caracteriza por su sensibilidad; ya que, se puede determinar una reacción antígeno-anticuerpo del orden de los picogramos y con un mínimo de desnaturalización. Recientemente, se han desarrollado sistemas automatizados para realizar diferentes determinaciones analíticas; con lo cual, básicamente se pretende abaratar costos, con eficiencia y calidad de resultados. Igualmente, el uso de Inmunoensayos basados en la emisión de luz asociada con la energía (Quimioluminiscencia), es una tecnología con importantes ventajas, donde su ejecución no requiere del marcaje con isótopos radioactivos (7).

La perspectiva es disponer de tecnología de vanguardia, que utiliza determinaciones inmunológicas más sencillas, con la ecuanimidad en la determinación y que admite realizar diferentes determinaciones en casi todas las áreas del Laboratorio Clínico tales como: Endocrinología, Inmunología, Virología, Epidemiología, Hematología, Bioquímica Clínica, etc., (7).

Igualmente, se han el desarrollo de sistemas de quimioluminiscencia y equipos analíticos avanzados con alta resolución como tubo fotomultiplicador y dispositivo de carga acoplada (CCD), tecnología de imágenes de quimioluminiscencia se ha vuelto atractiva en aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. La alta sensibilidad y alta resolución de estos dispositivos hace que la aplicación de imágenes de quimioluminiscencia sea más amplia. Es fácil medir señales de fotones en microarreglos para lograr análisis simultáneos de sustancias multicomponentes, en el que las cantidades de las muestras se reducen considerablemente (6).

Hasta ahora, la tecnología de imágenes de quimioluminiscencia se ha aplicado para detectar una amplia gama de analitos en el campo del análisis bioquímico, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, pequeñas moléculas biológicas e incluso células (6). Recientemente, se han llevado al desarrollo de sondas quimioluminiscentes de alta eficiencia y gran luminosidad en condiciones fisiológicas. La quimioluminiscencia está a punto de alcanzar su potencial como una valiosa herramienta para la imagenología en sistemas vivos (3). Las reacciones químicas que emiten luz (quimioluminiscencia) y las reacciones biológicas tienen un diverso rango de aplicaciones, pero muchas no han sido adoptadas para la rutina de los laboratorios clínicos (7).

Las ventajas de la quimioluminiscencia en los ensayos incluyen a parte de excelente sensibilidad (límites de detección de moles, nanogramos, picogramos), velocidad (señal generada en unos pocos segundos y en algunos casos estable por varias horas), sin residuos peligrosos, y procedimientos simples. En estos casos, la mayoría de las aplicaciones son en inmunoensayos, marcaje de proteínas, ensayos en moléculas de ADN. Las moléculas quimioluminiscentes investigadas marcadas incluyen el luminol, isoluminol, ésteres de acridina, tioésteres y sulfaminas, y ésteres de fenantreno (7).



Quimioluminiscencia en Hematología Forense

Entre los indicios biológicos que pueden hallarse se encuentran distintos fluidos corporales como la sangre, el semen, la saliva, la orina y el vómito, además de restos óseos como huesos, dientes, osamentas, así como otros materiales biológicos, incluyendo tejidos y órganos. La disciplina de la Ciencia Forense que se ocupa del análisis de estos fluidos y componentes biológicos es la Hematología y la Serología Forense. Esta área permite abordar interrogantes como: ¿Se trata de un fluido biológico de interés forense?; ¿Es de origen humano?; ¿Cómo se depositó el fluido en el lugar de investigación o escena del crimen?; todas ellas esenciales para decidir si deben aplicarse métodos más avanzados dirigidos a resolver la pregunta fundamental: ¿A quién pertenece dicho fluido biológico? Cada uno de estos cuestionamientos puede resolverse mediante diferentes pruebas y análisis, como las pruebas presuntivas, que permiten estimar la probabilidad de que una muestra corresponda a un fluido biológico de interés forense, y las pruebas confirmatorias, que verifican dicha correspondencia (10).

La hematología forense se considera como aquella aplicación de los conocimientos hematológicos, biológicos, médicos y criminalísticos al campo forense, fundamentado en el estudio de la morfología, serología y bioquímica de la sangre; así como sus requisitos legales en la colecta, preservación y análisis de las evidencias. Por lo cual, dentro del contexto forense sus dos grandes líneas de investigación son: 1) aspecto rector según la morfología de las manchas de naturaleza hemática y 2) aspecto identificador en el terreno policial, penal y civil; en este último campo con el apoyo de la genética resuelve problemas principalmente en los casos de identificación humana, filiación y paternidad (11).

La hematología de reconstrucción consiste en el estudio de las manchas hemáticas, permiten deducir la dinámica o violencia que haya presidido a su formación o depósito. Es decir, si las manchas se formaron por mecanismos de proyección, escurrimiento, contacto, impregnación o limpieza. Por ejemplo, una mancha alargada significa que la sangre cayó en ángulo, indicando mediante su cola la dirección de formación (ascendente, descendente, de izquierda a derecha o viceversas). El estudio se puede realizar en el sitio del suceso, en la morgue sobre el cuerpo humano sin vida o en el laboratorio criminalístico. Como resultado, se establecen como se han producido los hechos: posible arma empleada, ubicación de la víctima y victimario, movimientos realizados, volumen, patrones y morfologías, número y vínculo de las manchas con un sitio del suceso, entre otros aspectos de interés criminalísticos (11).

Por otra parte, la hematología de identificación, se lleva a cabo en el laboratorio biológico para el análisis mediante procedimientos metodológicos efectivos de la inmunología, bioquímica y física, determinando la naturaleza de la mancha (humana o animal), a través de, métodos de orientación y certeza (10). En las ciencias forenses, el análisis de patrones de manchas de sangre puede contribuir de múltiples maneras al esclarecimiento de estos casos. Igualmente, a través de la hematología forense, se puede detectar el sistema de clasificación (ABO / Rh), realizar el análisis genético, para la obtención de un perfil de ADN de los sospechosos y las víctimas, además de, descifrar el sitio de origen, dónde se ha cometido el crimen, la cantidad de fuerza requerida en las punciones y el número de los mismos (12).

La sangre es un componente del tejido conjuntivo y desempeña diversas funciones esenciales para la supervivencia, como el intercambio de gases, la protección frente a agentes infecciosos y la distribución de nutrientes en el organismo. Está compuesta por una fase líquida, conocida como plasma, y una fracción sólida integrada por los elementos formes: glóbulos rojos o eritrocitos, glóbulos blancos y plaquetas o trombocitos. Dentro del ámbito forense, una de las moléculas más significativas para la identificación de sangre es el grupo hemo (figura 1), que constituye el grupo prostético de la proteína hemoglobina, encargada del transporte de oxígeno y dióxido de carbono (10).

Estructuralmente, el grupo hemo está compuesto por un átomo de hierro y un anillo orgánico heterocíclico de gran tamaño denominado porfirina, es decir un tetrapirrol cíclico en el que los 4 anillos de pirrol están unidos por enlaces metileno (=CH-) y en el centro de este anillo se encuentra el átomo de hierro (II), (13).

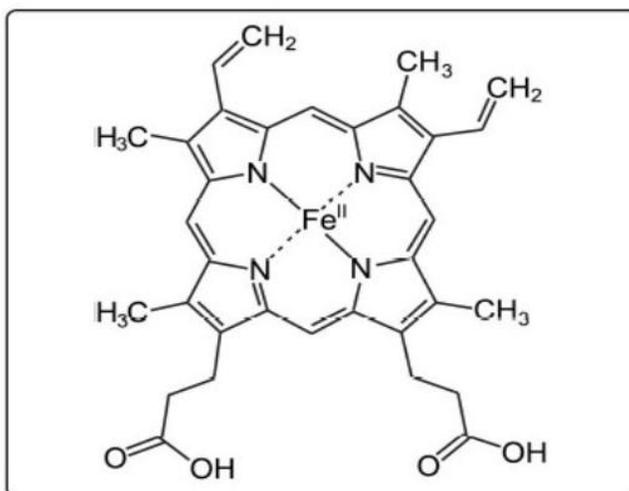


Figura 2. Estructura del grupo hemo, se puede observar cuatro anillos pirrólicos y átomo de hierro ferroso al centro

Fuente: (13).

Quimioluminiscencia – Hematología forense de identificación

Pruebas de orientación

El examen de los indicios recolectados constituye el fundamento de la investigación forense, ya que puede permitir la identificación del presunto autor del delito, proporcionar elementos probatorios sobre la ocurrencia del hecho y facilitar la reconstrucción de los acontecimientos. Todo ello con el objetivo de emplear el indicio como medio de prueba en audiencia, y así alcanzar una conclusión objetiva y verificable respecto a los hechos que son objeto de imputación (10).

Las pruebas de orientación o presuntivas permiten obtener una guía, que encamina la investigación en un mismo sentido, ya que solo presume y orienta la existencia probable de un elemento o una sustancia. Aunque cuando, estas pruebas pueden llegar a ser muy sensibles,



son poco específicas. En ocasiones, las muestras pueden estar muy diluidas, pero, aun así, a partir de ellas se pueden obtener resultados positivos, ya que, permiten su utilización en análisis posteriores (11). Sin embargo, son pocas específicas porque además de la sangre hay otras sustancias capaces de reaccionar con estos reactivos, dando como resultado un falso positivo. Es decir, aquel resultado teóricamente confirmatorio de un proceso o suceso obtenido tras la correcta aplicación de una técnica de laboratorio, pero erróneo debido a contaminantes, enmascaramiento o existencia de productos que despistan (11).

Las pruebas de orientación o presuntivas se dividen en dos categorías principales: pruebas luminosas (quimioluminiscentes y fluorescentes) y pruebas coloridas, según el modo en que se percibe o detecta el resultado positivo. Dentro de las coloridas se incluyen la prueba de Adler, que emplea Bencidina como indicador y agente donador de electrones, y la prueba de Kastle-Mayer, basada en el uso de fenolftaleína. Desde hace unas tres décadas, el fenómeno de la luminiscencia ha sido incorporado como una subdisciplina de la espectrometría aplicada en el campo de la química analítica. La quimioluminiscencia se define como la emisión de luz resultante de la liberación de energía por una sustancia que se encuentra en un estado electrónicamente excitado. La hemoglobina, en su forma oxigenada (oxihemoglobina), presenta bandas de absorción en el espectro visible (575 y 540 nm), asociadas a los compuestos porfirínicos, cercanas a la región del ultravioleta (UV), (10).

Para detectar vestigios de sangre, semen o saliva en estado líquido o seco, bien sea en el sitio, como en cadáveres, vestimentas, incluso en personas asociadas con el hecho que se investiga, los peritos realizan el rastreo de fluidos biológicos, con la técnica denominada búsqueda con luz forense. Esta técnica utiliza luz ultravioleta que permite detectar manchas fluorescentes y se fundamenta en que algunos fluidos biológicos, como el semen y la sangre poseen fluorescencia intrínseca. No obstante, la fluorescencia intrínseca depende de la antigüedad de la muestra, y de la concentración de la misma. Es por ello, que se emplean reactivos como el Luminol y el Bluestar[®], que al oxidarse, exhiben quimioluminiscencia, por lo que, son utilizados en las pruebas luminosas (10).

La prueba de luminol es una de las técnicas bioquímicas forenses más utilizadas en la investigación forense para detectar trazas de sangre en una escena del crimen (14). El Luminol ($C_8H_7N_3O_2$) es un derivado del ácido ftálico, sólido a temperatura ambiente, de color amarillo pálido, soluble en la mayoría de solventes orgánicos y ligeramente soluble en agua. Es una molécula sencilla sin centros asimétricos, que se prepara comercialmente a partir del ácido 3-nitroftálico mediante la condensación de este ácido con hidracina (N_2H_4). La reducción del grupo nitro a la amina primaria correspondiente permite la síntesis del Luminol (figura 3), (15).

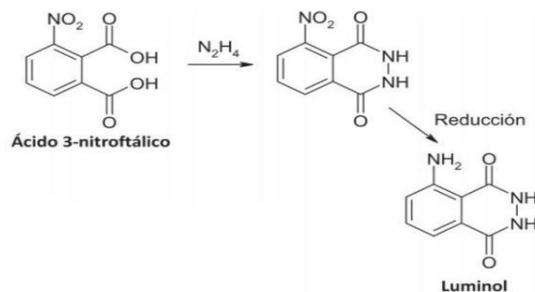


Figura 2. Síntesis de Luminol a partir del ácido 3-nitroftálico

Fuente: (15).

Inicialmente, el luminol no tenía uso en Medicina Forense, de hecho, la aplicación directa de este no produce la luminiscencia. Para que la luminiscencia ocurra, es necesario la excitación del Luminol y esto sucede cuando se prepara una solución acuosa del luminol junto con un agente oxidante, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y un hidróxido que proporcione un medio básico. Cuando se encuentran presentes determinadas sustancias, la oxidación del luminol se produce de forma lenta a través de una serie de reacciones; sin embargo, este proceso se acelera significativamente en presencia de hierro (Fe). En este contexto, el hierro contenido en la sangre funciona como catalizador de la reacción (16).

Durante la oxidación, el luminol atraviesa un estado intermedio inestable con un nivel de energía superior al luminol no excitado, lo que da lugar a la emisión de quimioluminiscencia en forma de luz visible de tonalidad azul (17,18). En el caso específico de la sangre, el hierro presente en la molécula de hemoglobina acelera la reacción, lo que provoca que la emisión luminosa ocurra casi de manera instantánea al entrar en contacto con dicha sustancia (16).

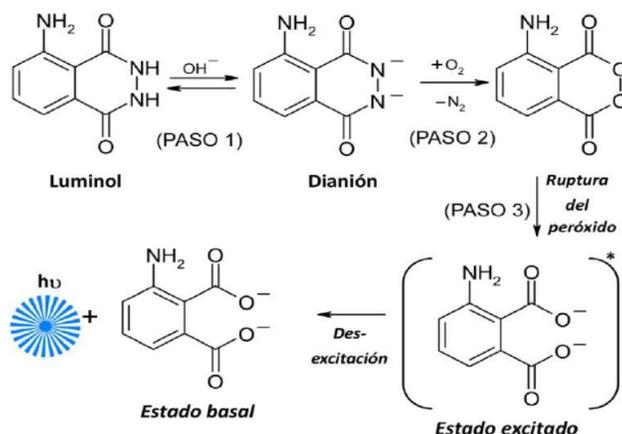


Figura 4. Mecanismo propuesto para la quimioluminiscencia del luminol

Fuente: (15).



La aplicación del reactivo (luminol) en el área a examinar, no produce *per se* luminiscencia, para que esto ocurra es necesario oxidar al Luminol añadiendo durante la preparación del reactivo de trabajo un agente oxidante, específicamente agua oxigenada (H_2O_2) en un medio básico. La actividad peroxidasa del grupo hemo de la hemoglobina cataliza la oxidación del Luminol concomitante a la reducción del H_2O_2 a agua (10).

El Luminol presenta una serie de ventajas y desventajas ya que permite analizar pequeñas trazas de sangre, incluso si estas no son fáciles de visualizar. Si la sangre es seca y degradada, el Luminol reacciona frente a esta en forma más intensa y duradera que con la sangre fresca y se ha demostrado que puede extraerse ADN de muestras tratadas con Luminol sin interferencias. Finalmente, si la luminiscencia desaparece, puede volver a reproducirse añadiendo una nueva disolución de luminol-peróxido de hidrógeno (16).

El principal inconveniente del Luminol es su efecto destructivo sobre las muestras, especialmente cuando se aplica ácido clorhídrico al 2% para desnaturalizar la hemoglobina y mejorar la reacción, lo cual debe hacerse solo tras recoger otras evidencias. Requiere oscuridad total para su observación y puede generar falsos positivos ante la presencia de cobre, compuestos que lo contengan o blanqueadores como la lejía, provocando una luminiscencia uniforme que puede ocultar restos reales de sangre (10,16).

Otro falso positivo puede producirse por productos alimenticios derivados del rábano o por partículas de humos residuales (humo de tabaco). El Luminol puede detectar pequeñas cantidades de sangre encontradas en la orina, por lo que el resultado podría verse distorsionado. También reacciona con la materia fecal, causando el mismo brillo que produce la sangre. A pesar de que puede dar lugar a falsos positivos, es posible concluir que el Luminol tiene una gran importancia en el área criminalística, ya que es una de las herramientas principales para la resolución de casos en los que aparecen sangre, además de ser un método de fácil obtención y preparación (16).

Sin embargo, una de las principales ventajas de las pruebas presuntivas luminosas radica en la implementación de instrumentación básica y sencilla, esencialmente una lámpara luz en la región de ultravioleta. El procedimiento implica rociar el reactivo (Luminol o Bluestar®) sobre la superficie que se desea evaluar y posteriormente se enfoca la lámpara UV procurando que el espacio se encuentre en total oscuridad para poder apreciar la luminiscencia (10). No obstante, las ventajas y desventajas del Luminol como ensayo orientativo se realiza en el lugar del hecho, para identificar la presencia de manchas hemáticas; ya que solo se puede valorar un resultado negativo como fehaciente; no así, el resultado positivo (14).

En el año 2000, Loic Blum, Ph.D., descubrió una nueva fórmula a base de Luminol que posteriormente fue llamado Bluestar Forensic. La sensibilidad de Bluestar Forensic, según su es de hasta 1:10,000; pero según estudios en diferentes soportes inertes realizados por la misma empresa demuestra una sensibilidad es de hasta 1: 1,000,000. No es tóxico, gracias a la ausencia del perborato de sodio. Bluestar tiene una luminiscencia más fuerte y duradera que no requiere oscuridad absoluta para ser visible y con un pH reacción de 11,5 no altera el ADN y permite análisis subsecuentes de ADN y serología forense de rutina (19).



La reacción de quimioluminiscencia Bluestar ocurre cuando la urea (base nitrogenada) y una sustancia fuertemente alcalina como el peróxido de hidrogeno, en presencia de agentes oxido reductores como el hierro de la sangre, peroxidasa y/o catalasas, hacen que se libere oxígeno del álcali más agua libera el nitrógeno de la urea, por ser estos muy inestables (N_2) formando fotones que se puede observar en la oscuridad mediante la emisión de luz azul brillante. Cuando no existe agentes oxido reductores en esta reacción, no se produce la emisión de luz azul brillante. En otras palabras, una mezcla de Bluestar Forensic + un agente oxidante + un medio alcalino en contacto con los agentes oxido reductores, peroxidasa y/o catalasas emiten luz azul brillante (20).

Sin embargo, en el estudio realizado para la determinación del efecto del sustrato sobre las pruebas de orientación (Bluestar Forensic y Luminol) en la detección de restos hemáticos, en el Laboratorio de Biología Forense del Departamento De Criminalística (DEPCRI); utilizando como muestra sangre humana diluida con agua desionizada estéril en concentraciones de (1/500, 1/10.000, 1/25.000, 1/1.000 000, 1/500 000), la muestra se colocó en soportes de madera barnizada, monedas de latón, monedas de alpaca, vidrio, loza cerámica y telas naturales de algodón para conocer su reacción y su comportamiento en los diferentes sustratos (20).

Los resultados obtenidos en este estudio, referentes a la sensibilidad y especificidad, muestran datos estadísticos basados en tablas de contingencia como herramienta de análisis, estos resultados se tabularon en las casillas: (a) positivos, (b) Falsos positivos, (c) Falsos negativos y (d) negativos, datos con los cuales se calculó la sensibilidad, especificidad e índice de Kappa para las dos pruebas; además, del tiempo de duración de la quimioluminiscencia producida desde el momento de agregado los reactivos hasta la finalización de la misma(21).

La evaluación de la intensidad se categorizo en; 4+ (alta), 3+ (mediano), 2+ (baja), 1+ (muy baja) y - (negativo) según fueron observadas. Con base a los resultados obtenidos se pudo concluir que las técnicas de Bluestar Forensic y Luminol poseen diferencias altamente significativas influenciadas por el tipo de sustrato y concentración de la muestra, que interfieren con la intensidad, sensibilidad, especificidad, así como también, el tiempo de luminiscencia, siendo el Luminol la prueba de orientación más sensible y con una luminiscencia más prolongada que el Bluestar (21).

Por otra parte, en el estudio realizado por Sarrini (2020), se plantea una interrogante clave: ¿un resultado negativo en la prueba con Luminol puede considerarse verdaderamente concluyente? Esta cuestión pone en duda la fiabilidad absoluta de la técnica, sugiriendo la necesidad de una interpretación cuidadosa de los resultados obtenidos. Por lo cual, se procedió a estudiar si existe algún tipo de pintura que pueda ocultar la presencia de sangre de la reacción del Luminol, independientemente de si la muestra ha sido o no limpiada. Para ello, se procedió a tomar muestras de sangre y aplicarlas en una pared blanca. Se dividió la superficie en dos columnas identificadas como A y B, y filas 1, 2, 3 y 4, reservando la fila 5 como muestra testigo. A continuación, se procedió a limpiar la columna A y dejar las muestras de la columna B con sus manchas de sangre tipo proyección.



Por último, se aplicaron 4 (cuatro) tipos de pinturas diferentes en cada fila. Luego de un tiempo de espera para el secado de la pintura, se realiza la prueba de luminol. Los resultados obtenidos, permitieron afirmar la hipótesis de investigación planteada Sarrini (2020); es decir, hay pinturas que pueden alterar el resultado de la prueba del Luminol; produciendo un falso negativo (20).

Las características físicas y los resultados de diferentes técnicas aplicadas para identificar manchas de sangre no autorizan responder con certeza si una mancha está constituida por sangre, ya que las reacciones químicas son reacciones de posibilidad, probabilidad u orientación; por esta razón se deben complementar los resultados con técnicas cristalográficas cuyas especificidades complementan la sensibilidad de pruebas de orientación obteniéndose resultados de mayor confiabilidad. Ejemplos: La prueba Confirmativa de Takayama es una técnica de cristalización basada en la existencia de cierto derivado de la hemoglobina que tiene la tendencia de cristalizar en hemocromógeno (21).

El reactivo de cristalización se compone de una base nitrogenada, generalmente la piridina, de un agente hematinizante, el hidróxido de sodio y un agente reductor la glucosa que, al colocarse en contacto con la mancha de sangre a analizar, presenta en el microscopio cristales de forma arborescente como las hojas de un pino de color naranja. La decisión final sobre el resultado de esta prueba se debe hacer por comparación de la sustancia desconocida con una sustancia de referencia o control bajo las mismas condiciones de temperatura, humedad y ambiente (21).

El análisis de identificación de sangre en manchas secas utilizando el método cristalográfico de Teichmann como soporte a las pruebas colorimétricas de orientación en la labor pericial de los laboratorios de Biología Forenses del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses; debido a su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, límite de detección, índice de concordancia e índice de Kappa según las distintas condiciones de temperatura, soporte y medio en el cual se encuentren(22).

Determinación del grupo sanguíneo A, B, AB, O, y su factor Rh (+ o -) certeza que es de origen hemático, perteneciente a la especie humana [10]. Finalmente, la Genética Forense es el área del conocimiento que se ocupa de la utilización del conocimiento científico, técnicas de genética y biología molecular, para coadyuvar a la justicia en la resolución de casos entre civiles y delitos contra las personas. Actualmente, la identificación humana a través del ADN forense es aceptada en procesos legales alrededor del mundo, permitiendo localizar personas, vivas o muertas, a partir de diversas muestras biológicas colectadas para investigaciones de laboratorio (23,24).

CONCLUSIONES

El análisis de indicios es esencial en la investigación forense, ya que permite establecer la verdad de los hechos y la responsabilidad penal mediante evidencias objetivas. En este ámbito, la quimioluminiscencia se consolida como una herramienta altamente eficaz para la presencia orientativa de manchas de fluidos por su sensibilidad, bajo costo y facilidad de uso en el lugar del crimen. Su aplicación, especialmente a través de reactivos como el Luminol y Bluestar®, ha



revolucionado la detección de fluidos biológicos, como la sangre, incluso en condiciones desfavorables.

Aunque, la quimioluminiscencia presenta limitaciones como la posibilidad de falsos positivos y la alteración de muestras, su integración con métodos confirmatorios asegura la fiabilidad del proceso investigativo. Así, que esta técnica fortalece tanto la reconstrucción de los hechos como la preservación de la cadena de custodia, consolidándose como un recurso técnico y científico de gran valor en la criminalística moderna.

Declaración de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses en relación con el presente artículo.

Contribuciones de los autores

Los autores contribuyeron mancomunadamente en cada una de las fases del proceso de elaboración del presente artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Correcher V, García-Guinea J. Técnicas Luminiscentes. En: María Isabel Rucandio Sáez, Virgilio Correcher, Editores. Curso: Análisis químico mediante técnicas espectroscópicas moleculares. Madrid: Editorial: EDITORIAL CIEMAT; 2015.5-34.
https://www.researchgate.net/publication/284837661_Tecnicas_Luminiscentes#fullTextFileContent
2. Yao Z, Zhang BS, Prescher JA. Advances in bioluminescence imaging: new probes from old recipes. *Curr Opin Chem Biol.* 2018 Aug;45: 148-156. DOI:10.1016/j.cbpa.2018.05.009.
3. Hananya N, Shabat D. A Glowing Trajectory between Bio- and Chemiluminescence: From Luciferin-Based Probes to Triggerable Dioxetanes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2017 Dec 22;56(52):16454-16463. doi: 10.1002/anie.201706969.
4. Feng G, Zhang GQ, Ding D. Design of superior phototheranostic agents guided by Jablonski diagrams. *Chem Soc Rev.* 2020; 49(22): 8179-8234. DOI:10.1039/D0CS00671H
5. Analuisa K, Arregui- Almeida D, Guzmán-Cárdenas K, Parra D. Quimioluminiscencia: ¿la sangre humana como catalizador?. *infoANALÍTICA.* 2021;9(1):190-19. https://www.researchgate.net/publication/349607521_quimioluminiscencia_la_sangre_humana_como_catalizador/citations#fullTextFileContent
6. Yan Y, Shi P, Song W, Bi S. Chemiluminescence and Bioluminescence Imaging for Biosensing and Therapy: In Vitro and In Vivo Perspectives. *Theranostics.* 2019; 9(14): 4047- 4065. DOI: 10.7150/thno.33228.



7. García Rodríguez C, Martínez Maldonado I. Ventajas del método de quimioluminiscencia frente al de radioinmunoanálisis (RIA). *Vis scienti*. [online]. 2009;1(2):60-68. http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2222-43612009000100010&lng=en&nrm=iso
8. Márquez Noriego B, Hernanz Vila María, Jara Palacios, MJ. Aplicaciones de la quimioluminiscencia [Grado en Óptica y Optometría] Sevilla: Universidad de Sevilla;2022. <https://hdl.handle.net/11441/143481>
9. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Moher D. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *Systematic reviews*. 2021[Citado 2024 octubre 22]; 10(1): 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
10. Figueroa Martínez F, Martínez Romero V, Villavicencio Queijeiro A. Pruebas presuntivas y confirmatorias de sangre: enseñanza de la química en la hematología forense. *Educación Química*. 2022; 33 (Número especial Ciencias forenses): 85-95. <http://dx.doi.org/10.22201/fq.18708404e.2022.4.8353791>
11. Nuñez, J. Aporte de La Hematología Al Campo Forense: Pruebas de Orientación y Certeza. *Rev. Skopein* 2016, 4 (13), 32–40. <https://skopein.org/ojs/index.php/1/article/view/88>
12. Sniegovski, M.; Bortolato, J.; Formolo, F. Manchas de Sangre: El Análisis de Su Patrón En La Escena Del Crimen. *Rev. Skopein* 2016, 5 (14), 6–18. <https://skopein.org/ojs/index.php/1/article/view/94>
13. Villavicencio-Queijeiro A. La mitocondria como fábrica de cofactores: biosíntesis de grupo hemo, centros Fe-S y nucleótidos de flavina (FMN/FAD). *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*.2012; 15(2):116-132. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1405888X2012000200005&lng=en&nrm=iso
14. Quispe- Mayta S. Detección de manchas de sangre mediante la Prueba de Luminol en la investigación forense. *Revista Con-Ciencia*.2014; 1 (2):81-90. https://www.academia.edu/100858354/Detecci%C3%B3n_de_manchas_de_sangre_mediante_la_Prueba_de_Luminol_en_la_investigaci%C3%B3n_forense
15. Cedrón J C. El luminol. *Revista de Química*. 2011: 25(1-2): 13-14. <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/4606>
16. Bermúdez T A. Luminol, El Compuesto Químico que arroja luz sobre la escena del crimen. *Rev. Ciencias la Univ. Pablo Olavide* 2020, No. 36, 31–32. <https://www.upo.es/cms1/export/sites/upo/moleqla/documentos/Numero36/Numero-36.pdf>



17. Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*. 2007 May 15;72(3):896-913. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.12.045.
18. Hayashi S, Kakizaki E, Sonoda A, Shinkawa N, Shiragami T, Yukawa N. Acceleration effect of the forensic luminol reaction induced by visible light irradiation of whole human blood aqueous solutions. *Forensic Sci Int*. 2019 Jun; 299:208-214. DOI: 10.1016/j.forsciint.2019.04.007.
19. Mendoza Ramos D, Santos Lovaton J, Paredes Fernandez W. Efecto del sustrato sobre las pruebas de orientación quimioluminiscentes (Bluestar forensic y Luminol) en la detección de restos hemáticos. *Revista Postgrado Scientiarvm*. 2017;3(2): 59 - 65. DOI: 10.26696/sci.epg.0061
20. Sarrini R, Sánchez M. Sangre: Ocultamiento de evidencia con pintura y alteración de los resultados del Luminol [Tecnatura en Criminalística] Mar del Plata. Universidad FASTA;2023. http://redi.ufasta.edu.ar:8082/jspui/bitstream/123456789/2595/1/SarriniS%C3%A1nchez_TC_R_2023%20%281%29.pdf
21. Castillo Rodríguez N, Cortés-Osorio J. Validation of The Takayama Confirmatory Test for Blood Identification in Stains. *Scientia Et Technica*, 2019; 24(1): 140-145. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6888656>
22. Castillo N, Martínez S. TEICHMANN Prueba Confirmativa Para Identificación de Sangre En Manchas. *Sci. Tech*. 2020; 25 (1): 158–163. <https://doi.org/10.22517/23447214.22301>.
23. Silva G A. Importância Do Biomédico Na Biologia Molecular e Hematologia Forense. *Atas Ciências da Saúde*. 2020; 10 : 166–175. <https://revistaseletronicas.fmu.br/index.php/ACIS/article/view/2271/1639>
24. Villalobos, H. Las Pruebas de ADN en el contexto forense. *Ciencias Forenses de Honduras*. 2017; 3 (2): 28–38. <http://www.bvs.hn/RCFH/pdf/2017/pdf/RCFH3-2-2017-8.pdf>.