



# Detección de manchas de sangre mediante la Prueba de Luminol en la investigación forense

## *Luminol test to Blood samples detection in Forensic investigation*

QUISPE, SERGIO<sup>1</sup>  
FLORES, ANDRÉS<sup>2</sup>

FECHA DE RECEPCIÓN: 16 DE ABRIL DE 2014

FECHA DE ACEPTACIÓN 30 DE JULIO DE 2014

### Resumen

La investigación de manchas de sangre en la escena del crimen, se constituye en uno de los vestigios biológicos más importantes para esclarecer un hecho delictivo. Mediante la prueba de Luminol, se analizaron varios soportes con manchas de sangre sometidas a diversas condiciones de tiempo, ambiente, limpieza, diluciones y manchas antiguas para determinar su sensibilidad y eficacia en el Laboratorio de Biología Forense del Instituto de Investigaciones Forenses de La Paz. Las condiciones de tiempo y ambiente sobre los soportes con manchas de sangre no afectan a la prueba, en cambio varios lavados con detergentes químicos pueden afectar la detección de sangre. La sensibilidad del luminol alcanzó hasta una dilución 1:100.000. La prueba de luminol fue muy útil para la detección de manchas de sangre en investigación de diversos soportes sometidas a adversas condiciones.

### Abstract

Investigation blood stains at the scene of the crime have become an essential biological element when solving legal investigations. In our study we examined the Luminol test to establish their sensibility and efficiency with different degree of interference, different support, time, storage conditions and old stains in the Forensic Biology Laboratory from Forensic Investigations Institute, La Paz. In general terms the Luminol test was not affected in the different temperature, time and storage conditions we used. Samples which had been subject to washings with chemical detergents conditions could be affected the blood detection. The sensibility we found was high 1:100.000 dilution. Luminol test was fundamental to blood stains detection and their investigation about different difficult conditions.

1 Encargado Unidad de Identificación Genética. Carrera de Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, UMSA.

2 Director del Instituto de Investigaciones Forenses, Médico Forense. Ministerio Público de Bolivia

**PALABRAS CLAVE**

Luminol, Manchas de sangre,  
Quimioluminiscencia,  
Hemoglobina

**KEY WORDS**

Luminol, Blood stains,  
Chemiluminescence,  
Haemoglobin

## INTRODUCCIÓN

---

La sangre es uno de los fluidos biológicos más frecuentes e importantes como evidencia física en investigaciones de hechos violentos. Hallar manchas de sangre en una escena de crimen aporta información muy valiosa que puede ser decisiva en la resolución de un crimen. (Zweidinger, 1973, Shiro, 2002 y Neufeld, 1965).

Hoy en día la Prueba de Luminol y el *BLUESTAR FORENSIC* son las técnicas bioquímicas forenses más utilizadas en la investigación forense para detectar trazas de sangre en una escena del crimen. La *Quimioluminiscencia* de color azul del Luminol es catalizada por la Hemoglobina de la sangre. El reactivo Luminol (*5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione*) reacciona con la Hemoglobina de la sangre. Esta reacción es ampliamente utilizada en la investigación por la Comunidad Científica Forense como una prueba orientativa para la búsqueda de manchas de sangre. La emisión de luz es casi instantánea, cuando el Luminol es rociado sobre la sangre. El Luminol puede ser utilizado para detectar la presencia de sangre en cantidades tan bajas o diluidas como 1:106. Inclusive las manchas de sangre de una antigüedad mayor a seis años, pueden ser localizadas en superficies lavadas, en ambientes amplios y sobre diferentes soportes. La prueba de Luminol es una prueba preliminar previa a la determinación serológica y por ADN. (Shiro, 2002 y Neufeld, 1965).

En el presente estudio, se ha realizado la evaluación de la sensibilidad de la técnica de Luminol, la acción de factores ambientales como el tiempo, soporte, lavados, detergentes, para el estudio de manchas de sangre en casos de hechos violentos donde se deja como evidencia sangre. La comunidad científica forense, recomienda utilizar este método para realizar la detección de manchas de sangre en indicios de interés forense (Specht, 1937, Grodsky, Wright y Kirk, 1951 y Proescher, 1939).

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

### Muestras

Se analizó manchas de sangre sobre diferentes soportes absorbentes (tela de algodón, prendas, calzados, madera, cartón, papel) y soportes no absorbentes (madera tratada, vidrio, lavamanos, mosaico, pintura de auto, cuchillos, sierras), sometiéndose a diferentes intervalos de tiempo, se realizó diluciones de la sangre para evaluar la sensibilidad del método, utilizando sangre humana del Grupo ORh + con anticoagulante EDTA al 5%

## Preparación de Luminol

La técnica de luminol se la realizó según el método descrito por Weber et. al. (Grodsky, Wright y Kirk, 1951, Proescher, 1939 y Yeshion, 1991).

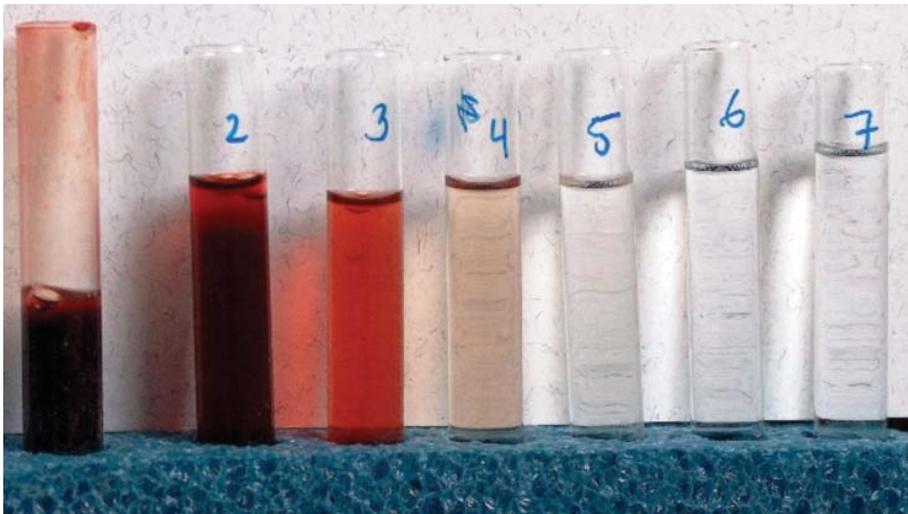
1. Pesar 8 g de Hidróxido de Sodio y disolverlo completamente en 0.5 L de agua deionizada. (Sol. I)
2. Medir 10 mL de Agua Oxigenada al 30%, añadir 0.49 L de agua deionizada. (Sol. II).
3. Pesar 0.354 g Luminol, disolverlo en 0.625 L de la Sol. I y enrasar a 0.5 L (Sol. III)
4. Conservarlos a 4°C, y proteger de la luz. (Solución de trabajo).
5. Prepare la Solución de Prueba mezclando 10 mL cada uno de las soluciones a 70 mL de agua deionizada para obtener 100 mL de solución de trabajo.
6. Llevar esta solución en un atomizador y está listo para usar.

## Prueba de Sensibilidad de Luminol

Se realizó una serie de diluciones de sangre humana con solución fisiológica. (Diluciones: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000, 1: 100.000). Las manchas fueron realizadas sobre diferentes soportes y analizadas en intervalos de tiempos de una semana, cuatro semanas, cuatro meses, utilizándose una esponja para realizar las manchas.

Foto 1

Serie de diluciones de una muestra de sangre (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000, 1: 100.000).



## Aplicación del luminol sobre los soportes

El reactivo Luminol fue preparado 12 horas antes de su aplicación, el rociado se realizó con un spray atomizador a una distancia de 50 cm del objetivo, las fotografías con la cámara en modo Fluorescente fueron tomadas entre los 15 segundos a 1 minuto en ambiente oscuro (Quickenden, 2001).

## RESULTADOS

La prueba de Luminol permitió localizar y detectar manchas de sangre en diversos soportes sometidos a diferentes condiciones, descritos en las siguientes tablas:

### 1. Prueba de los factores externos sobre Soporte Absorbente:

Tabla 1

Análisis de soportes absorbentes con la prueba de Luminol, sometida a diferentes intervalos de tiempo y condiciones de ambiente. (Elaboración propia)

TIEMPO	SOPORTE	SOPORTE ABSORBENTE	
		AMBIENTE CERRADO	AMBIENTE ABIERTO
UNA SEMANA	ALGODON	POSITIVO	POSITIVO
	ESPONJA	POSITIVO	POSITIVO
	MADERA	POSITIVO	POSITIVO
	CARTON	POSITIVO	POSITIVO
	PAPEL	POSITIVO	POSITIVO
	PARED	POSITIVO	POSITIVO
CUATRO SEMANAS	ALGODON	POSITIVO	POSITIVO
	ESPONJA	POSITIVO	POSITIVO
	MADERA	POSITIVO	POSITIVO
	CARTON	POSITIVO	POSITIVO
	PAPEL	POSITIVO	POSITIVO
	PARED	POSITIVO	<b>NEGATIVO</b>
CUATRO MESES	ALGODON	POSITIVO	POSITIVO
	ESPONJA	POSITIVO	POSITIVO
	MADERA	POSITIVO	<b>NEGATIVO</b>
	CARTON	POSITIVO	POSITIVO
	PAPEL	POSITIVO	POSITIVO
	PARED	POSITIVO	<b>NEGATIVO</b>

## 2. Prueba de los factores externos sobre soporte no absorbente:

Tabla 2

Análisis de soportes no absorbentes con la prueba de Luminol, sometida a diferentes tiempos y ambiente. (Elaboración propia)

TIEMPO	SOPORTE	SOPORTE NO ABSORBENTE	
		AMBIENTE CERRADO	AMBIENTE ABIERTO
UNA SEMANA	MOSAICO	POSITIVO	POSITIVO
	MADERA BARNIZADA	POSITIVO	POSITIVO
	CERAMICA	POSITIVO	POSITIVO
	LAVAMANO	POSITIVO	<b>NEGATIVO</b>
	VIDRIO	POSITIVO	POSITIVO
	PINTURA DE AUTO	POSITIVO	<b>NEGATIVO</b>
CUATRO SEMANAS	MOSAICO	POSITIVO	POSITIVO
	MADERA BARNIZADA	POSITIVO	POSITIVO
	CERAMICA	POSITIVO	POSITIVO
	LAVAMANO	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>
	VIDRIO	POSITIVO	POSITIVO
	PINTURA DE AUTO	POSITIVO	<b>NEGATIVO</b>
CUATRO MESES	MOSAICO	POSITIVO	POSITIVO
	MADERA BARNIZADA	POSITIVO	POSITIVO
	CERAMICA	POSITIVO	POSITIVO
	LAVAMANO	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>
	VIDRIO	POSITIVO	<b>NEGATIVO</b>
	PINTURA DE AUTO	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>

## 3. Prueba de la acción de agentes químicos y tratamiento de lavados:

Tabla 3

Análisis de soportes con manchas de sangre con la prueba de Luminol, sometidas a diferentes procedimientos de limpieza. (Elaboración propia)

CONDICION	SOPORTE	NUMERO DE LAVADOS				
		1	2	3	4	5
AGUA	ALGODON	+	+	+	+	+
	MADERA	+	+	+	-	-
	MOSAICO	+	+	+	-	-
DETERGENTE EN POLVO	ALGODON	+	+	-	-	-
	MADERA	+	-	-	-	-
	MOSAICO	+	-	-	-	-
JABON	ALGODON	+	+	-	-	-
	MADERA	+	+	-	-	-
	MOSAICO	+	-	-	-	-
LAVANDINA	ALGODON	+	+	-	-	-
	MADERA	+	-	-	-	-
	MOSAICO	+	-	-	-	-

#### 4. Prueba de la sensibilidad del Luminol mediante dilución de las muestras:

Tabla 4

Sensibilidad de la prueba de Luminol, en diferentes soportes. (+): prueba positiva; (-):prueba negativa. (Elaboración propia)

SOPORTE	DILUCION DE LA SANGRE				
	1:10	1:100	1:1000	1:10.000	1:100.000
ALGODON	+	+	+	+	+
MADERA	+	+	+	+	-
MOSAICO	+	+	+	-	-
CUERO	+	+	+	+	-
VIDRIO	+	+	+	-	-

#### Fotografías experimentales propias de los soportes analizados con Luminol.

La preparación forense del Luminol fue aplicado sobre diferentes muestras de cartón, prendas de algodón, madera y otros.

Foto 2

Izquierda: Muestra de papel carbónico con manchas de sangre con data de 6 años vista a luz natural. Derecha: Observación en ambiente oscuro la reacción de quimioluminiscencia luego de aplicar el Luminol

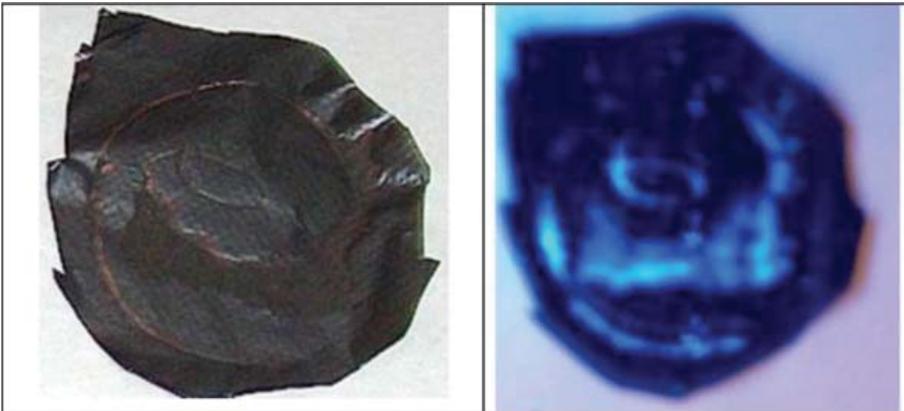


Foto 3

a) Calzado deportivo con manchas de sangre humana, luego de ser sometida a 3 lavados con detergente b) Calzado deportivo luego de la aplicación de la prueba de luminol en ambiente oscuro.



Foto 4

a) Sierra metálica con manchas de sangre humana, luego de ser expuesta a la intemperie por el lapso de 4 meses b) Sierra metálica luego de la aplicación de la prueba de luminol en ambiente oscuro.



Foto5

a) Combo metálico con manchas de sangre humana, procedimiento de colecta de la muestra para posterior estudio de pruebas confirmatorias y ADN.



## DISCUSION

---

La prueba de Luminol resulta una magnífica prueba forense presuntiva y orientativa en diversos soportes y condiciones ambientales (Ver anexo A).

La Prueba de los factores externos sobre **Soportes Absorbentes** como pared y madera bajo la exposición a la intemperie pueden dar resultados negativos al Luminol, probablemente por la acción de los factores externos sobre la muestra biológica.

Los resultados sobre los factores externos sobre **soportes no absorbentes** fueron negativas en objetos como el lavamanos, pintura de coches, vidrio, esto debido a que la muestra es más fácilmente eliminada o desprendida en aquellos soportes lisos por factores ambientales (la lluvia, el viento, el sol) o la acción de la utilización de estos objetos no absorbentes. Las manchas de sangre sobre los soportes no absorbentes como vidrio, mosaico, pintura de autos pierden más rápidamente su poder de reacción del Luminol a medida que transcurre el tiempo, a partir de las cuatro semanas y hasta el cuarto mes.

Las muestras que fueron tratadas con **detergentes químicos** deben ser interpretadas con cuidado. En soportes sometidos a lavados con agua el Luminol posee bastante sensibilidad. En cambio cuando fueron sometidas a varios lavados con detergentes químicos no tienen la misma sensibilidad. La acción del agua con la prueba del luminol persiste inclusive hasta 5 lavados, en cambio bajo la acción de detergentes en polvo o jabón todavía persiste hasta el segundo lavado. La acción de la lavandina o cloro resulto más eficaz para poder desprender las manchas de sangre.

La sensibilidad del luminol se mostró bastante buena hasta en diluciones de 1:100.000 cuando la mancha se produjo en soportes absorbentes (prendas, calzados de tela), en cambio en soportes de madera tratada (vinilo), cuero, vidrio se obtuvo una sensibilidad más baja 1:10.000.

## CONCLUSION

---

El Luminol permitió realizar la localización e identificación presuntiva de **manchas no visibles de sangre** en diversos soportes a partir de vestigios biológicos, mediante la observación de la reacción de Quimioluminiscencia del Luminol con la Hemoglobina de la sangre (figura 1).

La prueba de luminol es una técnica bioquímica forense muy útil y la mas apropiada para la detección de manchas de sangre, cuando se va a realizar el estudio de manchas de sangre escondidas a simple vista, manchas de data antigua dejadas en ambientes abiertos y cerrados, soportes sometidos a diferentes procedimientos de limpieza o lavado, manchas de sangre diluida, todas son útiles para el análisis forense.

## REFERENCIAS

- Zweidinger RA, Lytle LT, Pitt CG. (1973). Photography of bloodstains visualized by luminol. *J. Forens. Sci.*; 18: 296–303.
- Schiro G. (2002). Collection and preservation of blood evidence from crime scenes: <http://www.crime-scene-investigator.net/phoblood.html>.
- Neufeld HA, Conklin CJ, Towner RD. (1965). Chemiluminescence of luminol in the presence of hematin compounds. *Anal. Biochem.*; 12: 303–309.
- Specht W. (1937). The chemiluminescence of hemin as a means of finding and recognizing blood traces of forensic importance. *Angew. Chem.*; 50: 155–157.
- Grodsky M, Wright K, Kirk PL. (1951). Simplified preliminary blood testing: an improved technique and a comparative study of methods. *J. Crimin. Law, Criminol. Police Sci.*; 42: 95–104.
- Proescher F, Moody AM. Detection of blood by means of chemiluminescence. *J. Lab. Clin. (1939). Med.*; 24: 1183–1189.
- Yeshion TE. (1991). The forensic application of luminol as a presumptive blood test. *Proceedings of the 6th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence*, Stanley PE, Kricka LJ (eds). Wiley: Chichester; 379–384.
- Quickenden TI, Cooper PD. (2001). Increasing the specificity of the forensic luminol test. *Luminescence*; 16: 251–253.
- Quickenden TI, Creamer JI. (2001). A study of common interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence*; 16: 295–298.
- Creamer JI, Quickenden TI, Apanah MV, Kerr KA, Robertson PA. (2003). Comprehensive experimental study of industrial, domestic and environmental interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence*; 18: 193–198.
- Mouzos J. (2001). *Homicide in Australia 1999–2000*. Australian Institute of Criminology: Canberra.
- Information bulletin for forensic examiners—luminol enhancement. (1995). Western Australian Police Service: Perth.