

ESCUELA: CENS N° 74 Juan Vucetich

AÑO: 3ero.

TURNO: Nocturno

ÁREA CURRICULAR: Química Criminalística

TÍTULO DE LA PROPUESTA: Ensayos de Certeza para la identificación de presuntas manchas de sangre

CONTENIDO SELECCIONADO: Observación directa al microscopio y observación tras preparación. Formación de cristales de Teichman y Takayama. Cromatografía en placa delgada

Son ensayos específicos que certifican la existencia de sangre en la mancha. Verifican la presencia de **células sanguíneas** (eritrocitos y/o leucocitos) o la existencia de la proteína **hemoglobina**

Este tipo de ensayos se pueden clasificar en:

- ✓ MÉTODOS MICROSCÓPICOS
- ✓ MÉTODOS MICROCRISTALOGRAFÍCOS
- ✓ MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

### MÉTODOS MICROSCÓPICOS

*Tienen como fundamento el poner de manifiesto los elementos formes de la sangre, cuya presencia demuestra sin lugar a dudas la naturaleza sanguínea de la mancha.*

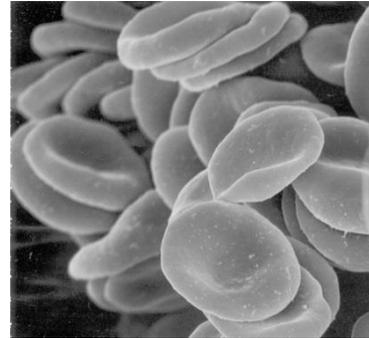
Presentan 2 ventajas:

- ✚ Si el examen de la muestra es directo, no modifica la prueba pericial
- ✚ Cuando el diagnóstico es positivo puede adelantar datos referentes a la especie

La investigación puede hacerse directamente sobre la muestra, otras veces requiere una preparación previa de los elementos formes para verlos.

### a- Investigación directa

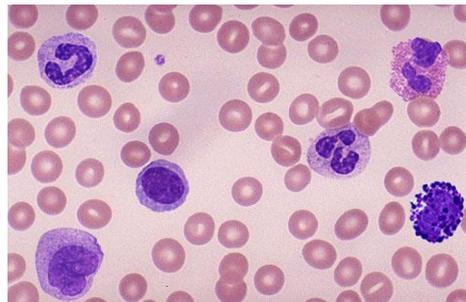
Se realiza con un microscopio especial (DISPOSITIVO ULTROPACK) en el que la iluminación del objeto se hace por reflexión (por incidencia de la luz: epimicroscopía), la microscopía tradicional utiliza luz por transparencia. Esto permite la visualización de los cuerpos opacos. *Los mejores resultados con este método se obtienen cuando la capa de sangre se encuentra en una superficie plana, formando una costra delgada (superficie no absorbente)*



Ej: arma blanca. Los **glóbulos se ven como pilas de monedas**, puede apreciarse si son nucleados o no, forma redondeada u oval, con lo cual podemos adelantar conclusiones en cuanto a especie.

### b- Investigación de los elementos formes tras preparación (aislar y teñir)

A menudo los elementos formes de la sangre se rompen en la mancha y se hace imposible su investigación directa. En estos casos, lo que da mejores resultados es regenerar la mancha mediante maceración con líquidos isotónicos o con suero sanguíneo del grupo AB. Una vez regenerados los hematíes y leucocitos pueden estudiarse, centrifugando suavemente y preparando un extendido con el sedimento (frotis).



Los colorantes que dan mejores resultados son: Hematoxilina- eosina, May Grunwald- Giemsa.

## MÉTODOS MICROCRISTALOGRAFICOS

Ciertos derivados de la hemoglobina tienen tendencia a cristalizar, como por ejemplo las sales halogenadas de la hematina y el hemocromógeno. Estos derivados forman microcristales solo visibles a la microscopía y se puede inducir su formación por acción de ciertos reactivos, como son:

### a- Cristales de Teichmann (Clorhidrato de hematina)

Técnica propuesta por el polaco Teichmann en 1853. Se observan **cristales de forma prismática, de color pardo oscuro**, utilizando ácido acético glacial con vestigios

de cloruro de sodio. Esta prueba da buenos resultados para manchas secas y antiguas y con muy pequeña cantidad de sangre.

Técnica: se debe partir de una costra de sangre. Si la mancha está en un tejido, se macera con agua hasta conseguir una solución coloreada. Después se procede a fabricar una costra: se calienta un portaobjeto a 60° durante 1 minuto sobre una platina o una tapa de baño maría y con una pipeta se coloca una gota de del extracto y se evapora hasta la sequedad. Si es necesario se evaporan más gotas hasta obtener una mancha visible de color pardo. Se coloca sobre la mancha un cubreobjeto y se adiciona por capilaridad unas gotas de Ácido acético glacial. La preparación se calienta a llama hasta que se inicie la ebullición del ácido, repitiendo la maniobra 2 o 3 veces.



*Cristales de Teichman*

#### **b- Cristales de Takayama (Hemocromógeno)**

Se forman *cristales de piridina-hemocromógeno de color rojo o rosado intenso con forma arborescente como hojas de un pino y suelen entrelazarse*. Esta técnica es más reciente que la anterior y es el de mayor uso por los laboratorios forenses, el reactivo consiste en una mezcla de piridina, solución saturada de glucosa y solución de hidróxido de sodio. La técnica es análoga a la anterior.

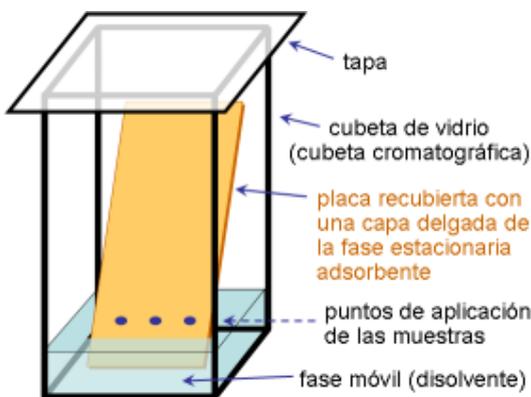


*Cristales de Takayama*

## MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Se basan en la obtención del mismo factor de retención ( $R_f$ ) característico para un extracto de la muestra y un testigo de sangre, sembrados sobre una placa delgada.

Técnica: Se disuelven las manchas con solución fisiológica. Se siembran 5 micro gotas de sangre testigo y de la muestra. Se coloca la placa en la cuba con el solvente (Metanol-ácido acético- agua 90:3:7). Luego del desarrollo del cromatograma se retira la placa y se seca con estufa a  $100^\circ$  por 5 min. Se rocía con el reactivo verde de malaquita y luego con agua oxigenada. Si es positiva aparecerá una mancha verde +o- intensa a la misma altura que la mancha testigo.



### ACTIVIDADES:

1) Lee atentamente el material aportado por las docentes y arma un glosario con las palabras que a continuación se detallan, considerando su significado en el texto.

- Epimicroscopia
- Cromatografía
- Frotis
- Cubreobjetos

2) Dada la siguiente fracción del texto:

### MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Se basan en la obtención del mismo **factor de retención ( $R_f$ )** característico para un **extracto de la muestra** y un **testigo de sangre**, sembrados sobre una placa delgada.

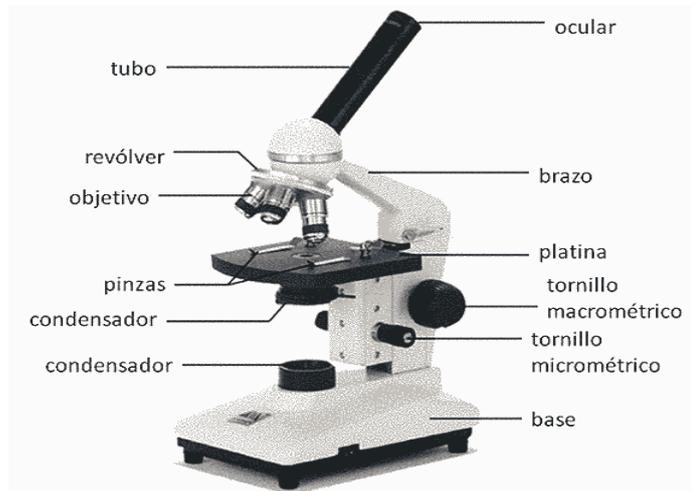
a) señala que significa:

- Factor de retención
- Extracto de muestra
- Testigo de sangre

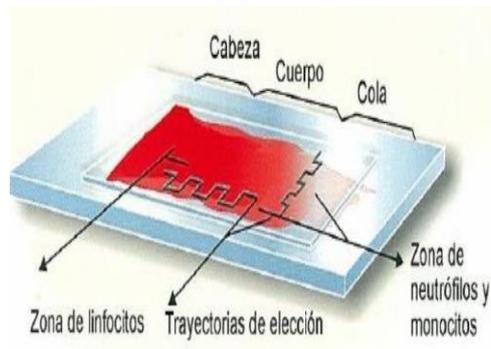
- Siembra sobre una placa delgada

3) Observa las siguientes imágenes, sus nombres y sus partes, las cuales, junto con la información aportada al principio, te ayudaran a completar la actividad n°4.

a) Microscopio:



b) Frotis o extendido de sangre y sus partes



c) Tinción con colorante May Grunwald- Giemsa.



4) Completa el siguiente cuadro:

<b>ENSAYOS DE CERTEZA</b>			
	<b><i>Métodos microscópicos</i></b>	<b><i>Métodos microcristalográficos</i></b>	<b><i>Método de cromatograficos</i></b>
¿Para qué lo uso?			
¿Qué técnicas utilizo?	a)          b)	a)          b)	
¿Qué material se usa?			
¿Qué reactivos son necesarios?			

Directivo a cargo: Ing. Gustavo Lucero