



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

mossos d'esquadra



TREBALL DE FINAL DE MÀSTER

Optimització de la fórmula del LumiUCIO

Celia Uroz Mas

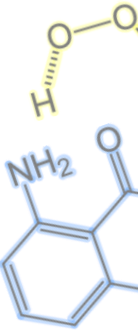
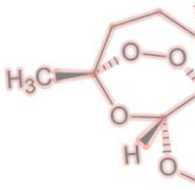
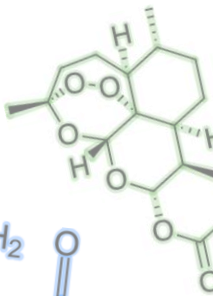
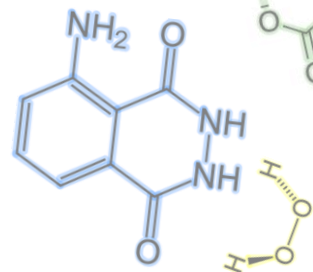
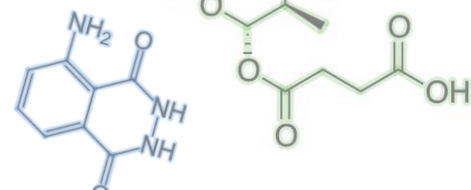
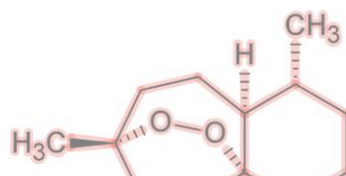
MÀSTER EN GENÈTICA, FÍSICA I QUÍMICA FORENSE

Tutors professionals: Ubaldo Fernández Alonso i Jose Manuel Mejuto Escudero

Tutor acadèmic: Josep Maria Serres Serres

Universitat Rovira i Virgili

Tarragona, Juny del 2023



Resum

Res s'esvaeix sense deixar rastre. Per aquest motiu, quan es produeix un delicta el cos de policia inicia una investigació criminal on és essencial trobar qualsevol tipus de prova per poder resoldre el cas. El fluid biològic més freqüentment trobat és la sang. Tot i així, en trobar una taca d'aspecte sospitos, un científic forense haurà d'identificar-ne la composició, usualment mitjançant proves d'orientació basades en una reacció química quimioluminescent. La prova del luminol és la tècnica bioquímica forense més utilitzada en la investigació forense i la detecció presumptiva de taques de sang. Tot i així, aquest presenta una sèrie d'inconvenients. Es valora que el luminol sigui un potencial destructor de l'ADN i les proteïnes de la sang. A més, per a que una reacció quimioluminiscent funcioni satisfactòriament és necessari un agent oxidant, usualment el peròxid d'hidrogen (H_2O_2). Avui dia es coneix que el H_2O_2 té un efecte nociu sobre l'ADN. També, un dels majors problemes associats a l'ús del luminol són els falsos positius i falsos negatius. Ara bé, alguns peròxids naturals com l'Artemisinina o l'Artesanat han demostrat tenir una elevada selectivitat contra interferències comunes del luminol. En aquest sentit, el present treball es centra en avaluar l'efecte del peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i el luminol, així com de l'Artemisinina i de l'Artesanat en la intensitat lumínica de la reacció i la degradació del ADN de la mostra. Així doncs, es va avaluar la intensitat quimioluminescent i la seva durada en front de diverses variants del reactiu LumiUCIO en mostres sanguínies. Els resultats obtinguts van demostrar que són més adequats els reactius amb menor concentració de peròxid d'hidrogen i luminol. A més, tant l'addició d'Artemisinina com d'Artesanat al reactiu LumiUCIO no va mostrar efectes potenciadors ni inhibidors en la reacció.

Paraules clau: Luminol, sang, reacció quimioluminiscent, LumiUCIO, Artemisinina, Artesanat.

Resumen

Nada se desvanece sin dejar rastro. Por este motivo, cuando se produce un delito el cuerpo de policía inicia una investigación criminal en la que es esencial encontrar cualquier tipo de prueba para poder resolver el caso. El fluido biológico más frecuentemente hallado es la sangre. Sin embargo, al encontrar una mancha de aspecto sospechoso, un científico forense deberá identificar su composición, usualmente mediante pruebas de orientación basadas en una reacción química quimioluminiscente. La prueba del luminol es la técnica bioquímica forense más utilizada en la investigación forense y la detección presuntiva de manchas de sangre. Sin embargo, éste presenta una serie de inconvenientes. Se valora que el luminol sea un potencial destructor del ADN y las proteínas de la sangre. Además, para que una reacción quimioluminiscente funcione satisfactoriamente es necesario un agente oxidante, usualmente el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Hoy en día se conoce que el H_2O_2 tiene un efecto nocivo sobre el ADN. También uno de los mayores problemas asociados al uso del luminol son los falsos positivos y falsos negativos. Ahora bien, algunos peróxidos naturales como la Artemisinina o el Artesanato han demostrado tener una elevada selectividad contra interferencias comunes del luminol. En este sentido, el presente trabajo se centra en evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el luminol, así como de la Artemisinina y del Artesanato en la intensidad lumínica de la reacción y la degradación del ADN de la muestra. Así pues, se evaluó la intensidad quimioluminiscente y su duración frente a diversas variantes del reactivo LumiUCIO en muestras sanguíneas. Los resultados obtenidos demostraron que son más adecuados los reactivos con menor concentración de peróxido de hidrogeno y luminol. Además, tanto la adición de Artemisinina como de Artesanato al reactivo LumiUCIO no mostró efectos potenciadores ni inhibidores en la reacción.

Palabras clave: Luminol, sangre, reacción quimioluminiscente, LumiUCIO, Artemisinina, Artesanato.

Abstract

Nothing disappears without a trace. For this reason, when a crime occurs, the police force initiates a criminal investigation where it is essential to find any type of evidence in order to solve the case. The most frequently encountered biological fluid is blood. Even so, when finding a suspicious-looking stain, a forensic scientist will have to identify its composition, usually through targeting tests based on a chemiluminescent chemical reaction. The luminol test is the most widely used forensic biochemical technique in forensic investigation and presumptive detection of bloodstains. Even so, it presents a series of drawbacks. It is estimated that luminol has a destructive potential for DNA and blood proteins. In addition, for a chemiluminescent reaction to work adequately, an oxidizing agent is necessary, usually hydrogen peroxide (H_2O_2). Today it is known that H_2O_2 has a destructive effect on DNA. Also, one of the biggest problems associated with the use of luminol are false positives and false negatives. However, some natural peroxides such as Artemisinin or Artesunate have shown to have a high selectivity against common luminol interferences. In this sense, the present work focuses on evaluating the effect of hydrogen peroxide (H_2O_2) and luminol, as well as Artemisinin and Artesunate on the light intensity of the reaction and sample DNA degradation. Therefore, the chemiluminescent intensity and its duration were evaluated against several variants of the LumiUCIO reagent in blood samples. The results obtained showed that the reagents with a lower concentration of hydrogen peroxide and luminol are more suitable. In addition, both the addition of Artemisinin and Artesunate to the LumiUCIO reagent did not show potentiating or inhibitory effects on the reaction.

Key words: Luminol, blood, quimioluminiscent reaction, LumiUCIO, Artemisinin, Artesunate.

Índex

1. Introducció	6
1.1. La sang.....	7
1.2. Detecció de taques de sang	9
1.2.1. Reacció quimioluminescent	10
1.3. Luminol.....	11
1.3.1. LumiUCIO.....	13
1.3.2. Artemisinina.....	14
1.3.3. Artesanat	14
2. Hipòtesi i objectius del treball.....	15
3. Materials i mètodes.....	16
3.1. Disseny de l'estudi.....	16
3.1.1. Preparació de mostres de sang	16
3.1.2. Preparació de reactius.....	17
3.1.3. Optimització de la fórmula del reactiu LumiUCIO.....	17
3.1.4. Optimització de la fórmula del reactiu basat en Artemisinina	17
3.1.5. Optimització de la fórmula del reactiu basat en Artesanat.....	17
3.2. Mesura de la intensitat i la durada de la quimioluminescència	18
3.3. Avaluació del grau de degradació de l'ADN	18
3.4. Anàlisi estadístic	19
4. Resultats i discussió	20
4.1. Resultats previs	20
4.2. Mesura de la intensitat i la durada de la quimioluminescència	20
4.2.1. Reactiu LumiUCIO.....	20
4.2.2. Reactiu LumiUCIO amb Artemisinina.....	23
4.2.3. Reactiu LumiUCIO amb Artesanat.....	24
4.3. Avaluació del grau de degradació de l'ADN.....	25
4.4. Resum dels resultats	27
5. Conclusions	28
6. Agraïments	29
7. Bibliografia.....	30
8. Annexos	32
8.1. Annex 1: Preparació de reactius	32
8.2. Annex 2: Gràfiques complementàries	32
8.3. Annex 3: Taules de dades de la quantificació d'ADN.....	34

1. Introducció

Quan es produeix un delictu, ja sigui un crim, una agressió sexual o qualsevol altre fet delictiu, el cos de policia inicia una investigació criminal. És altament probable que en aquelles il·legalitats on s'ha presentat violència, s'hagi deixat material biològic degut a l'atac ja que res s'esvaeix sense deixar rastre. Per aquesta raó, els investigadors tenen com a objectiu buscar aquestes evidències en analitzar l'escena.^{1,2}

Durant la investigació criminal es recol·lectaran, s'analitzaran i s'avaluaran les evidències trobades per poder resoldre el crim. Una de les parts més importants d'una investigació criminal és la recopilació de la evidència. De fet, els primers minuts del processament de l'escena del crim poden ser els moments més crítics ja que en cap altre període, els investigadors estaran més a prop del moment en que es va cometre el crim. L'autor dels fets pot haver deixat indicis visibles o invisibles, així que s'assegura l'escena del crim per evitar qualsevol alteració com destruir proves o crear-ne de noves.¹ Els investigadors forenses han d'utilitzar múltiples tècniques i proves per recopilar la major quantitat d'evidències i poder analitzar-les de manera exhaustiva per ajudar a resoldre el cas.³ És important assenyalar que cada cas és únic i que els tipus de proves presents en l'escena poden variar depenent de la naturalesa del crim. Aquestes proves poden presentar-se desde fluids biològics fins a empremtes dactilars, petjades, fibres, traces, armes, d'entre altres.¹ Totes les proves s'acostumen a trobar en una gran varietat de superfícies i en petites quantitats, degradades o contaminades per l'ambient. És possible que diversos fluids hagin quedat barrejats com sang amb algunes substàncies pròpies de les superfícies on estava.^{4,5}

L'anàlisi de fluids biològics en una escena del crim és una part crítica de la investigació forense, ja que aquests fluids poden proporcionar informació valuosa que es pot utilitzar per identificar el perpetrador del crim.⁶ Els tipus de fluids biològics que poden ser trobats en una escena del crim inclouen sang, semen, fluids vaginals, saliva, orina, pèls, llàgrimes i suor. Tot i així, majoritàriament, la sang acostuma a ser el component més comú. A més, també és crucial ja que pot aportar informació molt valuosa i decisiva per a la resolució del crim.^{1,4}

1.1. La sang

La sang és un dels fluids biològics més freqüentment trobats i rellevants com a evidència física en el món de la justícia penal actual.^{4,6,7} A més, la sang té la capacitat d'aportar una gran quantitat d'informació molt valuosa que pot ser decisiva en la resolució del crim⁴ i resoldre les circumstàncies que envolten en la perpetració del delictes.¹ En la pràctica penal i judicial, la sang pot donar informació sobre l'escenari del crim, determinar el nombre de persones implicades en els fets, el temps que fa que s'ha produït i, fins i tot, qui són les persones implicades. Això és així ja que és possible extreure el material genètic de les mostres a partir del seu anàlisi en el laboratori.^{3,7} Les restes de sang també poden ser un factor de control important per avaluar la credibilitat i la veracitat de les declaracions dels participants de l'esdeveniment.¹

La sang és l'únic teixit del cos humà que es troba en estat líquid i representa entre el 7 i el 8% del pes corporal total.⁶ Conté tots els elements necessaris pel suport de les cèl·lules i tot l'organisme de l'individu. Està constituïda en un 45% de cèl·lules i un 55% de plasma sanguini.^{6,8} Més específicament, la composició principal de la sang és la següent (Figura 2):

- Eritròcits o glòbuls vermells

Els glòbuls vermells (RBC) són la cèl·lula més abundant de la sang, representant entre el 40 i el 45% del seu volum. Tenen forma de disc bicòncav amb un centre aplanat i no tenen nucli i, per tant, no contenen ADN.^{3,6,8}

El component principal dels eritròcits és la proteïna hemoglobina (Figura 1), la qual és la responsable del color vermell d'aquests i, al seu torn, de la sang. L'hemoglobina (Hb) dels mamífers és una hemoproteïna tetramèrica formada per quatre porcions de proteïnes, anomenades globines, cadascuna de les quals inclou un grup hemo prostètic. Les quatre subunitats hemo tenen unides un àtom de ferro que pot unir una molècula d'oxigen. Això permet el transport d'oxigen dels pulmons a la resta del cos i el retorn del diòxid de carboni per la seva exhalació.^{1,3,8,9}

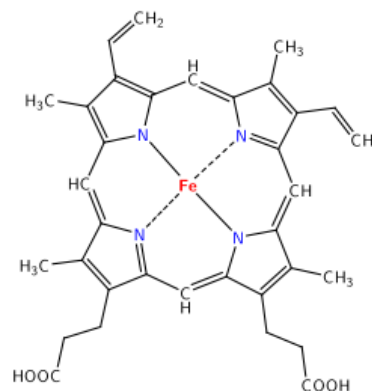


Figura 1. Estructura química de l'hemoglobina (Hb).

Com a hemoproteïna, l'hemoglobina (Hb), en presència d'equivalents oxidants com el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), pot actuar com a peroxidasa amb un potencial oxidant molt alt. En els glòbuls vermells, aquesta activitat està estrictament regulada per l'entorn reductor i la manca de substàncies oxidants.¹⁰

- Leucòcits o glòbuls blancs

Els leucòcits són molt menys nombrosos que els anteriors, representant aproximadament l'1% del volum sanguini. La seva principal funció és la defensa de l'organisme i la contribució en el sistema immunitari. Hi ha diferents tipus de glòbuls blancs, d'entre ells, els neutròfils que són els més comuns i, els limfòcits T i B, encarregats de regular la funció d'altres cèl·lules immunitàries i, de produir anticossos, respectivament. A més, tenint en compte que els eritròcits no tenen nucli, l'ADN de les mostres de sang s'extreu d'aquestes cèl·lules.^{3,6,8}

- Plaquetes

A diferència de les cèl·lules comentades anteriorment, les plaquetes no són en realitat cèl·lules, sinó petits fragments de cèl·lules. Les plaquetes ajuden al procés de coagulació de la sang reunint-se al lloc d'una lesió, adherint-se al revestiment del vas sanguini lesionat i formant una plataforma per formar un coàgul de fibrina.^{3,6,8}

- Plasma sanguini

El plasma és el component líquid de la sang on estan contingudes les cèl·lules anteriorment comentades. Està format per una barreja d'aigua, sucre, greixos, proteïnes i sals. A més, absorbeix calor i transporta substàncies com nutrients, electròlits (sodi, potassi, calci, clorur de magnesi, bicarbonat,...), productes de rebuig, anticossos, proteïnes de coagulació, missatgers químics com hormones i proteïnes plasmàtiques (albúmina, fibrinogen i globulina).^{3,6,8}

Com s'ha anomenat anteriorment, la detecció de sang en escenes del crim és un punt clau per molts motius. Tot i així, hi ha vegades que les taques de sang són latents i no es veuen a simple vista, per la qual cosa es necessiten sistemes de detecció per a localitzar les mostres de sang i procedir a la seva correcta recollida.

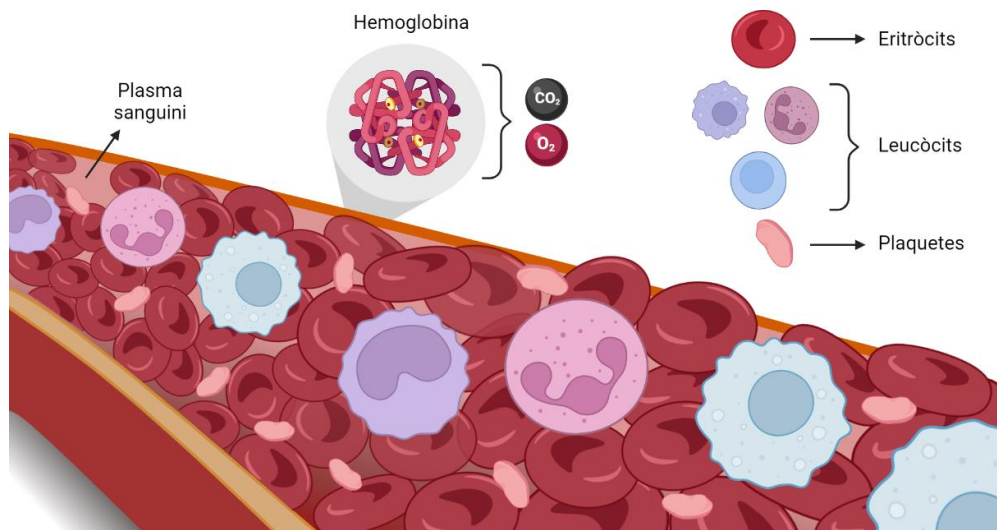


Figura 2. Esquema de la composició de la sang. Adaptat de *Hematology Glossary* ⁸.

1.2. Detecció de taques de sang

Tothom pot reconèixer una taca de sang. Les taques fresques són vermelles i les més antigues són de color marró vermellós però no totes les taques que tenen aquests colors son sang. Alguns líquids com la pintura, l'aigua rovellada, el colorant alimentari, algunes sales i el quètxup, poden semblar sang. Per aquest motiu, en trobar una taca d'aspecte sospitosa en l'escena del crim, un científic forense haurà de identificar-ne la composició.¹ Això es possible gràcies a la realització de proves, que poden ser de dos tipus: confirmatòries o orientatives.

- Confirmatòries

La prova confirmatòria aplicada en la detecció de sang és l'OBTI®. Aquest es basa en un test immunocromatogràfic que detecta el grup hemo i permet obtenir resultats en uns 2-5 minuts. Degut a que la quantitat de mostra present en l'escena del crim és inferior a la que es necessitaria per fer el test, normalment no s'arriba a utilitzar. Aquesta prova té falsos positius i falsos negatius. En el primer cas, la sang de mustela o de goril·la reaccionen positivament al test. Tot i així, com aquests animals no son molt comuns, si la prova dona positiva és molt probable que sigui sang humana. En el segon cas, tenim la sang degradada.¹¹

- Orientatives o presumptives

El luminol, el verd de leucomalaquita, la fenolftaleïna, el Hemastix®, el Hemident™, el Bluestar i el Lumiscene s'utilitzen com a proves presumptes de sang.⁷ Gairebé totes es basen en un procés químic anomenat oxidació –

reducció.¹ Per norma general, els atributs que hauria de tenir una prova ideal de presumpció de sang serien: alta sensibilitat, especificitat per la sang humana, ràpida, senzilla, segura i, que no danyi l'ADN subjacent per a que es pugui obtenir un perfil complet després de l'ús del reactiu. A més, que també tingui un emmagatzematge i transport fàcil i, una llarga vida útil.⁷

Per altra banda, per a que aquestes proves presumptes de sang funcionin correctament, han de detectar un component de la sang, que idealment no s'hauria de trobar habitualment en l'entorn quotidià. Per tant, la majoria de les proves presumptes de sang es basen en l'activitat semblant a la peroxidasa de l'hemoglobina.⁷ Malauradament, algunes plantes, com el rave, les patates o la farigola, contenen enzims que també poden induir una emissió de llum durant una prova presumptiva de sang, és a dir, podrien donar lloc a un fals positiu.¹ A més, s'ha comprovat que alguns factors ambientals influeixen en el resultat de les proves orientatives.⁵ Això és degut a que hi ha una àmplia gamma de substàncies mediambientals, farmacèutiques, domèstiques i industrials que poden afectar en el resultat de la prova. Alguns exemples d'aquestes substàncies químiques són els components de diversos materials, com ara sòls, detergents, vernissos, lleixius, catifes, objectes metàl·lics, eines, panells de plàstic, fusta i compostos vegetals.⁹

1.2.1. Reacció quimioluminescent

Les proves d'orientació que es realitzen sobre la sang es basen en una reacció química quimioluminescent. La quimioluminescència fa referència a l'emissió de llum d'una reacció química que pot passar en sistemes sòlids, líquids o gasosos. La llum emesa d'aquestes reaccions té diferents graus d'intensitat, vida útil i longitud d'ona. La intensitat de l'emissió depèn de la velocitat de reacció i de l'eficiència del procés que genera espècies en estat excitat.⁹ Per a que una reacció quimioluminescent funcioni satisfactòriament, principalment es necessiten quatre components:

- Agent oxidant: peròxid d'hidrogen (H_2O_2)
- Donador d'electrons: el químic del test (luminol)
- Medi bàsic: hidròxid de sodi (NaOH)
- Catalitzador: hemoglobina (Hb)

Els enzims son catalitzadors que acceleren reaccions que d'altra manera serien lentes. Seguint el mateix principi, el grup hemo actua com a catalitzador de la reacció.¹ Més concretament, l'hemoglobina present a la sang, té la capacitat enzimàtica de catalitzar la descomposició del peròxid d'hidrogen en aigua i oxigen, mostrant una coloració blava intensa en oxidar-se com a resultat de la reacció amb el compost químic (luminol).⁹

1.3. Luminol

Avui en dia, la prova del luminol és la tècnica bioquímica més utilitzada en la investigació forense i ha estat emprada eficaçment durant més de 40 anys per a la detecció presumptiva de taques de sang en l'escena del crim.^{4,9}

El reactiu Luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazina-diona) reacciona amb l'hemoglobina de la sang emetent llum blava de forma quasi instantània.⁴ El luminol és una acil-hidrazina cíclica formada per nitrogen, hidrogen, oxigen i carboni (Figura 3) que és sensible a la llum i a la presència de cations metàl·lics. A més, es va demostrar que el luminol era tèrmicament inestable, de manera que s'ha de protegir de les altes temperatures.⁹ Els reactius comercials més coneguts basats en luminol són el reactiu Bluestar® Forensic i el Lumiscene®.

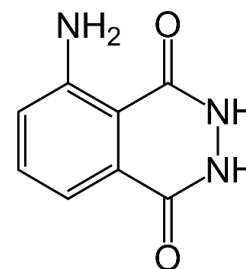


Figura 3. Estructura química del Luminol.

Com s'ha anomenat anteriorment, el peròxid d'hidrogen i el luminol són els components principals per a produir la reacció química. En aquesta, es necessita un catalitzador per accelerar el procés i, de fet, és la presència d'aquest el que es detectarà en aquesta prova.² El luminol és activat per una solució bàsica (NaOH) que proporciona ions hidròxid. Per altre banda, l'agent oxidant (H_2O_2) en entrar en contacte amb la sang, el ferro de l'hemoglobina el descompon formant aigua i oxigen. A continuació, passen una sèrie de reaccions (Figura 4). Més concretament, en primer lloc, l'ió hidròxid proporcionat pel NaOH, atrapa els dos hidrògens que es troben units als nitrògens del luminol i es forma una molècula amb dues càrregues negatives, és a dir, un dianió. Acte seguit, aquest reacciona amb la molècula d'oxigen procedent de la descomposició del peròxid d'hidrogen pel ferro, perd els nitrògens i guanya oxígens i forma un peròxid orgànic molt inestable anomenat 3-aminoftalat (3-APA*). Finalment, els reactius o molècules

originals tenen menys energia que les molècules resultants o productes, per tant, per arribar a un estat de major estabilitat i tornar al seu estat fonamental, la molècula allibera l'excés d'energia en forma d'un fotó visible de color blau.^{2,10}

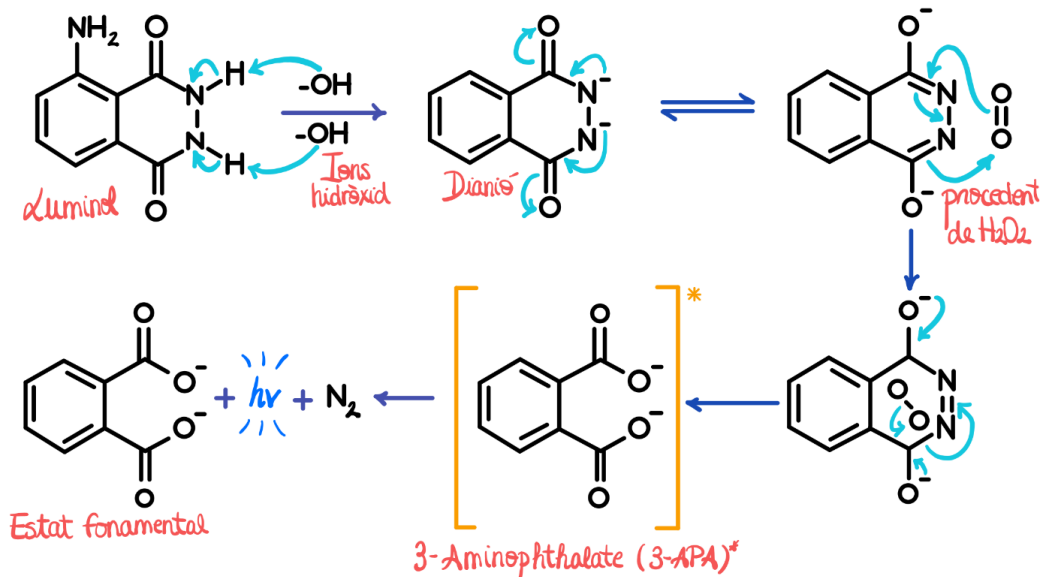


Figura 4. Reacció química del luminol front a la descomposició del peroxid de hidrogen mediada pel grup hemo. Adaptat de *The Chemiluminescence of Luminol*¹².

La via de producció de llum per a l'oxidació del luminol és un procés complex de diversos passos i depèn de diversos factors, inclosos el pH, la temperatura, la força iònica del medi de reacció i les espècies reactives que poden estar presents en solució.⁹ Per aquest motiu, tot i els grans avantatges que mostra el luminol, aquest també té una sèrie d'inconvenients i limitacions. En primer lloc, el luminol requereix quasi una foscor total per observar la reacció, el qual obliga a bloquejar les finestres i tota font de llum. En segon lloc, tant el reactiu, un cop barrejat, com la reacció quimioluminescent tenen una vida curta, per la qual cosa, fotografiar la reacció requereix un entrenament específic per capturar-la en aquest curt període. En tercer lloc, en aplicar el reactiu a la mostra, diluirà la sang i resultarà en una concentració de luminol major, lo qual pot ser una possible contaminació. A més, es valora que el luminol sigui un potencial destructiu de l'ADN i les proteïnes de la sang. En quart lloc, l'anàlisi morfològic de les taques de sang després del tractament amb luminol és limitat degut a la solubilitat dels productes oxidants produïts en la reacció, per tant, la interpretació de patrons de sang resulta poc fiable.¹² És a dir, la reacció química pot destruir algunes proves de l'escena del crim. Per aquest motiu, els investigadors només utilitzen luminol després d'explorar moltes altres opcions.² Finalment, un dels majors problemes associats a l'ús del luminol són els falsos positius i falsos negatius. Interpretar la

reacció del luminol pot ser complicat per les substàncies i substrats que interfereixen. El luminol pot reaccionar amb certes substàncies com agents oxidants forts o ions metàl·lics, peroxidases i lleixius domèstics i, d'altres que poden suprimir la reacció o afectar la sensibilitat de la tècnica.^{2,4,12}

Actualment, per minimitzar les interferències del luminol i/o augmentar el rendiment de l'emissió de quimioluminescència es suggereix l'ús de derivats i anàlegs del luminol, una variació en l'ordre de la mescla dels reactius, el pretractament del substrat a provar amb substàncies químiques i, finalment, l'addició al reactiu amb luminol certs additius químics que reaccionen selectivament amb les espècies interferents reduint la seva disponibilitat per a la reacció amb el luminol.⁹

1.3.1. LumiUCIO

Com s'ha anomenat anteriorment, hi ha diferents reactius que es basen en el luminol. El LumiUCIO és un reactiu relativament nou de producció pròpia de la Unitat Central d'Inspeccions Oculars (UCIO) de la Divisió de Policia Científica del Cos de Mossos d'Esquadra. La fórmula d'aquest reactiu és confidencial, però també està basat en el luminol i peròxid d'hidrogen (H_2O_2).

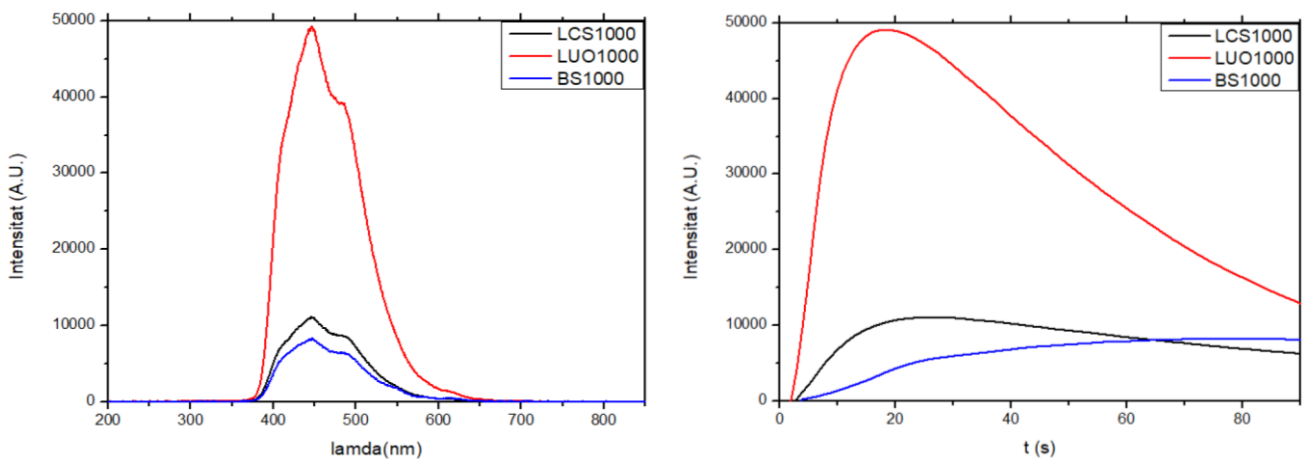


Figura 5. Comparació entre els reactius Lumiscene®, Bluestar® Forensic i LumiUCIO. A l'esquerra, representació de la intensitat lumínica (A.U.) front la lambda (nm) i, a la dreta, representació de la intensitat lumínica (A.U.) front el temps (s).

Anteriorment, es va confirmar la millora de la intensitat lumínica emesa en la reacció al utilitzar el reactiu LumiUCIO respecte el reactiu Lumiscene® i el reactiu Bluestar® Forensic.¹³ Com s'observa en la Figura 5, queda demostrat l'avantatge que presenta aquest nou reactiu en la detecció de restes de sang latents.

1.3.2. Artemisinina

Posteriorment, en resultats previs, es va estudiar el reemplaçament del peròxid d'hidrogen per l'Artemisinina. L'Artemisinina (Figura 6) és un fàrmac tradicional xinès galardonat amb el Premi Nobel 2015 pel tractament contra la malària. És un peròxid natural que és bastant estable en presència d'espècies comunes. Té la capacitat de diferenciar taques de sang amb taques de cafè, sucre morè i te

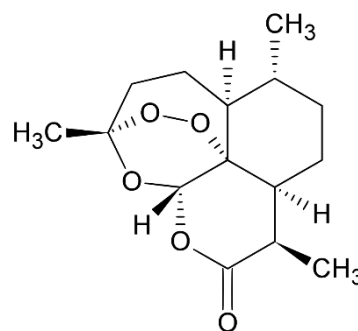


Figura 6. Estructura química de l'Artemisinina.

negre. El seu enllaç endoperòxid pot ser escindit pel grup hemo de la sang i generar espècies reactives d'oxigen (ROS) que poden reaccionar amb el luminol per emetre llum. A més, l'Artemisinina és més estable que el peròxid d'hidrogen i, per tant, la seva descomposició és més lenta.¹⁴ El més interessant d'aquesta molècula és que té una alta selectivitat contra les interferències comunes del luminol com els ions metàl·lics i diferents biomolècules. Tot i així, no es va obtenir intensitat lumínica visible de la reacció quimioluminescent.

1.3.3. Artesanat

L'Artesanat és un derivat de l'Artemisinina i té els seus mateixos punts positius però mostra una intensitat lumínica major en la reacció quimioluminescent. Més concretament l'Artesanat (Figura 7) és una lactona sesquiterpènica amb un nucli d'1,2,4-trioxà que incorpora un enllaç endoperòxid que és essencial per al

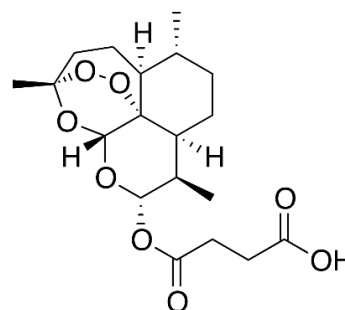


Figura 7. Estructura química de l'Artesanat.

desenvolupament de la reacció. L'enllaç d'endoperòxid és un desencadenant, activat per la reducció induïda pel ferro dins del paràsit de la malària, que allibera una cascada de reactius intermediaris: radicals lliures citotòxics, un o més intermediaris ferro-oxo i agents alquilants electròfils que finalment causen danys mortals als paràsits. Aquest mètode és capaç de detectar l'hemina de la mostra de sang amb un factor de dilució de fins a 120.000. També va mostrar una excel·lent selectivitat front a ions metàl·lics interferents i biomolècules (orina, saliva matinal, cafè, aigua, té vermell, etc).¹⁵

2. Hipòtesi i objectius del treball

Tenint en compte que les taques de sang en l'escena del crim constitueixen un dels vestigis biològics més importants per esclarir un fet delictiu,⁴ està clar que tenir bons mètodes per la detecció d'aquestes mostres és imperatiu. Coneixent la composició del LumiUCIO i la seva reacció en entrar en contacte amb la sang, s'han observat diversos inconvenients i limitacions.^{2,4,12}

En aquest sentit, la hipòtesis del treball és que es pot aconseguir optimitzar la fórmula del reactiu LumiUCIO per a que en reaccionar amb la sang doni més intensitat lumínica, durant més temps i no interfereixi amb la mostra, degradant-la lo mínim possible.

És ben sabut que el luminol i el H_2O_2 son els únics responsables de la quimioluminescència per part del reactiu ja que el ferro i l'activitat pseudo-peroxidasa de l'hemoglobina son els catalitzadors proporcionats per la sang.^{9,16} En aquest context, per tal de poder corroborar la hipòtesi proposada, l'objectiu principal del present estudi va ser avaluar l'efecte de diferents concentracions de peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i luminol, així com de la presència d'Artemisinina i d'Artesanat en la intensitat lumínica i la duració de la reacció i, la idoneïtat de l'ADN de la mostra per obtenir un perfil genètic. Aquest objectiu es va dividir en els següents objectius específics:

- Estudiar la intensitat lumínica i la durada de la reacció del LumiUCIO amb: diferents concentracions de H_2O_2 i luminol.
- Estudiar la intensitat lumínica i la durada de la reacció del LumiUCIO amb Artemisinina.
- Estudiar la intensitat lumínica i la durada de la reacció del LumiUCIO amb Artesanat.
- Avaluar la idoneïtat de l'ADN de les mostres analitzades en els estudis anteriors per obtenir un perfil genètic.

3. Materials i mètodes

3.1. Disseny de l'estudi

Amb els objectius i la hipòtesis fixada, en el present estudi es pretén mesurar l'emissió de quimioluminescència per part del reactiu LumiUCIO amb concentracions variants de peròxid d'hidrogen i luminol i, estudiar com afecta l'addició d'Artemisinina i d'Artesanat a la mescla. A més, esbrinar com afecten a la quantitat i la qualitat del ADN extret de les mostres. El procediment realitzat pel desenvolupament d'aquest treball es mostra esquematitzat en la Figura 8.

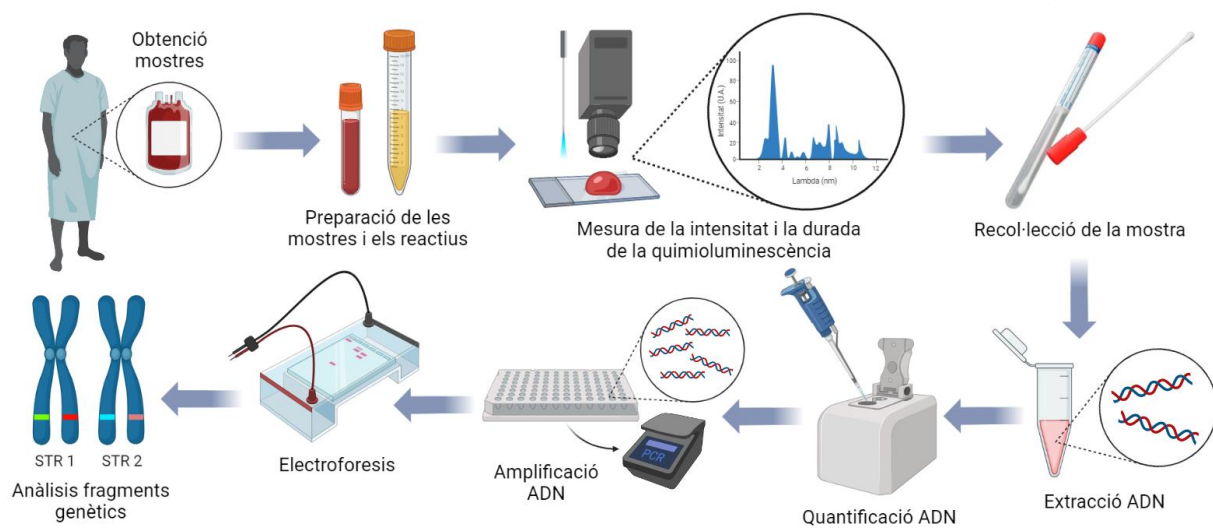


Figura 8. Esquema del procediment pel desenvolupament del Treball de Fi de Màster.

3.1.1. Preparació de mostres de sang

Per desenvolupar aquesta idea, es van emprar mostres sanguínies que van ser obtingudes per punció intravenosa d'un voluntari baró sa. La sang va ser recol·lectada en tubs amb anticoagulant (EDTA) i conservada a 4°C. Les mostres de sang es van obtenir i preparar el primer dia d'experimentació per tenir-les el màxim fresques possible. Abans de dur a terme les proves oficials es va avaluar quina era la millor dilució de sang per a efectuar les mesures. Amb el reactiu LumiUCIO original es van avaluar les dilucions 1/100, 1/1.000 i 1/10.000 amb les mateixes condicions que les fixades més endavant per la mesura de la intensitat quimioluminescent (Apartat 3.3). Les dilucions es van fer amb sèrum fisiològic 0,9% NaCl per tal d'evitar la plasmòlisi dels eritròcits. Al realitzar la prova i fer reaccionar la sang amb el reactiu es van observar bombolles d'oxigen que dificultaven la mesura, per aquest motiu es va decidir pretractar la sang. Es va afegir Proteïnasa K (Promega Corporation, Madison, USA) a la dilució 1/1.000 per a hidrolitzar la peroxidasa present en la mostra.

3.1.2. Preparació de reactius

El reactiu LumiUCIO original es va preparar seguint les instruccions proporcionades per la Unitat Central d'Inspeccions Oculars (UCIO) del Cos de Mossos d'Esquadra. Per a la preparació dels reactius restants, es va mantenir el procediment anterior però amb concentracions variants de diversos components de la mescla (veure Annex 1). Tots els reactius utilitzats es van preparar just abans de la seva utilització per tal d'evitar pèrdues de funcionalitat.

3.1.3. Optimització de la fórmula del reactiu LumiUCIO

En primer lloc, es va plantejar la optimització del reactiu LumiUCIO original variant les concentracions de luminol ([] 1, [] 2 i [] 3) i peròxid d'hidrogen ([] 1, [] 2 i [] 3). Tenint en compte que el reactiu original era l'anomenat L1, s'han estudiat les combinacions següents:

Taula 1. Combinacions creades per a la optimització del reactiu LumiUCIO.

		Peròxid d'hidrogen (H ₂ O ₂)		
		[] 1	[] 2	[] 3
Luminol	[] 1	L1	L2	L3
	[] 2	L4	L5	L6
	[] 3	L7	L8	L9

3.1.4. Optimització de la fórmula del reactiu basat en Artemisinina

En segon lloc, es va abordar la idea d'optimitzar el reactiu LumiUCIO afegint una quantitat fixe d'Artemisinina i variant les concentracions de peròxid d'hidrogen ([] 1, [] 2 i [] 3). Tenint en compte que el reactiu original era l'anomenat AControl, s'han estudiat les combinacions següents:

Taula 2. Combinacions creades per a la optimització del reactiu LumiUCIO amb Artemisinina.

		Sense H ₂ O ₂	Peròxid d'hidrogen (H ₂ O ₂)		
		-	[] 1	[] 2	[] 3
Sense Artemisinina	-	/	AControl	/	/
Artemisinina	[] 1	AControl2	A1	A2	A3

3.1.5. Optimització de la fórmula del reactiu basat en Artesanat

En tercer i últim lloc, es va repetir l'optimització anterior però afegint una quantitat fixe d'Artesanat i variant les concentracions de peròxid d'hidrogen ([] 1, [] 2 i

[] 3). Tenint en compte que el reactiu original era l'anomenat UControl, s'han estudiat les combinacions següents:

Taula 3. Combinacions creades per a la optimització del reactiu LumiUCIO amb Artesanat.

		Sense H ₂ O ₂	Peròxid d'hidrogen (H ₂ O ₂)		
		-	[] 1	[] 2	[] 3
Sense Artesanat	-	/	UControl	/	/
Artesanat	[] 1	UControl2	U1	U2	U3

3.2. Mesura de la intensitat i la durada de la quimioluminescència

Per analitzar la intensitat i la durada de la quimioluminescència es va utilitzar una càmera visible amb un espectrofotòmetre acoblat a una fibra òptica (Figura 9). Les reaccions es van produir en portaobjectes de vidre on es van afegir dues gotes de sang diluïda 1/1.000 amb cinc gotes del reactiu corresponent. Per una banda, amb la càmera visible es va gravar la reacció i, per altra banda, es van obtenir espectres cada 10 segons durant 3 minuts. Les mesures es van realitzar per triplicat. Finalment, es van recollir les mostres de sang en hisops per a la posterior extracció d'ADN.

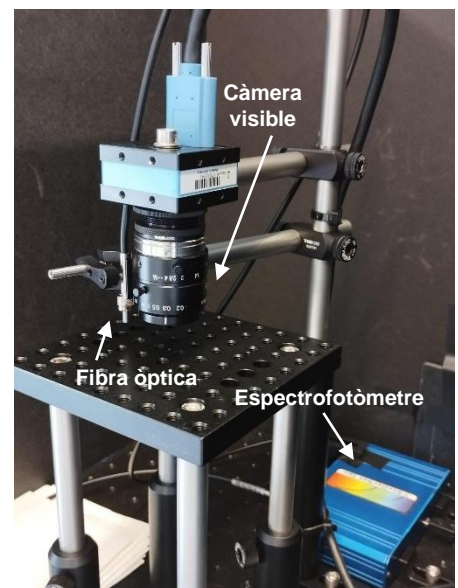


Figura 9. Càmera visible amb espectrofotòmetre acoblat a una fibra òptica.

3.3. Avaluació del grau de degradació de l'ADN

Per tal d'avaluar l'afectació dels diferents reactius davant la obtenció del correcte perfil genètic es va analitzar la possible degradació de l'ADN de les mostres. L'extracció d'ADN de les mostres es va dur a terme seguint les indicacions de l'apartat 4.B. del kit *DNA IQ™ System – Small Sample Casework Protocol* de Promega¹⁷ a partir dels hisops. Posteriorment, es va quantificar el material genètic extret mitjançant el *NanoDrop Spectrophotometer* de Implen. Tot i ser un mètode poc sensible es va utilitzar ja que la quantificació amb una PCR quantitativa a temps real va fracassar. A partir d'aquest punt es va prosseguir per dos vessants. Per una banda, es va dur a terme una electroforesis amb gel d'agarosa al 0,8% i tampó TBE 1X, on es va carregar l'ADN total. D'aquesta manera es va poder estudiar la degradació de l'ADN de manera general. Per

altra banda, es va amplificar amb una Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR), tres fragments d'STRs seguit d'una electroforesis amb un gel d'agarosa. Concretament, es van amplificar tres fragments (Taula 4), un gran (FG), un intermedi (FI) i un petit (FP). Es va utilitzar la Phusion Flash Mastermix (ThermoFisher, Waltham, EUA) i sis encebadors extrets de diferents articles.

Taula 4. Fragments amplificats en la qPCR per l'anàlisi de la degradació de l'ADN junt amb els encebadors utilitzats.

	STR	Mida amplió	Encebadors (5' → 3')	Referència
FG	Y-STR	524 pb	F – AAAGGCAACGTCCAGGATAGAG R – ATGTTACCCGATTGTCCTACAGC	<i>Kimura, M. et al</i> ¹⁸
FI	T-POX	256 pb	F – ACTGGCACAGAACAGGCACTTAGG R – GGAGGAACTGGGAACCACACAGGT	<i>Mohammad, A. et al</i> ¹⁹
FP	TH01	74 pb	F – CTGTTCCCTCCCTTATTTCCCTC R – GTGCAGGTACAGGGAACACAGAC	<i>Tsukada, K. et al</i> ²⁰

Els encebadors no s'ajustaven a unes condicions úniques, així que per una banda en el termociclador es va utilitzar el següent programa (per FG i FP): 98°C durant 10 segons, 35 cicles de un segon a 98°C, 10 segons a 55°C, 15 segons a 72°C i, 72°C durant 7 minuts. Per altra banda, per FI: 98°C durant 10 segons, 35 cicles de un segon a 98°C, 5 segons a 69°C, 15 segons a 72°C i, 72°C durant un minut. Acte seguit, es van fer córrer els resultats de la PCR en una electroforesis en gel d'agarosa (1% per FG i FI i, 3% per FP). Finalment, es van revelar les bandes obtingudes de les electroforesis amb el transiluminador.

3.4. Anàlisi estadístic

Es va utilitzar l'Excel per a calcular les dades estadístiques descriptives com les mitjanes i les desviacions estàndard de cada triplicat en les dades dels espectres i de la quantificació. També es van crear els gràfics obtinguts de les dades de l'espectrofotòmetre. Per altra banda, es va comprovar la normalitat dels resultats obtinguts de la quantificació d'ADN mitjançant la prova Saphiro-Wilk. Com es van obtenir paràmetres amb una distribució no normal, es van aplicar tests no paramètrics com la prova U de Mann-Whitney i Kruskal-Wallis. Els p valors inferiors a 0.05 van ser considerats estadísticament significatius. Aquestes anàlisis estadístiques es van dur a terme amb el SPSS (IBM SPSS Statistics 26.0).

4. Resultats i discussió

4.1. Resultats previs

En realitzar la prova de la dilució de sang ens vam trobar amb un resultat inesperat, unes bombolles d'oxigen que dificultaven la mesura de la intensitat quimioluminescent. Aquestes eren formades degut a la hidròlisi del peròxid d'hidrogen del reactiu amb la peroxidasa de la sang. Per aquest motiu, es va decidir, com s'ha anomenat anteriorment, pretractar les mostres sanguínies amb Proteïna K. En la Figura 10, s'observa la diferència de la reacció sang-reactiu abans i després de pretractar les mostres.

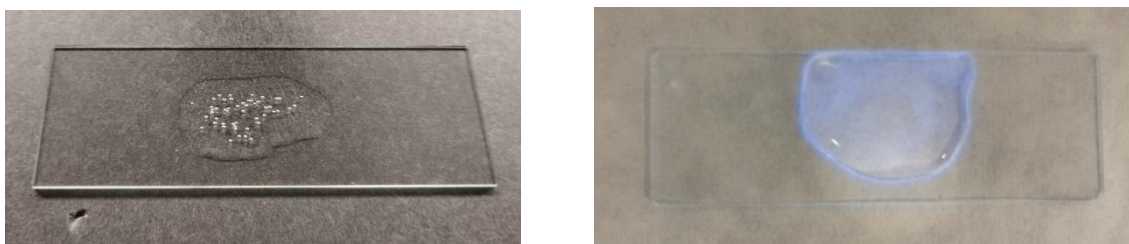


Figura 10. A l'esquerra, reacció sang-reactiu abans de pretractar la mostra de sang (aparició de les bombolles d'oxigen). A la dreta, reacció després de pretractar la sang (no aparició de bombolles).

A més, vista la intensitat i la durada de la reacció quimioluminescent de les tres dilucions proposades, es va considerar que la més òptima per a efectuar les mesures era la dilució 1/1.000, per tant, les altres es van descartar.

4.2. Mesura de la intensitat i la durada de la quimioluminescència

Gràcies a l'espectrofotòmetre acoblat a la fibra òptica es va poder mesurar la intensitat quimioluminescent (U.A., unitats arbitràries) en un rang de longitud d'ona de 200 a 1000nm. Tenint en compte el punt màxim del pic procedent de la llum blava emesa per la reacció, es va treballar amb els valors d'intensitat a 419nm. Es van enregistrar les dades a diferents temps i es van obtenir gràfiques que mostren l'evolució de la reacció quimioluminescent (veure Annex 2).

Per altra banda, gràcies a la càmera visible es va poder enregistrar la reacció quimioluminescent. Integrant les imatges capturades es va poder obtenir l'evolució de la intensitat lumínica emesa al llarg de la reacció.

4.2.1. Reactiu LumiUCIO

Referent a les gràfiques obtingudes amb l'espectrofotòmetre per les diferents variants de LumiUCIO (Annex 2, Figura A1), es va obtenir la gràfica següent:

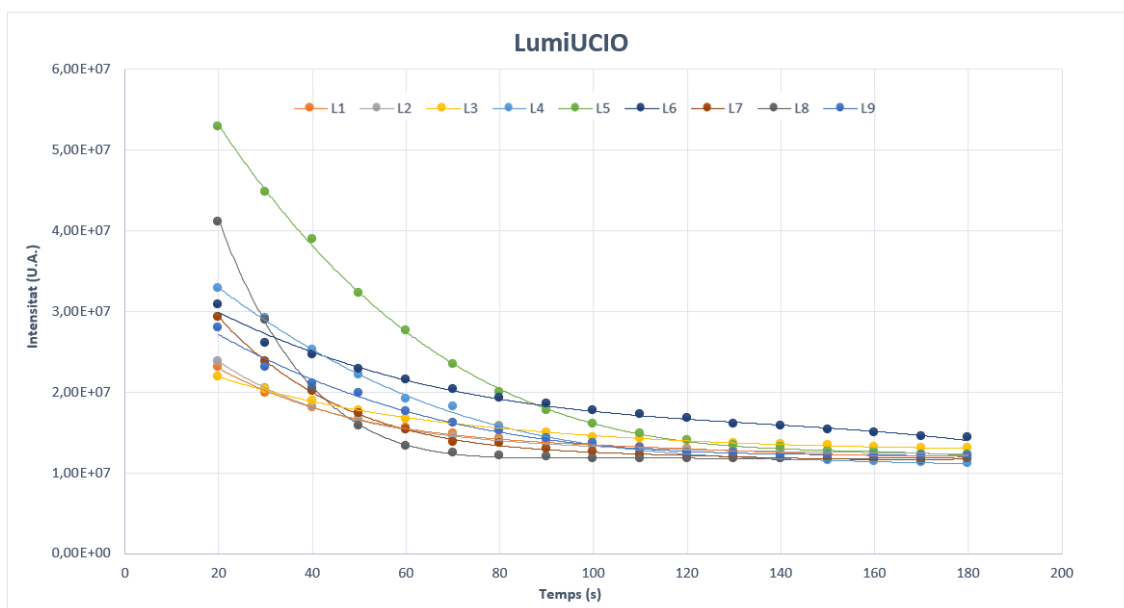


Figura 11. Representació de la intensitat (U.A.) en front del temps (s) de les diferents variants del reactiu LumiUCIO.

En la Figura 11 es pot observar que el reactiu que mostra més intensitat lumínica és el L5. Respecte al reactiu original, aquest té una concentració menor de luminol i peròxid d'hidrogen. Aquest resultat pot ser degut a la alta capacitat oxidativa del peròxid d'hidrogen. En la comunitat científica és ben conegut l'efecte nociu del peròxid d'hidrogen sobre l'ADN. En degradar-se el peròxid d'hidrogen es formen radicals d'oxigen lliures. Si bé l'oxigen és imprescindible pel metabolisme i les funcions de l'organisme, aquest també posseeix molts efectes tòxics causant danys cel·lulars i genètics.²¹ L'ADN és un objectiu biològicament important per aquests oxidants produint estrès oxidatiu cel·lular.²² Per tant, una concentració elevada de H_2O_2 podria destruir la mostra i afectar negativament a la reacció i, en conseqüència, a la obtenció de la quimioluminescència.²³ Per aquest motiu, al disminuir la concentració de peròxid d'hidrogen en el reactiu ha desencadenat la obtenció d'un perfil de la reacció millor. Per altra banda, també es valora que el luminol tingui capacitat de mutagènesis i sigui un potencial destructor de l'ADN i les proteïnes de la sang.²⁴ De la mateixa manera, al disminuir la concentració de luminol en el reactiu, ha produït una millora en els resultats obtinguts. Tot això explicaria la millora observada en el reactiu L5 respecte la resta.

El següent reactiu que mostra major intensitat inicial és el L8, el qual emet una elevada intensitat lumínica inicial però una davallada ràpida d'aquesta en el

temps. Descartaríem l'ús diari d'aquest reactiu pel baix manteniment de la intensitat al llarg del temps. Tot i així, sabent que té la mateixa concentració de peròxid d'hidrogen que el L5 però una concentració de luminol menor, podem atribuir els canvis observats a aquest últim factor. En conseqüència, podríem associar la presència del peròxid d'hidrogen amb el major o menor nivell d'intensitat lumínica i, el luminol, amb el manteniment d'aquest durant el temps.

Per altra banda, el reactiu L6 és el que mostra millors resultats en quant a la durada de la reacció ja que manté una intensitat major durant més temps. Aquest reactiu estava format per la concentració més baixa de peròxid d'hidrogen i una concentració intermèdia de luminol. Al tenir menor concentració de peròxid d'hidrogen fa que la intensitat inicial respecte L5 sigui menor. Ara bé, al tenir la concentració intermèdia de luminol, fa que es mantingui alta al llarg del temps (Figura 12). Pot ser que aquesta combinació tingui el balanç de reactius més òptim per allargar la reacció en el temps.

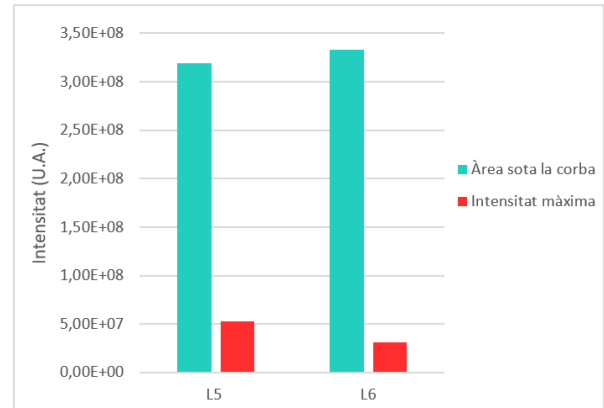


Figura 12. Comparació de l'àrea sota la corba i la intensitat màxima dels reactius L5 i L6. Àrea sota la corba calculada amb la regla trapezoidal i dividida per 10.

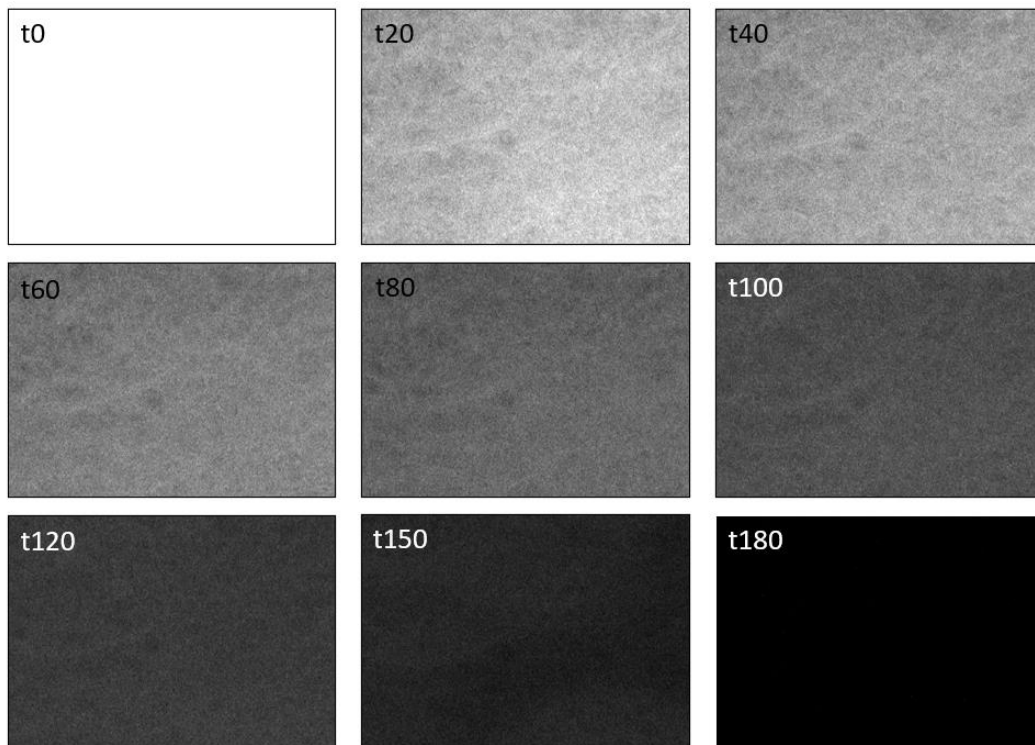


Figura 13. Evolució de la reacció de L6 amb la mostra dels 0 fins als 180 segons capturada amb la càmera visible.

Per altra banda, gràcies a la càmera visible es va poder observar l'evolució de la reacció quimioluminiscent de manera visual. En la Figura 13 es mostra la reacció del reactiu L6 a diferents temps. Inicialment, es mostra el sensor totalment saturat per la elevada intensitat lumínica del principi de la reacció. Per contra, als 180 segons, no s'observa cap resta de recepció lumínica. De manera general, les reaccions amb els diferents reactius es mostraven com en la Figura 13.

Tenint en compte aquests resultats, podríem postular que la millor combinació de peròxid d'hidrogen i luminol per a l'ús del LumiUCIO per a la detecció de taques de sang és el reactiu L5.

4.2.2. Reactiu LumiUCIO amb Artemisinina

Referent a les gràfiques obtingudes amb l'espectrofotòmetre per les diferents variants de LumiUCIO amb Artemisinina (Annex 2, Figura A2), es va obtenir la gràfica següent:

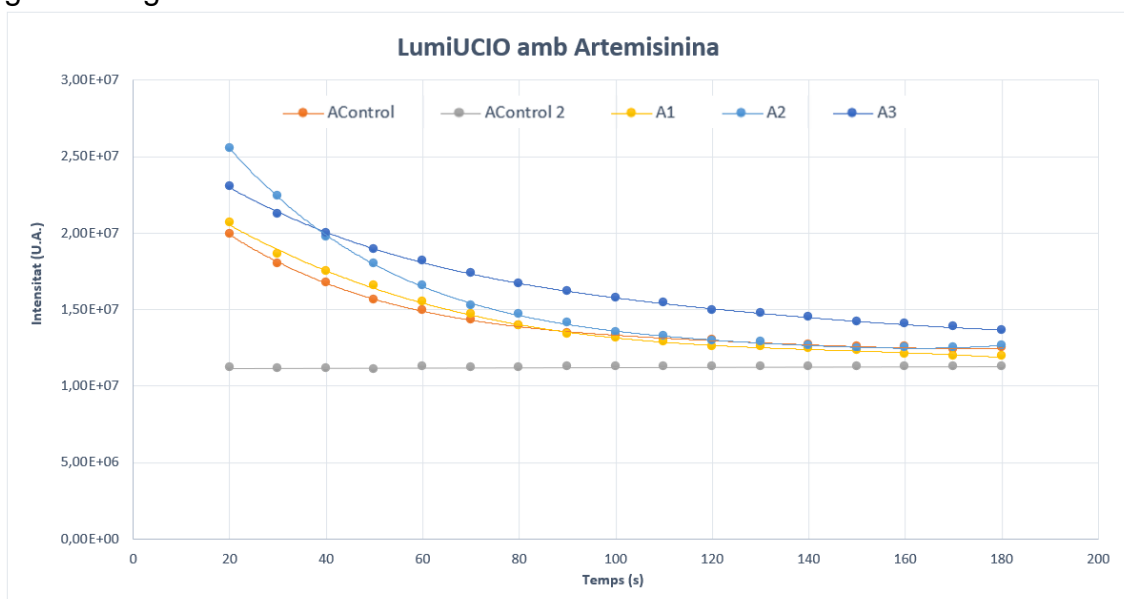


Figura 14. Representació de la intensitat (U.A.) en front del temps (s) de les diferents variants del reactiu LumiUCIO amb Artemisinina.

En la Figura 14, en primera instància, sobta el perfil de la reacció obtinguda amb el reactiu AControl 2, el qual solament contenia Artemisinina. No hi ha producció de llum i en conseqüència, no hi ha reacció. Això pot ser degut a que *W. Gao et al*¹⁴, en el seu article diluïen les mostres de sang amb hidròxid de sodi, per assegurar el caràcter bàsic en la reacció. En el present treball, la sang s'ha diluït amb sèrum fisiològic (0,9% NaCl) per tal d'evitar la plasmòlisi dels eritròcits i adaptar el procediment a allò que es podria trobar en la vida real. A més, en

l'article es feia servir un tub fotomultiplicador (PMT) i un telèfon intel·ligent com a detector, els quals podrien diferir amb l'equip utilitzat en el present treball.

Per altre banda, comentar els resultats obtinguts per part dels reactius AControl i A1. Aquests han mostrat una corba de reacció quasi idèntica. Aquest fet demostra que l'Artemisinina no intervé en la reacció, és a dir, ni potencia ni inhibeix l'efecte del peròxid d'hidrogen.

Finalment, fer referència a la millora dels perfils de reacció dels reactius A2 i A3 respecte l'original (AControl). Tenint en compte tot allò comentat fins ara, es pot afirmar que les millores observades en aquests perfils són degudes completament al peròxid d'hidrogen. Al disminuir la seva concentració, el perfil de la reacció millora. De la mateixa manera que passava amb els reactius L5 i L6, el reactiu A2 mostra una alta intensitat lumínica inicial mentre que el A3 té una major durada.

4.2.3. Reactiu LumiUCIO amb Artesanat

Referent a les gràfiques obtingudes amb l'espectrofotòmetre per les diferents variants de LumiUCIO amb Artesanat (Annex 2, Figura A3), es va obtenir la gràfica següent:

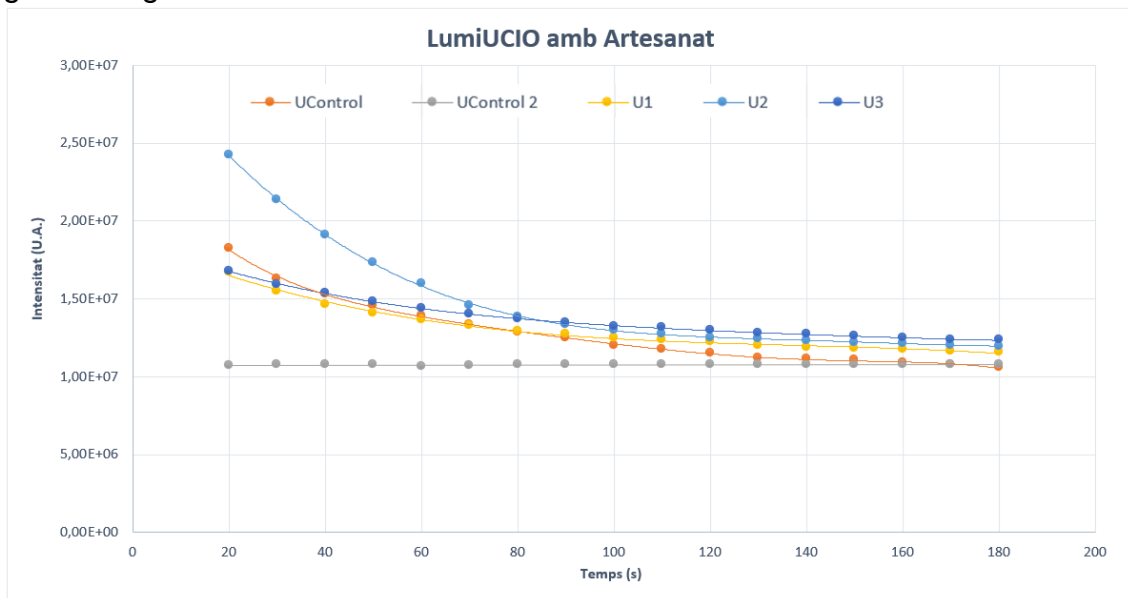


Figura 15. Representació de la intensitat (U.A.) en front del temps (s) de les diferents variants del reactiu LumiUCIO amb Artesanat.

En observar la Figura 15, veiem el mateix patró que observàvem en la Figura 14. Això comporta que l'Artesanat tampoc potencia ni inhibeix la reacció quimioluminescent. Tot i que *Fereja, T et al*¹⁵ afirmaven que aquest derivat de

l'Artemisinina mostrava millors resultats que l'Artemisinina, en aquest experiment els resultats difereixen del que es va informar. De la mateixa manera que amb l'Artemisinina, el reactiu U2 és el que mostra una major intensitat lumínica. Per altra banda, l'acció individual de l'Artesanat (UControl 2) no és suficient per

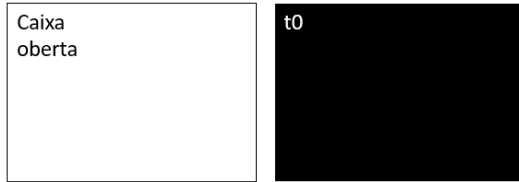


Figura 16. Enregistrament dels reactius AControl2 i UControl2 amb la mostra amb la caixa oberta i a temps zero capturada amb la càmera visible.

emetre llum. En observar les gravacions dels reactius AControl2 i UControl2 fetes amb la càmera (Figura 16), es nota clarament l'absència de reacció lumínica.

Tot i els inesperats resultats, tant la Figura 12 com la 13 ens permeten corroborar les afirmacions sobre la funció del peròxid d'hidrogen realitzades anteriorment. Sembla ser que un reactiu amb una concentració de H_2O_2 menor mostra millors resultats d'intensitat quimioluminescent que l'original. I, en segon lloc, un reactiu amb una concentració de H_2O_2 més baixa manté la emissió lumínica durant més temps.

4.3. Avaluació del grau de degradació de l'ADN

Per tal d'avaluar la idoneïtat de l'ADN de les mostres analitzades en els estudis anteriors per obtenir un perfil genètic, es va analitzar la seva concentració, degradació i qualitat.

En quantificar l'ADN extret de les diferents mostres amb el NanoDrop, es van obtenir les dades mostrades en les Taules A4, A5 i A6 (Annex 3). De forma general, es divisa que aquells reactius que tenen una concentració major de peròxid d'hidrogen, tenen menor concentració d'ADN extret.

A nivell estadístic, després de realitzar les proves d'associació no paramètriques, no es van trobar

diferències significatives en estudiar l'efecte de la concentració de peròxid d'hidrogen front la concentració d'ADN obtinguda en la mostra (Figura 17). Que

Prova de Kruskal – Wallis en l'experiment amb LumiUCIO

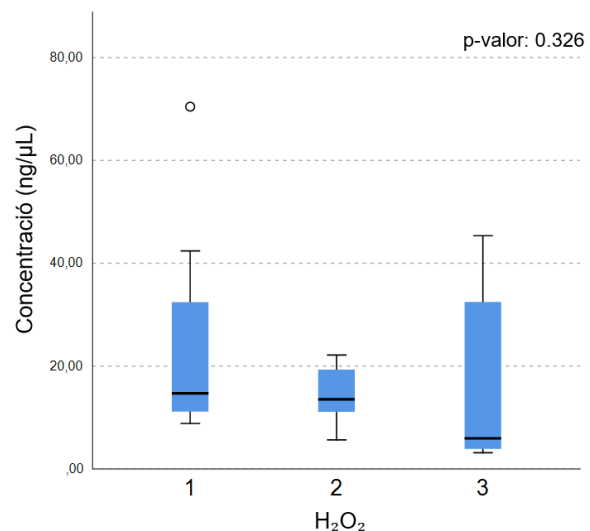


Figura 17. Prova de Kruskal - Wallis en l'experiment amb el reactiu LumiUCIO. Es representa la concentració (ng/μL) obtinguts al quantificar l'ADN amb el NanoDrop, en front dels diferents concentracions de peròxid d'hidrogen provats (grup 1: [] 3 grup 2: [] 2 i grup 3: [] 1).

el reactiu que permet la detecció de sang, degradi la mostra no és d'interès. En l'àmbit forense i davant d'una investigació criminal es solen trobar mostres de sang molt diluïdes i, per tant, amb concentracions d'ADN molt baixes. Per aquest motiu, s'ha de procurar que el reactiu utilitzat per la seva detecció no malmeti la mostra i empitjori les condicions pel seu posterior anàlisi. Sabent això, no haver obtingut diferències significatives entre grups és un fet positiu ja que podem afirmar que la major o menor concentració de peròxid d'hidrogen no afecta a l'extracció d'ADN.

Prova de Kruskal – Wallis en l'experiment amb LumiUCIO

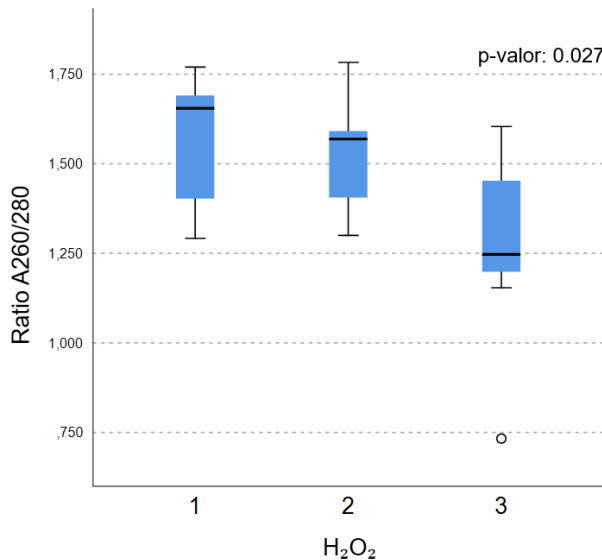


Figura 18. Prova de Kruskal - Wallis en l'experiment amb el reactiu LumiUCIO. Es representa el Ratio 260/280 obtinguts al quantificar l'ADN amb el NanoDrop, en front dels diferents concentracions de peròxid d'hidrogen provats (grup 1: [] 3 grup 2: [] 2 i grup 3: [] 1).

Tot i així, en analitzar els ratis de puresa de les mostres es va observar que hi havien diferències significatives entre les diferents concentracions de peròxid d'hidrogen. De manera ideal el rati A260/280 hauria d'estar entre 1,8 i 2. En la Figura 18, podem observar que aquelles mostres ruixades amb reactius amb major concentració de

peròxid d'hidrogen, tenen un rati menor. A més, en disminuir la concentració de H₂O₂ el rati puja significativament. Per tant, podem afirmar que al baixar la concentració de H₂O₂, l'ADN té una qualitat major i/o està menys contaminat. Això corrobora el fet que el peròxid d'hidrogen afecta en la qualitat de l'extracció de l'ADN de les mostres sanguínies tot i que no ho fa en la quantitat.²¹⁻²³

Un cop quantificades les mostres, es van carregar en un gel per observar la degradació de l'ADN total. Els resultats obtinguts no van ser concloents possiblement per la baixa concentració de les mostres carregades en el gel.

Acte seguit, es va dur a terme la PCR i es van fer córrer els resultats amb una electroforesis. Només van ser analitzades les mostres que es van tractar anteriorment amb el reactiu LumiUCIO (L1-L9) i es van descartar les restants. Aquest pas permet fer un anàlisi qualitatiu del nivell de degradació de l'ADN

extret de les mostres analitzades amb les diferents variants del reactiu. Els resultats corresponents a l'amplificació del STR T-POX (fragment intermedi) no van ser aclaridors possiblement per un error en la posada a punt dels encebadors. Ara bé, la falta del fragment de mida intermèdia no és crític ja que amb els resultats dels fragments restants es pot analitzar la degradació i qualitat de l'ADN extret de les mostres. En la Figura 19, es mostren els resultats obtinguts de l'amplificació dels STRs Y-STR (fragment gran) i TH01 (fragment petit).

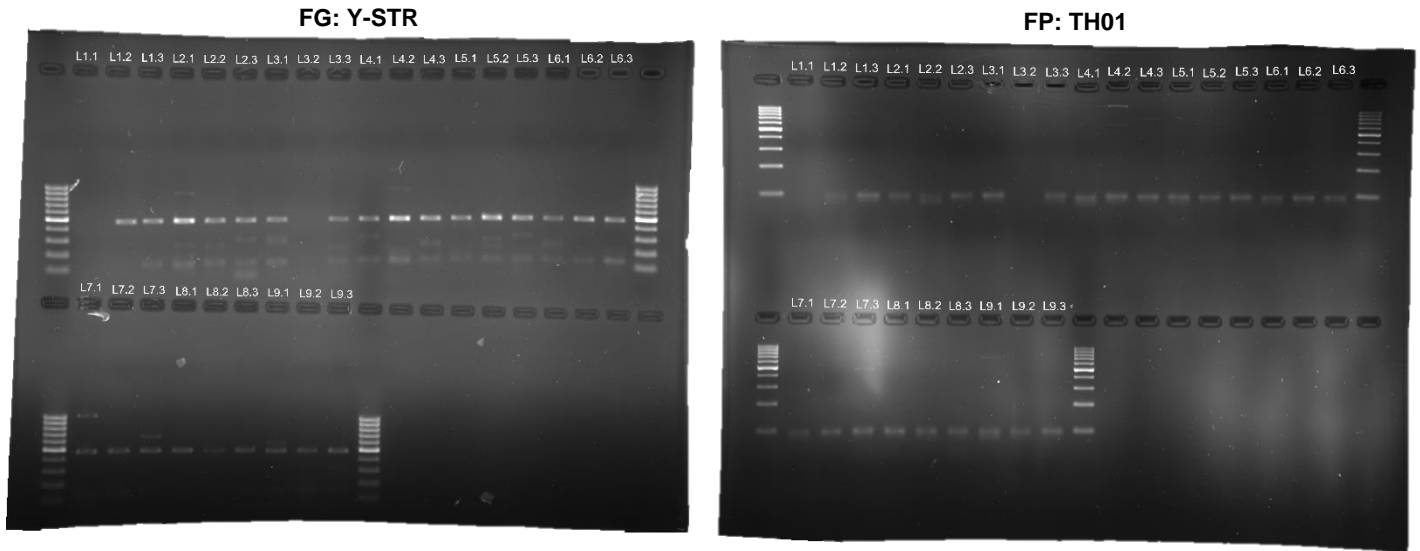


Figura 19. Electroforesis dels resultats de l'amplificació amb PCR de dos STRs. A l'esquerra, l'amplificació del fragment gran (Y-STR) amb un gel d'agarosa al 1% i, a la dreta, l'amplificació del fragment petit (TH01) amb un gel d'agarosa al 3%.

En la Figura 19, es pot observar que la gran majoria de mostres tenen bandes d'ambdós fragments, per tant, es podria assumir una integritat total de l'ADN i absència de degradació. Aquelles mostres on no s'observa cap banda (L1.1 i L3.2) és probable que sigui degut a un error experimental. Poder amplificar aquests fragments és comparable a la correcte extracció d'un perfil genètic.

4.4. Resum dels resultats

En la Taula 5 s'agrupen els resultats dels millors reactius relacionats amb l'efecte de la concentració de peròxid d'hidrogen i luminol en la intensitat lumínica de la reacció, la seva duració i la qualitat de l'ADN de la mostra.

Taula 5. Resum dels resultats dels millors reactius obtinguts. ↑: excel·lent, ~: correcte i ↓: deficient

	Intensitat lumínica	Duració reacció	Qualitat ADN
L5	↑↑	~	~
L6	~	↑	↑
L8	~	↓	↑

5. Conclusions

En el present estudi, d'acord als resultats obtinguts, es pot concloure que el millor reactiu per a la detecció de sang en l'àmbit forense és el L5. En aquest sentit, els resultats semblen indicar que una concentració intermèdia de peròxid d'hidrogen i una concentració menor de luminol forma la combinació amb el balanç de reactius més òptim. Per altra banda, l'addició d'Artemisinina o Artesanat al reactiu LumiUCIO no ha mostrat efectes potenciadors ni inhibidors en la reacció quimioluminescent. En quant a la idoneïtat de l'ADN per l'extracció d'un perfil genètic, es pot concloure que són més adequats els reactius amb menor concentració de peròxid d'hidrogen. Tot i així, són necessaris més estudis per tal de conèixer amb major profunditat l'efecte del luminol i el peròxid d'hidrogen en la reacció quimioluminescent amb mostres sanguínies. A més, s'ha de seguir investigant per obtenir el balanç més òptim de la composició i concentració dels reactius.

Pel que fa a les línies futures de recerca en aquest entorn, cal ampliar l'anàlisi d'aquests reactius millorats en les condicions que es troben en la vida real en l'àmbit forense. Per exemple, posar a prova els reactius amb sang degradada i/o exposada a l'ambient durant diversos dies o, sang en diversos suports que habitualment es troben en les escenes del crim (rajoles, guix, terres, suports foscos, etc). Per altra banda, davant els resultats obtinguts per part de l'Artemisinina i l'Artesanat, caldria trobar un agent oxidant feble més selectiu i innocu per a substituir al peròxid d'hidrogen. A més, aquest mateix estudi es podria realitzar tractant l'Artemisinina i l'Artesanat com un reactiu independent. És a dir, ruixar les mostres sanguínies amb LumiUCIO i, acte seguit, amb Artemisinina o Artesanat.

6. Agraïments

Abans de finalitzar completament aquest treball m'agradaria agrair a certes persones ja que sense elles realitzar-lo no hauria sigut possible.

Agrair als meus tutors professionals, Ubaldo Fernández Alonso i Jose Manuel Mejuto Escudero, membres de la Unitat Central d'Inspeccions Oculars (UCIO) de la Divisió de la Policia Científica del Cos de Mossos d'Esquadra, per donar-me la oportunitat de treballar en aquest tema i aportar el meu granet de sorra en aquesta línia d'investigació.

Dono gràcies al meu tutor acadèmic, el Dr. Josep Maria Serres Serres, per cedir-me els aparells per dur a terme la part experimental i el seguiment realitzat.

Agrair també a la Facultat de Química i a tot el Departament de Bioquímica i Biotecnologia per permetre'm realitzar les pràctiques en els seus laboratoris i donar-me la oportunitat de desenvolupar aquest treball.

A més, agrair a la tècnica de laboratori, la Dra. Maria Isabel Araque Granados pels consells rebuts i fer-me costat en tot moment en la part experimental d'aquest projecte. També agrair a la Maria, l'Helena, la Mònica i l'Adrià per l'ajuda brindada i ser-hi dia a dia.

En especial, m'agradaria agrair al coordinador del màster, el Dr. Raúl Beltran Debón, per tots els dubtes resolts, guiar-me durant tot el procediment i estar-hi sempre que l'he necessitat. Gràcies per fins i tot deixar-t'hi la sang en aquest projecte.

I per últim però no menys important, agrair als meus pares i amics per la seva presència i vetlla durant tot el recorregut.

7. Bibliografia

1. Blood in Murder Investigation. <https://www.crime-scene-investigator.net/blood-in-murder-investigation.html>.
2. How Luminol Works.
3. Bremmer, R. H., De Bruin, K. G., Van Gemert, M. J. C., Van Leeuwen, T. G. & Aalders, M. C. G. Forensic quest for age determination of bloodstains. *Forensic Sci Int* **216**, 1–11 (2012).
4. Quispe, S. & Flores, A. Detección de manchas de sangre mediante la Prueba de Luminol en la investigación forense. *Revista Con-Ciencia* **2**, 83–91 (2014).
5. Gil Pitarch, P., Verdú Pascual, F. A., Castelló Ponce, A. & Negre Muñoz, M. del C. Técnica de criminalística en manchas de sangre: factor ambiental en las pruebas de orientación. *Revista de la Escuela de Medicina Legal, ISSN-e 1887-3278, ISSN 1885-9577, N.º. 14 (junio), 2010, págs. 4-14* (2010).
6. Valdivieso-González, L. G. *et al.* Identificación del área de origen de manchas hemáticas en una escena de crimen: análisis teórico. *Iteckne* **17**, 31–37 (2020).
7. Tobe, S. S., Watson, N. & Daéid, N. N. Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA. *J Forensic Sci* **52**, 102–109 (2007).
8. Hematology Glossary - Hematology.org. <https://www.hematology.org/education/patients/blood-basics>.
9. Barni, F., Lewis, S. W., Berti, A., Miskelly, G. M. & Lago, G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta* **72**, 896–913 (2007).
10. Kapralov, A. *et al.* Peroxidase Activity of Hemoglobin-Haptoglobin Complexes: covalent aggregation and oxidative stress in plasma and macrophages*. *J Biol Chem* **284**, 30395 (2009).
11. OBTI® - Bluestar Forensic. <https://www.bluestar-forensic.com/es/productos/bluestar-obti/>.
12. The Chemiluminescence of Luminol - Home. <https://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/fleming/mechanism.htm>.

13. Garrigós Panisello, X. LumiUCIO: Un nou reactiu de detecció de sang latent. (2021).
14. Gao, W. *et al.* Artemisinin-Luminol Chemiluminescence for Forensic Bloodstain Detection Using a Smart Phone as a Detector. *Anal Chem* **89**, 6160–6165 (2017).
15. Fereja, T. H. *et al.* Artesunate-luminol chemiluminescence system for the detection of hemin. *Talanta* **204**, 379–385 (2019).
16. Stoica, B. A. *et al.* Improving Luminol Blood Detection in Forensics. *J Forensic Sci* **61**, 1331–1336 (2016).
17. DNA IQ™ System—Database Protocol. <https://www.promega.es/resources/protocols/technical-bulletins/101/dna-iq-system-database-protocol/>.
18. Kimura, M. *et al.* Fragment size analysis of free fetal dna in maternal plasma using y-str loci and sry gene amplification. *Nagoya J Med Sci* **73**, 129 (2011).
19. Foroughmand, A. M. *et al.* Genetic analysis of two STR loci (VWA and TPOX) in the Iranian province of Khuzestan. *Iran J Basic Med Sci* **17**, 583 (2014).
20. Tsukada, K. *et al.* Multiplex PCR using newly designed primers for very short fragments of TH01, TPOX, CSF1PO, and vWA loci. *Am. J. Hum. Genet* **114**, 183 (2001).
21. Justo, C. & Venereo Gutiérrez, R. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* **31**, 126–159 (2002).
22. Linn, S. DNA Damage by Iron and Hydrogen Peroxide in Vitro and in Vivo. *Drug Metab Rev* **30**, 13–326 (1998).
23. Lumiscene. <https://www.lociforensics.nl/lumiscene/lumiscene/>.
24. Cheyne, M. Illuminating Latent Blood Application methods, fixatives, alternatives and new formulas for luminol. (2011).

8. Annexos

8.1. Annex 1: Preparació de reactius

Apartat confidencial.

8.2. Annex 2: Gràfiques complementàries

Gràcies a la mesura de la intensitat quimioluminescent a 419nm en diferents temps, es van poder obtenir les gràfiques següents:

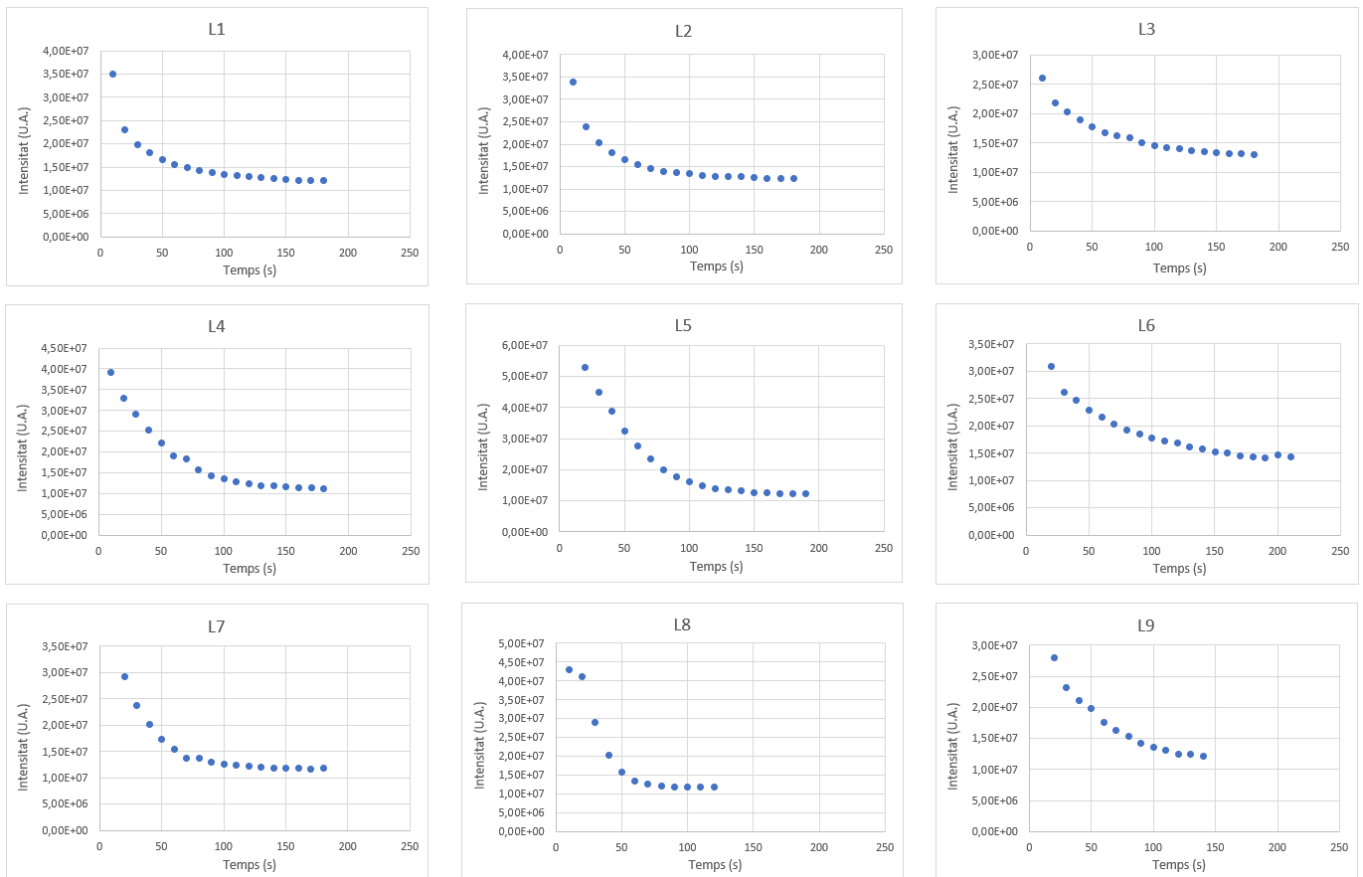


Figura A1. Gràfiques de les variants del reactiu LumiUCIO analitzats (L1-L9) amb les representacions de les respectives intensitats (U.A.) respecte els temps (s).

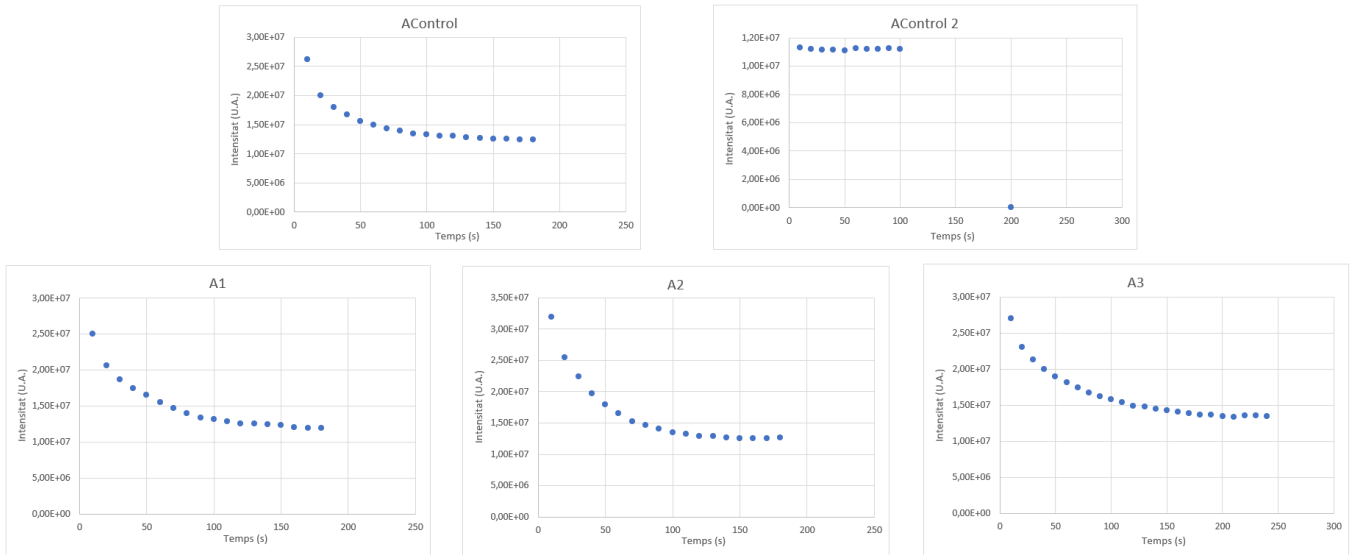


Figura A2. Gràfiques de les variants del reactiu LumiUCIO amb Artemisinina analitzats (AControl-A3) amb les representacions de les respectives intensitats (U.A.) respecte els temps (s).

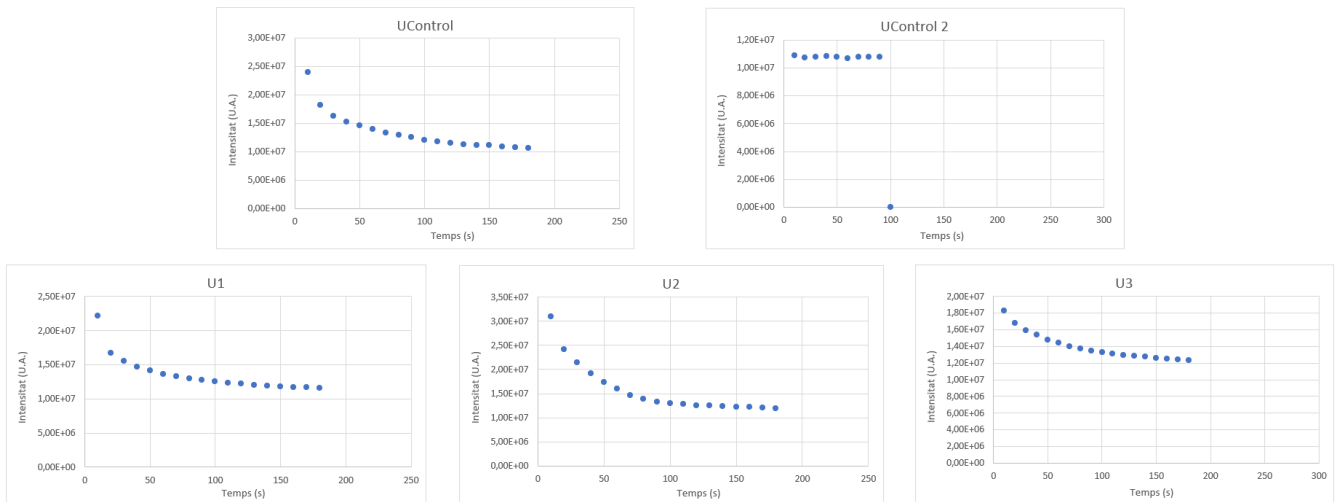


Figura A3. Gràfiques de les variants del reactiu LumiUCIO amb Artesanat analitzats (UControl-U3) amb les representacions de les respectives intensitats (U.A.) respecte els temps (s).

La unió d'aquestes gràfiques entre sí van permetre la obtenció de les Figures 11, 14 i 15 d'aquest treball.

8.3. Annex 3: Taules de dades de la quantificació d'ADN

Gràcies a la extracció i quantificació del ADN de les mostres, es van poder obtenir les taules següents:

Taula A4. Valors obtinguts de la quantificació de l'ADN extret de la reacció amb les diferents variants del reactiu LumiUCIO. Els valors en vermell representen els *outliers*

Mostra	Concentració (ng/ μ L)	A260/280	A260/230	Mitja []
L1.1	45,35	1,558	0,044	45,28
L1.2	*7,15	1,349	0,03	
L1.3	45,2	1,249	0,071	
L2.1	9,75	1,3	0,009	12,43
L2.2	21,9	1,587	0,021	
L2.3	5,65	1,569	0,008	
L3.1	*2,15	0,741	0,005	56,43
L3.2	70,45	1,428	0,067	
L3.3	42,4	1,663	0,04	
L4.1	7,3	1,604	0,155	5,47
L4.2	4,6	1,243	0,006	
L4.3	4,5	1,154	0,006	
L5.1	*4,2	1,826	0,005	19,45
L5.2	16,75	1,432	0,016	
L5.3	22,15	1,38	0,02	
L6.1	22,45	1,377	0,021	18,58
L6.2	*3,65	1,237	0,007	
L6.3	14,7	1,719	0,227	
L7.1	19,75	1,348	0,018	8,73
L7.2	3,3	1,245	0,018	
L7.3	3,15	0,733	0,005	
L8.1	*4,4	1,205	0,006	13,00
L8.2	12,45	1,596	0,219	
L8.3	13,55	1,783	0,403	
L9.1	11,5	1,655	0,369	10,38
L9.2	10,8	1,77	0,01	
L9.3	8,85	1,292	0,049	

Taula A5. Valors obtinguts de la quantificació de l'ADN extret de la reacció amb les diferents variants del reactiu LumiUCIO amb Artemisinina. Els valors en vermell representen els *outliers*.

Mostra	Concentració (ng/ μ L)	A260/280	A260/230	Mitja []
AC1.1	19,25	1,314	0,017	26,33
AC1.2	37,9	1,452	0,035	
AC1.3	21,85	1,481	0,02	
AC2.1	10,4	1,465	0,013	24,43
AC2.2	38,45	1,381	0,036	
AC2.3	*3,05	0,772	0,005	
A1.1	23,65	1,031	0,062	23,63
A1.2	*79,65	1,276	0,074	
A1.3	23,6	1,368	0,022	
A2.1	38,6	1,369	0,036	34,23
A2.2	*6,1	0,787	0,006	
A2.3	29,85	1,408	0,027	
A3.1	111,5	1,221	0,112	129,48
A3.2	147,45	1,281	0,02	
A3.3	*3,3	0,805	0,007	

Taula A6. Valors obtinguts de la quantificació de l'ADN extret de la reacció amb les diferents variants del reactiu LumiUCIO amb Artesanat. Els valors en vermell representen els *outliers*.

Mostra	Concentració (ng/ μ L)	A260/280	A260/230	Mitja []
UC1.1	*3,55	0,877	0,399	12,63
UC1.2	12,15	1,279	0,046	
UC1.3	13,1	1,074	0,012	
UC2.1	10,4	1,588	0,009	11,78
UC2.2	*7,15	1,336	0,009	
UC2.3	13,15	1,814	0,012	
U1.1	5,75	1,036	0,434	6,88
U1.2	6,15	1,034	0,488	
U1.3	8,75	1,591	0,009	
U2.1	12,9	1,856	0,012	10,33
U2.2	7,75	1,325	0,009	
U2.3	*26,9	1,587	0,024	
U3.1	12,4	2,175	0,011	14,77
U3.2	10,8	1,543	0,011	
U3.3	21,1	1,402	0,029	