

Determinación Químico-Criminalística del Sexo a partir de Huellas Dérmicas**Criminalistics Chemical Determination of Sex from Dermal Prints****Determinação Químico-Criminalística do Sexo a partir de Impressões Dérmicas**

Autores: Roger Reyner Legrá Correa,
Doctor en Ciencias Policiales.
Dirección de Criminalística, La Habana.
Correo electrónico: rogerlegra1974@gmail.com

José Ángel Posada Jeanjacques
Doctor en Ciencias.
Dirección de Criminalística, La Habana.
Correo electrónico: japosada123@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8402-8324>

Arturo Fanego González.
Especialista de Posgrado en Criminalística.
Dirección de Criminalística, La Habana.
Correo electrónico: artfg1987@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-8029-5205>

Artículo original**RESUMEN**

La determinación del sexo a partir de vestigios constituye una herramienta crucial para el direccionamiento de investigaciones criminales. La explotación química de las huellas dérmicas, específicamente de los aminoácidos del sudor, representa una alternativa prometedora. Este estudio aborda esta problemática mediante la validación exhaustiva de dos métodos analíticos alternativos, basados en Espectroscopía UV-Visible. El objetivo fue desarrollar y validar estadísticamente los métodos enzimático y colorimétrico para la cuantificación de aminoácidos en huellas dérmicas, evaluando su poder discriminante para la determinación del sexo, su robustez frente a variables operativas (superficie, agente revelador) y su aplicabilidad en casos reales. Se implementó un diseño experimental en fases: Simulación estocástica de 100 perfiles de aminoácidos basada en una distribución log-normal a partir de datos bibliográficos, optimización sistemática de parámetros espectroscópicos, validación metodológica según protocolos internacionales, análisis del poder discriminante mediante estadística inferencial no paramétrica y validación operativa con 1800 huellas experimentales y 60 huellas reales de archivo criminalístico. Como resultados se establecieron condiciones

óptimas robustas (Enzimático: $\lambda=436$ nm, $T=40^{\circ}\text{C}$, $t=30$ min; Colorimétrico: $\lambda=570$ nm, $T=40^{\circ}\text{C}$, $t=35$ min). Ambos métodos demostraron linealidad ($R^2 > 0.997$), precisión ($\text{CV} < 1.5\%$) y exactitud ($p > 0.01$ en tests de comparación de medias). El análisis estadístico confirmó diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) entre las concentraciones de aminoácidos de ambos sexos, siendo aproximadamente duplicadas en mujeres. La validación con huellas reales arrojó una eficacia del 96.6%, la naturaleza de la superficie receptora y el agente revelador físico no mostraron influencia estadísticamente significativa en la determinación.

Palabras clave: Aminoácidos; Biomarcadores; Determinación del Sexo; Espectroscopía UV-Visible; Huellas Dérmicas.

ABSTRACT

Sex determination from trace evidence is a crucial tool for guiding criminal investigations. The chemical exploitation of fingerprints, specifically the amino acids in sweat, represents a promising alternative. This study addresses this issue through the comprehensive validation of two alternative analytical methods based on UV-Visible Spectroscopy. The objective was to develop and statistically validate the enzymatic and colorimetric methods for the quantification of amino acids in fingerprints, evaluating their discriminative power for sex determination, their robustness against operational variables (surface, developing agent), and their applicability in real casework. A phased experimental design was implemented: stochastic simulation of 100 amino acid profiles based on a log-normal distribution from bibliographic data, systematic optimization of spectroscopic parameters, method validation according to international protocols, analysis of discriminative power using non-parametric inferential statistics, and operational validation with 1800 experimental marks and 60 real fingerprints from criminal archives. As results, robust optimal conditions were established (Enzymatic: $\lambda=436$ nm, $T=40^{\circ}\text{C}$, $t=30$ min; Colorimetric: $\lambda=570$ nm, $T=40^{\circ}\text{C}$, $t=35$ min). Both methods demonstrated linearity ($R^2 > 0.997$), precision ($\text{CV} < 1.5\%$), and accuracy ($p > 0.01$ in mean comparison tests). Statistical analysis confirmed highly significant differences ($p < 0.001$) in amino acid concentrations between sexes, with concentrations approximately doubled in females. Validation with real fingerprints yielded an efficacy of 96.6%. The nature of the receiving surface and the physical developing agent showed no statistically significant influence on the determination.

Keywords: Amino Acids; Biomarkers, Fingermarks; Sex Determination; UV-Visible Spectroscopy.

RESUMO

A determinação do sexo a partir de vestígios constitui uma ferramenta crucial para o direccionamento de investigações criminais. A exploração química das impressões digitais, especificamente dos aminoácidos do suor, representa uma alternativa promissora. Este estudo aborda esta problemática mediante a validação abrangente de dois métodos analíticos alternativos, baseados em Espectroscopia UV-Visível. O objectivo foi desenvolver e validar estatisticamente os métodos enzimático e colorimétrico para a quantificação de aminoácidos em impressões digitais, avaliando o seu poder discriminativo para a determinação do sexo, a sua robustez face a variáveis operacionais (superfície, agente revelador) e a sua aplicabilidade em casos reais. Foi implementado um desenho experimental em fases: simulação estocástica de 100 perfis de aminoácidos baseada numa distribuição log-normal a partir de dados bibliográficos, optimização sistemática de parâmetros espectroscópicos, validação metodológica de acordo com protocolos internacionais, análise do poder discriminativo mediante estatística inferencial não paramétrica e validação operacional com 1800 impressões experimentais e 60 impressões reais de arquivo criminalístico. Como resultados, foram estabelecidas condições robustas e óptimas (Enzimático: $\lambda=436$ nm, $T=40^{\circ}\text{C}$, $t=30$ min; Colorimétrico: $\lambda=570$ nm, $T=40^{\circ}\text{C}$, $t=35$ min). Ambos os métodos demonstraram linearidade ($R^2 > 0,997$), precisão ($CV < 1,5\%$) e exactidão ($p > 0,01$ em testes de comparação de médias). A análise estatística confirmou diferenças altamente significativas ($p < 0,001$) entre as concentrações de aminoácidos de ambos os sexos, sendo estas aproximadamente duplicadas em mulheres. A validação com impressões reais resultou numa eficácia de 96,6%. A natureza da superfície receptora e o agente revelador físico não mostraram influência estatisticamente significativa na determinação.

Palavras-chave: Aminoácidos; Biomarcadores, Determinação do Sexo; Espectroscopia UV-Visível; Impressões Digitais.

INTRODUCCIÓN

La maximización del valor informativo extraíble de los vestigios constituye un principio cardinal de la criminalística moderna. Entre estos, las huellas dérmicas han sido históricamente explotadas casi en exclusiva para la identificación individual mediante análisis dermatoscópico



(Posada, 2015). Sin embargo, el residuo químico que las compone, una matriz compleja de excreciones sebáceas, ecrinas y apocrinas, representa un archivo bioquímico subexplotado, conteniendo información diagnóstica sobre el fenotipo y el estado fisiológico del donante (Girod et al. 2012; Ramatowski, 2013).

La determinación del sexo a partir de vestigios biológicos es un dato de un valor incalculable en la fase de orientación inicial de una investigación, permitiendo acotar de manera significativa el universo de sospechosos. Las técnicas gold standard para este fin, la identificación de la cromatina sexual X (Barr & Bertram, 1949), el análisis de marcadores del cromosoma Y mediante PCR (Butler, 2012), y la espectrometría de masas de alta resolución (p. ej., MALDI-MS) (Ferguson, 2012), si bien poseen una precisión incontrovertible, presenta limitaciones para la mayoría de los laboratorios de criminalística del país (Legra, 2020). Esta centralización de capacidades genera dificultades en el orden operativo, ralentizando críticamente la investigación en sus horas más cruciales.

Ante este escenario, la búsqueda de alternativas analíticas viables se convierte en una prioridad científica y operativa. La Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis) emerge como una candidata ideal: es una técnica robusta, de bajo costo, ampliamente disponible en laboratorios de química básica y con un historial probado de aplicación en química analítica (Skoog et al. 2017). Su acoplamiento con reacciones de derivatización química permite la cuantificación indirecta de analitos no cromóforos, como los aminoácidos.

Los aminoácidos libres, componentes minoritarios pero ubicuos del sudor ecrino, han sido identificados como biomarcadores prometedores para la determinación del sexo. Estudios metabolómicos preliminares indican diferencias cuantitativas sustanciales en sus perfiles de excreción entre hombres y mujeres, atribuibles a dimorfismos en el metabolismo nitrogenado y la influencia hormonal (Hadorn et al, 1967; Halamek et al, 2015). Además, su estabilidad química en el residuo de la huella, incluso tras el revelado con agentes físicos, los convierte en un blanco analítico robusto (Legra, 2020).

Este estudio se fundamenta en la hipótesis de que la cuantificación espectrofotométrica de los aminoácidos totales extraídos de huellas dérmicas, mediante reacciones enzimáticas o colorimétricas validadas, permite discriminar el sexo del donante con un nivel de confiabilidad estadística suficiente para su aplicación en contextos criminalísticos reales. El presente trabajo no solo busca validar analíticamente dos métodos, sino también demostrar su robustez frente a



las variables inherentes al trabajo criminalístico (tipo de superficie, agente revelador) y su aplicabilidad directa sobre evidencias de casos reales, proponiendo así una solución pragmática y de alto impacto para el desarrollo de pericias diagnósticas.

DESARROLLO

Diseño experimental y simulación de muestras

Para el desarrollo de la fue adoptado un diseño experimental secuencial y de validación cruzada. Dado que la concentración de aminoácidos reportados en sudor no sigue una distribución normal (Legra, 2020), se realizó una simulación estocástica utilizando el software Statgraphics Centurion XV (v.15.2.14). A partir de los valores medios reportados en la literatura para 23 aminoácidos (Hadorn et al, 1967; Haahti et al, 1963), se generaron 100 perfiles de concentración (50 masculinos y 50 femeninos) que obedecen a una distribución logarítmica normal, replicando así la variabilidad interindividual esperada en una población. Estas concentraciones teóricas se utilizaron para preparar soluciones patrones y, posteriormente, soluciones simuladas de sudor mediante la mezcla convenientemente con los demás componentes mayoritarios que forman el sudor real.

Tabla 1. Concentraciones aleatorias masculinas

| AA | Conc Masc Prom | C. M. A. 1 | C. M. A. 2 | C. M. A. 3 | C. M. A. 4 | C. M. A. 5 | C. M. A. 6 | ... | C. M. A. 50 |
|-------|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|-------------|
| Thr | 0,1121 | 0,1123 | 0,1121 | 0,1119 | 0,1122 | 0,1124 | 0,1127 | | 0,1028 |
| Ser | 0,5208 | 0,5201 | 0,5204 | 0,5206 | 0,5206 | 0,5213 | 0,5200 | | 0,5116 |
| Glu | 0,1109 | 0,1101 | 0,1108 | 0,1109 | 0,1108 | 0,1113 | 0,1099 | | 0,1086 |
| Gly | 0,3418 | 0,3414 | 0,3426 | 0,3424 | 0,3422 | 0,3424 | 0,3420 | | 0,3490 |
| Ala | 0,1968 | 0,1976 | 0,1969 | 0,1961 | 0,1972 | 0,1968 | 0,1973 | | 0,2046 |
| Cit | 0,1267 | 0,1275 | 0,1261 | 0,1268 | 0,1262 | 0,1263 | 0,1272 | | 0,1322 |
| Asp | 0,0638 | 0,0636 | 0,0635 | 0,0638 | 0,0639 | 0,0631 | 0,0638 | | 0,0634 |
| Asn | 0,0161 | 0,0161 | 0,0158 | 0,0163 | 0,0166 | 0,0164 | 0,0159 | | 0,0110 |
| Gln | 0,0120 | 0,0122 | 0,0118 | 0,0120 | 0,0118 | 0,0120 | 0,0121 | | 0,0024 |
| Pro | 0,0349 | 0,0341 | 0,0358 | 0,0344 | 0,0346 | 0,0349 | 0,0349 | | 0,0235 |
| Val | 0,0459 | 0,0464 | 0,0457 | 0,0452 | 0,0458 | 0,0453 | 0,0462 | | 0,0604 |
| Cys | 0,0009 | 0,0021 | 0,0008 | 0,0005 | 0,0007 | 0,0011 | 0,0009 | | 0,0170 |
| Met | 0,0034 | 0,0033 | 0,0035 | 0,0034 | 0,0039 | 0,0037 | 0,0040 | | 0,0091 |
| Iso | 0,0229 | 0,0224 | 0,0226 | 0,0222 | 0,0230 | 0,0234 | 0,0224 | | 0,0116 |
| Leu | 0,0324 | 0,0317 | 0,0317 | 0,0319 | 0,0325 | 0,0325 | 0,0312 | | 0,0322 |
| Tyr | 0,0303 | 0,0302 | 0,0296 | 0,0305 | 0,0298 | 0,0301 | 0,0311 | | 0,0123 |
| Phe | 0,0172 | 0,0174 | 0,0179 | 0,0165 | 0,0173 | 0,0179 | 0,0170 | | 0,0179 |
| β-Ala | 0,0034 | 0,0029 | 0,0035 | 0,0037 | 0,0036 | 0,0030 | 0,0035 | | 0,0255 |
| Orn | 0,0684 | 0,0682 | 0,0682 | 0,0690 | 0,0686 | 0,0682 | 0,0684 | | 0,0780 |
| Lys | 0,0285 | 0,0287 | 0,0273 | 0,0281 | 0,0278 | 0,0282 | 0,0290 | | 0,0120 |
| Trp | 0,0071 | 0,0066 | 0,0073 | 0,008 | 0,0079 | 0,0072 | 0,0066 | | 0,0004 |
| His | 0,0804 | 0,0810 | 0,0810 | 0,0808 | 0,0800 | 0,0805 | 0,0806 | | 0,0917 |
| Arg | 0,0540 | 0,0533 | 0,0547 | 0,0547 | 0,0543 | 0,0546 | 0,0540 | | 0,0674 |

Tabla 2. Concentraciones aleatorias femeninas

| AA | Conc Fem Prom | C. F. A.1 | C. F. A. 2 | C. F. A. 3 | C. F. A. 4 | C. F. A. 5 | C. F. A. 6 | ... | C. F. A. 50 |
|-------|---------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|-------------|
| Thr | 0,2090 | 0,2103 | 0,2101 | 0,2107 | 0,2083 | 0,2096 | 0,2095 | | 0,2082 |
| Ser | 0,9840 | 0,9849 | 0,9853 | 0,9829 | 0,9842 | 0,9827 | 0,9828 | | 0,9846 |
| Glu | 0,1780 | 0,1783 | 0,1789 | 0,1794 | 0,1772 | 0,1762 | 0,1799 | | 0,1772 |
| Gly | 0,6463 | 0,6506 | 0,6461 | 0,6499 | 0,6459 | 0,6470 | 0,6457 | | 0,6456 |
| Ala | 0,3870 | 0,3880 | 0,3863 | 0,3864 | 0,3867 | 0,3862 | 0,3871 | | 0,3898 |
| Cit | 0,1967 | 0,1975 | 0,1958 | 0,1968 | 0,1970 | 0,1952 | 0,1985 | | 0,1988 |
| Asp | 0,1196 | 0,1211 | 0,1175 | 0,1192 | 0,1182 | 0,1196 | 0,1200 | | 0,1194 |
| Asn | 0,0380 | 0,0403 | 0,0382 | 0,0396 | 0,0397 | 0,0367 | 0,0394 | | 0,0384 |
| Gln | 0,0178 | 0,0172 | 0,0174 | 0,0176 | 0,0177 | 0,0199 | 0,0154 | | 0,0194 |
| Pro | 0,0728 | 0,0710 | 0,0725 | 0,0737 | 0,0738 | 0,0707 | 0,0723 | | 0,0716 |
| Val | 0,0919 | 0,0930 | 0,0907 | 0,0914 | 0,0914 | 0,0926 | 0,0918 | | 0,0901 |
| Cys | 0,0012 | 0,0010 | 0,0024 | 0,0006 | 0,0023 | 0,0026 | 0,0017 | | 0,0004 |
| Met | 0,0085 | 0,0086 | 0,0096 | 0,0078 | 0,0096 | 0,0096 | 0,0080 | | 0,0086 |
| Iso | 0,0494 | 0,0502 | 0,0521 | 0,0476 | 0,0488 | 0,0500 | 0,0490 | | 0,0491 |
| Leu | 0,0625 | 0,0626 | 0,0617 | 0,0631 | 0,0617 | 0,0633 | 0,0612 | | 0,0628 |
| Tyr | 0,0559 | 0,0569 | 0,0552 | 0,0576 | 0,0578 | 0,0550 | 0,0554 | | 0,0543 |
| Phe | 0,0378 | 0,0360 | 0,0366 | 0,0379 | 0,0365 | 0,0379 | 0,0364 | | 0,0369 |
| β-Ala | 0,0128 | 0,0132 | 0,0128 | 0,0142 | 0,0119 | 0,0122 | 0,0134 | | 0,0114 |
| Orn | 0,1361 | 0,1352 | 0,1356 | 0,1365 | 0,1367 | 0,1372 | 0,1371 | | 0,1361 |
| Lys | 0,0528 | 0,0529 | 0,0537 | 0,0518 | 0,0528 | 0,0524 | 0,0570 | | 0,0506 |
| Trp | 0,0151 | 0,0135 | 0,0145 | 0,0154 | 0,0168 | 0,0143 | 0,0127 | | 0,0147 |
| His | 0,1790 | 0,1786 | 0,1807 | 0,1770 | 0,1796 | 0,1795 | 0,1774 | | 0,1774 |
| Arg | 0,0948 | 0,0960 | 0,0957 | 0,0934 | 0,0960 | 0,0931 | 0,0945 | | 0,0960 |

Optimización espectroscópica y cinética

La optimización se abordó de forma sistemática, evaluando cada variable de forma independiente mientras se mantenían constantes las demás.

Espectros de absorbancia y λ_{max} : Se realizaron barridos completos (200-800 nm) para identificar la longitud de onda de máxima absorbancia para el complejo Púrpura de Ruhemann (ninhidrina) y la o-Dianisidina oxidada (enzimático). Como resultado de este experimento fueron escogidos el valor de $\lambda_{\text{max}}=436$ nm como la longitud de onda a la cual serían desarrollados todos los experimentos posteriores relacionados con la reacción enzimática el valor de $\lambda_{\text{max}}=570$ nm como la longitud de onda a la cual serían desarrollados todos los experimentos posteriores relacionados con la reacción cromática, pues a estas longitudes de onda, la solución coloreada formada durante el transcurso de la reacción absorbe la mayor cantidad de radiación proveniente de la fuente energizante del equipo.



Figura 1. Espectro uv-vis obtenido de la reacción enzimática

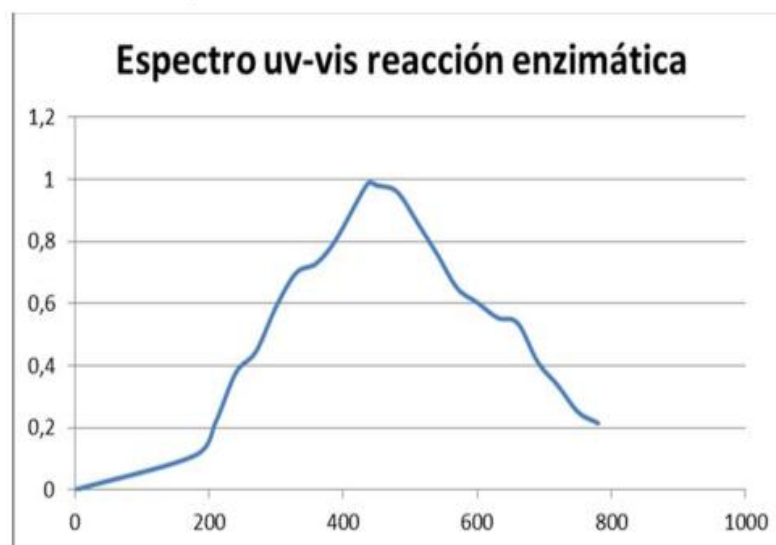
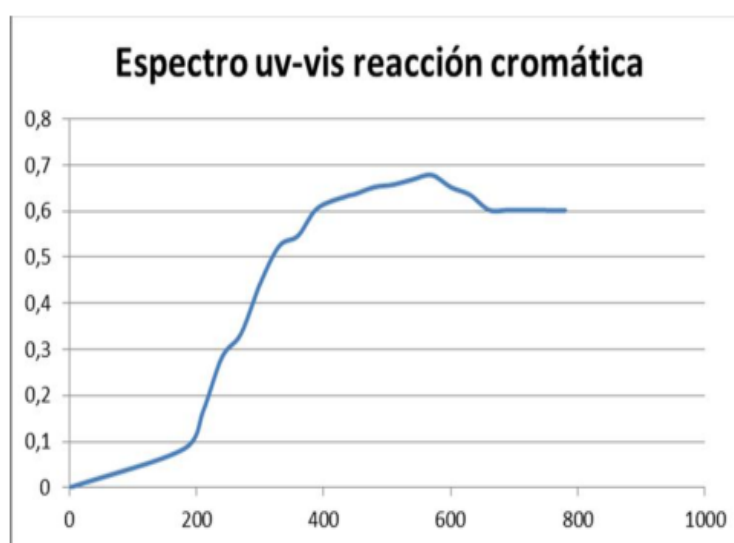
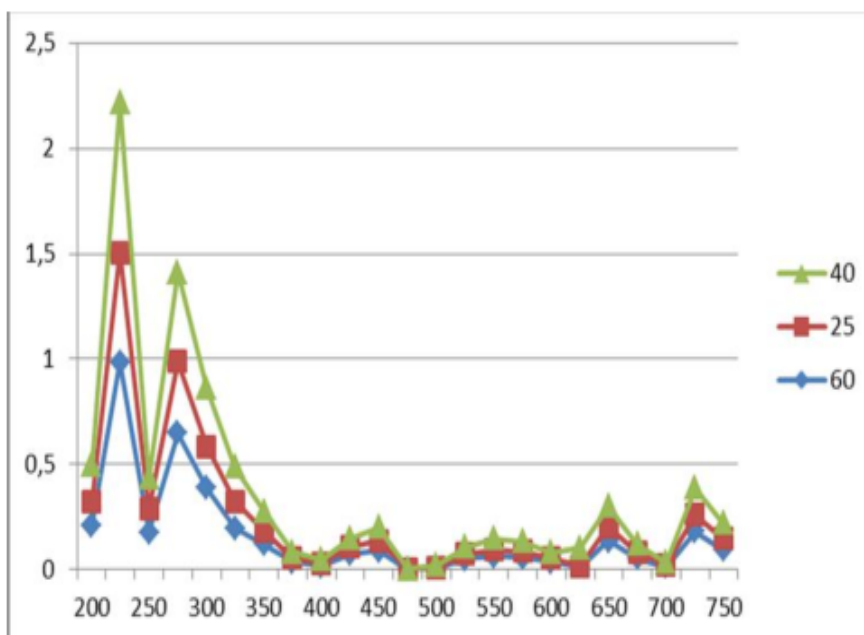


Figura 2. Espectro uv-vis obtenido de la reacción cromática



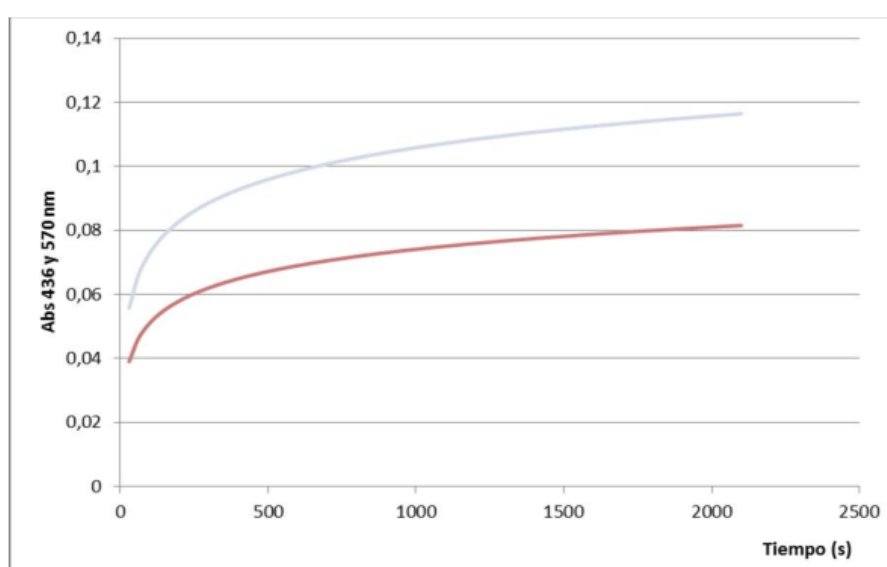
Temperatura de reacción: Se evaluó la eficiencia de la reacción a 25°C, 40°C y 60°C, monitoreando la absorbancia final y el tiempo para alcanzar el equilibrio. Al desarrollar ambas reacciones, teniendo en cuenta la influencia de la temperatura de reacción, se pudo comprobar que los mejores resultados se obtuvieron a 40°C. los experimentos realizados a temperatura de 60°C, muy superior a la temperatura corporal y a 25°C inferior a la fisiológica, no favorecen los procesos de solubilidad ni su determinación.

Figura 3. Influencia de la temperatura en la determinación.



Cinética de reacción: Se determinaron los tiempos de reacción óptimos monitorizando la absorbancia a λ_{max} hasta que la pendiente de la curva se estabilizara en cero ($\Delta A/\Delta t \approx 0$), indicando el agotamiento estequiométrico de los reactivos (aminoácidos extraídos del sudor). En el caso de la reacción enzimática resultó ser de 30 minutos, mientras que en la reacción cromática con ninhidrina resultó ser de 35 minutos.

Figura 4. Tiempo de reacción para ambas variantes: enzimática y cromática



Otros parámetros: Se optimizó la velocidad de barrido (50, 100, 1000 nm/min), la cual se fijó en 50nm/min y se seleccionaron celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico por su versatilidad espectral.

Protocolo de extracción de aminoácidos

Para el proceso de extracción de los aminoácidos presentes en el sudor simulado se utilizó una variante del protocolo desarrollado por (Halamek et al, 2015). Combinando temperaturas relativamente altas con un pH ácido, a la huella dérmica (levantada con cinta adhesiva de celulosa) se le adicionaron 120 µL de HCl 0.01 M, asegurando la cobertura completa de la impresión. El sistema se incubó a 40°C durante 20 min en un baño termostatzado. El extracto ácido se recuperó cuantitativamente mediante micropipeta para su análisis inmediato. Este protocolo aprovecha la hidrosolubilidad de los aminoácidos y su estabilidad en medio ácido, separándolos de la fracción lipídica insoluble.

Métodos de determinación de aminoácidos

Método enzimático en cascada: Se utilizó un buffer de Trietanolamina 0.1 M (pH 7.6). La reacción se inició con la adición de L-Aminoácido Oxidasa (L-AAO, Tipo IV, Sigma) y Horseradish Peroxidasa (HRP, Tipo IV, Sigma). El H₂O₂ generado por la L-AAO oxida la o-Dianisidina, catalizada por la HRP, produciendo un compuesto marrón-amarillento cuya absorbancia se midió a 436 nm. La reacción se desarrolló a 40°C durante 30 min.

Método colorimétrico con ninhidrina: El extracto se mezcló con una solución de ninhidrina al 2% (p/v) en etanol. La mezcla se calentó a 40°C durante 35 min, desarrollando el característico color violeta (Púrpura de Ruhemann) que se midió a 570 nm.

Para ambos métodos, se utilizó un espectrofotómetro Cintra 101 con software de adquisición de datos, empleando un blanco de reactivo para corregir la absorbancia de fondo.

Figura 5. determinación de los aminoácidos por el método enzimático

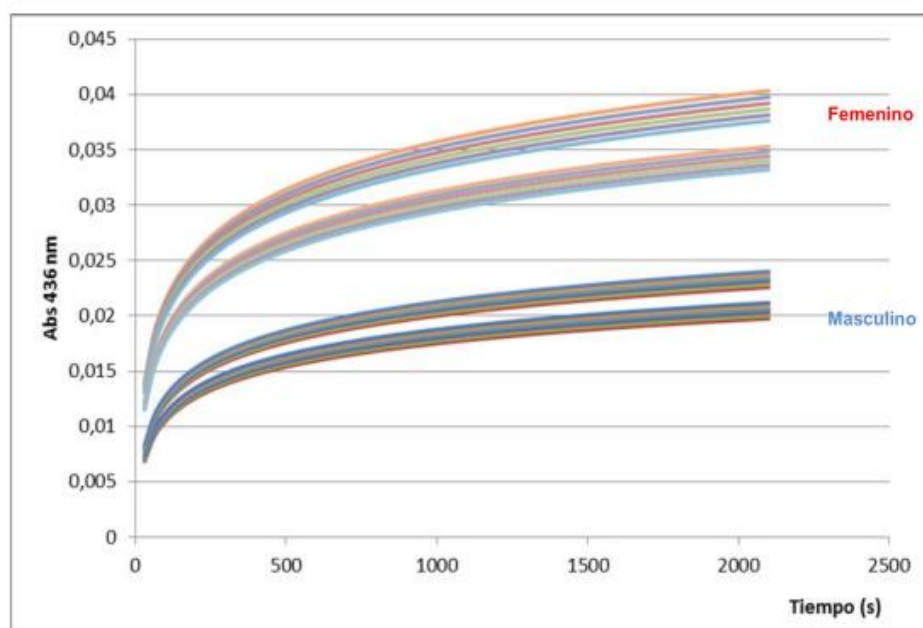
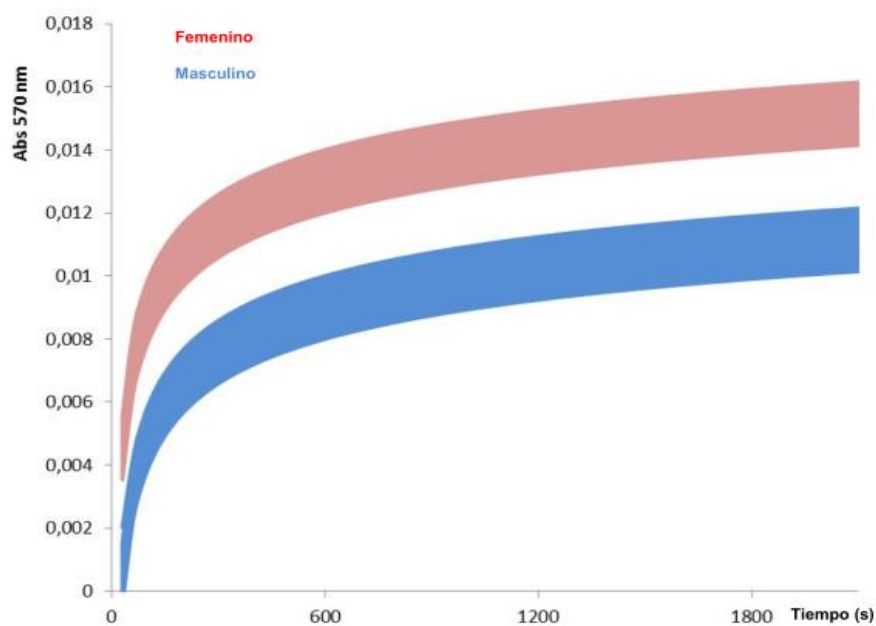


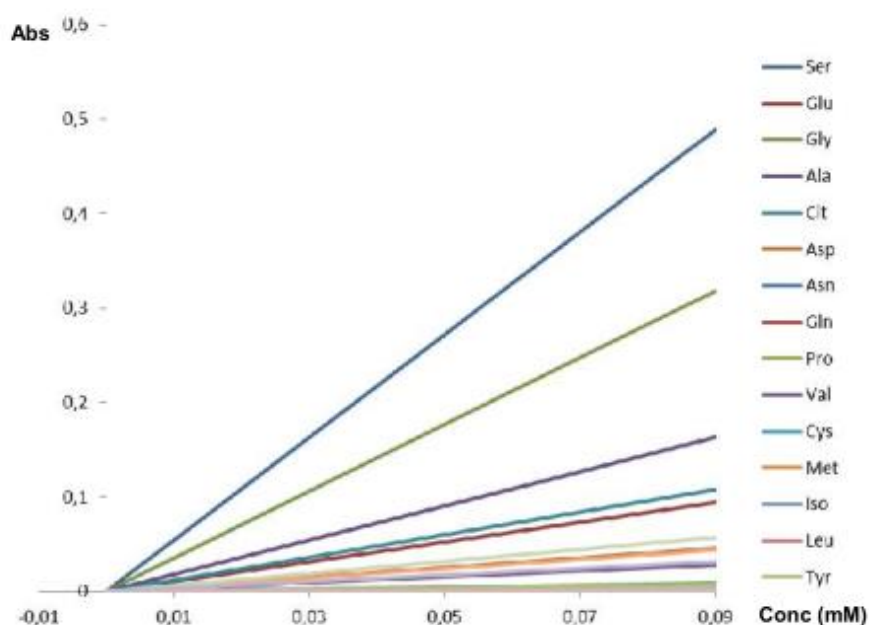
Figura 6. determinación de los aminoácidos por el método cromático



Validación del método analítico

La validación se realizó de acuerdo con los criterios de la Guía NC-TS-368:2004 y principios (ICH Q2(R1), 2005). Linealidad y rango: Se construyeron curvas de calibración para cada aminoácido patrón mediante regresión lineal por mínimos cuadrados. Se calculó el coeficiente de correlación (R^2) y se realizó un ANOVA de regresión. Este análisis estadístico demostró, que el comportamiento de cada aminoácido objeto de investigación, en el rango de concentraciones establecido, se puede explicar utilizando un modelo de distribución lineal. Se obtuvieron altos coeficientes de correlación, con valores entre 0,997 y 0,998.

Figura 7. Curva de calibración para los aminoácidos investigados



Exactitud y precisión: La exactitud se evaluó mediante la recuperación porcentual de patrones de aminoácidos añadidos a las muestras simuladas a tres niveles de concentración (bajo, medio, alto). La precisión se expresó como Coeficiente de Variación (CV%) para estudios de repetibilidad (mismo analista, mismo día) y reproducibilidad interna (diferentes analistas, diferentes días). Los valores del coeficiente de variación (CV) obtenidos en los experimentos de repetibilidad y reproducibilidad interna, se encuentran por debajo del 3 %, tanto para los patrones, como para las muestras, estos resultados obtenidos a estos niveles de concentración son considerablemente aceptables si tenemos en cuenta lo establecido en la NC-TS-368, 2004, donde se reporta una variación máxima permisible del 5 % para el análisis.



Análisis estadístico del poder discriminante

Para confirmar la capacidad de discriminar entre sexos, los datos de absorbancia de las 100 soluciones simuladas se sometieron a análisis de Varianza (ANOVA) de una vía para comparar las medias entre los grupos masculino y femenino. Como el P-Valor de la Prueba-F arrojó un valor mayor que 0,01, NO existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los valores de cada método, con un 99% de confiabilidad.

Prueba de *Kruskal-Wallis*, dada la naturaleza no paramétrica de los datos subyacentes, para comparar las medianas. Este estadígrafo también demostró que NO existen diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los valores de cada método, con un 99% de confiabilidad.

Prueba de rangos múltiples de Duncan para identificar grupos homogéneos y visualizar la separación entre los conjuntos de datos de ambos sexos. Los resultados mostraron claramente la semejanza existente entre ambos grupos de datos, correspondientes a ambos métodos. Se estableció un nivel de significancia de $\alpha=0.01$ para todas las pruebas.

Validación Operativa con Huellas Reales

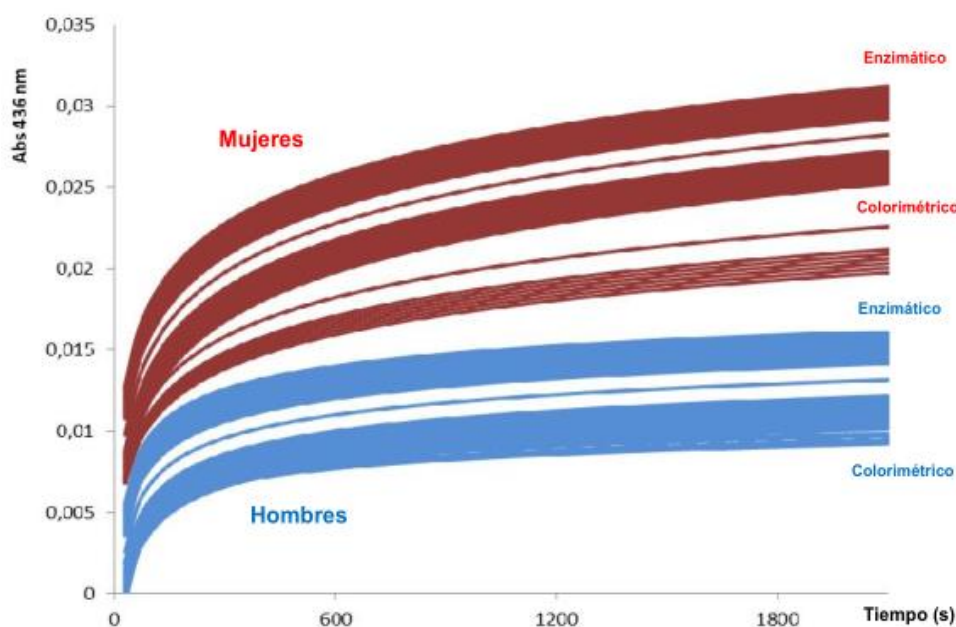
El estudio se dividió en dos fases:

1. Huellas experimentales (n=1800): Se recolectaron huellas de 100 donantes voluntarios (50H/50M, edades 15-64 años) en tres superficies (vidrio, metal, madera), reveladas con tres agentes físicos (negro de humo, polvo carmelita, polvo de aluminio). Se analizaron por sextuplicado. De esta manera se obtuvieron dieciocho (18) huellas por cada persona, para un total de mil ochocientas (1800) huellas. La mitad de ellas se emplearon en la realización del método enzimático y la otra mitad en el método colorimétrico. Al realizar un simple análisis de la gráfica, se puede observar claramente, como ambos métodos discriminan ambos sexos.

Al analizar más detalladamente los datos obtenidos, y mostrados en el gráfico, notamos la aparición de un valor añadido y con el cual no se contaba al inicio de la investigación. Este resultó ser la aparición, en la variante enzimática, de subgrupos con notables diferencias entre ellos y que coincidían, precisamente, a los grupos etarios correspondientes a la juventud (15-29 años), adultez (30-54 años) y vejez (55-64 años), respectivamente, con algunos valores intermedios. Estos resultados inesperados resultaron ser muy esperanzadores, pues además de la diferenciación genérica, indican que se puede establecer una diferenciación etaria; lo que les

imprime mayor significación a las determinaciones criminalísticas acerca del autor de una determinada huella dérmica.

Figura 8. Determinación de aminoácidos a partir de huellas reales de ambos sexos por ambos métodos.



Independientemente de la superficie empleada, la absorbancia, como variable dependiente en las determinaciones, mantuvo el mismo comportamiento que ya fue abordado anteriormente, para cada tipo de variante de análisis empleado. Es de señalar que la superficie sobre la que se obtuvieron los mejores resultados, expresados como la mayor concentración de aminoácidos extraídos, resultó el vidrio, seguido del metal y por último la madera. Los resultados de la absorbancia, como la medida de la concentración de aminoácidos presentes en el sudor, no muestran variación alguna respecto a lo que ya fue analizado. De este hecho se desprende que el empleo de los diferentes agentes reveladores estudiados, no tiene influencia significativa en las determinaciones.

2. Huellas reales de archivo (n=60): Se seleccionaron aleatoriamente huellas de casos criminalísticos resueltos, con identidad del productor conocida en la mitad de ellas, para una validación a ciegas. En un primer momento se trabajó con (30) huellas seleccionadas, el 96.6 % (29), arrojaron resultados positivos al determinar el sexo (24 masculinos y 5 femeninos), una vez aplicado el método propuesto en ambas variantes de ensayo.

Figura 9. Validación con huella reales conocidas



En un segundo momento se trabajó con igual número (30) de huellas reales, esta vez sin conocer el género de los sujetos huella productores; pues se encontraban en los archivos criminalísticos a la espera de patrones comparativos para su identificación. Una vez aplicado el método propuesto, se obtuvo como resultado que, de las 30 huellas, 27 correspondían al sexo masculino y 3 al sexo femenino. Referente a los grupos etarios, de las huellas correspondientes a mujeres, una (33%) pertenecía al grupo etario comprendido en la juventud (15-29 años) y las otras (66%) pertenecían a la adultez (30-54 años). En el caso de las huellas pertenecientes a hombres: 17 (63%) correspondían al segmento comprendido entre 15 y 29 años (juventud); 6 (22%) pertenecían al grupo enmarcado entre 30 y 54 años (adultez) y finalmente 4 (15%) arrojaron una edad entre 55 y 64 años (vejez).

Figura 10. Validación y clasificación de grupos etarios con huellas reales desconocidas



Resultados

Optimización y condiciones analíticas finales

El proceso de optimización reveló que la temperatura de 40°C es crítica, maximizando la solubilidad y reactividad de los aminoácidos sin inducir desnaturalización térmica. Los tiempos de reacción de 30 min (enzimático) y 35 min (colorimétrico) aseguraron el consumo completo del sustrato, alcanzando una meseta de absorbancia estable

Validación analítica rigurosa

Linealidad: Los modelos de regresión lineal mostraron $R^2 > 0.997$ para todos los aminoácidos investigados, con un p-valor del ANOVA de regresión < 0.0001 , confirmando una relación lineal altamente significativa en el rango de trabajo.

Precisión y exactitud: Los resultados de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad mostraron el cumplimiento de estas condiciones, los CV% fueron consistentemente inferiores al 1.5%, muy por debajo del umbral de aceptación del 5%. Los tests de comparación de medias (Student) y varianzas (Fisher) no mostraron diferencias significativas ($p > 0.01$) entre los valores de los patrones y las muestras, confirmando una excelente exactitud.

Discriminación de sexo y análisis estadístico

El análisis de los datos de las soluciones simuladas reveló una separación clara e inequívoca entre los sexos. La prueba de Kruskal-Wallis, apropiada para los datos de distribución no normal, arrojó un p-valor < 0.001 , rechazando la hipótesis nula de que las medianas son iguales. La prueba de rangos múltiples agrupó todas las muestras femeninas en un grupo homogéneo y todas las masculinas en otro, sin superposición. La concentración media de aminoácidos en las simulaciones femeninas fue un 98% mayor que en las masculinas.

Hallazgo adicional, diferenciación de grupos etarios

Un hallazgo no previsto inicialmente fue la capacidad del método enzimático para revelar subestructuras dentro de los datos de absorbancia, que se correlacionaron con los grupos etarios de los donantes (15-29, 30-54, 55-64 años). Esta estratificación, probablemente vinculada a cambios metabólicos y hormonales asociados a la edad, no fue observable con la misma resolución en el método colorimétrico, sugiriendo una mayor especificidad del sistema enzimático.

Validación operativa y robustez

La aplicación a huellas experimentales y reales confirmó la robustez de los métodos. En la validación a ciegas con 30 huellas reales, se obtuvo una eficacia del 96.6% (29/30 aciertos). El único falso negativo se asoció a una huella levantada en papel, un soporte poroso que puede retener irreversiblemente los analitos. Críticamente, el ANOVA de dos vías no mostró interacciones significativas entre el sexo y el tipo de superficie ($p = 0.87$) o entre el sexo y el agente revelador ($p = 0.92$), demostrando que estas variables operativas no comprometen la integridad de la determinación.

Discusión

Este estudio trasciende la mera propuesta de un método alternativo; valida científica y estadísticamente una herramienta operativa robusta para un problema criminalístico real. La elección de una simulación estocástica basada en una distribución log-normal para generar las muestras es un punto fuerte metodológico, ya que incorpora la variabilidad biológica real en la fase de desarrollo, haciendo la validación más representativa y robusta (Miller y Miller, 2010).

La superioridad del método enzimático frente al colorimétrico es consistente con la literatura bioquímica. La cascada enzimática (L-AAO/HRP) es inherentemente más específica para los L- α -aminoácidos, evitando potenciales interferencias de otros compuestos amino que podrían reaccionar inespecíficamente con la ninhidrina (Halamek et al, 2015; Friedman, 2004). Además, la capacidad del método enzimático para discriminar grupos etarios es un hallazgo de alto impacto. Esto sugiere que el sistema no solo responde a la concentración total de aminoácidos, sino posiblemente a cambios sutiles en el perfil relativo de aminoácidos específicos a lo largo de la vida, un aspecto que merece una investigación metabolómica más profunda.

La independencia de los resultados frente al agente revelador físico es fundamental. Confirma que la interacción polvo-residuo es predominantemente mecánica y no química, preservando la integridad de los aminoácidos para su posterior análisis. Esto convierte a la metodología en una técnica "no destructiva" de segunda instancia, perfectamente integrable en el flujo de trabajo criminalístico estándar.

La única limitación identificada, la reducida eficacia en soportes porosos como el papel, es coherente con los principios de la retención analítica. En estos sustratos, los aminoácidos

pueden quedar adsorbidos en la matriz de fibras, siendo inaccesibles para el protocolo de extracción acuoso. Futuras investigaciones podrían explorar modificaciones al protocolo de extracción (uso de surfactantes, sonicación) para superar esta limitación.

Al situar nuestros resultados en el contexto criminalístico más amplio, la implicación práctica es profunda. Esta metodología no compite con la genética o la espectrometría de masas en precisión identificativa, sino que opera en un espacio complementario: el del diagnóstico operativo rápido y descentralizado. Proporciona al investigador en el terreno una respuesta química fiable sobre el sexo (y potencialmente la edad) del sospechoso en cuestión de horas, utilizando infraestructura preexistente y a un costo mínimo. Esto puede redefinir las estrategias de investigación en las primeras 48-72 horas, el período más crítico para el esclarecimiento de un hecho delictivo.

CONCLUSIONES

- La metodología de trabajo propuesta demostró que es posible diferenciar el sexo del donante de una huella dérmica a partir del estudio de su contenido aminoacídico, mediante los métodos de enzimático y cromático, acoplado a la espectrofotometría uv-vis, con un 99 % de confiabilidad.
- Las superficies receptoras vidrio, metal y maderas, así como el uso de agentes reveladores como negro de humo, polvo carmelita y polvo de aluminio, no mostraron una intervención estadísticamente significativa en los resultados de diferenciación genérica.
- La conjugación bioquímica del método enzimático predijo poder diferenciar el sexo del productor de una huella dérmica e incluso establecer una diferenciación etaria, basada posiblemente como una respuesta a los sutiles cambios en el perfil de los aminoácidos a lo largo de la vida.
- El desarrollo de la investigación permite fortalecer el marco teórico relacionado con las investigaciones criminalísticas de las huellas dérmicas, a las cuales se les podrá extraer información más allá de las asociadas a la identidad.

Referencias Bibliográficas

- Barr, M. L. & Bertram, E. G. (1949). A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*, 163(4148), 676-677. <https://doi.org/10.1038/163676a0>
- Butler, J. M. (2012). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-66251-0>
- Ferguson, L. S., Wulfert, F., Wolstenholme, R., Fonville, J. M., Clench, M. R., Carolan, V. A., & Francese, S. (2012). Direct detection of peptides and small proteins in fingerprints and determination of sex by MALDI mass spectrometry profiling. *The Analyst*, 137(20), 4686–4692. <https://doi.org/10.1039/c2an36074h>
- Friedman, M. (2004). Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 385-406. <https://doi.org/10.1021/jf030490p>
- Girod, A., Ramotowski, R., & Weyermann, C. (2012). Composition of fingerprint residue: A qualitative and quantitative review. *Forensic Sci Int*, 223(1-3), 10-24. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.05.018>.
- Haahti, E., & Maibach, H. I. (1963). Free amino acids of human eccrine sweat. *Journal of Investigative Dermatology*, 41(4), 259-263. <https://doi.org/10.1038/jid.1963.95>
- Hadorn, B., Hanimann, F., Anders, P., Curtius, H. C., & Halverson, R. (1967). Free amino-acids in human sweat from different parts of the body. *Nature*, 215(5099), 416-417. <https://doi.org/10.1038/215416a0>
- Huynh, C., Brunelle, E., Halámková, L., Agudelo, J., & Halamek J. (2015). Forensic Identification of Gender from Fingerprints. *J Anal Chem*, 87(22), 11531–11536. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03323>
- International Council Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2005). ICH harmonised tripartite guideline Q2(R1): *Validation of analytical procedures: Text and Methodology*. Geneva: ICH

- Legrá Correa, R. R. (2020). *Metodología para la determinación químico criminalística del sexo a partir de huellas dérmicas*. (Tesis Doctora), Ministerio del Interior.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (6th ed.). Pearson Education.
- Posada, J. A. (2015). *Teoría Criminalística de las Huellas*. Ed. Capitán San Luis. La Habana.
- Ramotowski, R. S. (2013). *Lee and Gaensslen's Advances in Fingerprint Technology* (3rd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b12882>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9th ed.). Cengage Learning.