



4



mercedes.alvarez  
@actumforense.es

#### Historia del artículo:

Recibido: 10/10/2025  
Corregido: 30/10/2025  
Aceptado: 8/11/2025  
Publicado: 30/11/2025

#### Contribución de Autoría:

**Autor 1:** M. Carmen  
Ferrer Gómez.

Conceptualización,  
metodología, análisis,  
redacción, revisión,  
supervisión.

**Autor 2:** Beatriz  
Fernández Mata.

Análisis, redacción,  
revisión

**Autor 3:** Mercedes  
Álvarez Seguí.

Conceptualización,  
metodología, análisis,

## DELITOS CONTRA LA LIBERTAD SEXUAL: BUENAS PRÁCTICAS EN EL TRATAMIENTO FORENSE DE INDICIOS BIOLÓGICOS

Álvarez Seguí, M<sup>1</sup>, Fernández Mata, B<sup>2</sup>  
y Ferrer Gómez, MC.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Médico Forense. Jefa del Servicio de Laboratorio. Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Valencia. Criminóloga.

<sup>2</sup>Médico Forense. Servicio de Información Toxicológica. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, Madrid.

<sup>3</sup>Médico Forense. Jefa del Servicio de Clínica. Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Valencia. Criminóloga.

### Resumen

La investigación forense en delitos sexuales representa un ámbito altamente sensible que exige un enfoque técnico riguroso y ético. Estos delitos provocan un impacto profundo en las víctimas y plantean desafíos complejos para los peritos, quienes deben identificar, recoger y preservar indicios biológicos clave, aun cuando el ADN no sea detectable.

Los estudios preliminares -como la detección de fosfatasa ácida, proteína seminal P-30 y la tinción de Árbol de Navidad- entre otras, son fundamentales para confirmar la presencia de semen, guiando eficazmente la posterior extracción de ADN. Estas técnicas pueden aportar pruebas válidas incluso cuando no se obtiene un perfil genético completo, lo cual tiene gran valor probatorio en los tribunales.

El proceso forense abarca varias fases críticas: la toma cuidadosa de muestras en cavidades anatómicas y prendas, el secado y embalaje adecuados (en sobres de papel y no plásticos), el registro detallado en la cadena de custodia, y la toma de muestras de referencia de la víctima y el sospechoso. La integridad de este procedimiento afecta directamente la calidad del material genético recuperado.

En el laboratorio, se selecciona el método de extracción de ADN más adecuado según el tipo y estado de la muestra, usando desde columnas de



**Conflicto intereses:**

Las autoras declaran no tener ningún tipo de conflicto de intereses.

**Fuentes de financiación:**

Las autoras declaran la ausencia de financiación

**Cómo citar este artículo:**

Álvarez Seguí, M.,  
Fernández Mata, B. y  
Ferrer Gómez, M.C.  
(2025). Delitos contra la  
libertad sexual: Buenas

sílice hasta fenol-cloroformo para casos complejos, aunque hoy en día, la extracción automática de ADN está presente en prácticamente todos los laboratorios de genética forense. En todos los casos, se incluyen controles para asegurar resultados fiables y evitar contaminaciones.

Desde el punto de vista jurídico, los tribunales españoles y otros internacionales, han reconocido que la evidencia presuntiva basada en metodologías científicas válidas puede fundamentar una condena, especialmente cuando se presenta junto con otros elementos como el testimonio de la víctima.

En conclusión, los estudios preliminares no solo optimizan la extracción de ADN, sino que también constituyen evidencia valiosa por sí mismos.

Es indispensable reforzar la capacitación técnica, invertir en tecnología molecular y mantener protocolos interinstitucionales fuertes que aseguren una justicia efectiva con perspectiva de género y base científica.

**Palabras Clave:** Delitos sexuales, evidencia biológica, cadena de custodia, pruebas presuntivas.

**Abstrac**

Forensic investigation in sexual offence cases is a highly sensitive and complex field that demands strict technical and ethical standards. These crimes have a profound impact on victims and present significant challenges for forensic experts, who must identify, collect, and preserve biological evidence, even when DNA is not detectable.

Preliminary tests -such as the detection of acid phosphatase, seminal protein P-30, and the Christmas Tree stain technique- are essential to confirm the presence of semen or other biological fluids. These techniques can provide valid evidence even in the absence of a complete genetic profile, offering high probative value in court proceedings. The forensic process Involves several critical stages: careful collection of samples from anatomical cavities and clothing, proper drying and packaging (in paper envelopes rather than plastic to avoid microbial degradation), detailed documentation through the chain of custody, and the collection of reference samples from both the victim and the suspect. The integrity of these procedures directly affects the quality and viability of the recovered genetic material.

In the laboratory, the choice of DNA extraction method depends on the type and condition of the sample. High-quality samples such as dried blood or saliva can be processed using silica columns or ion exchange resins, while degraded or mixed samples may require organic extraction



prácticas en el  
tratamiento forense de  
indicios biológicos.  
Actum Forense.

with phenol-chloroform or specialized commercial kits. Each extraction includes positive and negative controls to ensure reliability and prevent contamination.

Legally, courts have recognized that scientifically validated presumptive evidence may be sufficient to support a conviction, especially when combined with other elements such as victim testimony and narrative consistency.

In conclusion, preliminary forensic tests are indispensable not only for guiding DNA extraction but also as standalone evidence. Strengthening technical training, investing in molecular technologies, and maintaining robust interinstitutional protocols are essential for ensuring justice in sexual violence cases, with both scientific rigor and a gender-sensitive approach.

**Keywords:** Sexual offences, biological evidence, chain of custody, presumptive tests.

## Introducción

La investigación forense en delitos sexuales constituye un área de especial sensibilidad y complejidad, tanto desde el punto de vista científico como legal. Los delitos contra la libertad sexual generan un profundo impacto en las víctimas y presentan grandes desafíos técnicos para los peritos forenses, quienes deben identificar, recoger y custodiar las muestras biológica con el máximo rigor técnico y ético. Dentro de este proceso, los estudios preliminares adquieren una relevancia crucial, ya que permiten orientar adecuadamente la aplicación de técnicas posteriores, como la extracción de ADN, y establecer indicios de alto valor probatorio aun en ausencia de perfiles genéticos completos o concluyentes.

En el contexto forense, los indicios biológicos -como restos de semen, sangre, saliva o células epiteliales...- constituyen elementos materiales de prueba fundamentales, capaces de vincular al agresor con la víctima o con el lugar del hecho (Li, 2008; Prieto, 2007). Sin embargo, no todas las muestras biológicas recogidas contienen ADN útil o detectable, debido a factores como el tiempo transcurrido desde la agresión, las condiciones ambientales, las características fisiológicas del agresor (por ejemplo, azoospermia) o la degradación natural de los tejidos (Hochmeister, 1999; Behre y Nieschlag, 2000).



Por ello, los análisis presuntivos y confirmatorios previos a la extracción de ADN, como la detección de fosfatasa ácida, proteína seminal P-30 o la observación microscópica de espermatozoides mediante la tinción de Árbol de Navidad, entre otras, resultan indispensables. Estos métodos permiten determinar la presencia de semen u otros fluidos biológicos incluso cuando el ADN del agresor no está presente en cantidades detectables (Prieto, 2007; Li, 2008).

Además, los estudios preliminares guían al perito en la selección de la técnica de extracción de ADN más adecuada, ya que diferentes tipos de muestras (sangre seca, semen degradado, células epiteliales) requieren métodos de extracción específicos, como fenol-cloroformo, columnas de sílice, resinas de intercambio iónico o programas específicos en las extracciones automáticas, dependiendo del tipo de matriz biológica y del grado de degradación (Budowle et al., 2003; Butler, 2010).

Desde el punto de vista jurídico, estos hallazgos también tienen un peso relevante. En este sentido, una prueba positiva a espermatozoides en la víctima o en la escena, aun sin ADN foráneo detectable, puede ser suficiente para que un tribunal fundamente una sentencia condenatoria, especialmente si se encuentra acompañada de otros elementos de prueba, como el testimonio de la víctima y la coherencia de la narrativa (Benton, Donahue y Valdez, 1998; Prieto, 2007; Serological Research Institute, 2009).

De acuerdo con estudios de campo está documentado que, en casos de violación a menores, el hallazgo de espermatozoides en hisopos anales o vaginales, junto con la detección de otros fluidos biológicos pertenecientes a la víctima en la ropa interior del sospechoso, ha sido determinante para la emisión de sentencias condenatorias incluso antes de que se completaran los perfiles de ADN (Mbogori et al., 2006; Li, 2008).

Esto resalta la importancia de mantener protocolos rigurosos y disponer de un sistema de gestión de calidad y acreditación según la norma ISO 17025, tanto para la documentación como para la sistemática analítica de todos los indicios, desde la recogida inicial hasta el procesamiento en laboratorio y emisión de los informes preliminares y/o definitivos.

### **Sistemática de la investigación**



La investigación forense en delitos sexuales requiere una metodología rigurosa que garantice la integridad, trazabilidad y confiabilidad de los indicios biológicos recogidos. Para ello, es necesario que se sigan protocolos estandarizados tanto en la recogida de muestras en el lugar de los hechos como en el procesamiento y análisis de las mismas en el laboratorio. A continuación, se detallan las principales fases de este proceso, incluyendo los procedimientos preliminares, el manejo de muestras, los controles de calidad y las técnicas de análisis molecular aplicadas.

### ***Recogida y embalaje de indicios biológicos***

Durante la intervención médico-forense y/o criminalística, se recogen muestras biológicas de las cavidades anatómicas de la víctima (vaginal, anal y oral), así como de otras superficies corporales o elementos del entorno que puedan contener material genético del agresor. Se utilizan hisopos estériles de algodón o Dacron para cada región evaluada.

Por protocolo, se toman tres hisopos por cavidad: uno para análisis de semen, otro para análisis de ADN y un tercero de reserva o control (California Commission on Peace Officer Standards and Training, 1999). Posteriormente, los hisopos pueden secarse al aire durante al menos 30 minutos, evitando la exposición directa a fuentes de calor o luz solar, lo cual podría degradar el ADN, o bien congelarse hasta el momento de su procesamiento para los análisis correspondientes. Una vez secos en el caso de que se opte por el secado, los hisopos son introducidos en sobres de papel -nuevos y limpios- identificados individualmente, con información del caso, fecha, hora y persona responsable de la recogida de muestras (Paredes, 1988).

Además de los hisopados, se recoge la ropa interior de la víctima, así como otras prendas o textiles que, de acuerdo con el relato de los hechos, puedan contener fluidos biológicos (semen, sangre, saliva, orina...). Cada prenda se embala por separado en bolsas de papel, nunca en bolsas plásticas, para evitar la proliferación de microorganismos que puedan comprometer el material biológico (Jiménez, 2004).

En caso de encontrar preservativos, estos deben manipularse lo menos posible. Se anudan cuidadosamente para evitar derrame del contenido, se embalan en bolsas de papel y se conservan en condiciones ambientales



secas (Paredes, 1988). Todos los indicios son rotulados y documentados en los formularios correspondientes de cadena de custodia.

Para llevar a cabo comparaciones genéticas, se requiere obtener muestras biológicas de referencia de la víctima y del presunto agresor. La muestra más utilizada es la sangre capilar fijada en tarjetas FTA (Flinders Technology Associates), que permiten conservar el ADN a temperatura ambiente por largos períodos, protegiéndolo de la degradación por nucleasas, microorganismos y humedad (Mbogori et al., 2006). Se colocan al menos dos gotas de sangre por tarjeta, y se deja secar antes del almacenamiento.

De manera alternativa, se utilizan hisopados bucales para obtener células epiteliales de la mucosa oral. El hisopo es frotado firmemente en el interior de la mejilla durante 30 segundos y luego transferido a la tarjeta FTA o almacenado en tubo estéril (Butler, 2010).

En nuestro instituto se emplean kits específicos para la recogida de vestigios biológicos en escenas del delito y para la toma de muestras de referencia tanto de víctimas como de personas investigadas. Estos kits incluyen hisopos flocados de fibra de nailon, alojados en tubos con sistema de autosecado, lo que garantiza la adecuada conservación del material biológico.

Los hisopos están certificados conforme a la norma ISO 18385, que establece los requisitos para minimizar el riesgo de contaminación en análisis de ADN (ISO, 2016). Además, cada kit se acompaña de los formularios oficiales elaborados por la Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN (CNUFADN), cuyo cumplimiento es obligatorio en el caso de muestras de referencia (Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN, 2019).

#### ***Cadena de custodia: principios y aplicación***

La cadena de custodia constituye el conjunto de procedimientos destinados a garantizar la integridad y trazabilidad de las evidencias desde su recogida en la escena del delito hasta su presentación en sede judicial. Cada transferencia debe documentarse mediante registros que incluyan la fecha, la hora, la identidad del responsable y las condiciones de almacenamiento (Instituto Nacional de Ciencias Penales, 2012; IMF Smart Education, 2023).



Un error en la cadena de custodia puede comprometer la validez de la prueba, por lo que se recomienda aplicar medidas estrictas como:

- Uso de embalajes sellados y etiquetados para evitar manipulaciones indebidas.
- Registro detallado en formularios oficiales, siguiendo protocolos normalizados.
- Almacenamiento en condiciones controladas, preservando la integridad del material biológico.

Estas prácticas están recogidas en protocolos internacionales y nacionales (GHEP-ISFG, 2000; Zadorov López, 2002) y son esenciales para garantizar la fiabilidad científica y jurídica de los análisis forenses de ADN.

El cumplimiento de normas como ISO 18385, que establece requisitos para minimizar la contaminación en productos utilizados en genética forense, y las directrices de la Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN (CNUFADN) refuerza la calidad del proceso (ISO, 2016; Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN, 2019).

Todos los indicios recogidos se gestionan bajo un sistema estricto de cadena de custodia que incluye aspectos documentales y procesales. El registro documental debe contener la descripción del indicio, el lugar de recogida, los datos del perito actuante, la autoridad judicial solicitante y la firma de todas las personas que hayan tenido posesión del mismo.

En cuanto al aspecto procesal, se recomienda el marcado físico del indicio con las iniciales del perito, en un área que no interfiera con los análisis posteriores (Milena, 2009).

El incumplimiento de estos protocolos puede invalidar los resultados periciales ante un tribunal, por lo que el control de trazabilidad es indispensable desde el levantamiento hasta la entrega de resultados (Marchal González, 2023; Solórzano Villar, 2022).

### ***Estudios preliminares en el laboratorio***

En el ámbito de la genética forense, uno de los primeros pasos en el análisis de una evidencia biológica consiste en determinar la naturaleza del fluido presente en la escena del crimen. Esta información no solo



orienta la investigación, sino que también puede establecer vínculos temporales y espaciales entre víctimas, agresores y objetos (Butler, 2021). Por ejemplo, no es lo mismo encontrar sangre en una prenda que semen, saliva o leche materna, ya que cada uno de estos fluidos puede sugerir un tipo de delito diferente o una interacción específica.

Para ello, los laboratorios forenses han desarrollado y adoptado técnicas presuntivas y confirmatorias que permiten identificar con precisión el fluido presente en una muestra (Prieto, 2007; Benton et al., 1998).

#### a) Pruebas presuntivas

Las pruebas presuntivas indican la posible presencia de un fluido biológico, aunque no ofrecen certeza absoluta. Su ventaja radica en la rapidez, bajo coste y aplicabilidad directa en el lugar de los hechos (Serological Research Institute, 2009).

- Sangre: Se emplean pruebas basadas en la actividad peroxidasa de la hemoglobina, como Kastle-Meyer (fenolftaleína) o luminol, que emite luz al reaccionar con rastros sanguíneos incluso degradados. Kits como Hexagon OBTI® permiten detectar hemoglobina humana mediante inmunoensayo rápido (Butler, 2021).
- Semen: Se utiliza la prueba de fosfatasa ácida, altamente presente en el líquido seminal, y la visualización con luz ultravioleta. Kits como SERATEC® PSA Semiquant y ABACard® p30 detectan antígenos específicos del semen (Benton et al., 1998).
- Saliva: Se identifica por su alto contenido de  $\alpha$ -amilasa, aunque se confirma con kits como RSID™-Saliva, que detectan la forma humana mediante inmunocromatografía (Prieto, 2007).

#### b) Pruebas confirmatorias

Estas pruebas certifican con alta especificidad el tipo de fluido analizado. Para sangre, se emplean reacciones de cristalización (Takayama, Teichmann), análisis espectrofotométrico y técnicas moleculares como RT-PCR. En semen, se detectan genes como semenogelina o protamina 2. Para saliva, fluido vaginal y leche materna, se utilizan marcadores específicos (HTN3, hBD1, CSN2) mediante RT-qPCR (Butler, 2021). Para diagnóstico de semen apreciar espermatozoides a microscopio es la prueba de certeza por excelencia.

Entre las técnicas más recientes nos encontramos con:



- mRNA profiling que permite identificar múltiples fluidos en una sola reacción (Kukucka et al., 2020).
- Proteómica forense que detecta proteínas exclusivas mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS).
- Epigenética que analiza patrones de metilación del ADN para diferenciar fluidos (Vidaki & Kayser, 2018).
- Microbioma que estudia microorganismos característicos de cada fluido, útil en casos complejos (Schmedes et al., 2019).

El procedimiento general sigue una secuencia estructurada: muestreo con hisopos estériles, pruebas presuntivas, confirmatorias y, si procede, extracción de ADN para individualización, siempre bajo estricta cadena de custodia (Marchal González, 2023).

### Discusión

Las pruebas presuntivas y confirmatorias permiten detectar la presencia de fluidos biológicos incluso en condiciones adversas de conservación o tiempo prolongado desde el hecho delictivo, lo cual constituye una ventaja significativa ante la posibilidad de que el ADN foráneo no pueda ser recuperado.

Estudios previos han demostrado que la detección de la proteína seminal P-30 y de espermatozoides mediante técnicas histoquímicas tiene una alta especificidad y valor forense, pudiendo constituir evidencia probatoria válida incluso sin perfil genético. Especialmente con la visión de espermatozoides a microscopía óptica (Benton et al., 1998; Prieto, 2007).

Además, estos estudios permiten optimizar el uso de recursos, seleccionando aquellas muestras más prometedoras para la extracción de ADN, y descartando aquellas que no contienen indicios relevantes.

La posibilidad de lograr perfiles genéticos completos está fuertemente influida por el tipo de muestra, su estado de conservación, y el tiempo transcurrido desde la agresión. En los casos analizados, el éxito fue mayor en muestras frescas, secadas y almacenadas adecuadamente, lo cual enfatiza la necesidad de capacitación constante en buenas prácticas de recolección y embalaje para personal policial y sanitario.

Por otro lado, es importante destacar el creciente reconocimiento de los



tribunales a la evidencia presuntiva y no solo genética. Tal como lo establecen los principios de libertad probatoria y valoración conjunta del material de prueba, una pericia que demuestre la presencia de semen en el cuerpo o ropa de la víctima, cuando está sustentada en una metodología científica validada, puede ser suficiente para motivar una condena penal (CIDH, 2022; Milena, 2009).

### Conclusiones

Los estudios preliminares constituyen una herramienta indispensable en la investigación de delitos sexuales, tanto por su capacidad para orientar la extracción de ADN como por su valor probatorio independiente.

La aplicación combinada de pruebas presuntivas (fosfatasa ácida, PSA) y confirmatorias (tinción de Árbol de Navidad) permite detectar la presencia de semen incluso cuando el ADN no puede ser recuperado. El cumplimiento riguroso de los protocolos de recolección, secado, embalaje y cadena de custodia impacta directamente en la calidad del material genético recuperado.

La evidencia presuntiva adquiere especial relevancia cuando se encuentra integrada con otros elementos de prueba, y puede ser suficiente para fundamentar una sentencia condenatoria, especialmente en contextos de violencia sexual intrafamiliar o en menores.

Es fundamental continuar promoviendo la capacitación técnico-pericial, la inversión en tecnologías moleculares y el fortalecimiento de protocolos interinstitucionales para garantizar el acceso a justicia con enfoque científico y con perspectiva de género.

### Referencias

Behre, H. M. y Nieschlag, E. (2000). *Andrology: Male reproductive health and dysfunction*. Springer-Verlag.

Benton, C., Donahue, G. A. y Valdez, L. A. (1998). Evaluation of the ABACard® PSA test kit for the forensic identification of semen. *Journal of Forensic Sciences*, 43(2), 179-183.

Benton, D., et al. (1998). Detection of seminal fluid proteins in forensic samples. *Journal of Forensic Sciences*, 43(5), 1007-1013.



- Butler, J. M. (2010). Fundamentals of forensic DNA typing. Academic Press.
- Butler, J. M. (2021). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Academic Press.
- Budowle, B., Moretti, T. R., Niezgoda, S. J. y Brown, B. L. (2003). CODIS and PCR-based short tandem repeat loci: Law enforcement tools. Forensic Science Communications, 5(2).
- California Commission on Peace Officer Standards and Training. (1999). Sexual Assault Response Guidelines.
- Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN. (2019). Guía para el uso forense del ADN. Ministerio de Justicia. Recuperado de <https://www.mjusticia.gob.es>
- GHEP-ISFG. (2000). Recomendaciones para la recogida de vestigios biológicos en la práctica forense. Sociedad Internacional de Genética Forense. Recuperado de <https://1library.co/article/protocolos-recogida-vestigios-pr%C3%A1ctica-forense.q2nnepeq>
- Hochmeister, M. N. (1999). Successful DNA typing of semen samples from postcoital vaginal swabs with the use of a new lysis buffer. Journal of Forensic Sciences, 44(5), 857–860.
- IMF Smart Education. (2021). Recogida, remisión y conservación de vestigios biológicos: cadena de custodia. Universidad de Los Hemisferios. Recuperado de <https://www.studocu.com/ec/document/universidad-de-los-hemisferios/criminalistica/recogida-remision-y-conservacion-de-vestigios-biologicos-cadena-de-custodia/145425480>
- Jiménez, L. (2004). Protocolos en investigación criminal. Instituto de Formación Profesional.
- Kukucka, M. A., et al. (2020). mRNA profiling for body fluid identification in forensic science. Forensic Science International: Genetics, 46, 102259.



- Li, R. (2008). Forensic Biology (2nd ed.). CRC Press.
- Marchal González, A. N. (2023). La cadena de custodia y su impacto en el proceso judicial. *Via Iuris*, (35), 214-251.
- Milena, A. (2009). Cadena de custodia: fundamentos y aplicación en el proceso penal. Editorial Jurídica.
- Mbogori, T. N., Kimani, J., Kuria, D., Lagat, A., y Danson, J. (2006). Use of FTA cards for collection and storage of buccal cell DNA for genetic analysis in forensic studies. *African Journal of Health Sciences*, 13(1), 1-9.
- Orden JUS/1291/2010, de 13 de mayo, por la que se aprueban las normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, BOE núm. 122, 830 (2010).
- Organización Internacional de Normalización. (2016). Forensic science. Minimizing the risk of human DNA contamination in products used to collect, store and analyze biological material (ISO 18385:2016). ISO. Recuperado de <https://www.iso.org/standard/62353.html>
- Prieto, V. (2007). Manual de biología forense. INACIF.
- Prieto, J. (2007). Manual de técnicas forenses para la identificación de fluidos biológicos. Madrid: Ministerio de Justicia.
- Schmedes, S. E., et al. (2019). Microbiome-based body fluid identification in forensic science. *Forensic Science International: Genetics*, 38, 1-8.
- Serological Research Institute. (2009). Forensic serology protocols. California: SRI.
- Serological Research Institute. (2009). Staining protocol: Christmas Tree stain. [www.serological.com](http://www.serological.com)
- Vidaki, A., & Kayser, M. (2018). Recent advances in forensic epigenetics.



Forensic Science International: Genetics, 37, 180–195.

Zadorov López, H. (2002). Guía metodológica para el levantamiento de indicios biológicos. Procuraduría General de la República.

Recuperado de

<http://fgjem.edomex.gob.mx/sites/fgjem.edomex.gob.mx/files/files/SeguridadDelincuencia/JornadaCriminalistica/guia%20metodologica.pdf>