

RELEVANCIA DE LAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS EN LA IDENTIFICACIÓN FORENSE DE MANCHAS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS EN SUSTRATOS

Cristina Cano-Trujillo<sup>a,b</sup>, Fernando E. Ortega-Ojeda<sup>a,b,c</sup>, Gemma Montalvo<sup>a,b</sup>, Carmen García-Ruiz<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Universidad de Alcalá, Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química, Ctra. Madrid-Barcelona km 33,6, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

<sup>b</sup> Universidad de Alcalá, Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Policiales, Libreros 27, 28801 Alcalá de Henares, Madrid, España.

<sup>c</sup> Universidad de Alcalá, Departamento de Física y Matemáticas, Ctra. Madrid-Barcelona km 33,6, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

**Introducción**

Las escenas del crimen deben investigarse de manera eficiente para obtener pruebas fiables que puedan presentarse en un juicio. Estas pruebas pueden requerir analizar vestigios de naturaleza muy diversa: Sustancias psicoactivas y sus metabolitos, artefactos explosivos e incendiarios y sus restos, residuos de disparo, diversos vestigios materiales, huellas dactilares, fluidos biológicos, entre otros (García-Ruiz 2020). Los fluidos biológicos son muy relevantes ya que pueden aportar una gran cantidad de información, permitiendo estimar el momento en el que se produjo el crimen, el tipo de crimen que se ha cometido según el fluido encontrado o, incluso, extraer información genética que permita identificar a la persona causante del delito. En ocasiones se encuentran mezclas de fluidos biológicos, lo que dificulta el análisis.

Además, los fluidos biológicos no tienen las mismas características dentro del cuerpo que cuando se encuentran en las escenas del crimen, formando manchas sobre distintas superficies, en un ambiente con condiciones muy diversas y donde pueden encontrarse agentes contaminantes, como microorganismos, polvo o arena (Cano-Trujillo, García-Ruiz *et al.* 2021). Tampoco se parecen estas condiciones a las del laboratorio. Por ello, es importante que las manchas de fluidos se investiguen en condiciones que mimeticen aquellas que podrían darse en la escena del delito.

Por todo ello, es de vital importancia llevar a cabo una correcta identificación de manchas de los fluidos biológicos encontrados en la escena de un delito (García-Ruiz 2020, Cano-Trujillo, García-Ruiz *et al.* 2021). Es

importante remarcar que la identificación forense trasciende a la identificación analítica mediante un análisis cualitativo (*¿qué hay?*). Esta incluye tanto la clasificación (*¿hay alguna sustancia?* Clases de sustancias como las benzodiazepinas o las sales de perclorato) como la individualización (*¿qué hay?* Identificando la sustancia en su clase como el lorazepam o el perclorato de amonio) (Figura 1) (García-Ruiz 2020).

Hoy en día, para la identificación forense de fluidos biológicos en la escena del delito, se persigue la combinación de técnicas de análisis rápidas, selectivas y no destructivas. Dentro de las técnicas con estas características, están las técnicas de espectroscopía vibracional. La espectroscopía Raman y la espectroscopía infrarroja (IR) son dos técnicas basadas en las características vibracionales de las moléculas analizadas, por lo que ambas se agrupan como técnicas de espectroscopía vibracional. En ellas, se excitan las moléculas de las muestras a analizar con energía y se mide, en forma de espectros, la energía vibracional de sus enlaces, lo que permite su caracterización (Weber, Lednev 2020). Los datos que se obtienen a partir de estas técnicas son tan complejos que tienen que procesarse matemáticamente mediante quimiometría para obtener información.

**Manchas de fluidos biológicos y técnicas analíticas empleadas**

Recientemente, se ha evidenciado que la espectroscopía Raman es la más utilizada, seguida de la espectroscopía IR (Figura 2), para el análisis de manchas de fluidos

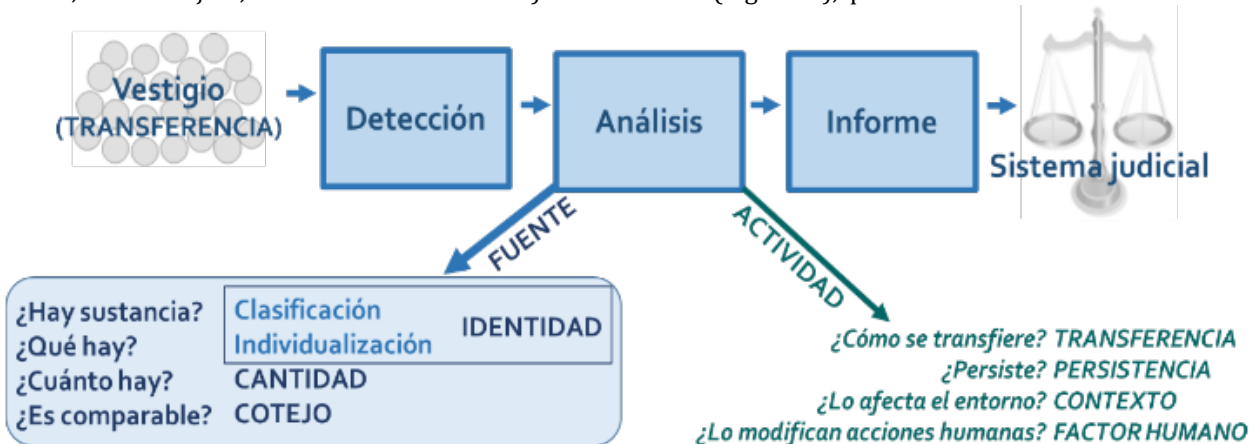
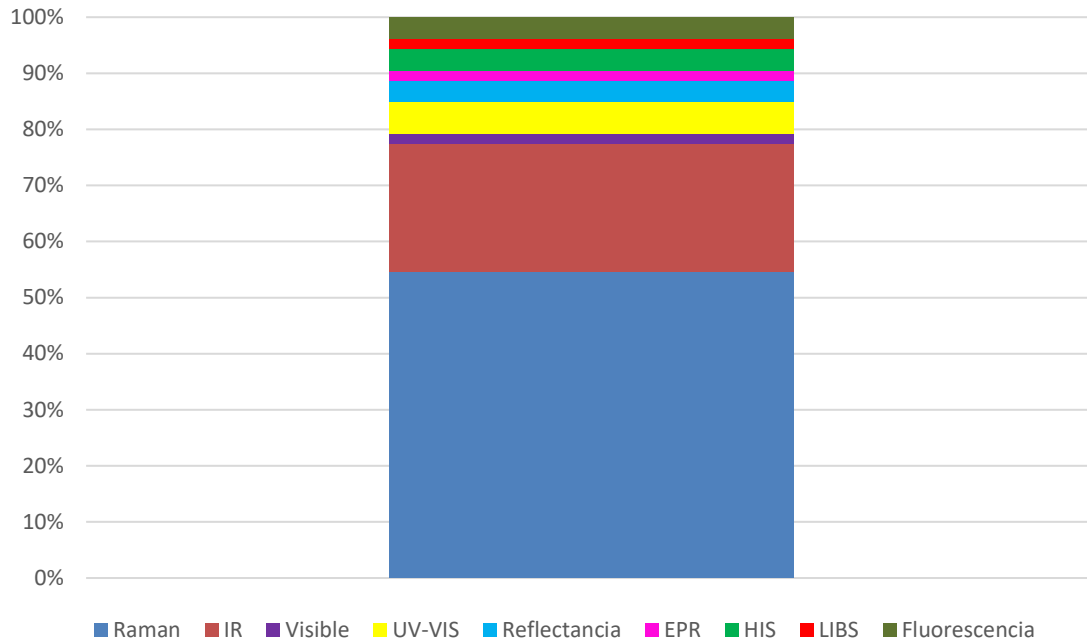


Figura 1. Concepción de la identificación forense dentro de un proceso forense general.



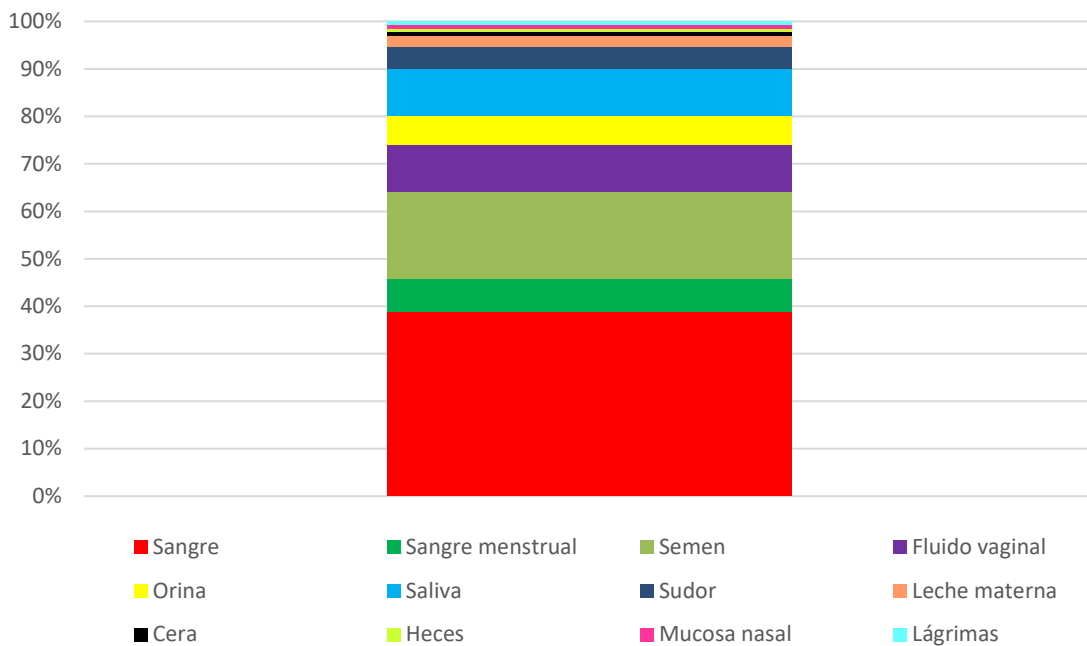
**Figura 2.** Técnicas espectroscópicas utilizadas para el estudio de manchas de fluidos biológicos. Abreviaturas: EPR: electrónica paramagnética de resonancia; HIS: imagen hiperespectral; IR: infrarroja; LIBS: espectroscopía de plasma inducido por láser, UV-Vis: ultravioleta-visible.

biológicos. Por otro lado, se ha observado que las manchas de sangre y de semen son las más estudiadas hasta ahora (Figura 3). Otras, como las de saliva u orina, no se encuentran tan frecuentemente en las escenas del crimen, pero también son relevantes. La sangre es el fluido biológico más común que aparece prácticamente en todos los delitos, principalmente en los violentos. También podemos encontrarla en los de naturaleza sexual junto al semen, en ocasiones dando lugar a mezclas entre ambos (Cano-Trujillo, García-Ruiz *et al.* 2021).

**Técnicas espectroscópicas empleadas en el análisis de manchas de fluidos**

*Espectroscopía Raman*

La espectroscopía Raman es altamente sensible, rápida y no destructiva. En ella, un rayo láser incide en la muestra con una frecuencia determinada, las moléculas se excitan y vibran, generando una radiación inelásticamente dispersada que tiene una frecuencia distinta a la que incidió sobre la muestra. Los enlaces de estos compuestos deben sufrir un cambio de polarización cuando se exponen al haz de luz para poder



**Figura 3.** Porcentaje de manchas de fluidos biológicos estudiados. Información tomada de la reciente revisión (Cano-Trujillo, García-Ruiz *et al.* 2021).

ser activos y analizados con espectroscopía Raman (Zapata, López-Fernández *et al.* 2020). La espectroscopía Raman se ha empleado para analizar sangre contaminada con arena, polvo o tierra y para diferenciar muestras de sangre, semen, fluido oral, fluido vaginal, sudor y orina entre sí y de fluidos no biológicos que pudiesen dar lugar a errores de análisis cuando se encuentran formando manchas en la escena del crimen. También se ha usado para estudiar manchas de mezclas de fluidos, como sangre y semen, así como para diferenciar sangre periférica de sangre menstrual. Incluso, ha permitido identificar el semen azoospermico como semen. Se han llevado a cabo estudios en los que se utilizaba la espectroscopía Raman para diferenciar la raza de las personas a partir de una muestra de sangre o de una muestra de semen. También ha permitido diferenciar la especie a la que pertenece una muestra de sangre, así como determinar el sexo de las personas a partir de sangre o de saliva. Uno de los aspectos más importantes de la investigación criminal es determinar el tiempo ocurrido desde el crimen; la espectroscopía Raman se ha empleado para determinar el tiempo transcurrido desde que se formó una mancha de sangre, por lo que se puede emplear para investigar el envejecimiento de la sangre a lo largo del tiempo (Cano-Trujillo, García-Ruiz *et al.* 2021).

### *Espectroscopía infrarroja (IR)*

Además de la espectroscopía Raman, la otra técnica de espectroscopía vibracional ampliamente utilizada para estudiar manchas de fluidos biológicos es la espectroscopía infrarroja (IR). En ella, se excitan las muestras con radiación electromagnética y se miden los cambios en el momento dipolar que se generan en los enlaces de las moléculas (Zapata, López-Fernández *et al.* 2020). La técnica se ha empleado para la diferenciación de distintos fluidos biológicos, como sangre, semen, orina, sudor o fluido oral, entre otros. Empleando la espectroscopía IR, a partir de manchas de sangre ha sido posible determinar la especie de la que procede dicha mancha o si procede de sangre *ante-mortem* o sangre *post-mortem*. Con la espectroscopía IR se ha podido diferenciar sangre menstrual de sangre periférica y también de fluido vaginal o seminal, así como determinar la edad de la muestra, ya que detecta los cambios que se producen durante el envejecimiento, al igual que ocurría con la espectroscopía Raman (Cano-Trujillo, García-Ruiz *et al.* 2021).

### *Otras técnicas espectroscópicas*

El objetivo principal de los artículos en los que se empleaban técnicas de espectroscopía diferentes a Raman e IR es, en su mayoría, el estudio del envejecimiento de muestras de sangre. Una de estas técnicas es la espectroscopía electrónica paramagnética de resonancia (EPR). Esta técnica estudia el espín de los electrones de los iones y mide los cambios en ellos (Weber, Lednev 2020). Gracias a estos cambios se pueden generar relaciones que permiten estimar la edad de la muestra (Fujita, Tsuchiya *et al.* 2005).

En la espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) se mide la absorción o la emisión de radiación de las muestras tras ser expuestas a radiación UV-Vis (Zapata, Fernández-de-la-Ossa *et al.* 2015). Permite ver los cambios que se producen en la banda Soret de la hemoglobina, pudiendo correlacionar dichos cambios con la edad de la muestra (Hanson, Ballantyne 2010). La espectroscopía de reflectancia se ha empleado para identificar y datar manchas de sangre depositada sobre diferentes sustratos, para diferenciar manchas de semen, fluido vaginal y orina entre ellas y de sustancias no biológicas en distintos sustratos, además de para estudiar manchas creadas con mezclas de fluidos (Edelman, Manti *et al.* 2012, Zapata, Fernández-de-la-Ossa *et al.* 2016). Esta técnica combina la dispersión elástica y la absorción de la luz. Cuando la luz se redirige con la misma energía con la que impactó, se produce la dispersión elástica. La absorción se produce cuando la energía de la luz se transforma en energía interna debido a la excitación de los átomos y electrones a niveles de energía superiores (McGee, Mirkovic *et al.* 2016).

La técnica de imagen hiperespectral (HSI) combina la imagen convencional y la espectroscopía, permitiendo obtener información química y espacial de la muestra al mismo tiempo (Weber, Lednev 2020). Ha sido empleada para datar manchas de sangre, tanto animal como humana, así como para identificar semen humano (Zapata, Ortega-Ojeda *et al.* 2017, Li, Beveridge *et al.* 2013, Silva, Pimentel *et al.* 2017) y diferenciarlo de semen animal y otras sustancias que puedan dar falsos positivos. Incluso se han usado teléfonos móviles para determinar la edad de manchas de sangre sobre diferentes sustratos y condiciones ambientales (Thanakiatkrai, Yaodam *et al.* 2013).

La espectroscopía de plasma inducido por láser (LIBS) ha servido para determinar la edad de muestras de sangre situadas sobre distintas superficies y para diferenciar las manchas de sangre de manchas de pintura (Wang, Teng *et al.* 2019). Cuando el láser incide sobre la muestra, se elimina una cierta cantidad de material que comprime la atmósfera; debido a la alta temperatura del material evaporado sobre la muestra se forma un plasma. La técnica LIBS mide la emisión de luz de los electrones, iones, especies neutras y excitadas contenidas en este plasma (Fortes, Moros *et al.* 2013).

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica que mide la fluorescencia de fluoróforos. El fluoróforo absorbe un fotón y los electrones se excitan experimentando una transición de un estado de energía excitado a un estado de energía más bajo, emitiendo un fotón, proceso denominado fluorescencia (Alexiev, Farrens 2013). Esta técnica se ha empleado para estudiar tanto el envejecimiento de la sangre menstrual, como del semen (Wójtowicz, Weber *et al.* 2021, Achetib, Wilk *et al.* 2019).

### **Conclusiones y perspectivas de futuro**

La investigación forense requiere del empleo de técnicas que permitan realizar una identificación forense (clasificación e individualización) de forma rápida y no

destruccion a partir de cantidades pequeñas de manchas de fluidos biológicos, proporcionando información valiosa para la resolución de casos forenses. Dentro de las técnicas espectroscópicas, las técnicas de espectroscopía vibracional, como la espectroscopía Raman y la espectroscopía IR, son las más empleadas para la identificación de distintos fluidos biológicos (sangre y semen, principalmente) cuando forman manchas sobre diferentes sustratos. El proyecto europeo *Real-time on-site forensic trace qualification project* (RISEN, SU-FCT02-2018-2019-2020-883116), en el que participan los autores de este trabajo, busca desarrollar nueva tecnología capaz de agilizar y mejorar la investigación forense, empleando técnicas de espectroscopía Raman e IR para el análisis de distintas muestras, entre las que se encuentran las manchas de fluidos biológicos.

## Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación al programa de investigación e innovación de la Unión Europea Horizonte 2020, bajo el convenio de subvención N° 883116.

## Referencias

ACHETIB, N., WILK, L.S., SCHWARZ, J.C.V., LAMBRECHTS, S.A.G., VAN LEEUWEN, T.G., AALDERS, M.C.G. y VAN DAM, A., 2019. *Estimating the Time of Deposition of Semen Traces using Fluorescence Protein-Lipid Oxidation Signatures*. American Chemical Society (ACS).

ALEXIEV, U. y FARRENS, D.L., 2013. Fluorescence spectroscopy of rhodopsins: Insights and approaches. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*, **1837**(5), pp. 694-709.

CANO-TRUJILLO, C., GARCÍA-RUIZ, C., ORTEGA-OJEDA, F.E., ROMOLO, F. y MONTALVO, G., 2021. *Comprehensive revision on the analysis of biological fluids stains on substrates for forensics*. Enviado a Trends in Analytical Chemistry en octubre de 2021.

EDELMAN, G., MANTI, V., VAN RUTH, S.M., VAN LEEUWEN, T. y AALDERS, M., 2012. Identification and age estimation of blood stains on colored backgrounds by near infrared spectroscopy. *Forensic Science International*, **220**(1-3), pp. 239-244.

FORTES, F.J., MOROS, J., LUCENA, P., CABALÍN, L., M. y LASERNA, J.J., 2013. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Analytical Chemistry (Washington)*, **85**(2), pp. 640-669.

FUJITA, Y., TSUCHIYA, K., ABE, S., TAKIGUCHI, Y., KUBO, S. y SAKURAI, H., 2005. Estimation of the age of human bloodstains by electron paramagnetic resonance spectroscopy: Long-term controlled experiment on the effects of environmental factors. *Forensic Science International*, **152**(1), pp. 39-43.

GARCÍA-RUIZ C. *Introducción a la Química Forense*. 1ª ed. Barcelona: EDITOR J.M. BOSCH; 2020.

HANSON, E.K. y BALLANTYNE, J., 2010. A Blue Spectral Shift of the Hemoglobin Soret Band Correlates with the Age (Time Since Deposition) of Dried Bloodstains. *PLOS ONE*, **5**(9), pp. e12830.

LI, B., BEVERIDGE, P., O'HARE, W.T. y ISLAM, M., 2013. The age estimation of blood stains up to 30 days old using visible wavelength hyperspectral image analysis and linear discriminant analysis. *Science & Justice*, **53**(3), pp. 270-277.

MCGEE, S., MIRKOVIC, J. y FELD, M., 2016. Reflectance spectroscopy. *Handbook of Biomedical Optics*. CRC Press, pp. 103-130.

SILVA, C.S., PIMENTEL, M.F., AMIGO, J.M., HONORATO, R.S. y PASQUINI, C., 2017. Detecting semen stains on fabrics using near infrared hyperspectral images and multivariate models. *Trends in Analytical Chemistry*, **95**, pp. 23-35.

THANAKIATKRAI, P., YAODAM, A. y KITPIPIT, T., 2013. Age estimation of bloodstains using smartphones and digital image analysis. *Forensic Science International*, **233**(1), pp. 288-297.

WANG, Q., TENG, G., ZHAO, Y., CUI, X. y WEI, K., 2019. Identification and Determination of the Bloodstains Dry Time in the Crime Scenes Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *IEEE Photonics Journal*, **11**(3), pp. 1-12.

WEBER, A.R. y LEDNEV, I.K., 2020. Crime clock – Analytical studies for approximating time since deposition of bloodstains. *Forensic Chemistry*, **19**.

WÓJTOWICZ, A., WEBER, A., WIETECHE-POSŁUSZNY, R. y LEDNEV, I.K., 2021. Probing menstrual bloodstain aging with fluorescence spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **248**, pp. 119172.

ZAPATA, F., FERNÁNDEZ-DE-LA-OSSA, M. y GARCÍA-RUIZ, C., 2016. Differentiation of Body Fluid Stains on Fabrics Using External Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Chemometrics. *Applied Spectroscopy*, **70**(4), pp. 654-665.

ZAPATA, F., FERNÁNDEZ-DE-LA-OSSA, M. y GARCÍA-RUIZ, C., 2015. Emerging spectrometric techniques for the forensic analysis of body fluids. *Trends in analytical chemistry (Regular ed.)*, **64**, pp. 53-63.

ZAPATA, F., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, A., ORTEGA-OJEDA, F., MONTALVO, G. y GARCÍA-RUIZ, C., 2020. *A practical beginner's guide to Raman microscopy*. Informa UK Limited.

ZAPATA, F., ORTEGA-OJEDA, F.E. y GARCÍA-RUIZ, C., 2017. Revealing the location of semen, vaginal fluid and urine in stained evidence through near infrared chemical imaging. *Talanta (Oxford)*, **166**, pp. 292-299.