

COLABORACIONES EN QUÍMICA

TÉCNICAS LUMINISCENTES EN
CRIMINALÍSTICA

La luminiscencia es un tema que ha tenido y sigue teniendo un papel importante en el desarrollo tecnológico de la humanidad. De hecho, la generación de espacios, tanto interiores como exteriores, bien iluminados tiene gran importancia en nuestra sociedad. Es todavía casi un sueño la utilización de fuentes de energía constituidas por láminas flexibles, capaces de generar luz y que puedan reemplazar a los ya clásicos tubos fluorescentes.

La investigación en luminiscencia, en combinación con la ciencia de los materiales, está en constante desarrollo; existen materiales luminiscentes capaces de absorber energía que pueden emitir en forma de luz visible, con aplicación en optoelectrónica, en el sector textil y en medicina, entre otros campos.

¿QUÉ ES LA LUMINISCENCIA?

Luminiscencia es la emisión de luz por un cuerpo excitado por algún tipo de energía y que no es provocada por efecto de la temperatura; se puede considerar como la radiación que emite un cuerpo frío en condiciones de temperatura habituales. La luminiscencia a veces se emite en una reacción química, por movimientos subatómicos o incluso por el estrés en un cristal.

Es importante mencionar que la luz es una forma de energía, por lo tanto, para que un cuerpo emita luz tiene que haber absorbido energía previamente.

TIPOS DE LUMINISCENCIA

Entre los tipos de luminiscencia más útiles y conocidos en la sociedad están: i) la radiación del cuerpo negro, con aplicación en las lámparas de filamento incandescente, ii) la fotoluminiscencia, que tiene lugar en las lámparas fluorescentes clásicas, iii) la catodoluminiscencia en las pantallas de televisión y, finalmente, iv) la electroluminiscencia, luminiscencia emitida por los diodos de emisión de luz (LEDs) más modernos. La eficien-

cia luminosa, en estos casos, aumenta desde las lámparas de wolframio a los LEDs (aproximadamente 5%-50%) [1].

La luminiscencia, en general, se puede clasificar en tres grandes tipos dependiendo de la energía empleada para la activación: i) *bioluminiscencia*, ii) *fotoluminiscencia* y iii) *quimioluminiscencia*. La bioluminiscencia es un caso particular de quimioluminiscencia que tiene lugar en los organismos vivos. Mientras que la energía de activación en la quimioluminiscencia proviene de una reacción química, en la fotoluminiscencia la activación se produce por absorción de fotones.

No podemos hablar de *fotoluminiscencia* sin mencionar el diagrama de Jablonski, en el que se resumen los procesos que pueden tener lugar cuando una molécula absorbe una radiación electromagnética de longitud de onda corta (Figura 1) [2]. De forma general, cuando un electrón en estado fundamental, S_0 , es excitado por absorción de fotones, éste pasa a un nivel electrónico superior, de mayor energía, S_2 , de manera que por relajación vibracional y conversión interna de energía puede acceder al nivel vibracional de menor energía del estado electrónico excitado singlete S_1 . Realmente esta situa-

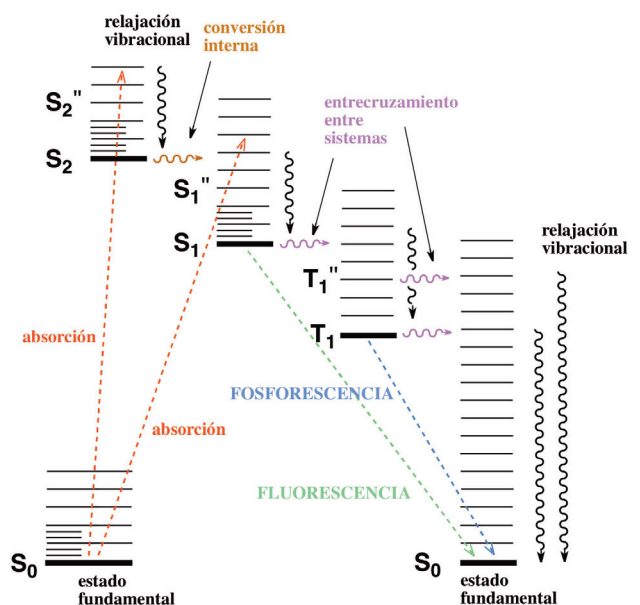


Figura 1. Diagrama de Jablonski.

Fuente: <http://www.ub.edu/talq/es/node/259>.

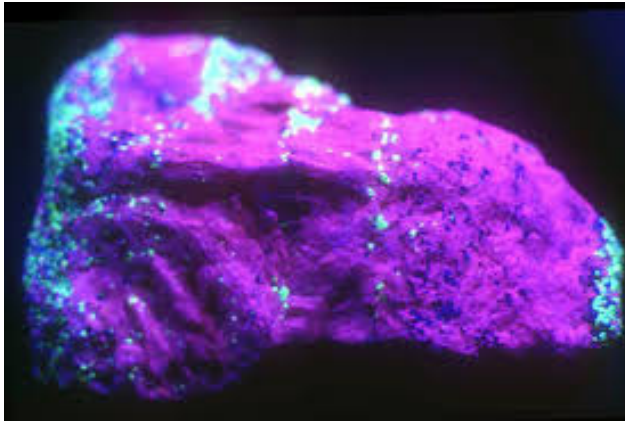


Figura 2. Fluorescencia en Calcita (rosácea) y Willemita (azul-verdosa). Fuente: http://www2.uned.es/cristamine/mineral/prop_fis/luminiscencia1.htm.

ción es muy inestable y, generalmente, el electrón en estado excitado S_1 tiende a recuperar S_0 emitiendo luz por desactivación. En función de cómo se produzca la desactivación del estado excitado se puede diferenciar entre dos tipos de procesos fotoluminiscentes: i) *fluorescencia*, si la desactivación se produce por emisión de radiación de frecuencia menor que la de la radiación que excitó la molécula, a partir de S_1 o, por el contrario, ii) *fosforescencia*, si el electrón salta al estado triplete T_1 por cruce intersistémico con la consiguiente emisión lumínica al recuperar el estado fundamental, S_0 . En ambos casos, la emisión de energía se puede observar en forma de luz visible o brillo –el ojo humano percibe radiación electromagnética con longitudes de onda comprendidas entre 400 nm–700 nm–. Teniendo en cuenta que las transiciones T-S son transiciones prohibidas, en el caso de la *fosforescencia* la vida media del estado excitado es grande y la desactivación se produce lentamente hasta alcanzar S_0 .

LUMINISCENCIA EN LA NATURALEZA

La *bioluminiscencia* es un proceso natural que ocurre tanto en algunos organismos vivos como en los minerales; consiste en la generación de energía, a través de una reacción química, que se manifiesta en forma de luz. Se trata de la conversión directa de energía química en energía lumínica. Como ya se ha comentado muy sucintamente, la bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia, ya que la emisión de luz que se produce en esta transformación no genera calor. De hecho, la *bioluminiscencia* es denominada “luz fría” debido a que tan solo el 20% de la luz genera radiación térmica o calor [3-4].

J. Wolfgang von Goethe (1749-1832), científico alemán, fue el primero en observar que la luz UV podía provocar fluorescencia en los minerales. Más tarde, A. y E. Becquerel estudiaron el efecto de diferentes longitudes de onda sobre numerosos materiales fluorescentes, demostrando que la fluorescencia de color rojo observada en la *Calcita* era debida a la presencia de manganeso (Figura 2).

La *bioluminiscencia* se produce en una amplia variedad de organismos de origen marino y terrestre; es un fenómeno que se encuentra en todos los niveles biológicos, –bacterias, hongos, protistas unicelulares, celentéreos, gusanos, moluscos, cefalópodos, crustáceos, insectos, equinodermos y peces–. La especie más comúnmente conocida es la luciérnaga, insecto que pertenece a la familia de los *Lampyridae*. Sin embargo, la mayoría de especies luminiscentes se encuentran en el hábitat marino [3].

Química en la bioluminiscencia

La reacción química que tiene lugar para producir *bioluminiscencia* requiere la participación de dos sustancias



Figura 3. Diferentes niveles biológicos en los que se produce bioluminiscencia. Fuente: <http://medioambientum.com/las-plantas-fluorescentes-son-ya-una-realidad/>, <http://s1116.photobucket.com/user/masverde/media/medusa-tentaculos.jpg.html>, <http://ranaestudios.com.mx/estudio-de-grabacion-audiovisual-por-que-brillan-las-luciernagas/>.

químicas, la luciferina y la luciferasa. La luciferina es una proteína que mediante el cambio de sus grupos funcionales libera energía en forma de luz. El color de la luz que libera cada especie es el resultado de la aglomeración de las moléculas de luciferina. Los cambios que se producen en la luciferina son provocados por la acción catalítica de la enzima luciferasa. La reacción del sistema luciferina-luciferasa es compleja; de forma general se puede decir que la actividad catalítica de esta enzima requiere de tres substratos: i) luciferina, ii) oxígeno y iii) ATP. La luciferina en estado oxidado es inestable, por lo que se desactiva emitiendo luz. Cabe destacar que tanto la luciferina como la luciferasa son moléculas específicas de cada especie (Figura 4). Sin embargo, en algunos casos la *bioluminiscencia* se da en ausencia de la enzima luciferasa utilizando las denominadas fotoproteínas que se unen con la luciferina, el oxígeno y otro agente, normalmente iones Ca^{2+} , para generar energía en forma de luz [4].

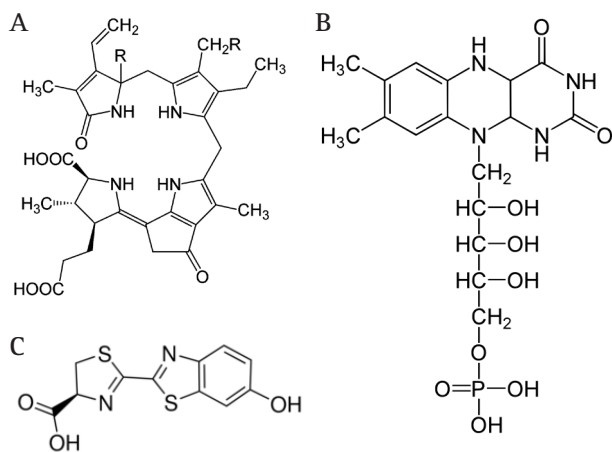


Figura 4. Luciferinas de diferentes especies: (A) luciferina de los dinoflagelados ($\text{R}=\text{H}$) y Euphausiidae ($\text{R}=\text{OH}$), (B) luciferina bacteriana de una flavinmononucleótida (riboflavina-5-fosfato) reducida y (C) un benzotiazol, luciferina de la luciérnaga *Photinuspyralis*.

Algunos organismos *bioluminiscentes* son capaces de sintetizar la luciferina, por ejemplo los *Dinoflagellates*, un tipo de plancton que emite luz cuando son molestados. Sin embargo, existen otras especies que no son capaces de sintetizar la luciferina y la obtienen mediante absorción de otros organismos de los que se alimentan o mediante una relación simbiótica. Un ejemplo del primer caso son algunas especies del género *Porichthys*, que obtienen la luciferina a partir de los ostrácodos que consumen (Figura 5) [4].



Figura 5. Bioluminiscencia marina producida por Dinoflagellates y *Porichthys*. Fuente: <http://jacintbiomar.blogspot.com.es/2013/11/bioluminiscencia-marina-mas-luz-en-el.html>.

El aspecto de la luz bioluminiscente es diferente dependiendo del hábitat y del organismo que la produce. La luz de la mayoría de los organismos bioluminiscentes acuáticos se encuentra en la región azul-verde del espectro visible [4,5]. Estos colores son más visibles en las profundidades del océano; la mayoría de los organismos marinos son sensibles a estos colores (azul-verde), ya que físicamente no son capaces de procesar otros colores como el amarillo, el rojo o el violeta. Muchos organismos terrestres también exhiben la bioluminiscencia azul-verde. Sin embargo algunos brillan en el espectro amarillo como por ejemplo las luciérnagas y el *Quantula striata*, el único caracol bioluminiscente. Además, existen algunas especies capaces de emitir dos colores diferentes, como es el caso de las larvas de coleópteros; sus cabezas son de color rojo brillante mientras que sus cuerpos son verdes [4].

Importancia de la bioluminiscencia

La luminiscencia en los organismos vivos tiene lugar para cumplir ciertas funciones, entre ellas la defensa, la comunicación, la reproducción y la atracción de presas [4-6].

El camuflaje está relacionado con la defensa. Algunos organismos producen la luz para confundir a sus depredadores. Por ejemplo, los *teútidos*, conocidos como calamares, producen la luz en la superficie ventral camuflándose con la luz que viene desde la superficie, por lo que su depredador no podrá visualizarlo desde una perspectiva más profunda, ya que la luz solar no creará la sombra característica que buscan los depredadores, como los tiburones, para dar caza a sus presas. También la *bioluminiscencia* se puede utilizar para atraer a la presa o buscarla, como es el caso de los *Lophiiformes* (Figura 6), que tienen en la cabeza un filamento que emite

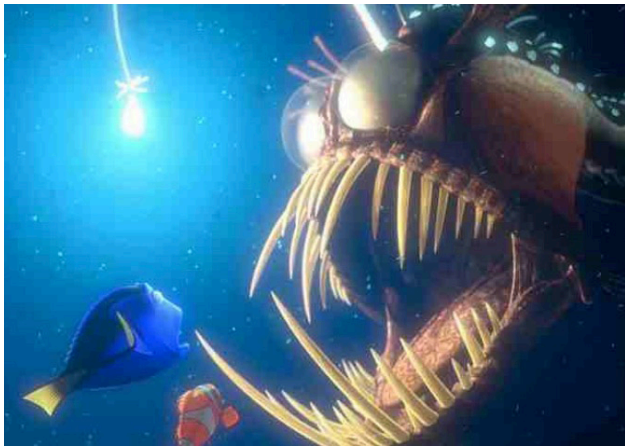


Figura 6. Dibujo animado de la especie Lophiiformes. Fuente: <http://www.batanga.com/curiosidades/7550/cientificos-filman-por-primera-vez-al-pez-diablo-de-buscando-a-nemo>.

luz, de tal manera que los peces más pequeños son atraídos y así capturados [6].

Otra función de la *bioluminiscencia* es la comunicación para ayudar a la reproducción. Así, las luciérnagas usan la *bioluminiscencia* para atraer a los machos en el periodo reproductivo. En este mismo sentido, los hongos de miel atraen a los insectos para que éstos les ayuden a difundir las esporas por todo el ecosistema en el que se encuentran. Además, la *bioluminiscencia* sirve para la comunicación entre algunas bacterias para inducir la simbiosis y formar las colonias [6].

Por otro lado los organismos a veces utilizan la *bioluminiscencia* para señalar una molestia o un cambio. Esta capacidad la poseen algunas algas que emiten luz en forma de puntos rosados o verdes cuando sufren alguna situación de estrés, como una disminución de la salinidad de las aguas [4].

INTERÉS DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA

La *quimioluminiscencia* se define como el fenómeno por el que se emite radiación electromagnética en la región del visible o infrarrojo cercano cuando tiene lugar una reacción química [7]. Las medidas de la intensidad de emisión de dicha radiación pueden utilizarse con fines analíticos, ya que ésta es función de la concentración de las especies participantes en la reacción.

Curiosamente, algunas sustancias químicas presentan esta propiedad de emitir luz por sí solas, como por ejemplo las que se utilizan para la fabricación de relojes que brillan en la oscuridad, o de manera natural, tal y como ya se ha comentado anteriormente.

La *quimioluminiscencia* ha despertado un interés progresivo a lo largo de los años por ser una alternativa simple, económica y sensible para la detección analítica tanto cualitativa como cuantitativa de una gran variedad de compuestos [8]. Los métodos establecidos en detección quimioluminiscente son una herramienta analítica muy útil debido a su gran sensibilidad y selectividad. El fenómeno de la *quimioluminiscencia* se conoce desde hace aproximadamente unos 300 años a.C. Sin embargo, el desarrollo de aplicaciones analíticas basadas en la *quimioluminiscencia* data de tiempos relativamente más recientes. Concretamente, Erdey en 1957 fue el primero en emplear la *quimioluminiscencia* como técnica analítica utilizando sustancias como luminol, lofina y lucigenina como indicadores volumétricos. Posteriormente, en los años 70 y después en los 80, se realizaron las primeras investigaciones empleando la *quimioluminiscencia* como técnica analítica en reacciones en fase gaseosa y en fase líquida, respectivamente. Fue a partir de entonces cuando los métodos quimioluminiscentes empezaron a utilizarse ampliamente, principalmente en las áreas de análisis bioquímico y ambiental, aumentando de forma considerable las publicaciones al respecto. Digamos que el progreso de los métodos quimioluminiscentes se encuentra bien diferenciado en dos periodos: un primer periodo, que abarcaría la década de los años treinta, representado por la búsqueda de nuevos sistemas o compuestos quimioluminiscentes modificando químicamente estructuras conocidas y, un segundo periodo, que va desde la segunda Guerra Mundial hasta el presente, que hace referencia a los avances en instrumentación analítica y aclaran conceptos teóricos relacionados con los principios de la *quimioluminiscencia*.

Un campo de investigación de gran interés en una extensa variedad de disciplinas es la aplicación analítica de la *quimioluminiscencia* como método de detección en inyección en flujo, electroforesis, cromatografía líquida e inmunoensayo, incluyendo técnicas de separación en análisis farmacéuticos, químicos, biomédicos, biológicos y alimentarios, llegando a proporcionar muy buena selectividad y sensibilidad, así como una gran resolución y cuantificación en distintos analitos en aquellas mezclas más complejas. Cada año son cada vez más las reacciones quimioluminiscentes que se citan en bibliografía relacionadas con aplicaciones en diferentes campos como son medioambiente, toxicología, química, alimentación y biomedicina (biopsias de tejidos, test de embarazo, análisis de NO/NO_x en la atmósfera, etc.). Está cla-

ro que las ventajas aportadas por los métodos quimioluminiscentes, como elevada sensibilidad, bajos límites de detección, además de rangos dinámicos amplios y una gran versatilidad, son la explicación a que el interés analítico por la *quimioluminiscencia* siga aumentado considerablemente desde su aparición. El desarrollo de productos quimioluminiscentes en el campo del diagnóstico clínico son algunas de las investigaciones más recientes en las últimas décadas, donde la *quimioluminiscencia* sustituye al marcado isotópico, evitándose así el uso de radioisótopos. También se han encontrado aplicaciones en el control de calidad, tanto de productos de la industria cárnica como de residuos, así como en medidas del ozono troposférico.

Por último, comentar que la detección quimioluminiscente es todavía una técnica en desarrollo, si se compara con otros métodos de detección potentes convencionales como los fluorescentes o electroquímicos, por lo que precisa mejoras. Algunas de estas mejoras están relacionadas con la miniaturización y, por ello, con la reducción del gasto de disolventes orgánicos empleados en los métodos de separación, utilizando agua como disolvente y volúmenes de muestra más pequeños y menos concentrados. A este respecto se han conseguido ya mejoras en electroforesis capilar, cromatografía e inmunoensayo. Parece ser que los sistemas miniaturizados o “microchip” resultan interesantes ya que evitan problemas relacionados con los límites de detección, muy comunes en estos sistemas. También, entre otras mejoras se encuentra el desarrollo de nuevos detectores más simples que los ya conocidos, permitiendo determinar diferentes variedades de analitos a nivel de traza.

APLICACIÓN DE LA LUMINISCENCIA EN CRIMINALÍSTICA

La Criminalística es una disciplina que se basa en la aplicación de métodos y técnicas de investigación para el descubrimiento, explicación y prueba de los delitos. En la mejora y evolución de estas técnicas, la Criminalística recurre a diversos avances científicos, por lo que guarda una estrecha relación con la Química y los progresos que en ella se producen [9].

Fluorescencia: el mejor detective del siglo XXI

Una de las grandes limitaciones que ha impedido, durante décadas, el progreso de la Criminalística es la incapacidad de las técnicas contemporáneas de revelar aquellos

indicios o muestras relevantes en la investigación de un crimen que se muestran ocultas a una inspección ocular simple. Sin embargo, gracias a la investigación y desarrollo de técnicas que emplean la luminiscencia, actualmente, es posible revelar numerosos indicios invisibles a simple vista.

Un ejemplo de esto lo encontramos en las dificultades que surgen ante el criminalista cuando se enfrenta al revelado de huellas latentes sobre fondos multicolor. La televisión y el cine han instaurado en nuestra cabeza la imagen del revelado de huellas dactilares en una superficie pulida, lisa, uniforme y monocolor, mediante la aplicación de polvos blancos o negros con pincel. Sin embargo en la realidad no es tan sencillo y el criminalista habitualmente tiene que enfrentarse a la recogida de huellas parciales sobre superficies que distan mucho de la idoneidad [10]. Existen casos en que resulta realmente complicado conseguir hallar las huellas posibles empleando los polvos convencionales, debido a la superposición de colores. Sin embargo, el desarrollo de polvos a base de reactivos químicos fluorescentes ha facilitado enormemente la búsqueda de huellas (Figura 7). Su aplicación es idéntica a los polvos convencionales, pero su revelado se lleva a cabo mediante luz ultravioleta en total oscuridad. La *fluorescencia* emitida será lo único



Figura 7. Polvos fluorescentes para revelado de huellas. Fuente: <http://revistamundoforense.com/brochas-y-polvos-convencionales>.



Figura 8. Luminol emitiendo quimioluminiscencia y aplicación en un caso real. Fuente: <https://en.wikipedia.org/wiki/Luminol>, <http://www.dudeiwantthat.com/gear/novelty/luminol-spray.asp>.

visible pudiendo así ser fotografiada, evitando la aparición de fondos indeseados [11].

Sin embargo, la técnica luminiscente por antonomasia es, sin duda, el revelado de restos de sangre mediante el uso de luminol (Figura 8); se basa en el proceso de oxidación de la molécula de luminol en presencia de un catalizador [12]. En este caso se trata del grupo hemo, un complejo de hierro que conforma la hemoglobina, molécula que da el color rojo característico de la sangre [13]. Para que esta reacción se produzca, el luminol debe encontrarse disuelto en peróxido de hidrógeno, que actuará como oxidante en la reacción, y estar en presencia de una sal básica. Una vez preparada la disolución, se aplicará directamente sobre la zona en la que previsiblemente se espera hallar restos de sangre. En el caso de que sea así, el grupo hemo iniciará el proceso de oxidación del luminol (Figura 9). Durante el proceso oxidativo, la molécula de luminol pasa por un estado de transición en el que se encuentra en forma de dianión con dos cargas

negativas ubicadas en los átomos de nitrógeno [14]. A continuación, este dianión reacciona con el oxígeno procedente del peróxido de hidrógeno para dar lugar a otro dianión inestable, el cual, para llegar a una situación de mayor estabilidad energética, emite radiación en forma de luz visible azulada. Una vez ha finalizado el proceso, la radiación se detiene. Es por ello que el efecto lumínico del luminol solo dura unos treinta segundos, lo que obliga al investigador a contar con material fotográfico preparado para una recreación posterior del escenario del crimen.

El luminol presenta la limitación de no ser selectivo para el hierro presente en el grupo hemo sanguíneo, sino que cualquier presencia de moléculas que contengan hierro podría actuar como catalizador. Al mismo tiempo existen compuestos, tales como el hipoclorito sódico (lejía), que dan falsos positivos. Sin embargo, éstos son detectables por el ojo experto, puesto que la luminiscencia producida es mucho más vigorosa y tiene mucha menor duración en el tiempo. Es por ello que toda muestra tomada durante una inspección policial, detectada gracias al luminol, debe someterse a un análisis posterior, no sólo con afán de aseverar que se trata realmente de sangre humana, sino también, en caso afirmativo, con el fin de determinar el ADN de la persona de procedencia.

En resumen, la luminiscencia es un fenómeno natural que, en sus diversas formas, es utilizado por el hombre y que contribuye al desarrollo de la sociedad. Tiene muy diversos campos de aplicación, que cubren desde el desarrollo de nuevos materiales bioinspirados, el diagnóstico de enfermedades y hasta el esclarecimiento de determinados hechos y acciones que ocurren continuamente en nuestra sociedad.

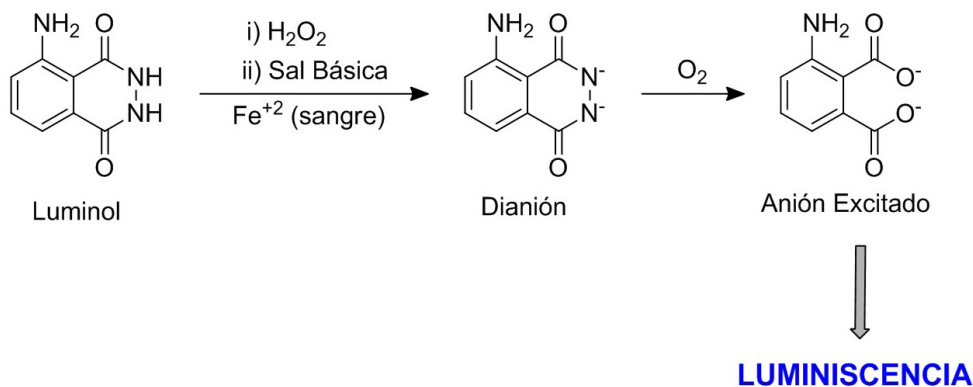


Figura 9. Reacción química del luminol. Fuente: <http://dciencia.es/c-s-i-dciencia-el-luminol>.

REFERENCIAS

- [1] Kitai, A.: Luminicent Materials and Applications. Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 2008.
- [2] Rauk, A.: Orbital Interaction Theory of Organic Chemistry, 2nd Edition. Wiley & Sons, 2001.
- [3] http://www.bbc.com/mundo/noticias/2013/01/130116_bioluminiscencia_naturaleza_produce_luz.
- [4] <http://education.nationalgeographic.org/encyclopedia/bioluminescence>.
- [5] Wong, J.M., Pérez-Moreno, J.L., Cham, T-Y., Frank, T. M. & Bracken-Grissom, H. D.: Molecular Phylogenetics and Evolution, **83**, 278-292 (2015).
- [6] <http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Bioluminescence>.
- [7] <https://todoesquimica.files.wordpress.com/2013/09/la-luz-y-nosotros.pdf>.
- [8] García-Campaña, A.M., Baeyens W.R.G., Zhang, X., Alés F. & Gámiz L.: Ars Pharmaceutica, **42**, 81-107 (2001).
- [9] Castelló Ponce, A., Álvarez Segui, M., Negre Muñoz, M.C. & Verdú Pascual, F.A.: Cuadernos de Medicina Forense, **34**, 43-37 (2003).
- [10] <http://www.bbc.com/news/science-environment-23136589>.
- [11] <http://www.revistamundoforense.com>.
- [12] Kricka, L.J.: Clinical Chemistry, **37**, 1472-1481 (1991).
- [13] Sheehan, F. & Kobilinsky, L.: J. Chem. Edu., **61**, 542-546 (1984).
- [14] <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/fleming/index.htm>.

Daniel González Rodal
Marina Godino Ojer
Ágata Smuszkiewicz
Antonio José López Peinado
Vanesa Calvino Casilda
Elena Pérez Mayoral

Dpto. de Química Inorgánica y Química Técnica