



Universidad de Oviedo

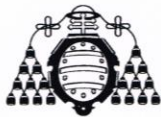
MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

“Empleo de espectroscopía y microscopía infrarroja de reflexión total atenuada para el análisis no invasivo en muestras biológicas”

Christian Chimeno Trinchet

Julio 2014, Oviedo



Rosana Badía Laíño, Profesor Titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “Empleo de espectroscopía y microscopía infrarroja de reflexión total atenuada para el análisis no invasivo en muestras biológicas”

ha sido realizado por el licenciado Christian Chimeno Trinchet, en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster del interesado en el curso académico 2013-14, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 23 de Junio de 2014

Fdo: R. Badía Laíño

Índice

	Página
Objetivos.....	A
I. Introducción	1
1.1. Clasificación de drogas.....	1
1.1.1. Por origen.....	1
1.1.2. Por efecto.....	2
1.1.3. Por uso	3
1.2. Tabaco y toxicidad	4
1.2.1. Consumo.....	5
1.2.2. Efectos	6
1.3. Espectroscopía FTIR.....	7
1.3.1. ATR – Reflexión Total Atenuada.....	9
1.3.2. Microscopía Infrarroja.....	10
1.3.3. FT-IR Imaging	11
1.4. Herramientas quimiométricas para el tratamiento de datos.	12
1.4.1. Redes Neuronales Artificiales, RNA.....	12
1.4.2. Análisis discriminante lineal, ADL.....	14
II. Equipo Experimental.....	15
2.1. Materiales	15
2.2. Reactivos.....	15
2.3. Aparatos e instrumental.....	15
2.4. Software	17
III. Procedimientos	18
3.1. Poblaciones y toma de muestra.....	18

3.1.1. Impresiones en KBr.....	18
3.1.1.1. Modo de transmisión.....	19
3.1.1.2. Microscopía IR.....	19
3.1.2. Huella en superficie metálica.....	19
3.1.2.1. Microscopía IR.....	20
3.1.2.2. Medidas FTIR-ATR.....	20
3.1.3. Extracción con hisopo	20
3.1.4. Muestras de pelo.....	21
3.2. Tratamiento estadístico.....	22
IV. Resultados y discusión	25
4.1. Determinación inicial.....	25
4.1.1. Impresiones en KBr.....	25
4.1.2. Huella en KBr.....	27
4.1.3. Extracción con hisopo	30
4.1.4. Huella en superficie metálica.....	31
4.2. Comparación de los cuatro métodos.....	35
4.2.1. Resultados.....	35
4.2.2. Resultados empleando sólo el criterio de fumador / no fumador	38
4.2.3. Selección del mejor método.....	40
4.3. Determinación de huellas con ATR en láminas de aluminio	40
4.4. Muestras de pelo.....	45
V. Conclusiones.....	47
VI. Bibliografía.....	48

Objetivos

La determinación de xenobióticos en seres humanos sin realizar una toma de muestra invasiva es una tendencia actual en el análisis forense. Actualmente se trabaja intensamente en la búsqueda de metodologías de análisis que sean rápidas, sencillas y fáciles de implementar para detectar estos compuestos sin afectar la integridad del individuo.

Es por ello que en el presente trabajo se ha planteado como objetivo el desarrollar metodologías que permitan desde un punto de vista legal el análisis de drogas de abuso por técnicas no invasivas. En este sentido la espectroscopía y microscopía infrarroja por reflexión total atenuada acoplada a herramientas quimiométricas adecuadas se presenta como una alternativa válida para la consecución de tal objetivo.

El acceso a este tipo de sustancias así como a individuos que hayan estado en contacto con ellas se presenta, desde una perspectiva investigadora, excesivamente complicado debido a las altas tasas y trámites burocráticos existentes que hacen que resulte virtualmente imposible trabajar con cualquier compuesto susceptible de ser usado como droga de abuso. Por ello, los presentes estudios se realizaron empleando como analito modelo la nicotina, donde debido al escaso impacto social que su adicción tiene, es factible el acceso a una población de individuos que fueran consumidores habituales de tabaco.

I. Introducción

Los xenobióticos son compuestos químicos que no se encuentran en los organismos de forma natural. La exposición a estas sustancias, a través de la ingestión, inyección, inhalación y/o absorción a través de la piel, es capaz de inducir cambios fisiológicos importantes en el individuo. Las drogas también pueden clasificarse como xenobióticos, y todas ellas son tóxicas. Su toxicidad depende de la dosis siendo ésta la que marca la diferencia entre droga terapéutica y veneno. Las combinaciones de estas drogas con otros compuestos inertes se denominan medicamentos, aunque es habitual la utilización de ambos términos (drogas y medicamentos) para referirnos a dichas mezclas.

Las drogas también pueden ser utilizadas en exceso, siendo entonces calificadas como drogas de abuso. Por ejemplo, la cocaína y el LSD (dietilamida del ácido lisérgico) son compuestos utilizados habitualmente en la medicina que, siendo consumidas sin control, se convierten en drogas de abuso como el Éxtasis o la MDMA (3,4-metilendioxi metanfetamina).

1.1. Clasificación de drogas

Las drogas en el laboratorio pueden definirse según su naturaleza ácido-base pero esta clasificación resulta demasiado general y poco efectiva en el ámbito legal, por ello se pueden definir otros grupos de clasificación que ayuden a entender los efectos y orígenes de los distintos compuestos [1].

1.1.1. Por origen

Dependiendo del origen, de cómo han sido obtenidas las drogas pueden clasificarse en tres categorías: producto natural, semisintético y sintético.

Los alcaloides que se extraen de semillas y plantas son un ejemplo de productos naturales, como pueden ser los opiáceos, la atropina, la cafeína o la nicotina. Los compuestos semisintéticos son elementos que se obtienen a partir de un producto natural mediante un proceso de síntesis químico; como por ejemplo la heroína, que se obtiene al realizar la acetilación de la morfina. Las hormonas y esteroides que son obtenidas o sintetizadas

por animales, humanos o bacterias diseñadas genéticamente, también se clasifican como semisintéticos.

Por último tenemos las drogas que son obtenidas mediante un proceso total de síntesis como el diazepam. También se pueden incluir en el grupo de sintéticos los compuestos naturales que hayan sido también sintetizados totalmente en el laboratorio, como por ejemplo el Dronabinol (THC sintetizado) que es el principio activo del Marinol.

1.1.2. Por efecto

Otro método de clasificación de drogas puede realizarse en base a sus efectos fisiológicos. Se categorizan en cinco grupos: analgésicos, depresoras, alucinógenos, narcóticos y estimulantes.

- **Analgésicos:** Drogas que reducen el dolor. Los analgésicos más comunes son aspirina, ibuprofeno, paracetamol o morfina.
- **Depresoras:** Drogas que ralentizan las funciones del sistema nervioso central (SNC) resultando en reducción del ritmo cardiaco, reducción de la ansiedad, sensación de aturdimiento y somnolencia. Los depresoras más comunes son el alcohol, los opiáceos, las benzodiazepinas o los barbitúricos.
- **Alucinógenos:** Drogas que provocan estados alterados de la consciencia afectando a la percepción del tiempo y la realidad. El consumo de estas drogas afecta al movimiento, pensamiento, percepción, visión y audición. Los alucinógenos más comunes son el LSD, MDMA, mescalina, psilocibina (hongos alucinógenos) o THC (tetrahidrocanabinol).

Los alucinógenos producen sus efectos interrumpiendo la interacción de las células nerviosas y los neurotransmisores debido a sus similitudes estructurales (Figura 1). Por ejemplo, la serotonina está involucrada en los sistemas de conducta, percepción y regulación, como el estado de ánimo, el hambre y la temperatura corporal. La psilocibina, una vez dentro del cuerpo se desfosforila

rápidamente convirtiéndose en psilocina, sustancia que actúa como agonista de los receptores de la serotonina [2].

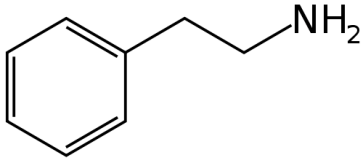
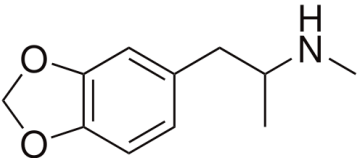
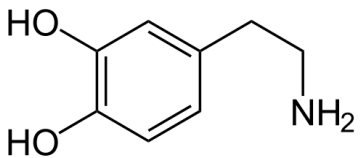
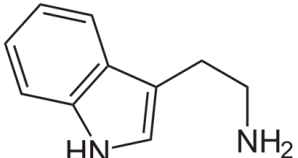
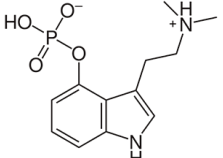
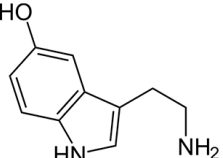
Comparación estructural entre droga y neurotransmisor		
Base Molecular	Droga	Neurotransmisor
Feniletilamina	MDMA	Dopamina
		
Triptamina	Psilocibina	Serotonina
		

Figura 1. Comparación estructural entre droga y neurotransmisor

- **Narcóticos:** Drogas con un efecto analgésico, que tienden a deprimir el sistema nervioso central (SNC) y dan somnolencia. Los narcóticos más comunes son los alcaloides opiáceos (drogas derivadas de la planta del opio) como la morfina, la codeína, la heroína, la oxicodona y la hidrocodona.

Estimulantes: Al contrario de narcóticos y depresores, estas drogas estimulan las funciones del SNC, induciendo arritmias e interfiriendo con el sueño. Los estimulantes más comunes son la cocaína, anfetamina y la metanfetamina. A altas dosis muchos de los estimulantes pueden ser alucinógenos. La cocaína puede bloquear los receptores de serotonina y dopamina, acabando en una estimulación generalizada y una potencial respuesta alucinógena.

1.1.3. Por uso

Algunas drogas son clasificadas en base a cómo son utilizadas y su finalidad. Las drogas que comparten grupo suelen tener estructuras moleculares así como efectos fisiológicos similares.

- **Drogas Predadoras:** Estas drogas son utilizadas por violadores y asaltantes sexuales para incapacitar a las mujeres con propósitos sexuales. Las más comunes son la ketamina, el Rohypnol (flunitrazepam) y el GHB (gamma hidroxibutirato). Mezcladas con la bebida, estas drogas pueden producir desde desorientación e inconsciencia hasta la pérdida de la memoria a corto plazo.
- **Drogas de Club:** Estas drogas son habitualmente consumidas en fiestas y discotecas por gente joven. Las más comunes son el MDMA y las citadas en la categoría de drogas predadoras, los alucinógenos como el LSD y las setas y las estimulantes como la PCP (fenciclidina) o metanfetamina. Su aceptación se debe a la idea errónea de que son menos dañinas que las clásicas como cocaína y heroína.
- **Drogas para mejorar el rendimiento:** Estas drogas son utilizadas para mejorar o afectar el rendimiento de un individuo. Las más comunes son los esteroides y el alcohol. Los anabolizantes incluyen docenas de drogas accesibles bajo prescripción médica y están basadas en la testosterona. Estas drogas son utilizadas con abuso por atletas con la intención de aumentar su masa muscular y reducir sus tiempos de recuperación tras los entrenamientos y las competiciones.
- **Drogas Inhaladas:** En este grupo se catalogan todas las sustancias que tras ser inhaladas producen el efecto deseado. En su mayoría son sustancias que no son consideradas como drogas ni utilizadas con ese fin. Los inhalantes más comunes son las pinturas, el óxido nitroso, limpiadores o laca de uñas. Cualquier sustancia con un compuesto volátil puede ser inhalada y habitualmente tienen efectos depresivos similares a los del alcohol.

1.2. Tabaco y toxicidad

El tabaco es obtenido de las hojas de la planta *Nicotiana tabacum*, producido principalmente en América. El método de consumo más habitual es la inhalación del humo producido por la combustión del tabaco. Las patologías más frecuentes relacionadas con el consumo de tabaco son la bronquitis y el enfisema. Se trata de dos

fenómenos esencialmente de tipo inflamatorio y destructivo. En general, las consecuencias derivadas del tabaquismo son percibidas a largo plazo.

La nicotina (Figura 2) es un compuesto orgánico que constituye cerca del 5% del peso de la planta. Es un potente veneno y es utilizado en gran variedad de insecticidas. Las plantas sintetizan la nicotina en las zonas de mayor actividad de las raíces y es transportada por la savia hasta las hojas verdes actuando como defensa natural contra las plagas.

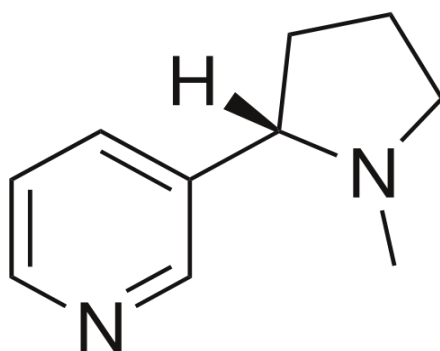


Figura 2. (S)-3-(1-metilpirrolidin-2-il) piridina

En bajas concentraciones, la sustancia es un estimulante siendo el factor principal de la adicción al tabaco.

1.2.1. Consumo

Fumar cigarrillos es el método más popular de consumo pero el tabaco también suele ser consumido como tabaco en polvo o rapé o tabaco para mascar. Este tipo de tabaco no está exento de nicotina ni de otras sustancias químicas.

Un fumador promedio consume de 1 a 2 mg de nicotina al inhalar el humo de un cigarrillo, la nicotina penetra rápidamente en el torrente sanguíneo y de ahí al cerebro. Los fumadores de pipas o puros no suelen inhalar el humo por lo que la nicotina es absorbida por las membranas de la mucosas alcanzándose los niveles máximos de nicotina en el cerebro de forma más lenta que en los fumadores de cigarrillos.

La persona que se expone a la nicotina recibe un estímulo causado en parte por la acción de la droga sobre las glándulas suprarrenales que descargan una dosis de adrenalina. La

sensación de “subidón” debida a la adrenalina estimula el cuerpo aumentando la presión arterial, el ritmo cardiaco y la respiración [3].

1.2.2. Efectos

El uso de la nicotina puede tener muchos efectos diferentes en el cuerpo:

- Disminución del apetito.
- Estimulación del estado anímico pudiendo experimentar una sensación de bienestar.
- Incremento de la actividad intestinal y salivar.
- Incremento de la frecuencia cardiaca y de la presión arterial.
- Estimulación de la memoria y la vigilia.

Los síntomas de abstinencia de nicotina pueden comenzar a las pocas horas después de haber fumado el último cigarrillo, provocando que las personas sientan la necesidad de volver a fumar. Los fumadores más activos son más propensos a desarrollar los síntomas de abstinencia. Los consumidores que dejan de fumar sufren el pico máximo de abstinencia a partir de los 2 ó 3 días, y para algunas personas estos síntomas pueden durar meses.

Los síntomas comunes abarcan [4]:

- Deseo vehemente de nicotina
- Irritabilidad
- Ansiedad
- Depresión
- Somnolencia y problemas para dormir
- Dolores de cabeza
- Incremento del apetito
- Dificultad para concentrarse

Mientras que el síndrome de abstinencia está relacionado con los efectos farmacológicos de la nicotina, otros factores conductuales pueden agravar estos síntomas. El ritual de

fumar (manipular el cigarrillo, encenderlo y fumarlo) está asociado con los efectos placenteros que se obtienen al fumar, por lo que sentir, oler o mirar un cigarrillo puede empeorar los síntomas de la abstinencia e incluso aumentar el deseo de fumar.

Los cigarrillos electrónicos, parches de nicotina o chicles pueden aliviar los aspectos farmacológicos pero el deseo de fumar un cigarrillo perdura. En cambio, las terapias conductuales enseñan a los exfumadores a emplear estrategias para prevenir estos deseos [3].

1.3. Espectroscopía FTIR

La espectroscopía infrarroja, como otros sistemas espectroscópicos de absorción de radiación similares, consta de una fuente cuya radiación se dirige hacia una muestra, una muestra que absorbe dicha radiación, un detector y un sistema de procesado de señal. En el caso de la espectroscopía FTIR, dicha radiación infrarroja, que se encuentra en el rango entre 400 y 4000 cm^{-1} (Figura 3), interactúa con las moléculas y sus enlaces químicos. La mayoría de los grupos funcionales orgánicos tienen frecuencias vibracionales en la región del infrarrojo medio. Después de interactuar con la muestra, la radiación infrarroja no absorbida es recogida por un detector como puede ser el DLaTGS (detector de Sulfato de Triglicina Deuterado dopado con lantano) o un detector FPA (Focal Plane Array) para FTIR Imaging.

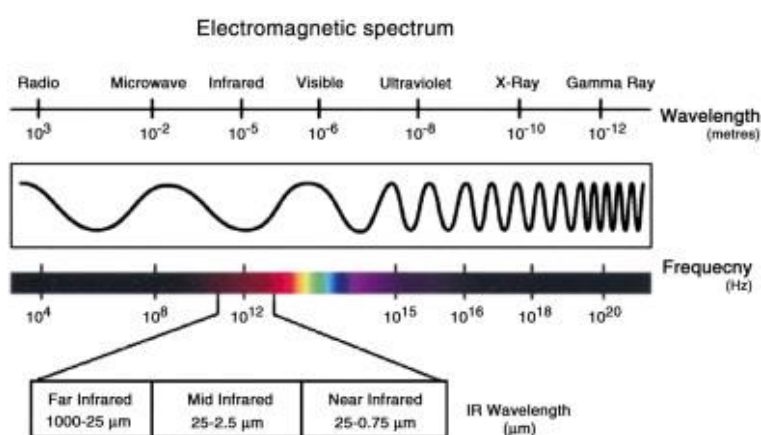


Figura 3. Espectro electromagnético

En la instrumentación clásica de infrarrojo se utilizaba un monocromador que dispersaba la luz infrarroja para así determinar la absorbancia / transmitancia de la muestra a cada longitud de onda. Actualmente, los equipos modernos han sustituido la instrumentación dispersiva por espectrómetros de transformada de Fourier (FTIR). La señal producida por los equipos dispersivos sufría de pérdida de sensibilidad y de largos tiempos de medida al tener que realizar un “barrido” de la muestra en todas las longitudes de onda.

Michelson desarrolló el interferómetro en 1880 para estudiar la velocidad de la luz. Los equipos FTIR actuales siguen basándose en este tipo de interferómetro; se obtiene un interferograma generado a partir de la interferencia de dos o más haces de radiación; este interferograma es convertido rápidamente mediante la transformada de Fourier y representado en un gráfico de intensidad frente a la longitud de onda o frecuencia (Figura 4). La principal ventaja del interferómetro de los equipos FTIR es que produce una señal codificada que incluye todas las frecuencias del infrarrojo, permitiendo así detectar todas las longitudes de onda al mismo tiempo en un interferograma.

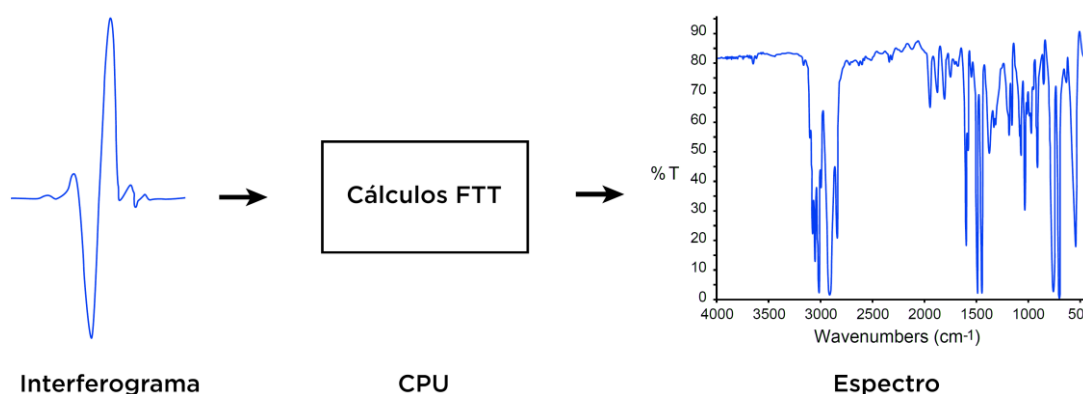


Figura 4. Decodificación del interferograma [5]

La espectroscopía infrarroja es una técnica importante para la identificación de grupos de compuestos o un compuesto individual presentes en un espécimen. Por ejemplo, la identificación de fibras como acrílico, nylon o poliéster; pinturas como acrílicas, alquídicas, o de nitrocelulosa. También tiene una gran ventaja respecto a otras técnicas

para obtener informaciones estructurales que podrían resultar muy difíciles de obtener utilizando otras técnicas. Los espectros de absorción específicos de cada longitud de onda de los grupos funcionales y estructurales ofrecen una “huella” molecular que permite una determinación rápida y sensible de la composición de un espécimen.

En la determinación de drogas, la espectroscopia puede resultar una herramienta importante para diferenciar entre un compuesto orgánico y una sal ya que tiene distintas propiedades espectrales. El límite de detección es normalmente de microgramos pero puede ser menor utilizando técnicas de microscopía infrarroja [6] [1].

1.3.1. ATR – Reflexión Total Atenuada

La reflexión total atenuada se basa en el fenómeno de la reflexión total interna. Un haz de luz que pasa de un medio a otro con diferente índice de refracción (por ejemplo aire – agua), se refracta. Sin embargo, cuando el cambio de medio se produce hacia uno cuyo índice de refracción es menor (por ejemplo del agua al aire, pero no viceversa), existe un ángulo crítico a partir del cual el haz no se refracta sino que se refleja completamente en la interfase, no pudiendo la radiación abandonar el medio de mayor índice de refracción [7].

Sin embargo, no toda la luz que entra en el material de alto índice de refracción se propaga a lo largo de éste, sino que la propagación depende del ángulo de entrada. Parte de la luz que se propaga por el material penetra unas pocas micras en el exterior en el punto en que se produce la reflexión total, dando origen a lo que se conoce como *onda evanescente*. Los materiales más comunes con altos índices de refracción son el ZnSe ($n = 2.4$), Ge ($n = 4.0$) y diamante ($n = 2.4$). La combinación de estos materiales con una geometría del cristal adecuada facilita la formación de las reflexiones internas y entre 10 y 50 ondas evanescentes (Figura 5).

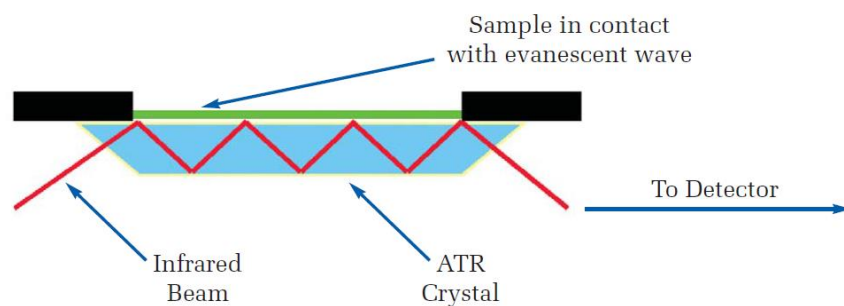


Figura 5. Reflexiones múltiples en sistema ATR [8]

Si la muestra se deposita sobre el cristal, la onda evanescente puede ser absorbida y atenuada por la muestra en las longitudes de onda correspondiente a las bandas de absorción infrarroja, produciendo así un espectro de reflexión total atenuado [6] [1]. El volumen efectivo de medida depende del volumen total de muestra y el área que cubre ésta. Una muestra en polvo muy compactada ofrecerá una determinación cuantitativa diferente de una muestra de polvo poco compactada. Obtener resultados cuantitativos con sólidos es más complicado que en muestras líquidas. Las muestras necesitan poco o ningún tratamiento previo pudiendo ser analizados directamente en el ATR, pero puede existir destrucción parcial de la muestra debido a la presión ejercida para asegurar un buen contacto entre la muestra sólida y el cristal [7].

1.3.2. Microscopía Infrarroja

Combinando un microscopio convencional con técnicas de espectroscopía infrarroja se pueden obtener espectros infrarrojos de gran calidad que proporcionen información sobre la composición química de una muestra desconocida del tamaño de micras. Permite obtener un mapa espectral de un área determinada de la muestra, pudiendo recoger la información espectral manteniendo la resolución espacial inherente de la microscopía infrarroja.

La microscopía infrarroja está adaptada para utilizar todos los elementos de un sistema FTIR convencional es decir transmitancia, reflectancia y ATR [6] [1].

1.3.3. FT-IR Imaging

El empleo de detectores *Focal Plane Array* (FPA) en un sistema de microscopía infrarroja permiten la adquisición de un número de n por n espectros espacialmente resueltos ($n = 16, 32, 64$ ó 128 según el detector), ofreciendo cada pixel de la imagen un espectro infrarrojo independiente (Figura 6). Adquiriendo simultáneamente cientos de espectros por minuto, un detector FPA ofrece información sobre la identidad y concentración de compuestos específicos y su distribución en el área de medición. Estos detectores también pueden ser usados acoplando un micro-ATR proporcionando así una mejora significativa en la resolución espacial respecto a la resolución espacial obtenida por la difracción en aire. Las muestras para un micro-ATR no necesitan ninguna o poca preparación [9].

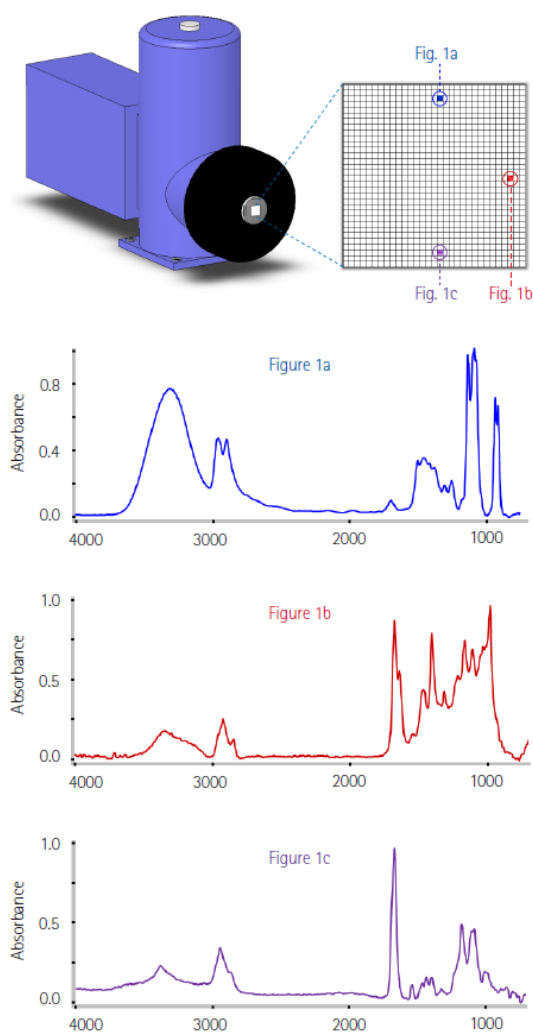


Figura 6. Identificación de tres especies químicas en tres localizaciones distintas [9].

1.4. Herramientas quimiométricas para el tratamiento de datos.

Para la determinación de xenobióticos en muestras biológicas, los estudios se dirigieron al empleo de metodologías analíticas no desarrolladas para la determinación de un analito específico. En nuestro caso el método propuesto consiste en la utilización de un número de muestras provenientes de una población lo suficientemente representativa como para que permita correlacionar las señales obtenidas con la presencia del xenobiótico teniendo en cuenta las diferencias entre las poblaciones analizadas: hombres y mujeres fumadores frente a hombres y mujeres no fumadores. La determinación de estas diferencias puede entonces ya no estar relacionada directamente con el xenobiótico en sí, sino en algunos casos con la presencia de, por ejemplo, metabolitos, con lo cual el tratamiento de las señales obtenida en los espectros se plantean como un problema mucho más complejo que requiere de la utilización de software informático de mayor capacidad que los utilizados habitualmente en tratamiento de datos.

1.4.1. Redes Neuronales Artificiales, RNA

Las redes neuronales artificiales (RNA, o ANN según sus siglas en inglés *Artificial Neural Network*) se basan en el principio del funcionamiento de un cerebro humano, el cual procesa la información mediante una estructura distribuida paralelamente llamada red neuronal. Las RNA consisten en tres capas, una primera capa que recibe los datos; una capa de salida que envía la información procesada; y una o más capas ocultas que enlazan las capas de entrada y salida (Figura 7). Todas o una fracción de las neuronas que se encuentran en una capa están conectadas con todas o con parte de las neuronas que se encuentran las capas anterior y posterior [10]. Las RNA están agrupadas en dos categorías principales; redes de propagación hacia adelante (acíclica) y redes recurrentes. Las redes acíclicas no forman ciclos en las conexiones de su red, todas las señales van desde la capa de entrada hacia la capa de salida siendo la Perceptrón Multicapa el tipo de red acíclica más común. Las redes recurrentes tienen al menos un ciclo en las conexiones de su red como por ejemplo una Red de Hopfield (Figura 8) [11].

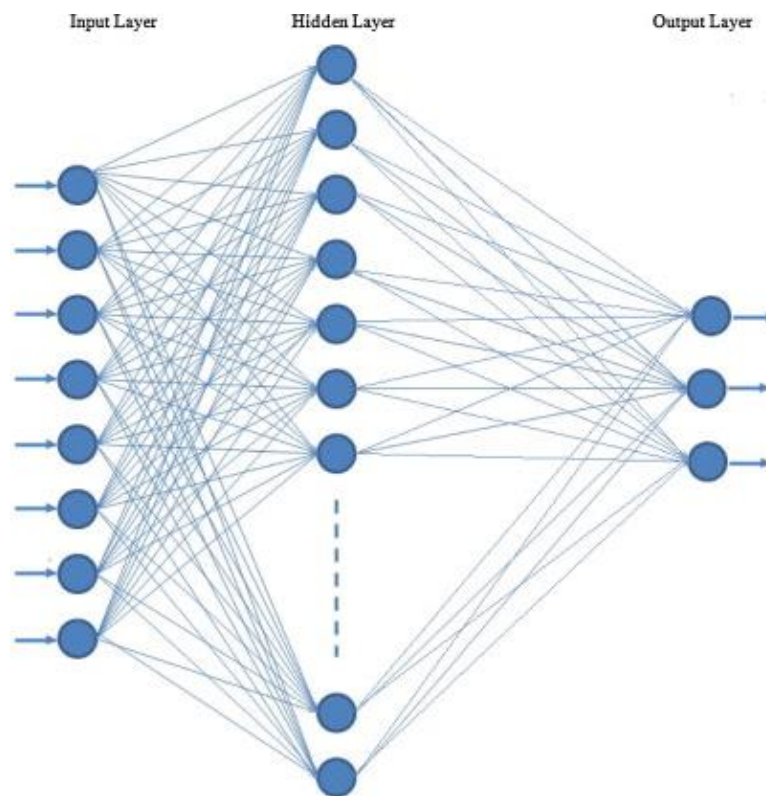


Figura 7. Red Neuronal Artificial [10]

Las ventajas que presentan las redes neuronales artificiales son [12]:

- **No linealidad:** Una neurona artificial puede ser lineal o no lineal. Una red neuronal, creada por interconexiones de neuronas lineales, es en sí misma no lineal. Además, la no linealidad es de un tipo especial en el sentido de que se distribuye en toda la red. La no linealidad es una propiedad muy importante, especialmente si el mecanismo físico subyacente responsable de la generación de la señal de entrada (por ejemplo, una señal de voz) es inherentemente no lineal.
- **Aprendizaje:** Las RNA tienen la capacidad de adquirir el conocimiento a través de la experiencia. Esto se consigue proporcionando a las RNA datos de entrada e indicando cual es la respuesta esperada. La información contextual es almacenada de forma similar a un cerebro, por lo tanto a mayores interconexiones neuronales, mayor conocimiento.
- **Flexibilidad y Adaptabilidad:** Una RNA puede corregir cambios pequeños en la información de entrada en tiempo real, por ejemplo corregir el ruido en una señal. Las RNA se adaptan rápidamente a las condiciones de trabajo.

- Tolerancia a fallos: Las RNA son capaces, a través de una computación robusta, de trabajar en condiciones adversas respondiendo correctamente aun si la información se daña parcialmente. Al igual que en un cerebro, si una neurona se daña, otra neurona interconectada podrá continuar su trabajo.

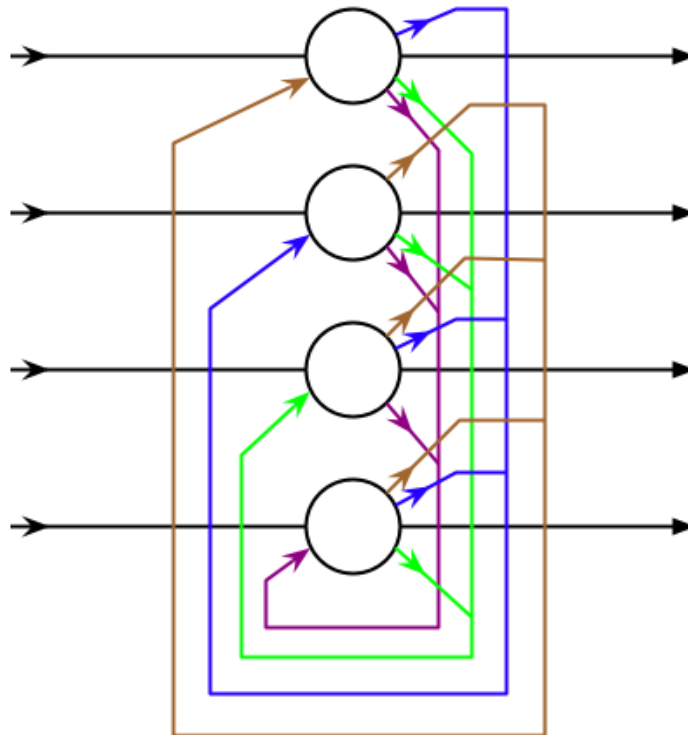


Figura 8. Red de Hopfield (red recurrente)

1.4.2. Análisis discriminante lineal, ADL

El análisis discriminante lineal (ADL, o *LDA* según sus siglas en inglés *Linear Discriminant Analysis*), es una herramienta matemática consistente en un cambio de variables. Cada una de las nuevas variables se genera a partir de combinaciones lineales de las variables iniciales (en nuestro caso, las absorbancias de los espectros a las distintas longitudes de onda) de tal forma que, en el nuevo sistema de referencia, todas las muestras pertenecientes a una misma categoría están lo más cerca posible entre sí y, así mismo, dos categorías diferentes están lo más alejadas posible entre sí.

II. Equipo Experimental

2.1. Materiales

- Espátula
- Mortero de ágata
- Portaobjetos para microscopía: 26 x 76 mm
- Láminas de aluminio
- Hisopos de algodón
- Cinta adhesiva
- Tubos de ensayo con tapón de 10 mL
- Micropipetas de 200 y 1000 μ L

2.2. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Alcohol Etilico Absoluto HPLC; J.T.Baker
- KBr
- Resina Epoxy
 - Crystic R115 PA
 - Catalizador X-8

2.3. Aparatos e instrumental

- Espectrofotómetro FTIR acoplado a un microscopio con sistema de formación de imágenes (Varian 620-IR y Varian 670-IR) con tres sistemas de detección: uno en el espectrómetro y dos en el microscopio (FPA, para formación de imágenes y MCT para medidas puntuales):
 - Espectrómetro FTIR Varian 670-IR (Figura 9)
 - Dispositivo IR de transmisión
 - Dispositivo ATR (Golden Gate, Specac) (Figura 11)



Figura 9. Espectrómetro FTIR

- Microscopia FTIR Varian 620-IR
 - Dispositivo micro-ATR
 - Sistema para formación de imágenes FPA
- Prensa Manual Hidráulica Atlas (Specac) (Figura 10)
- Moldes para Preparación de Pastillas (Specac)
- Moldes para probetas de resina epoxy
- Lijadora para probetas



Figura 10. Prensa manual

2.4. Software

- Mathworks Matlab R2013b
- Microsoft Excel 2013
- Resolutions Pro FTIR Software
 - Backgrounds medidos contra aire
 - Rango de medición: 16 ciclos, rango de espectro 2 cm^{-1} ; inicio de rango 0; fin de rango 8000 cm^{-1}
 - Mediciones con detector interno
 - Rango de medición: 16 ciclos; rango de espectro 2 cm^{-1} ; inicio de rango 600 cm^{-1} ; fin de rango 4000 cm^{-1}
 - Mediciones con detector FPA
 - Rango de medición: 16 ciclos; rango de espectro 2 cm^{-1} ; inicio de rango 950 cm^{-1} ; fin de rango 4000 cm^{-1}

III. Procedimientos

3.1. Poblaciones y toma de muestra

De los distintos tipos de muestras no invasivas que se podrían tomar de una población, como pueden ser aire expirado, saliva, sudor, cabellos, huellas digitales, etc., se optó por iniciar los estudios con las dos últimas por su facilidad y limpieza a la hora de la toma.

Se han desarrollado distintas técnicas para la determinación de componentes orgánicos [13] en distintas matrices mediante medidas de FTIR [14], por lo que se planteó la posibilidad de obtener información a partir de las huellas dactilares y así poder desarrollar un posible método no invasivo de determinación de xenobióticos.

En el caso de las huellas digitales, se ha descrito que la determinación de este tipo de muestras en hombres y mujeres no se ve afectada por la edad ni por el paso del tiempo durante su almacenamiento cuando se realizan medidas de FTIR-ATR o microscopía infrarroja [15].

Las muestras son fácilmente recogidas en KBr, metales y también se puede extraer las huellas de otras superficies utilizando cinta adhesiva [16]. En la búsqueda del mejor soporte para la realización de los futuros análisis se realizaron las siguientes recogidas de muestra [15].

3.1.1. Impresiones en KBr

Se prepararon pastillas de 250 mg de KBr con la prensa hidráulica habiendo homogeneizado el tamaño de los cristales en un mortero de ágata. Se seleccionaron las mejores pastillas, sin grietas y translucidas ya que diferencias de humedad, tamaño de granos diferentes o una pequeña diferencia al homogeneizar la sal en la prensa, dan como resultado dos pastillas totalmente distintas. Se tomó la precaución de almacenar las pastillas en un desecador para evitar que absorbieran agua del ambiente.

3.1.1.1. Modo de transmisión

Se procedió a recoger impresiones de huellas dactilares en las pastillas de KBr pidiendo a los individuos que se frotasen los dedos por la manos, cara, barba y pelo para poder aumentar la grasa natural de la piel y obtener una mejor muestra [15]. Con cuidado de no romper la pastilla, se debe apretar 10 veces seguidas la pastilla entre los dedos índice y pulgar.

Se determinaron los espectros de transmitancia en el Varian 670 en modo transmisión. Primeramente se realizó un blanco con una pastilla de KBr limpia para así poder comparar las señales de los espectros con huella. Posteriormente se realizaron los análisis de todas las pastillas.

3.1.1.2. Microscopía IR

Posteriormente se procedió a recolectar una sola impresión del dedo índice de la mano dominante, recogiendo así una huella dactilar definida.

Se determinaron las huellas mediante el microscopio de infrarrojo. Se buscaron las zonas con mayor concentración de muestra y registrando su espectro de IR, se barrió la superficie de la huella determinando las zonas con muestra y las zonas con solo KBr.

3.1.2. Huella en superficie metálica

Para el análisis de huellas en superficies metálicas se comenzó utilizando la placa de calibrado de plata del microscopio donde se observó que se apreciaban las huellas diferenciándose perfectamente las zonas con o sin muestra.

Dado el coste que implica emplear como soporte láminas de plata se buscaron nuevas alternativas. Las láminas más fácilmente accesibles y económicas fueron las láminas de aluminio que presentan un aspecto similar a la plata. Las láminas de aluminio se adherían a portaobjetos de microscopio para evitar su rotura y ofrecer una estructura rígida en la que depositar la huella fácilmente. El individuo debía de dejar una huella tras frotarse las manos, pelo o cara.

3.1.2.1. Microscopía IR

Se utilizó el microscopio para determinar la composición de las huellas mediante el detector MCT, realizando distintas mediciones a lo largo de la huella. También se utilizó el detector FPA [17] [13], para intentar realizar un barrido del aluminio y obtener una imagen de la huella dactilar con los espectros correspondientes en cada zona. Se utilizó como guía una huella depositada con tinta de bolígrafo para confirmar que las deposiciones observadas ópticamente eran realmente huella y no otro tipo de impureza.

3.1.2.2. Medidas FTIR-ATR

También se determinaron las huellas mediante el equipo ATR separando con cuidado la lámina de aluminio y depositándola sobre el cristal del equipo. Nuevamente se utilizó como guía una huella depositada con tinta de bolígrafo.



Figura 11. ATR Golden Gate

3.1.3. Extracción con hisopo

El último proceso de recolección de muestras se realizó con la ayuda de un hisopo con etanol frotando los dedos índice y corazón que los fumadores suelen emplear para sujetar

el cigarrillo, que se almacenó en un tubo de plástico cerrado hasta su uso posterior. Para las medidas se ensayaron distintos procedimientos operatorios:

1. Se emplea el hisopo original sin ningún tratamiento
2. Se añaden 200 μl etanol para proceder a su medición en la disolución alcohólica.
3. Se realizó una extracción con 1 mL de etanol dejándolo en contacto con el hisopo durante 10 min, y se evaporó el disolvente hasta su cuarta parte para obtener una disolución más concentrada.

Las medidas se realizaron en el ATR y consistieron en una primera medición con el hisopo original en contacto con el cristal del equipo; posteriormente se puso en contacto 10 veces el hisopo sobre el cristal para intentar transferir la mayor cantidad de muestra a el cristal; por último se determinó el contenido de las disoluciones etanólicas concentradas de extracción, depositando 30 μL poco a poco con la precaución de no dejar al disolvente expandirse mucho sobre el ATR manteniendo así la mayor cantidad de la muestra sobre el cristal del equipo.

3.1.4. Muestras de pelo

Se procedió a recoger muestras de pelo de fumadores y no fumadores para realizar un análisis FTIR de estos [18]. Posteriormente estas muestras de pelo se incluyeron en bloques de resina epoxi de forma perpendicular. Para ello se realizaron dos procedimientos distintos; el primero consistió en utilizar dos trozos de resina desechada como soporte, se adhirieron los pelos con laca de uñas y se unieron los dos trozos como un sándwich (Figura 12). Posteriormente se introdujo este soporte en un molde y se rellenó con resina nueva para crear una nueva probeta.

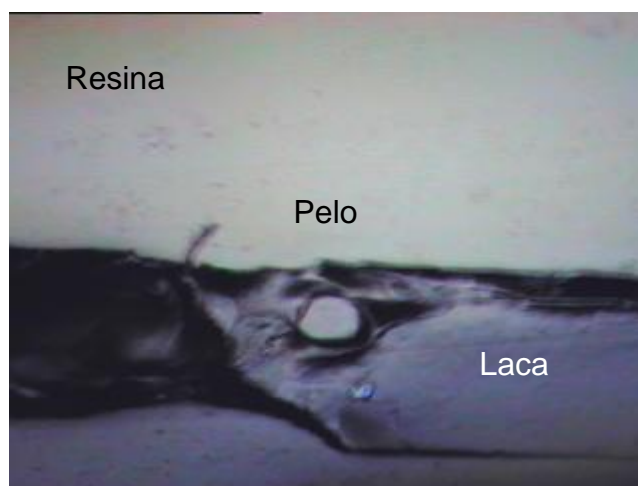


Figura 12. Pelo encapsulado entre dos resinas

El segundo procedimiento se realizó con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico. Se cortó la parte superior y se le realizó un agujero en la “base” para poder introducir los pelos, se selló y se rellenó la pera con resina para crear una probeta provisional. Una vez endurecida se recortó el plástico, se lijó la resina hasta el tamaño correcto para ser introducida en el molde estándar y se creó una nueva probeta.

Los moldes con la resina se introdujeron en un horno a 55 °C durante una hora hasta que está estuvo totalmente endurecida para su manipulación. Posteriormente se le realizó un proceso de lijado y pulido hasta el día siguiente.

3.2. Tratamiento estadístico

Mediante MatLab se compararon las similitudes de los espectros obtenidos adaptando el coeficiente MAD [19] el cual está basado en la media de las diferencias absolutas de absorbancia o transmitancia, escalada en el rango de 0-999. En nuestro caso se adaptó dicha ecuación a los espectros de transmisión y en un rango entre 0 y 1; a mayor similitud de dos espectros, más próximo es el coeficiente MAD igual a 1, siendo éste unitario en el caso de que los espectros sean exactamente iguales.

$$MAD = 999 \cdot \left[1 - \frac{d^T \cdot 1}{k} \right] \quad (1)$$

siendo d el vector que contiene las diferencias absolutas de absorbancia

$$d = |x_A - x_B| \quad (2)$$

Los espectros con una similitud máxima, $x_a - x_b$, obtienen un coeficiente MAD de 999. En nuestro caso su coeficiente sería 1.

$$MAD_{mod} = \left[1 - \frac{d^T \cdot 1}{k} \right] (3)$$

Los valores a comparar son las señales de transmitancia obtenidas a cada longitud de onda, para ello se ajustaron todos los espectros empleando una misma línea base y se eliminó la señal de CO₂ para minimizar las diferencias entre espectros y así obtener coeficientes MAD sólo dependientes de los diferentes picos obtenidos en cada espectro. Se introdujeron todos los valores en una tabla de Excel definiendo cada espectro como un vector y anotando en las columnas todos los valores de transmitancia (%T). Los datos finales se copiaron a un documento de texto compatible con MatLab y este creó una matriz (Tabla 1) en la que cada columna corresponde a un espectro-vector para la ecuación MAD.

Vector 1	Vector 2	...	Vector n
%T _{V11}	%T _{V21}	...	%T _{Vn1}
%T _{V12}	%T _{V22}	...	%T _{Vn2}
⋮	⋮	⋮	⋮
%T _{V1λ}	%T _{V2λ}	...	%T _{Vnλ}

Tabla 1. Ejemplo de matriz de espectros, siendo n el número de espectros y λ el número de longitudes de onda

Los cálculos del coeficiente de similitud MAD definido según la ecuación (3) se realizaron en MATLAB. Los resultados obtenidos se ordenaron en la Tabla 2, donde el coeficiente de similitud para el par de espectros (vectores) m y n puede leerse en la intersección de la n-ésima fila y la m-ésima columna o viceversa. Dada la definición del coeficiente, éste es simétrico: $MAD_{m,n}=MAD_{n,m}$.

	Vector 1	Vector 2	...	Vector n
Vector 1	1	MAD ₁₂	...	MAD _{1n}
Vector 2	MAD ₂₁	1	...	MAD _{2n}
...
Vector n	MAD _{n1}	MAD _{n2}	...	1

Tabla 2. Ejemplo de tabla final con coeficientes MAD obtenidos

Al comparar un vector consigo mismo no existen diferencias, por lo que el valor de MAD es igual a 1. Esto puede verse en la tabla anterior, en la que la diagonal principal de la matriz es 1.

Estos valores MAD se utilizaron como guía entre espectros de aspecto similar, comparando a las poblaciones fumadoras y no fumadoras en busca de diferencias que nos permitiese determinar si el método utilizado era capaz de discernir diferencias entre las poblaciones.

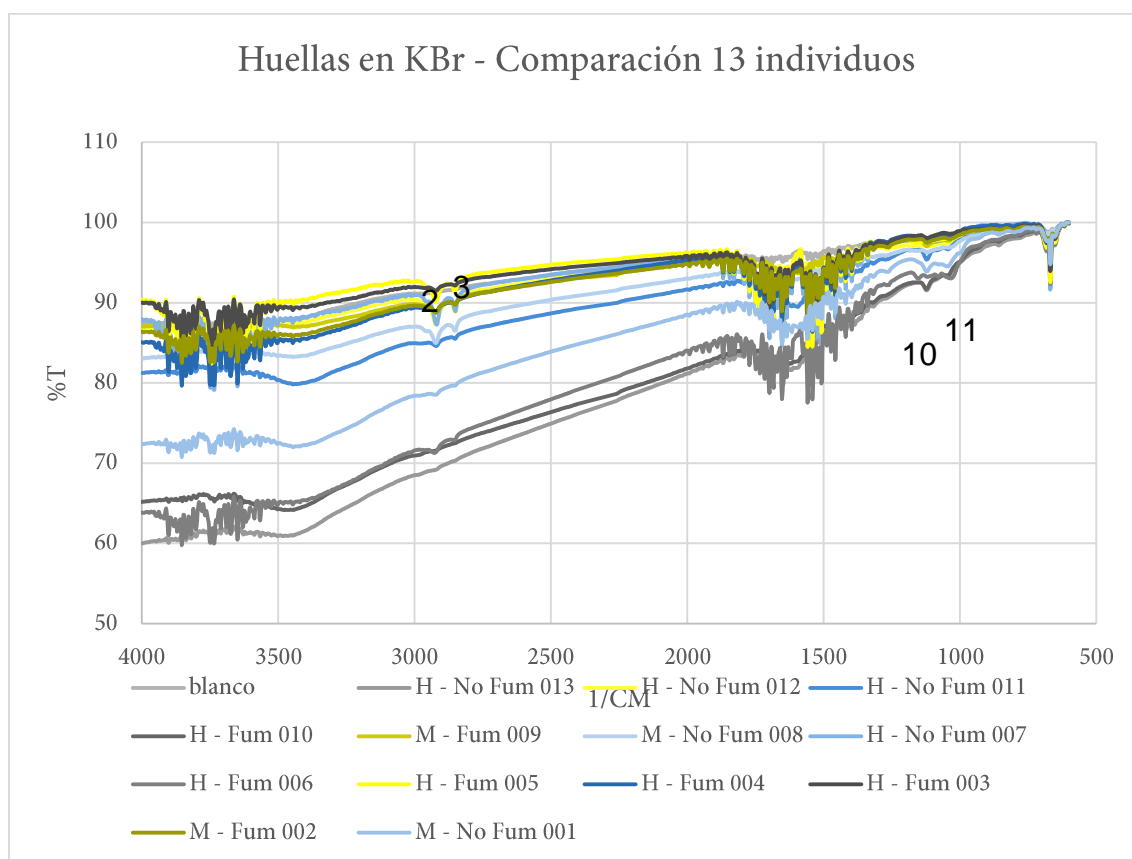
IV. Resultados y discusión

Los primeros resultados obtenidos con los distintos soportes empleados para las tomas de muestras se analizaron en conjunto para determinar la capacidad de encontrar diferencias significativas entre poblaciones de fumadores y no fumadores, mediante el uso de los equipos FTIR. Ya que este estudio dio un resultado no significativo se procedió a escoger el método que ofrecía mejor señal realizando el análisis de los espectros con un solo tipo de toma de muestra.

4.1. Determinación inicial

4.1.1. Impresiones en KBr

Las impresiones dejadas en pastillas de KBr se determinaron por transmitancia FTIR obteniendo los siguientes resultados:



Gráfica 1. Comparación de los espectros obtenidos en 13 individuos con la señal de CO₂ a 2400 cm⁻¹ eliminada.

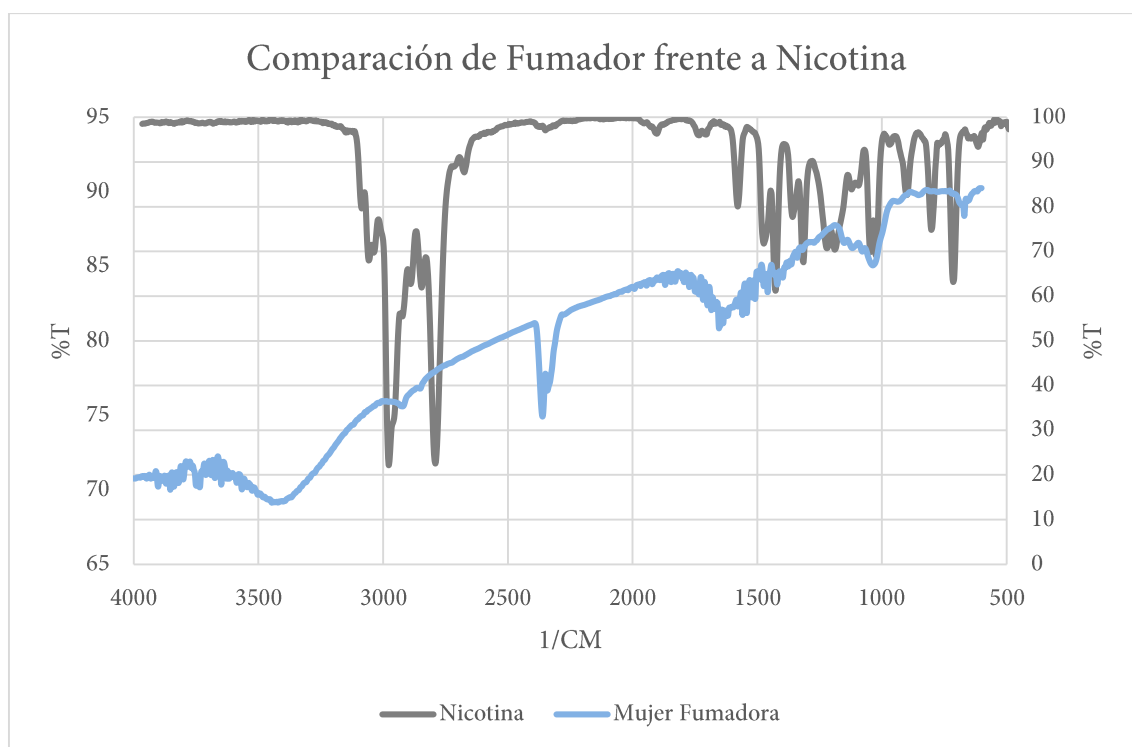
Se puede observar como los espectros varían sin relación aparente entre fumador y no fumador. Las señales obtenidas dependen más de la cantidad de muestra dejada en la pastilla de KBr que de las diferencias entre sexo o fumadores. Los picos observados corresponden a las señales esperadas para una huella dactilar humana (Tabla 3) [15].

Pico	Frecuencia (cm ⁻¹)	Vibración	Asignación Lípido/Proteína
1	3281	Estiramiento N-H (2º amida)	Proteína
2	2923	Estiramiento C-H (1 ^{er} carbono)	Lípido
3	2854	Estiramiento C-H (2º carbono)	Lípido
4	1741	Estiramiento C=O (éster saturado)	Lípido
5	1655	C=O (2ª amida)	Proteína
6	1546	<ul style="list-style-type: none"> • Mayoritario: Flexión en el plano N-H (2ª amida) • Minoritario: Estiramiento C-N 	Proteína Proteína
7	1463	<ul style="list-style-type: none"> • Flexión asimétrica CH₃ • Flexión simétrica CH₂ 	Lípido Lípido
8	1379	Flexión simétrica CH ₃	Lípido
9	1233	Estiramiento C-N (2ª amida)	Proteína
10	1160	Estiramiento C-C-O (éster saturado)	Lípido
11	1113	Estiramiento O-C-C (éster saturado)	Lípido

Tabla 3. Grupos funcionales encontrados en las huellas

Uno de los individuos fumadores ofreció un espectro claramente diferenciado del resto pero este al ser comparado con un patrón de nicotina [20] [21], compuesto que se absorbe por los fumadores [22], no se observaron picos similares por lo que se determinó como

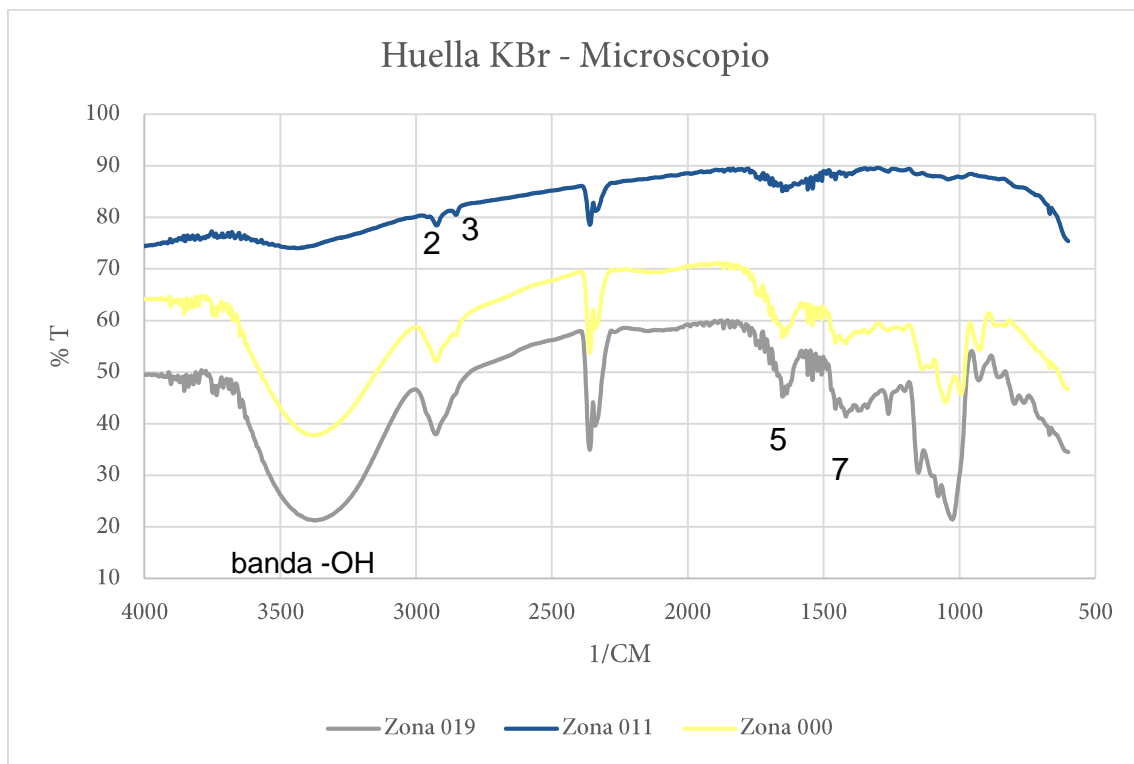
un caso aislado y de contaminación posiblemente por el empleo de otros productos como pueden ser el jabón de manos o cremas corporales.



Gráfica 2. Comparación del espectro de Nicotina frente a un fumador.

4.1.2. Huella en KBr

Se realizó un análisis de una huella en una pastilla de KBr para determinar la viabilidad del método empleando el microscopio de infrarrojos. Se rastreó la pastilla en busca de zonas donde se observara visualmente la presencia de muestra, con la ayuda de la cámara acoplada al microscopio se realizaron capturas de la huella (Figura 13, Figura 14 y Figura 15) para relacionar el aspecto de la muestra con el espectro (Gráfica 3) obtenido:



Gráfica 3. Espectros de huella en pastilla de KBr



Figura 13. Captura del microscopio de la Zona 000



Figura 14. Captura del microscopio de la Zona 011

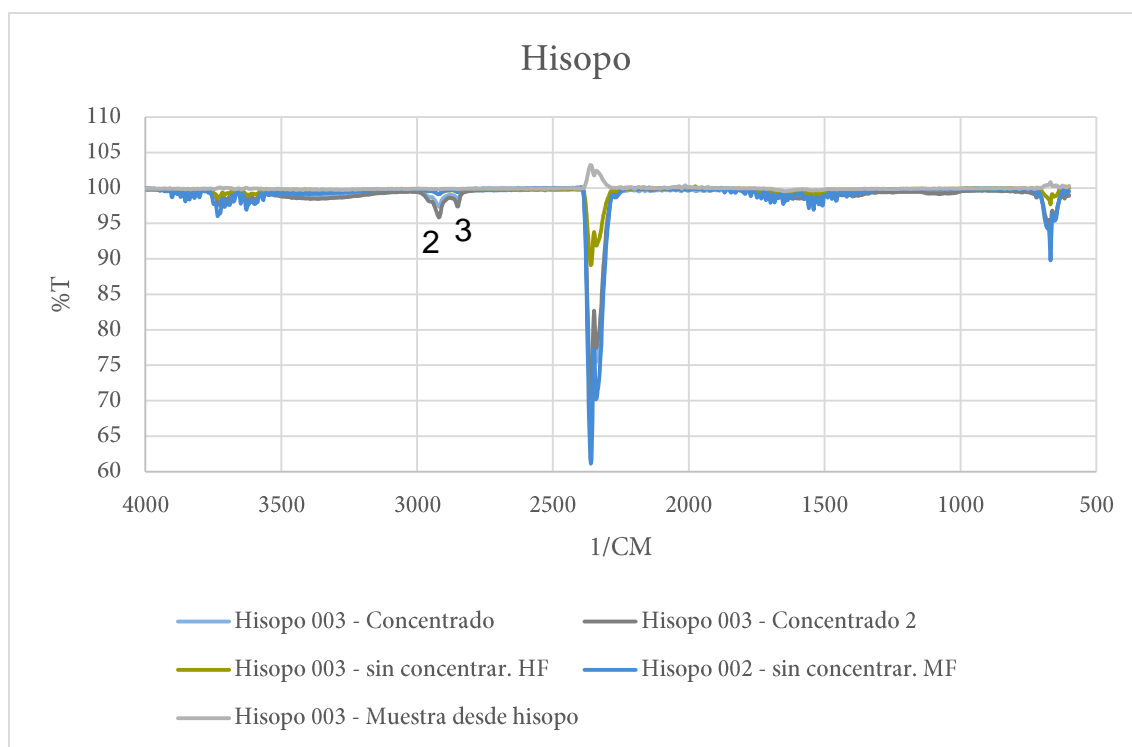


Figura 15. Captura del microscopio de la Zona 019

Se puede observar como las zonas de la pastilla con mayor rastro de la huella como en la zona 000 por su coloración amarillenta o la zona 019 por una “gota” de aspecto oleoso corresponden con los espectros con mayor señal y con una clara banda correspondiente al $-OH$. En el espectro correspondiente a la zona 011 se observa una presencia mínima de la huella siendo consecuente a la aparente ausencia de muestra observada en la captura.

4.1.3. Extracción con hisopo

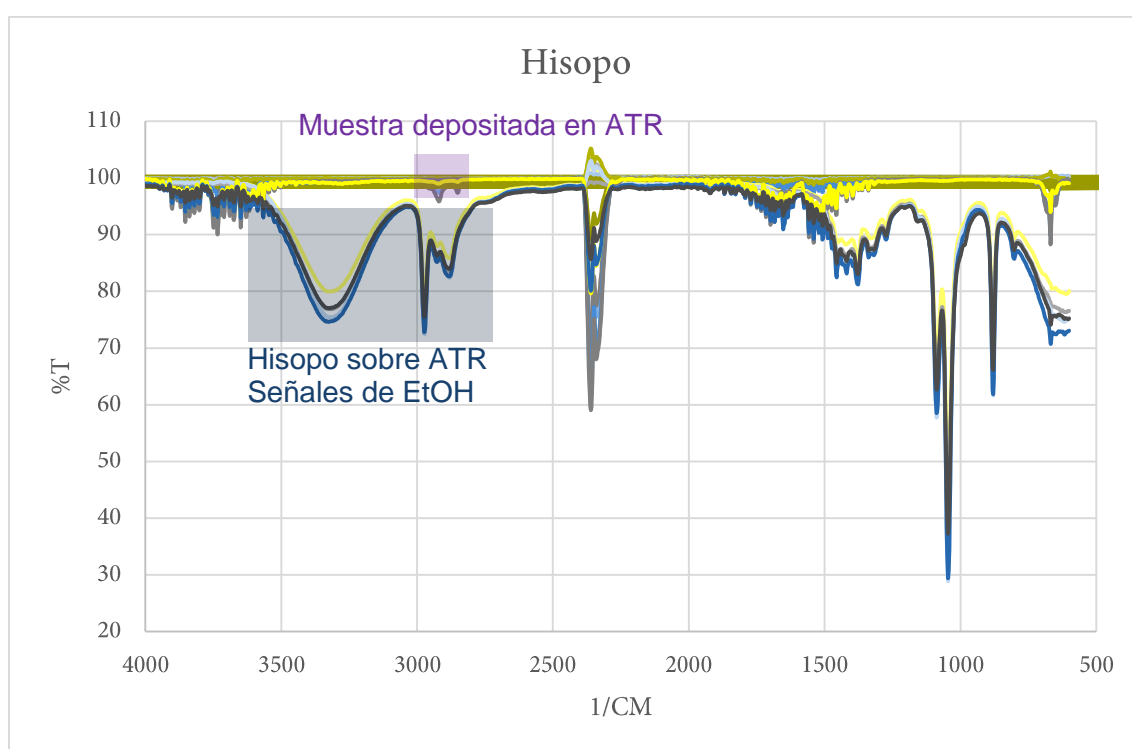
Los hisopos se determinaron utilizando el accesorio ATR del sistema FTIR. Se determinaron los espectros de mediante los tres procedimientos indicados en el apartado 3.1.3, obteniendo los siguientes espectros que se muestran en la Gráfica 4:



Gráfica 4. Comparación de espectros de disolución concentrada, extracción sin concentrar y muestra del hisopo.

Se puede observar que la cantidad de productos corporales extraída del hisopo y transferida al ATR es mínima, aun habiendo realizado una concentración evaporando el disolvente, sólo se siguen apreciando los picos correspondientes a la zona del espectro de entre 2900 y 2600 cm^{-1} .

Posteriormente se comparó los espectros (Gráfica 5) obtenidos depositando la muestra sobre el ATR desde el hisopo con los espectros manteniendo el hisopo sobre el cristal del equipo durante la detección. Se puede observar como aumenta la señal y los picos detectados pero estos corresponden al Etanol usado como disolvente y al propio algodón del hisopo, las posibles señales debidas a los productos corporales de fumadores y no fumadores resultan enmascaradas.



Gráfica 5. Comparación de espectros de Hisopo sobre ATR y Disolución.

4.1.4. Huella en superficie metálica

Las huellas en superficie metálica se determinaron utilizando:

- Detector FPA:

Se intentó realizar una imagen de la huella mediante la técnica *imaging* utilizando el detector FPA. No se consiguieron resultados positivos ya que la mayoría de las señales eran demasiado débiles como para ser detectadas por el FPA y realizar la interpolación de los espectros para la creación de la imagen. Solamente alguna zonas puntuales (Figura 16 y Figura 17) de la huella con mayor concentración de muestra ofrecieron la intensidad suficiente para poder crear una imagen correspondiente al pico 2 (2920 cm^{-1}) de la Tabla 3.

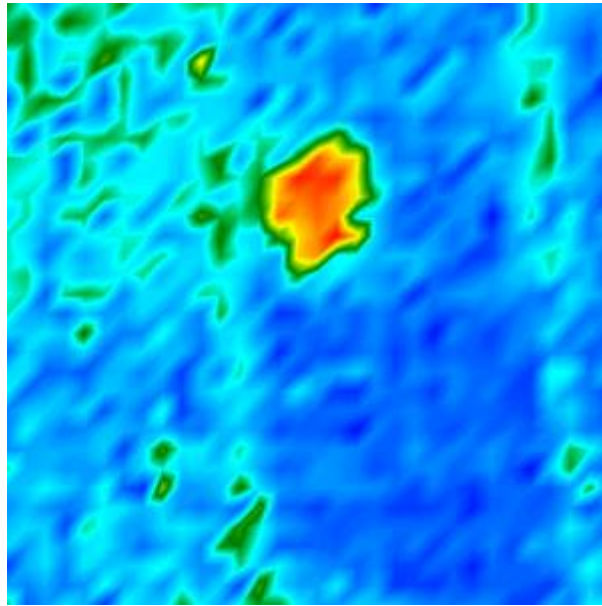
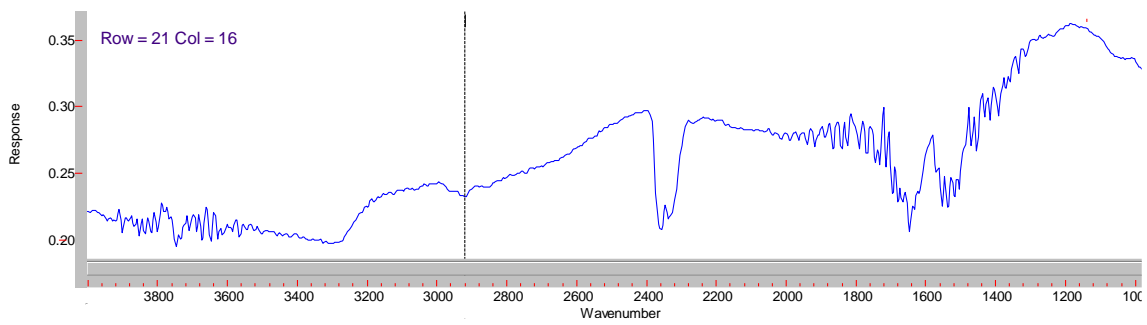


Figura 16. Imagen de la Zona 12 de una huella obtenida por interpolación de espectros a 2920 cm^{-1}



Gráfica 6. Espectro correspondiente a la Fila 21 - Columna 16.

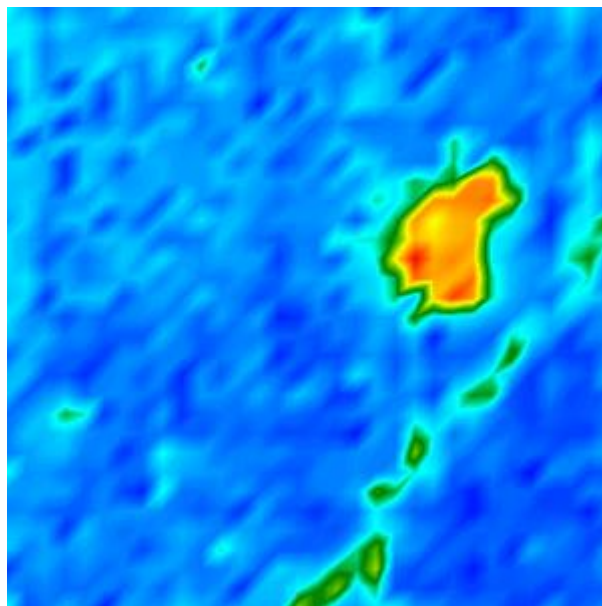
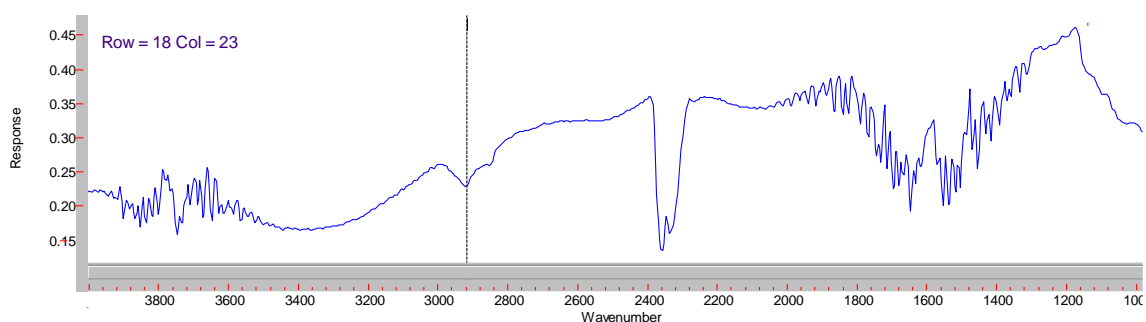


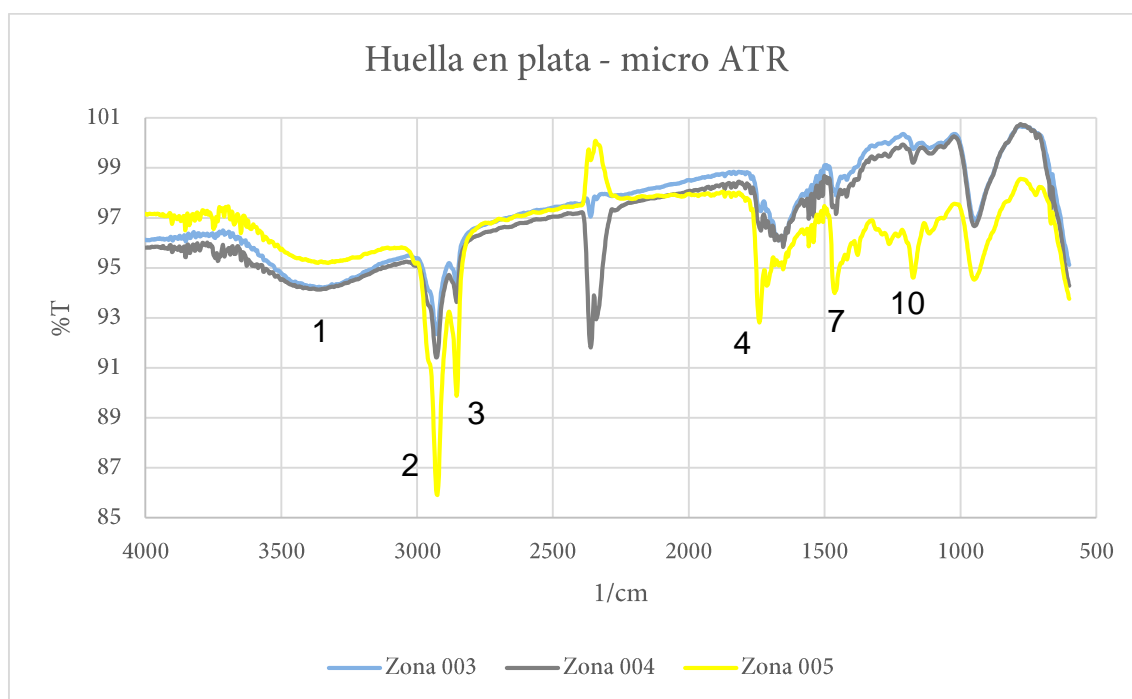
Figura 17. Imagen de la Zona 7 de una huella obtenida por interpolación de espectros a 2920 cm^{-1}



Gráfica 7. Espectro correspondiente a la Fila 18 - Columna 23.

- Micro - ATR:

Se realizó un análisis de una huella en una superficie de plata, con ayuda de la cámara acoplada al microscopio se rastreó la plata en busca de rastros de la huella depositada. Se capturó una imagen (Figura 18, Figura 19 y Figura 20) de la zona y se procedió a determinar espectro de infrarrojo (Gráfica 8) de la zona utilizando el acople micro-ATR para el microscopio.



Gráfica 8. Espectros de huella en superficie de plata

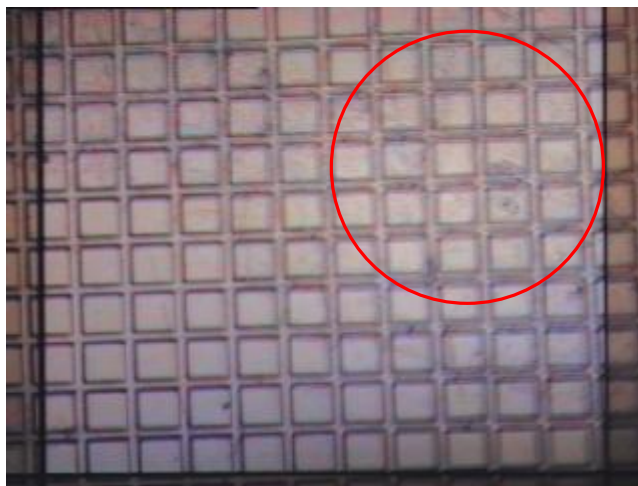


Figura 18. Captura del microscopio de la Zona 003, remarcado en rojo la huella.

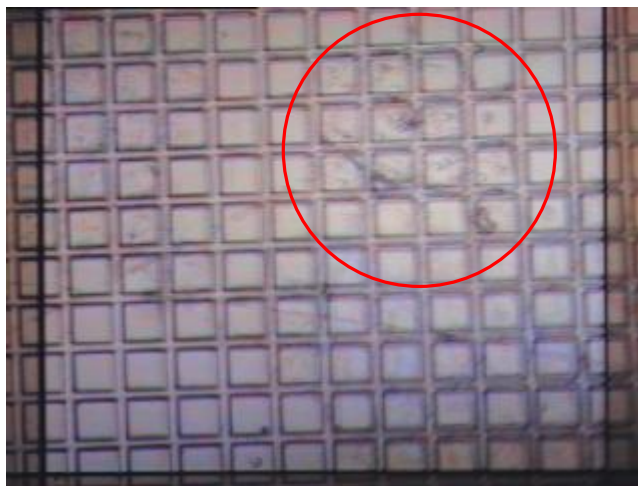


Figura 19. Captura del microscopio de la Zona 004, remarcado en rojo la huella.

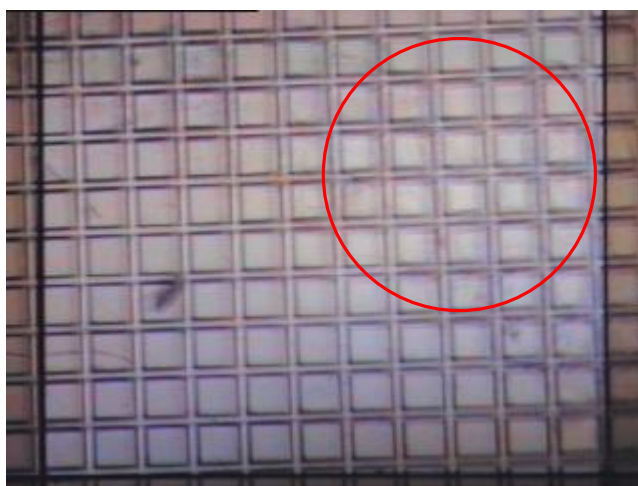


Figura 20. Captura del microscopio de la Zona 005, remarcado en rojo la huella.

4.2. Comparación de los cuatro métodos

Se tomaron los quince picos de todos los espectros disponibles (71) elaborando por tanto una matriz de 71x15 elementos. De los mencionados 71 elementos, se dispone de 14 correspondientes a *mujer fumadora* (tipo 3), 3 correspondientes a *mujer no fumadora* (tipo 2), 5 correspondientes a *hombre fumador* (tipo 1) y 49 correspondientes a *hombre no fumador* (tipo 0). Los análisis no pueden ser concluyentes debido al escaso número de muestras de tipo 1 y 2, y al desequilibrio en proporción de muestras (casi el 70% son *hombres no fumadores*). No obstante, las muestras disponibles se dividieron aleatoriamente en un conjunto de entrenamiento y otro de ensayo, disponiendo que el 70% de las muestras constituyan parte del grupo de entrenamiento. Esta división se realizó tres veces diferentes, utilizando el resultado cada vez en una clasificación por RNA, empleando como factor de sigmoidal (α) 0.90, parámetro de aprendizaje (η) 0.95, 16 neuronas por capa con una capa oculta.

4.2.1. Resultados

1^{er} ensayo: $v_{ent}^1=(11,3,5,36)$ y por tanto $v_{ens}=(3,0,0,13)$.

Tipo	0	1	2	3	Total
0	9	0	2	2	9 de 13
1	0	0	0	0	0 de 0
2	0	0	0	0	0 de 0
3	2	0	0	1	1 de 3

Tabla 4. Las filas indican cuántas muestras de ése tipo se clasificaron de acuerdo con el tipo indicado en la columna.

¹ Llamamos v_{ent} a un vector que nos indica cuántas muestras de cada categoría hay en el conjunto de entrenamiento; de forma similar v_{ens} se refiere al número de muestras de cada tipo en el conjunto de ensayo. Por lógica $v_{ens}+v_{ent} = (14,3,5,49)$.

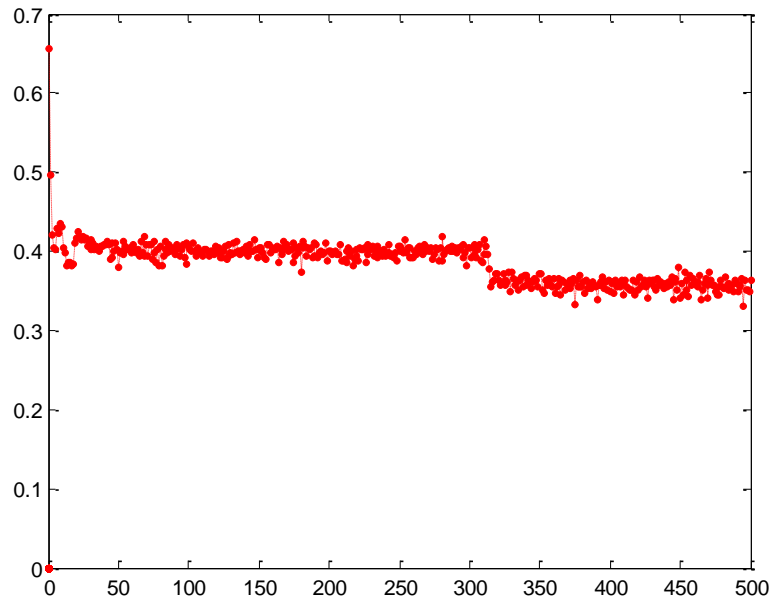


Figura 21. Variación del error con el número de ciclos para la clasificación por RNA en el primer ensayo.

2º ensayo: $v_{ent}=(13,2,4,34)$ y por tanto $v_{ens}=(1,1,1,15)$

Tipo	0	1	2	3	Total
0	11	2	0	2	11 de 15
1	1	0	0	0	0 de 1
2	1	0	0	0	0 de 1
3	1	0	0	0	0 de 1

Tabla 5. Las filas indican cuántas muestras de ése tipo se clasificaron de acuerdo con el tipo indicado en la columna.

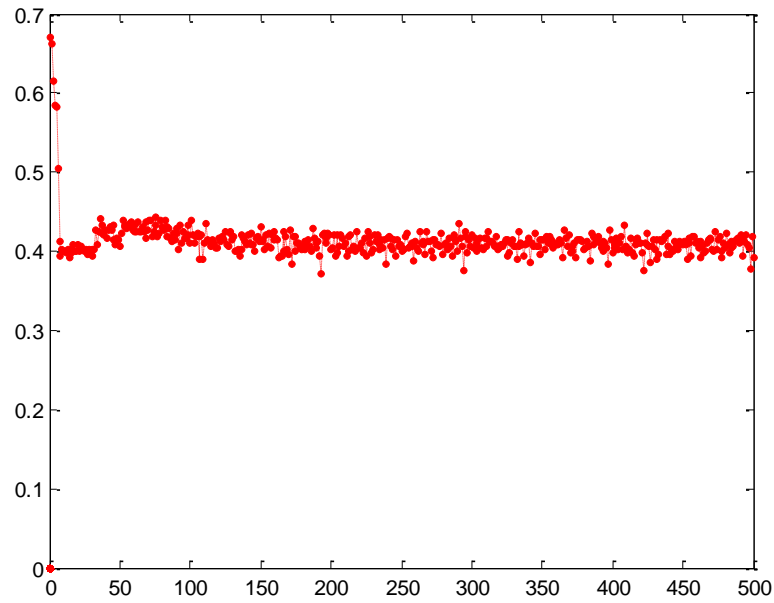


Figura 22. Variación del error con el número de ciclos para la clasificación por RNA en el segundo ensayo.

3^{er} ensayo: $v_{ent}=(11,3,5,36)$ y por tanto $v_{ens}=(3,0,0,13)$.

Tipo	0	1	2	3	Total
0	17	0	2	0	17 de 19
1	1	0	0	0	0 de 1
2	0	0	0	0	0 de 0
3	3	0	0	0	0 de 3

Tabla 6. Las filas indican cuántas muestras de ése tipo se clasificaron de acuerdo con el tipo indicado en la columna.

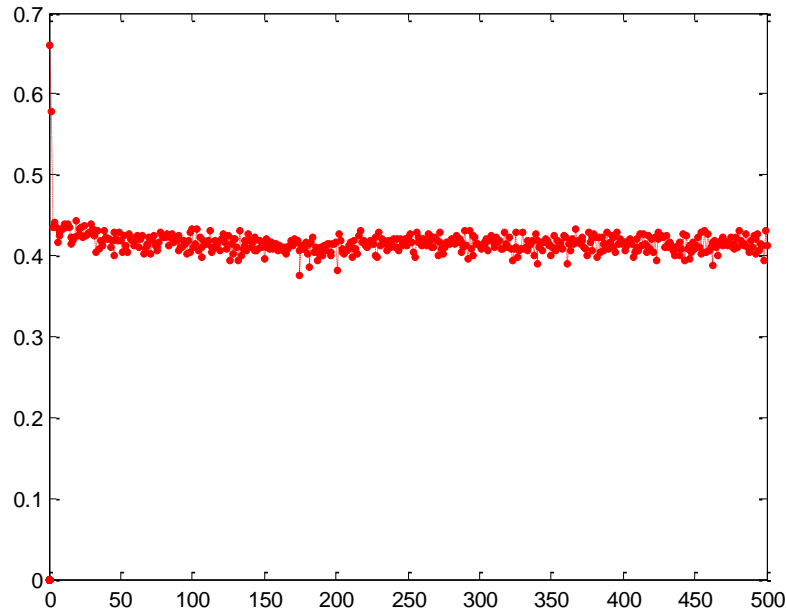


Figura 23. Variación del error con el número de ciclos para la clasificación por RNA en el tercer ensayo.

Como puede verse en los datos anteriores, la red no es capaz de diferenciar las distintas categorías sino que tiende a clasificarlas todas en la clase 0, probablemente porque es de las que más datos tiene.

4.2.2. Resultados empleando sólo el criterio de fumador / no fumador

1^{er} ensayo: $v_{ent}=(18,38)$ y por tanto $v_{ens}=(4,11)$

Tipo	Fumador	No fumador	Total
Fumador	1	3	1 de 4
No fumador	1	10	10 de 11

2º ensayo: $v_{ent}=(16,36)$ y por tanto $v_{ens}=(6,13)$

Tipo	Fumador	No fumador	Total
Fumador	0	6	0 de 6
No fumador	12	1	12 de 13

3º ensayo: $v_{ent}=(17,35)$ y por tanto $v_{ens}=(5,14)$

Tipo	Fumador	No fumador	Total
Fumador	1	4	1 de 5
No fumador	11	3	11 de 14

Con el número de datos presentado no es suficiente para poder establecer una clasificación mediante redes neuronales. No obstante hay una clara disparidad en cuanto al número de muestras presentes de cada tipo, lo que dificulta el análisis. La red neuronal, en los dos casos presentados, clasifica prácticamente la totalidad de las muestras en el grupo más abundante, lo que es de esperar dada la desproporción de muestras de entrenamiento.

4.2.3. Selección del mejor método

Ante los resultados obtenidos mediante las redes neuronales se procedió a comparar los espectros de las distintas técnicas mediante el coeficiente MAD:

	Huella 1 M.F - 4	Huella 1 M.F - 3	Huella 1 M.F - 2	Huella 1 M.F - 1	Huella 2 H.NF - 3	Huella 2 H.NF - 2	Huella 2 H.NF - 1
Huella 1 M.F - 4	1.000	0.694	0.499	-1.115	-0.272	-0.495	-0.213
Huella 1 M.F - 3	0.694	1.000	0.580	-1.287	-0.515	-0.653	-0.370
Huella 1 M.F - 2	0.499	0.580	1.000	-1.324	-0.540	-0.758	-0.461
Huella 1 M.F - 1	-1.115	-1.287	-1.324	1.000	-0.058	0.246	-0.053
Huella 2 H.NF - 3	-0.272	-0.515	-0.540	-0.058	1.000	0.505	0.463
Huella 2 H.NF - 2	-0.495	-0.653	-0.758	0.246	0.505	1.000	0.654
Huella 2 H.NF - 1	-0.213	-0.370	-0.461	-0.053	0.463	0.654	1.000

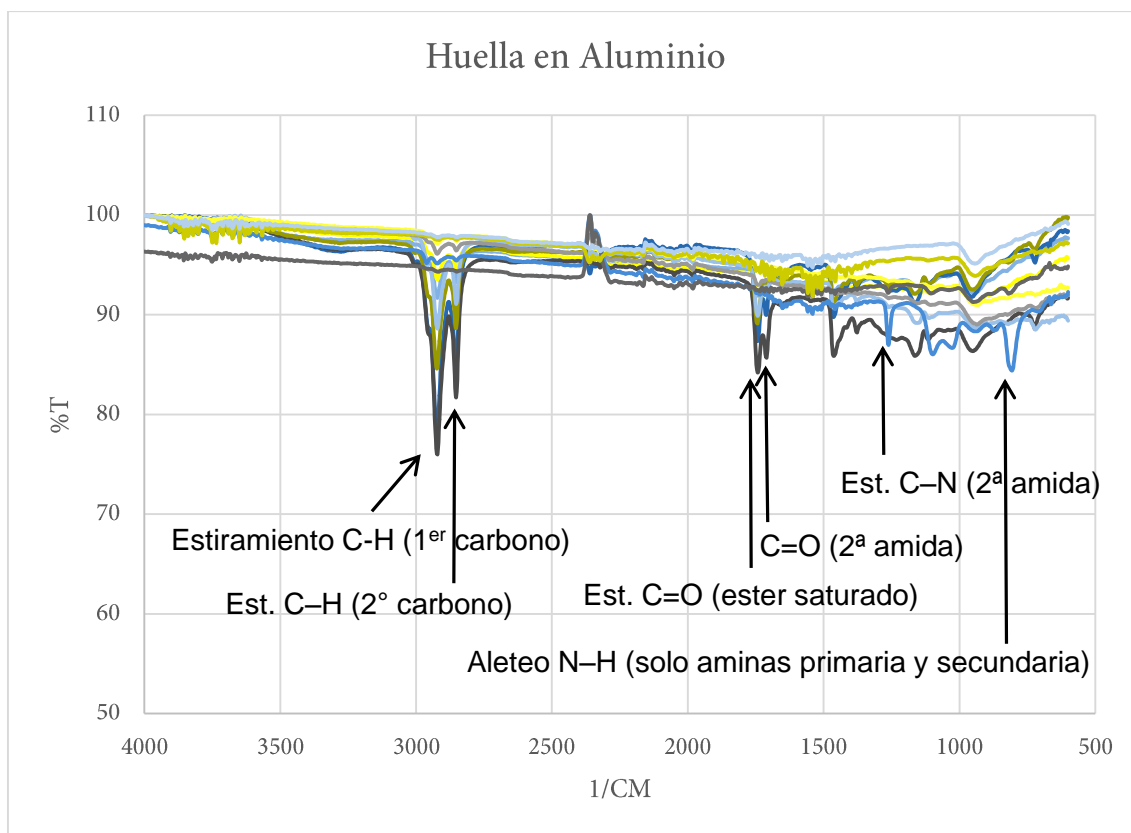
Tabla 7. Coeficientes MAD para huellas ATR en Aluminio

Como se puede observar, los coeficientes MAD (Tabla 7) muestran una relación de los espectros cuando provienen del mismo individuo pero cuando se comparan con otro, los espectros son tan diferentes que es menor que cero. En el resto de técnicas se observaron las mismas complicaciones por lo tanto las diferencias entre espectros dependen más por las condiciones de medición que por las propias diferencias entre fumador o no fumador. Por lo tanto se procedió a comparar los espectros individualmente para seleccionar la técnica que mejor relación señal / ruido presenta. Como se puede observar comparando la Gráfica 1, Gráfica 3, Gráfica 4 y Gráfica 8 los picos obtenidos por ATR de una huella en una superficie metálica son más intensos y la interferencia por CO₂ es mucho menor que en el resto de métodos.

4.3. Determinación de huellas con ATR en láminas de aluminio

Se amplió el muestreo para intentar conseguir una equiparación entre el número de muestras de cada clase. Se procesaron, por tanto, los picos de 82 espectros (22 hombres

no fumadores, 20 hombres fumadores, 22 mujeres fumadoras y 18 mujeres no fumadoras).



Gráfica 9. Comparación de los picos de doce espectros

El análisis por ADL (análisis discriminante lineal) presenta unos resultados bastante pobres, mostrados en la Tabla 8. Como puede verse en las gráficas, parece que es más fácilmente distinguible el hecho de ser hombre o mujer al de ser fumador o no fumador.

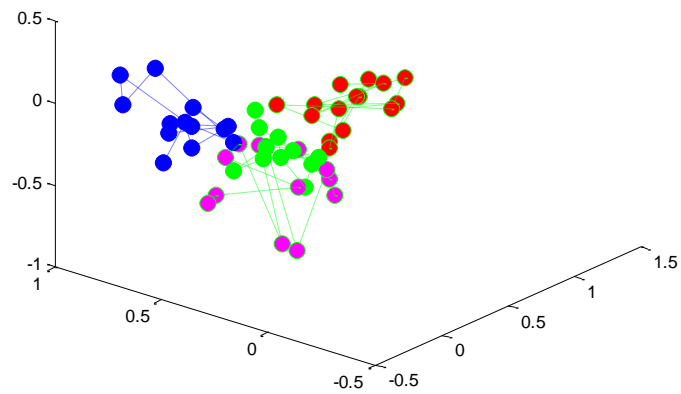
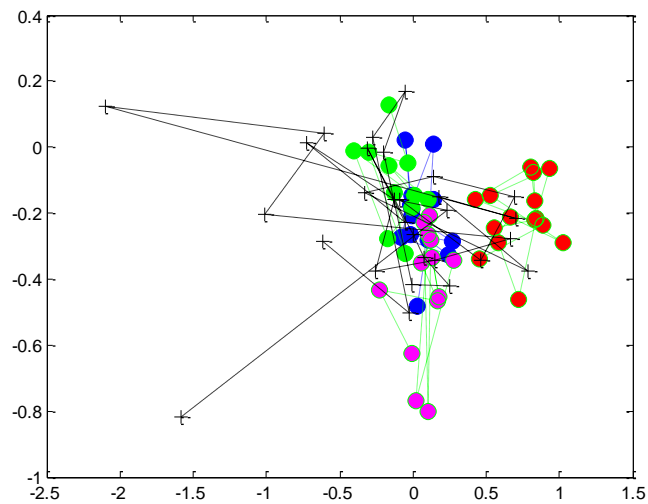
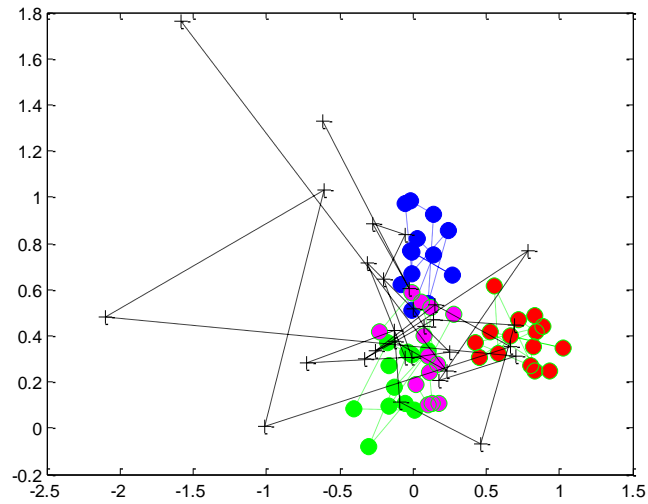


Figura 24. Representación gráfica del análisis ADL con cuatro categorías

El color azul representa a los hombres fumadores, el verde a las mujeres fumadoras, el rojo a los hombres no fumadores y el fucsia a las mujeres no fumadoras. Las cruces negras representan las muestras problema, desconocidas.

	Aciertos	Fallos	Inclasificable
Hombre fumador	3	3 (MN, MN, MN)	1 (HF)
Mujer fumadora	4	4 (HF, HF, HN, MN)	3 (HF, MF, HN)
Hombre no fumador	2	1 (MF)	4 (HF, MF, MF, HN)
Mujer no fumadora	2	2 (MF, MF)	1 (HF)

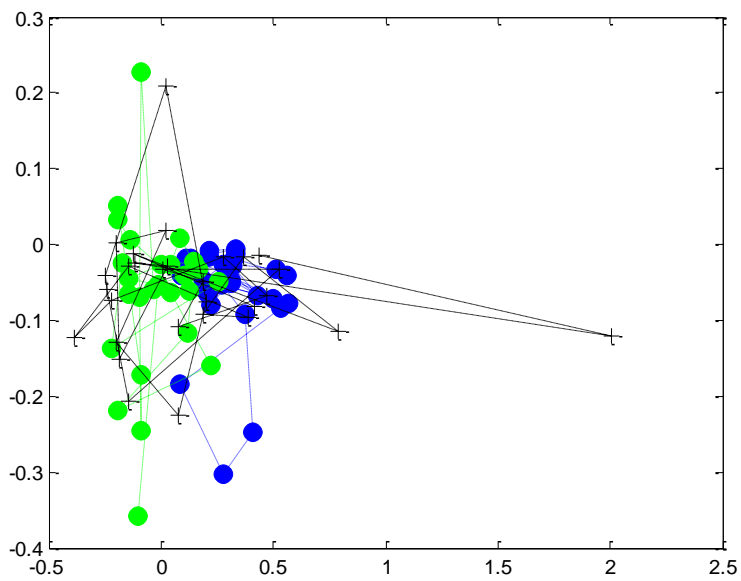
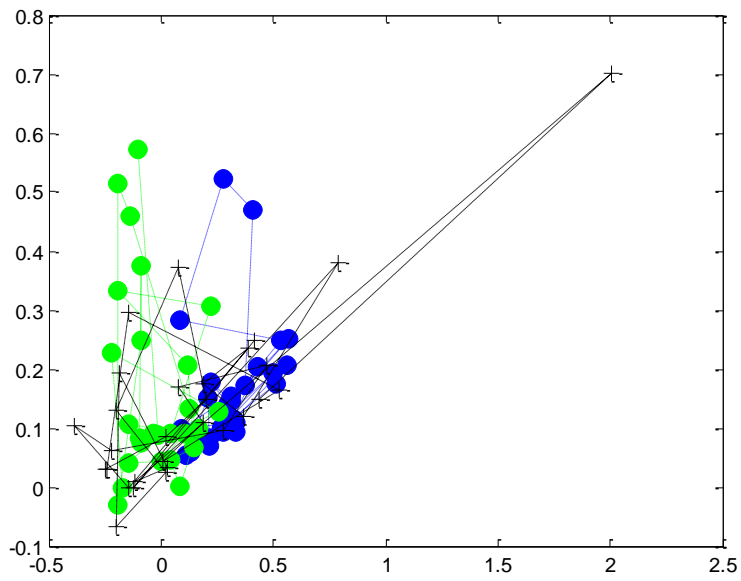
Tabla 8. Resultados por ADL con cuatro categorías. Entre paréntesis se da la clase en la que lo clasifica, o a la que más se aproxima en caso de inclasificable. El conjunto de entrenamiento está compuesto por 52 muestras y el de ensayo por 30.

Esta clasificación por ADL se intentó repetir considerando únicamente dos categorías: fumadores y no fumadores. En ese caso la tabla de resultados queda como sigue:

	Aciertos	Fallos	Inclasificable
Fumador	8	6	1 (F)
No fumador	11	2	1 (F)

Tabla 9. Resultados por ADL con dos categorías: Fumador y No Fumador. El conjunto de entrenamiento está compuesto por 53 muestras y el de ensayo por 29.

Siendo las representaciones gráficas:



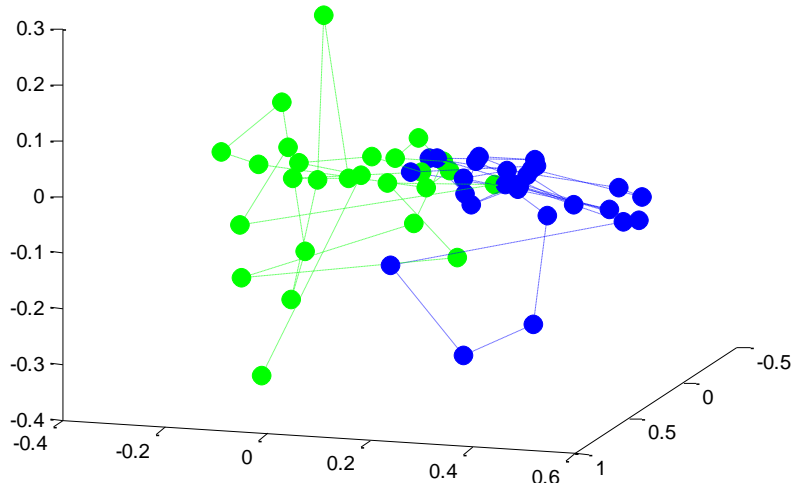


Figura 25. Representación gráfica del análisis ADL con dos categorías

Con los resultados observados parece haber una cierta tendencia a la separación, si bien los centroides están muy próximos y hay una amplia zona de confusión. Es posible que un mayor procesamiento matemático de las muestras, o quizá variaciones experimentales, permitan conseguir mejores resultados.

4.4. Muestras de pelo

Se estudiaron muestras de pelo (Figura 26) mediante el microscopio de infrarrojos con detector FPA con la intención de detectar rastros de nicotina o diferencias en el espectro de FTIR que permitieran la discriminación entre fumadores o no fumadores, pero no se consiguieron resultados satisfactorios.



Figura 26. Captura de imagen con el microscopio óptica de la muestra de pelos

La calibración del detector FPA se realiza empleando una superficie de oro que regula la intensidad de luz máxima que recibirán los detectores durante un análisis. En nuestro caso, la cantidad de luz reflejada en la muestra no es suficiente para formar una imagen de calidad. Alternativamente, se procedió a calibrar el detector FPA con la resina en donde está encapsulada nuestra muestra con resultados igualmente pobres.

Ante estos resultados se intentó realizar una medición mediante micro-ATR (Figura 27) ya que este no depende tanto de la cantidad de luz que reciba el detector. Las imágenes obtenidas volvieron a ser deficientes debido a la pobre calibración del detector FPA.

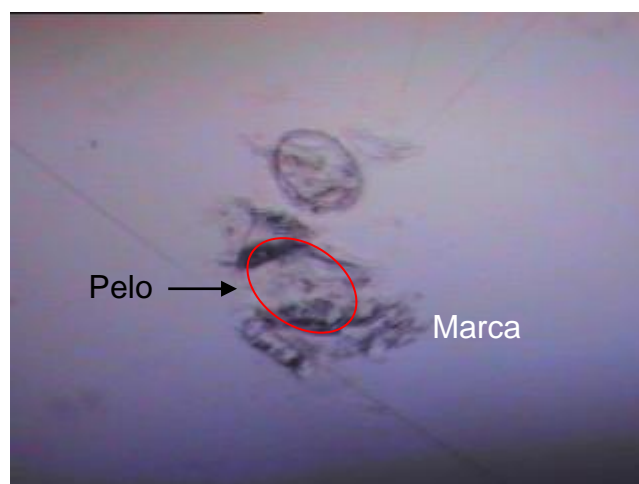


Figura 27. Marca dejada en la resina por el micro-ATR

V. Conclusiones

El estudio de huellas digitales humanas mediante espectroscopia FTIR empleando distintas superficies de soporte para la toma de muestra, sugiere la posibilidad de utilizar esta técnica para la determinación de compuestos de interés en muestras de origen biológico como cita la bibliografía consultada.

Los resultados obtenidos con ADL muestran una tendencia a la separación de las poblaciones a pesar de encontrarse aún muy cercanas. La optimización de la toma de muestra para permitir una mejor impresión; optimización de las superficies para obtener las muestras como puede ser la utilización de placas de oro que además ayudaría a la calibración del detector FPA; y el acceso a un mayor número de población de estudio, podrían permitir obtener resultados más definitivos y claros para el desarrollo de una metodología de *screening* de compuesto químicos no invasiva.

VI. Bibliografía

- [1] S. Bell, *Forensic Chemistry*, Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2006.
- [2] T. Passie, J. Seifert, U. Schneider y H. M. Emrich, «The pharmacology of psilocybin.,» *Addiction Biology*, nº 7, pp. 357-364, 2002.
- [3] National Institute on Drug Abuse, «National Institute on Drug Abuse,» Julio 2012. [En línea]. Available: <http://www.drugabuse.gov/publications/research-reports/tobacco/nicotine-addictive>. [Último acceso: Mayo 2014].
- [4] National Institutes of Health, «MedlinePlus,» Octubre 2012. [En línea]. Available: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000953.htm>. [Último acceso: Mayo 2014].
- [5] Thermo Nicolet, «Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry,» Thermo Nicolet Corporation, 2001.
- [6] L. Kobilinsky, *Forensic Chemistry Handbook*, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2012.
- [7] K. A. Rubinson y J. F. Rubinson, *Análisis Instrumental*, Prentice Hall, 2001.
- [8] PerkinElmer, «FT-IR Spectroscopy. Attenuated Total Reflectance (ATR),» PerkinElmer Life and Analytical Sciences, 2005.
- [9] Agilent Technologies, «FTIR chemical imaging using focal plane array-based systems,» Agilent Technologies, Inc, 2011.
- [10] N. D. Kaushika, R. K. Tomar y S. C. Kaushik, «Artificial neural network model based on interrelationship of direct, diffuse and global solar radiations,» *Solar Energy*, vol. 103, pp. 327-342, 2014.
- [11] J. M. Zurada, *Introduction to Artificial Neural Systems*, St. Paul, MN: West Publishing Company, 1992.

- [12] S. Haykin, *Neural Networks*, Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall International, 1999.
- [13] R. Bhargava, «Infrared Spectroscopic Imaging: The Next Generation,» *Applied Spectroscopy*, vol. 66, nº 10, pp. 1091-1120, 2012.
- [14] K. L. A. Chan y S. G. Kazarian, «Fourier Transform Infrared Imaging for High-Throughput Analysis of Pharmaceutical Formulations,» *J. Comb. Chem*, nº 7, pp. 185-189, 2005.
- [15] P. Fritz, W. van Bronswijk, K. Lepkova, S. W. Lewis, K. F. Lim, D. E. Martin y L. Puskar, «Infrared microscopy studies of the chemical composition of latent fingerprint residues,» *Microchemical Journal*, nº 111, pp. 40-46, 2013.
- [16] C. Ricci, S. Bleay y S. K. Kazarian, «Spectroscopic Imaging of Latent Fingermarks Collected with the Aid of a Gelatin Tape,» *Anal. Chem.*, nº 79, pp. 5771-5776, 2007.
- [17] D. J. Nagle, G. A. George, L. Rintoul y P. M. Fredericks, «Use of micro-ATR/FTIR imaging to study heterogeneous polymer oxidation by direct solvent casting onto the ATR IRE,» *Vibrational Spectroscopy*, nº 53, pp. 24-27, 2010.
- [18] K. Kyung Sook y P. Hun-Kuk, «Analysis of aging effects on chemical property of human hair by Fourier transform infrared spectroscopy,» *Skin Research and Technology*, nº 19, pp. e325-e331, 2013.
- [19] K. Varmuza, M. Karlovits y W. Demuth, «Spectral similarity versus structural similarity: infrared spectroscopy,» *Analytica Chimica Acta*, nº 490, pp. 313-324, 2003.
- [20] Z. Bacsik, J. McGregor y J. Mink, «FTIR analysis of gaseous compounds in the mainstream smoke of regular and light cigarettes,» *Food and Chemical Toxicology*, nº 45, pp. 266-271, 2007.

- [21] National Institute of Standards and Technology, «NIST Chemistry WebBook,» NIST, [En línea]. Available: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C54115&Type=IR-SPEC&Index=0>. [Último acceso: Febrero 2014].
- [22] A. F. Lavorante, S. Garrigues, B. F. Reis, Á. Morales-Rubio y M. de la Guardia, «Monitoring of the smoking process by multicommutation Fourier Transform Infrared spectroscopy,» *Food and Chemical Toxicology*, nº 45, pp. 266-271, 2007.