



DETERMINACIÓN DE METALES EN TABACO Y CENIZAS MEDIANTE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

Nerea González Rodríguez

Universidad de Burgos

Junio de 2017

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Abstract..... | 1 |
| Resumen | 1 |
| Introducción | 2 |
| Objectives..... | 3 |
| Técnicas instrumentales | 4 |
| Absorción atómica | 4 |
| Fotometría de llama | 4 |
| Herramientas de análisis de datos | 5 |
| Análisis de Componentes principales..... | 5 |
| Procedimiento experimental..... | 5 |
| Instrumentación, reactivos y software | 5 |
| Preparación de disoluciones patrón | 6 |
| Tratamiento de las muestras | 7 |
| Muestras de tabaco..... | 7 |
| Muestras de ceniza | 8 |
| Preparación de las muestras TEST | 9 |
| Codificación de las muestras..... | 9 |
| Resultados y conclusiones..... | 10 |
| Validación de las rectas de calibrado | 10 |
| Cuantificación de los metales..... | 13 |
| Estudio de las Componentes Principales | 15 |
| Componentes Principales de las muestras de Tabaco..... | 15 |
| Componentes principales de las muestras de ceniza..... | 17 |
| Conclusions | 21 |
| Bibliografía | 22 |

ABSTRACT

The analysis of the evidence found at a crime scene is crucial for its subsequent resolution. Thus, forensic science is responsible for analyzing these evidences by the techniques required, whether chemical, physical, computational methods...

In this study, it is intended to analyze one of these evidences that can be found when solving a crime, such as tobacco remains or ashes.

The presence of metals in both tobacco and ashes can be decisive when classifying the different tobacco brands marketed in Spain. Thereby, the levels of metals in tobacco and ash samples from 13 trademarks were analyzed by atomic absorption spectroscopy (AAS), for Cd, Fe, Mg, Ni, Pb, Co, Cr, Ca and Zn, or by flame emission spectroscopy, for Na and K. The analysis of 5 test samples was also performed.

Once these concentrations were obtained, a principal components analysis was performed in order to classify the analyzed brands, as well as to classify the samples according to their distributor or the variety of tobacco.

RESUMEN

El análisis de las evidencias encontradas en la escena de un crimen es crucial para su posterior resolución. Así, la ciencia forense es la encargada de analizar estas evidencias por las técnicas que se requieran, ya sean métodos químicos, físicos, informáticos...

En este trabajo se pretende analizar una de estas evidencias que pueden ser halladas a la hora de resolver un crimen, como lo son restos de tabaco o cenizas de éste.

La presencia de metales tanto en el tabaco como en las cenizas puede ser determinante a la hora de clasificar las distintas marcas comercializadas en España. De este modo, se analizaron por espectroscopía de absorción atómica (EAA) las concentraciones de Cd, Fe, Mg, Ni, Pb, Co, Cr, Ca y Zn, y mediante espectroscopía de emisión atómica las concentraciones de Na y K, en muestras de tabaco y cenizas de 13 marcas comerciales. Se realizó también el análisis de 5 muestras test.

Una vez obtenidas estas concentraciones, se realizó un análisis de componentes principales con el fin de clasificar las marcas analizadas, así como clasificar las muestras en función de la distribuidora o de la variedad de tabaco.

INTRODUCCIÓN

Se define la ciencia forense como la disciplina que aplica tanto los conocimientos como las técnicas y métodos científicos a cuestiones relacionadas con aspectos legales.

La ciencia forense es una ciencia multidisciplinar, ya que incluye un gran número de ramas de la ciencia y de la tecnología, como química, biología, física, antropología, entomología e informática, entre otras.

El campo de acción de un científico forense se extiende a todo aquel tipo de delitos y problemas legales que puedan requerir su aplicación, diferenciándose de un médico forense (o médico legal), que se centra en delitos en los que está implicado un cuerpo humano.

Dentro de las disciplinas de la ciencia forense, cabe destacar la química, ya que la mayoría de las técnicas y métodos aplicados al estudio de evidencias son de tipo químico. Esta disciplina se divide en toxicología forense y química forense propiamente dicha:

- La toxicología forense trabaja con evidencias de tipo biológico (sangre, saliva, pelo, uñas, restos de piel, órganos del cuerpo...)
- La química forense se centra en métodos analíticos instrumentales y no instrumentales. Las muestras empleadas son variadas y suelen ser muy pequeñas o encontrarse en trazas (1).

El análisis de trazas se realiza, por ejemplo, en pelo, fibras, cristal, pinturas...

Existe gran variedad de objetos que se pueden considerar evidencias en la escena de un crimen. Para la realización de este trabajo se ha considerado la importancia que tiene la posibilidad de determinar la procedencia del tabaco o cenizas de éste encontradas en el escenario de un crimen.

Esta posibilidad ya fue sugerida en 1892 por Sir Arthur Conan Doyle en su novela "Las Aventuras de Sherlock Holmes":

"Encontré ceniza de un cigarro. Con mi especial conocimiento sobre tabacos, pude establecer que se trataba de un cigarro de la India. Como usted sabe, he dedicado cierta atención a este asunto y escrito una breve monografía sobre las cenizas de unas ciento cuarenta variedades diferentes de tabaco para pipa, cigarros y cigarrillos" (2).

Fuera de la ficción, y más recientemente, se han publicado numerosos artículos en los que se estudia la composición de metales de distintas marcas de tabaco, e incluso la posibilidad de diferenciarlas en función de esta composición.

Así, Rubio y colaboradores (3) realizaron un estudio por ICP-OES de 33 muestras de tabaco comercializados en España, en los cuales se determinaron las concentraciones de aluminio, cadmio, cobalto, cromo, manganeso, níquel, plomo y estroncio. Además, encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de cobalto, cromo, manganeso y estroncio entre los tabacos rubios y negros.

Kazi y colaboradores (4) también realizaron un estudio de las concentraciones de metales en distintas marcas de tabaco, tanto en el tabaco propiamente dicho como en las cenizas y los filtros obtenidos tras consumir el cigarrillo. Los metales analizados en este caso fueron aluminio, cadmio, níquel y plomo, mediante espectrometría de absorción atómica electrotermica.

Dentro del análisis cualitativo, se han encontrado referencias bibliográficas en las que se realiza un análisis por componentes principales, con el objetivo de encontrar una técnica que permita la clasificación de distintas marcas de tabaco en función de sus características.

En el trabajo realizado por Pérez-Bernal y colaboradores (5) se estudió la distribución de zinc, boro, manganeso, hierro, magnesio, cobre, titanio, aluminio, estroncio, calcio, bario, sodio, litio y potasio en las cenizas obtenidas tras el consumo del cigarro, mediante ICP-AES. Con estos datos, y empleando, un análisis de componentes principales, se encontraron distribuciones diferentes con las que pudieron separar el tabaco en función de su variedad (rubio o negro) y marca.

Además de los trabajos basados en el análisis de metales, en la revisión bibliográfica realizada también aparecen referencias en las que se han analizado distintas marcas de tabaco mediante espectroscopía de UV-Vis, como el trabajo realizado por Giokas y colaboradores (6), en el que se aplica un análisis de componentes principales a los espectros obtenido de extractos acuosos de distintos tabacos.

Con esta información, en este trabajo se ha llevado a cabo la determinación de cadmio, níquel, plomo, zinc, hierro, magnesio, calcio, sodio, potasio, cobalto y cromo en cenizas y tabaco de 13 marcas de tabaco distintas mediante espectroscopía de absorción atómica y fotometría de llama, y se ha realizado un estudio por componentes principales para intentar clasificar las muestras en función de su contenido en metales.

OBJECTIVES

This study aims to:

- Quantify the metal content present in tobacco and tobacco ash samples using instrumental analysis techniques (atomic absorption spectroscopy and flame emission spectroscopy).
- Validate measurement methods with appropriate calibration models.
- Identify, by the metal content, different brands of tobacco marketed in Spain, its distributors and the variety of tobacco, using multivariate analysis.
- Develop transversal and specific competences framed in the bachelor thesis.

TÉCNICAS INSTRUMENTALES

ABSORCIÓN ATÓMICA

Las técnicas espectroscópicas atómicas de absorción consisten en la atomización de la muestra, es decir, en la transformación de la muestra en átomos en estado vapor, y en la medida de la radiación electromagnética absorbida por dichos átomos.

En absorción atómica, la concentración se deduce de la medida de la absorbancia de la luz por los átomos de los elementos que permanecen en el estado fundamental cuando son irradiados por una fuente luminosa con una longitud de onda adecuada.

El esquema óptico de un equipo de absorción atómica (Figura 1) consta de cuatro partes principales: el haz de luminoso procedente de la fente de radiación, que atraviesa la llama, donde se produce la atomización del elemento a analizar y se enfoca en un monocromador. La radiación seleccionada termina en la ventana de entrada de un detector, que se procesa para su lectura (7).

1. **Fuente de radiación:** Lámparas de cátodo hueco. Constan de un ánodo de tungsteno y un cátodo cilíndrico sellado en un tubo de vidrio lleno con gas neón. El cátodo está construido del metal que se desea detectar.
2. **Atomizador:** es el encargado de vaporizar la muestra. En la atomización con llama, una solución de la muestra se nebuliza mediante un flujo de oxidante gaseoso mezclado con un combustible también gaseoso y se lleva hacia una llama donde ocurre la atomización. Se empleará un atomizador con acetileno como combustible y aire como oxidante (8).
3. **Monocromador:** aísla la línea de resonancia del elemento de interés.
4. **Detector:** Tubo fotomultiplicador. transforma la señal luminosa en señal eléctrica para ser procesada.

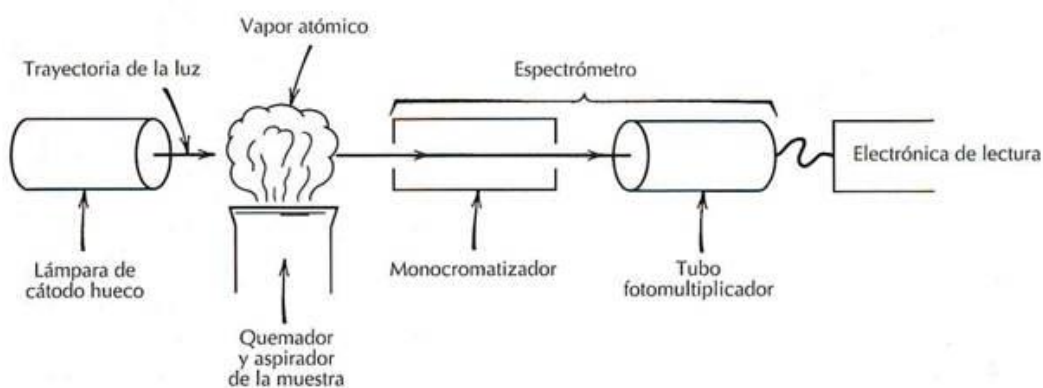


Figura 1. Esquema de un sistema de espectroscopía de absorción atómica

FOTOMETRÍA DE LLAMA

La fotometría de llama, también denominada espectroscopía de emisión de llama, tiene gran aplicación en la determinación de sodio, potasio, litio y calcio, ya que suelen ser difíciles de determinar por medio de otras técnicas. La fotometría de llama permite un análisis rápido y con una relativa falta de interferencias.

La instrumentación de la fotometría de llama es similar a la de absorción, con la diferencia de que, en el caso de la fotometría, la llama actúa como fuente de excitación y no es necesaria la lámpara de cátodo hueco.

Para el análisis de metales alcalinos y alcalinotérreos a menudo es suficiente con la utilización de fotómetros de filtros.

HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS DE DATOS

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

En análisis de componentes principales (ACP) es una técnica empleada para reducir la cantidad de datos cuando existe una correlación entre éstos.

La idea es encontrar unos componentes principales, Z_n , que sean combinación lineal de las variables originales, X_n , es decir:

$$Z_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + \dots + a_{1n}X_n$$

$$Z_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + \dots + a_{2n}X_n$$

Los coeficientes (a_{11} , a_{12} ...), denominados pesos o "loadings", se eligen de manera que las nuevas variables Z_n no estén relacionadas unas con otras.

Las componentes principales se eligen de manera que la primera componente principal, CP1, recoja la mayor parte de la variabilidad del conjunto de datos, la segunda componente (CP2) recoja la segunda mayor parte de la varianza, y así sucesivamente. De esta forma, cuando haya correlación significativa entre el número de variables, el número de componentes principales útiles será menor.

La proyección de los objetos sobre el espacio de las componentes principales proporciona las puntuaciones o "scores" (9).

Para decidir el número de componentes principales válidas, existen varios criterios:

- La interpretación gráfica de las componentes.
- Componentes principales con autovalores mayores de 1, si los datos están autoescalados.
- Componentes que expliquen la mayor variabilidad de los datos.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

INSTRUMENTACIÓN, REACTIVOS Y SOFTWARE

Para llevar a cabo la determinación de Cd, Fe, Mg, Ni, Pb, Co, Cr, Ca y Zn en las muestras de tabaco y cenizas se ha empleado un espectrofotómetro de absorción atómica modelo Z-8200 Polarized Zeeman Hitachi. Como combustible se ha utilizado acetileno y como oxidante aire suministrado por un compresor. Las condiciones analíticas empleadas para cada metal fueron las recomendadas por el fabricante.

El Na y el K se determinaron empleando un fotómetro de llama, modelo 410 Ciba Corning Analytical.

En primer lugar, se prepararon disoluciones patrón de 1000 ppm de cada uno de los metales a analizar a partir de las siguientes sales: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , NaNO_3 y $\text{Ni}(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, en HNO_3 al 5% (v/v).

El análisis de los datos obtenidos se efectuó con el paquete informático STATGRAPHICS Centurion XVII (10) para los análisis de regresión y análisis multivariantes.

PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN

Para la preparación de los patrones de calibrado, se utilizaron las sales de cada uno de los metales que se iban a determinar, principalmente nitratos, enumeradas en el apartado anterior. Se pesaron las cantidades adecuadas de cada una de ellas para obtener una disolución patrón de 500 ppm de cada metal. Estas disoluciones madre concentradas se diluyeron hasta 50 ppm, obteniéndose la disolución de trabajo a partir de la cual se obtuvieron, mediante dilución en HNO_3 al 5%, los patrones de calibrado necesarios en cada caso.

Para la disolución de cadmio, se partió de una dilución comercial de 1000 ppm, y se diluyó hasta 50 ppm para obtener la disolución madre.

En la Tabla 1 se recogen las concentraciones de las diluciones patrones con las que se realizaron los calibrados.

Tabla 1. Concentraciones de las disoluciones empleadas en la preparación de los patrones

| Sal | Concentración dis. madre (ppm) | Concentración dis. trabajo (ppm) |
|--|--------------------------------|----------------------------------|
| $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ | 503,0 | 50,3 |
| $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ | 509,8 | 51,0 |
| $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 504,6 | 50,5 |
| $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 502,6 | 50,3 |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 500,9 | 50,1 |
| $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ | 501,1 | 50,1 |
| $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 503,6 | 50,4 |
| $\text{Ni}(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 502,8 | 50,3 |
| KNO_3 | 500,4 | 50,0 |
| NaNO_3 | 501,0 | 50,1 |

De cada uno de los 11 metales analizados se prepararon los patrones de calibrado necesarios para el análisis. Alguno de los patrones de calibrado se preparó por duplicado para poder validar las rectas de regresión. Una vez preparados se procedió a su determinación mediante fotometría de llama (sodio y potasio) y mediante espectroscopía de absorción atómica (el resto de metales).

TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En el estudio realizado en este trabajo se utilizaron muestras de tabaco, obtenidas vaciando directamente el cigarrillo y las cenizas generadas tras el consumo de un cigarrillo de la misma marca. A continuación, se describe el tratamiento al que se ha sometido a cada una de ellas para su posterior análisis

MUESTRAS DE TABACO

Para la preparación de las muestras de tabaco se utilizó el procedimiento descrito por Rubio (3).

Se tomaron 0,6 g de cada muestra, lo correspondiente aproximadamente a un cigarro. En la Tabla 2 se recogen los pesos exactos de cada muestra.

Tabla 2. Cantidades pesadas de cada marca de tabaco

| Marcas | Masa (g) |
|-------------------------------|-----------------|
| Winston | 0.6251 |
| Pueblo | 0.6061 |
| Chesterfield Red | 0.5935 |
| Ducados Rubio | 0.6012 |
| Lucky Strike | 0.6251 |
| Lucky Strike Mentolado | 0.6071 |
| West | 0.6007 |
| Bull Brand | 0.6 |
| Mini Faria | 0.5996 |
| Camel | 0.5991 |
| Virginia | 0.608 |
| Malboro Gold | 0.573 |
| Malboro | 0.6058 |

Estas muestras se calcinaron en una mufla a 470°C durante 48 horas, obteniéndose una ceniza blanca para cada marca, tal y como se observa en la Figura 2.



Figura 2. Cenizas obtenidas tras el proceso de calcinación de las muestras de tabaco.

Estas cenizas se disuelven en 50 mL de HNO₃ al 5%. Como la disolución no es completa, se procede al filtrado de la misma para evitar introducir residuos sólidos en los equipos de medida.

MUESTRAS DE CENIZA

Además del tabaco, se han analizado las cenizas obtenidas tras el consumo de los cigarrillos. Para la preparación de éstas, se han empleado dos procedimientos distintos.

El tratamiento de las muestras de ceniza, denominado procedimiento 1 en el trabajo, está basado en el procedimiento para las muestras de tabaco, descrito en bibliografía por Rubio (3).

En este caso, se pesan 0,2 g de muestra y se calcinan durante aproximadamente 12 horas en la mufla, a 470 °C. Las cenizas calcinadas obtenidas se disuelven en 50 mL de HNO₃ al 5% y a continuación se filtran.

Se probó también realizando el tratamiento para cenizas que se describe en el trabajo de Perez-Bernal (5), denominado procedimiento 2 en el trabajo.

En este procedimiento, se pesan 0,2 g de cada muestra y se tratan con 20 mL de HNO₃ concentrado. A continuación, se colocan en la placa calefactora y se deja evaporar el ácido, colocando un vidrio de reloj sobre el vaso de precipitados con la disolución hasta comprobar que la ebullición no es muy vigorosa.

Cuando se alcanza la sequedad, se añaden 20 mL de una mezcla 1:3 de HNO₃/HCl, hasta que se evapore el líquido, de nuevo colocando un vidrio de reloj para evitar salpicaduras. El residuo obtenido se disuelve en 50 mL de HNO₃ al 5%.

En este caso, el proceso de filtrado se realizó varias veces para intentar eliminar por completo los residuos sólidos que aparecían cuando la muestra se encontraba en reposo.

Debido a la coloración de las disoluciones obtenidas (Figura 3) y a lo tedioso que resultaba, este procedimiento se desechó y solo se realizó en 8 de las 13 muestras de cenizas.



Figura 3. Diferencia en la coloración de las disoluciones de cenizas tras el procedimiento 1 (izquierda) y el procedimiento 2 (derecha).

En la Tabla 3 se recogen las cantidades pesadas para las cenizas de cada marca y para cada procedimiento.

Tabla 3. Cantidades de ceniza pesadas de cada marca de tabaco y para cada procedimiento

| Marcas | Masa Proc. 1 (g) | Masa Proc. 2 (g) |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Winston | 0,2008 | 0,2043 |
| Pueblo | 0,2018 | - |
| Chesterfield Red | 0,1999 | - |
| Ducados Rubio | 0,2024 | 0,2035 |
| Lucky Strike | 0,2005 | - |
| Lucky Strike Mentolado | 0,2001 | - |
| West | 0,2017 | 0,2005 |
| Bull Brand | 0,2035 | 0,2001 |
| Mini Faria | 0,2009 | 0,1997 |
| Camel | 0,2023 | 0,2006 |
| Virginia | 0,2009 | - |
| Malboro Gold | 0,2005 | 0,2006 |
| Malboro | 0,2043 | 0,2021 |

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS TEST

Además de las muestras anteriormente comentadas, se prepararon 5 muestras test, con el fin de comprobar la posibilidad de determinar la marca a la que pertenecen tanto las cenizas como el tabaco encontrado en la escena de un crimen.

Se realizaron dos muestras test para el tabaco (Chesterfield y Lucky) y tres para las cenizas (Faria, Bull Brand y Ducados), preparadas por el procedimiento 1 (Tabla 4).

Tabla 4. Cantidades de tabaco y ceniza pesadas para la preparación de muestras test

| Marca | Masa tabaco (g) | Masa ceniza (g) |
|---------------------|------------------------|------------------------|
| Chesterfield | 0,5943 | - |
| Lucky | 0,6090 | - |
| Faria | - | 0,2001 |
| Bull Brand | - | 0,2015 |
| Ducados | - | 0,2001 |

CODIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Dado que al estudiar los datos obtenidos en el trabajo se van a realizar comentarios tanto de las marcas del tabaco como de sus empresas distribuidoras y su variedad, a continuación, se muestra la codificación utilizada para cada una de ellas (Tabla 5).

- Por marca, tal y como se indica en la Tabla 5. Al código se le añade una T cuando se trate de una muestra de tabaco, C1 cuando sea una muestra de ceniza tratada por el procedimiento 1 y C2 en el caso de que sea por el procedimiento 2.

- Por distribuidora, empleando las siglas de éstas (por ejemplo, Altadis será ALT y Japan International Tobacco será JIT).
- Por variedad, en función de si es rubio (R), rubio mentolado (Rm), natural (NA), negro (NE), virginia (V) o faria (FA).

Tabla 5. Codificación de cada marca de tabaco, junto con su distribuidora y la variedad

| Marca | Código | Distribuidora | Variedad |
|-------------------------------|--------|-----------------------------|-------------------|
| Winston | WI | Japan International Tobacco | Rubio |
| Pueblo | P | Pöschl Tabak | Natural |
| Chesterfield Red | CH | Philip Morris International | Rubio |
| Ducados Rubio | DU | Altadis | Rubio |
| Lucky Strike | L | British American Tobacco | Rubio |
| Lucky Strike Mentolado | LM | British American Tobacco | Rubio (mentolado) |
| West | WE | Altadis | Rubio |
| Bull Brand | B | Bull Brand | Negro |
| Mini Faria | F | Altadis | Faria |
| Camel | CA | Japan International Tobacco | Rubio |
| Virginia | V | Flandes | Virginia |
| Malboro Gold | MG | Philip Morris International | Rubio |
| Malboro Red | MR | Philip Morris International | Rubio |

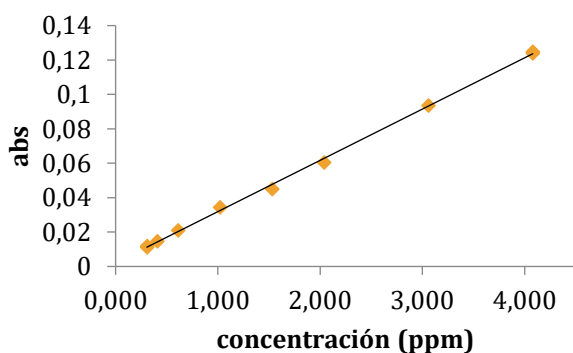
RESULTADOS Y CONCLUSIONES

VALIDACIÓN DE LAS RECTAS DE CALIBRADO

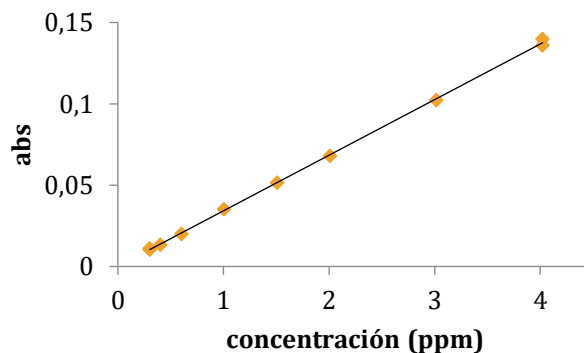
Las disoluciones patrón se midieron, como se ha comentado anteriormente, mediante fotometría de llama (sodio y potasio) y mediante espectroscopía de absorción atómica (el resto de metales).

En la Figura 4 y en la Figura 5 se muestran las rectas de calibrado obtenidas de los metales medidos.

Hierro



Niquel



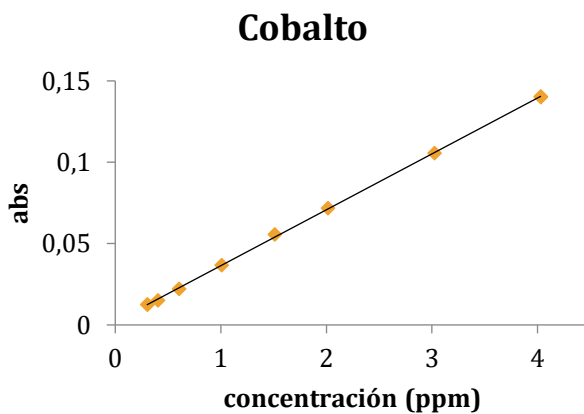
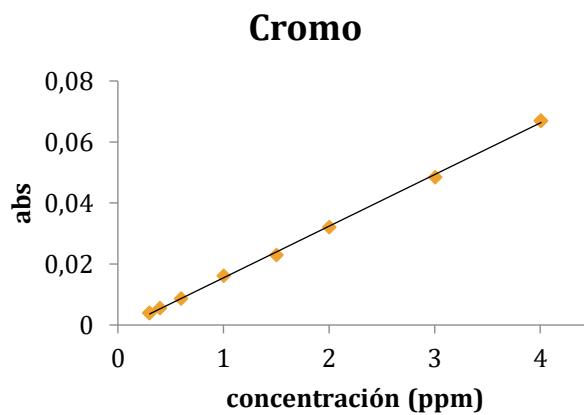
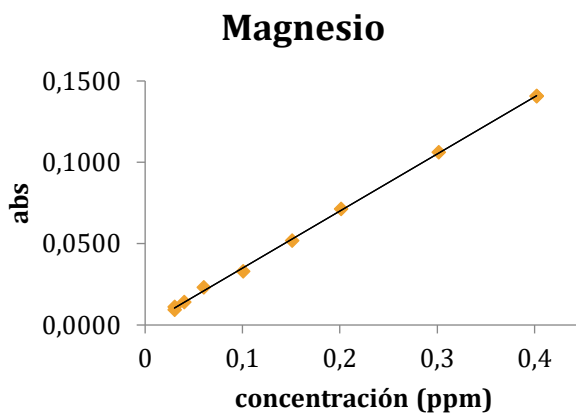
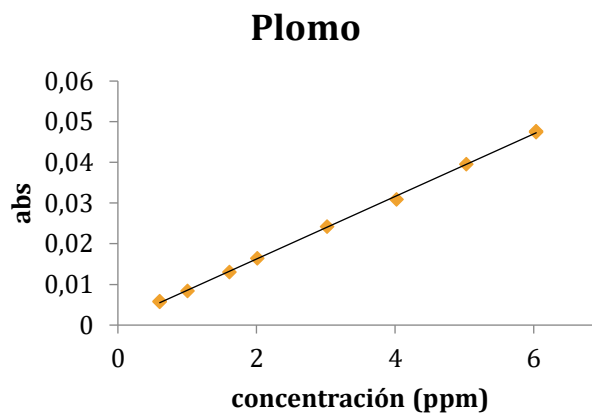
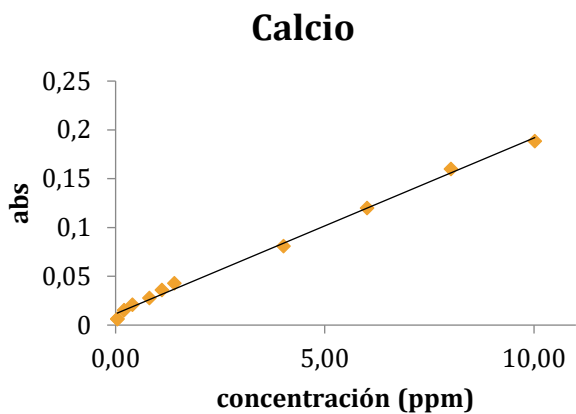
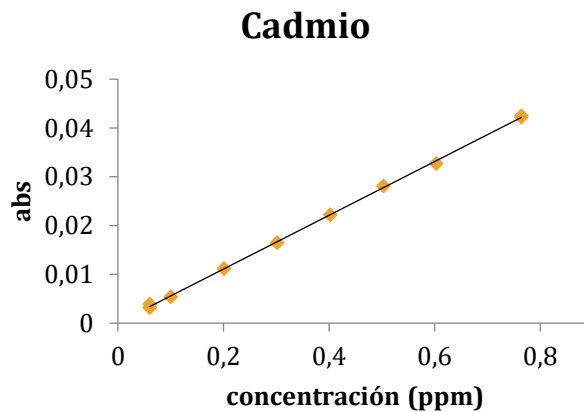
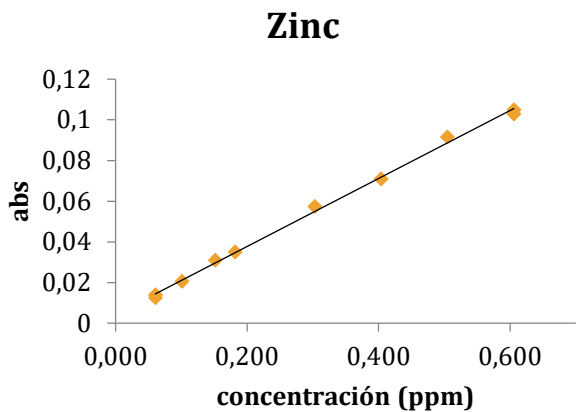


Figura 4. Rectas de calibrado obtenidas para los metales medidos por espectroscopía de absorción atómica

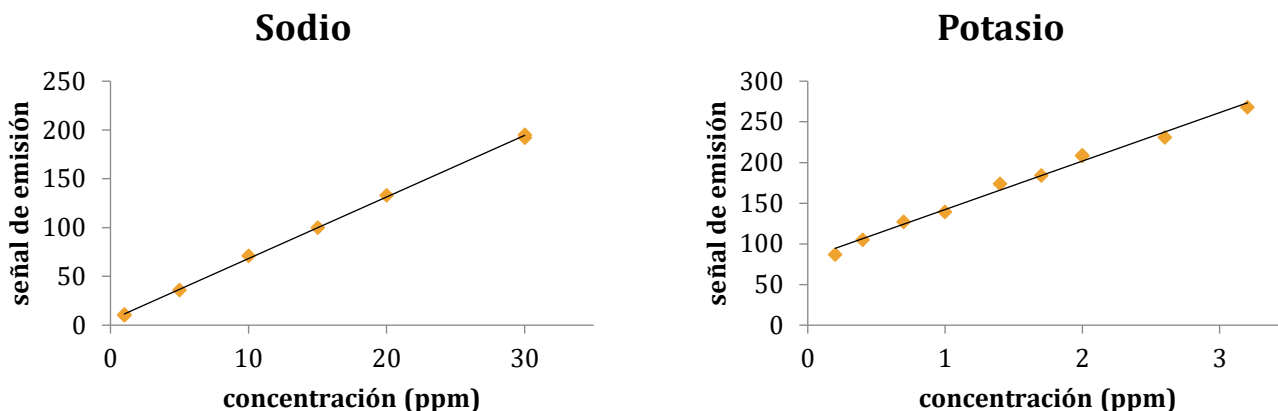


Figura 5. Rectas de calibrado obtenidas para los metales medidos por fotometría de llama

En la Tabla 6 se recogen los coeficientes de las rectas de calibrado correspondiente a cada metal ($y = b_0 + b_1x$), así como los valores de sus respectivos coeficientes de correlación, sus desviaciones típicas, y los P-Valores de la regresión y del fallo de ajuste.

Tabla 6. Parámetros de las rectas de calibrado de los metales analizados

| Metal | Rango de c (ppm) | b_0 | b_1 | ρ | S_{yx} | P- Valor regresión | P-Valor fallo de ajuste |
|-------|------------------|--------|--------|--------|----------|--------------------|-------------------------|
| Cd | 0,06 – 0,75 | 0,000 | 0,055 | 1,000 | 0,0004 | $<10^{-4}$ | 0,6519 |
| Ni | 0,3 – 4 | 0,000 | 0,034 | 1,000 | 0,0005 | $<10^{-4}$ | 0,7272 |
| Pb | 0,6 – 6 | 0,001 | 0,008 | 1,000 | 0,0002 | $<10^{-4}$ | 0,3761 |
| Zn | 0,06 – 0,61 | 0,004 | 0,017 | 0,999 | 0,0019 | $<10^{-4}$ | 0,3014 |
| Fe | 0,3 – 4 | 0,002 | 0,030 | 0,999 | 0,0016 | $<10^{-4}$ | 0,1022 |
| Mg | 0,03 – 0,4 | 0,000 | 0,351 | 1,000 | 0,0013 | $<10^{-4}$ | 0,3634 |
| Ca | 0,04 – 10 | 0,012 | 0,018 | 0,998 | 0,0044 | $<10^{-4}$ | 0,0233 |
| Na | 1 – 30 | 5,161 | 6,310 | 1,000 | 1,8010 | $<10^{-4}$ | 0,4478 |
| K | 0,15 – 3,5 | 82,523 | 59,606 | 0,995 | 6,1340 | $<10^{-4}$ | 0,0818 |
| Cr | 0,3 – 4 | -0,002 | 0,017 | 1,000 | 0,0007 | $<10^{-4}$ | 0,0705 |
| Co | 0,3 – 4 | 0,002 | 0,034 | 1,000 | 0,0005 | $<10^{-4}$ | 0,0769 |

b_0 : ordenada en el origen; b_1 : pendiente; ρ : coeficiente de correlación; S_{yx} : desviación típica de la regresión.

Para la validación de las rectas de calibrado, se realizaron dos test de hipótesis:

Test de validación del modelo:

Las hipótesis nula e hipótesis alternativa de este test son:

- $H_0 \rightarrow$ la regresión no explica la variabilidad de los datos
- $H_a \rightarrow$ la regresión explica la variabilidad de los datos

Como se observa en la Tabla 6, todos los P-Valores son menor que 0,05 (al 95% de confianza), por lo que se rechaza la hipótesis nula, es decir, todas las regresiones explican la variabilidad de los datos.

Test de fallo de ajuste

Este test solo se puede realizar en el caso de que haya réplicas.

Las hipótesis nula e hipótesis alternativa de este test son:

- $H_0 \rightarrow$ el modelo es correcto (no existe fallo de ajuste)
- $H_a \rightarrow$ existe fallo de ajuste

Tal y como se observa en la Tabla 6, los valores del P-Valor son mayores de 0,05, excepto para el calcio, por lo que no hay evidencias para rechazar la hipótesis nula, es decir, no existe fallo de ajuste. En el caso de la recta de calibrado del calcio, al tener un P-Valor menor que 0,05, se rechaza la hipótesis nula y, por lo tanto, sí que hay fallo de ajuste.

La existencia de fallo de ajuste en la recta de calibrado del calcio puede deberse a la precisión de las réplicas.

CUANTIFICACIÓN DE LOS METALES

Tras validar las rectas de calibrado, se predicen los valores de concentraciones de cada metal en las distintas muestras.

En las muestras analizadas, tanto para el caso del tabaco con de las cenizas, no se consiguió detectar cadmio, níquel, plomo, magnesio, cromo y cobalto, puesto que la instrumentación empleada no tiene un límite de detección lo suficientemente bajo para analizar las bajas concentraciones de esos metales.

Para el resto de metales, se aplicaron los distintos factores de dilución y se expresó el resultado en miligramos de metal por cada gramo de muestra, de tal forma que todas las muestras tuviesen la misma referencia.

En la Tabla 7 se recogen las concentraciones de metales de cada muestra, expresados en mg de metal/g de muestra.

Tabla 7. Concentraciones de cada muestra en mg de metal/g de muestra

| Código | Na | Ni | Pb | K | Co | Zn | Fe | Cr | Ca | Mg | Cd |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| WIT | 0,039 | n.d. | n.d. | 0,366 | n.d. | 0,0008 | 0,003 | n.d. | 1,233 | n.d. | n.d. |
| WIC1 | 0,099 | n.d. | n.d. | 2,997 | n.d. | 0,0039 | 0,031 | n.d. | 6,500 | n.d. | n.d. |
| WIC2 | 0,198 | n.d. | n.d. | 3,356 | n.d. | 0,0092 | 0,064 | n.d. | 0,573 | n.d. | n.d. |
| DUT | 0,079 | n.d. | n.d. | 0,248 | n.d. | 0,0011 | 0,006 | n.d. | 1,032 | n.d. | n.d. |
| DUC1 | 0,219 | n.d. | n.d. | 2,973 | n.d. | 0,0035 | 0,041 | n.d. | 4,883 | n.d. | n.d. |
| DUC2 | 0,307 | n.d. | n.d. | 2,895 | n.d. | 0,0059 | 0,074 | n.d. | 28,284 | n.d. | n.d. |
| VC1 | 0,127 | n.d. | n.d. | 1,659 | n.d. | 0,0044 | 0,042 | n.d. | 4,447 | n.d. | n.d. |
| CHT | 0,027 | n.d. | n.d. | 0,583 | n.d. | 0,0008 | 0,003 | n.d. | 0,411 | n.d. | n.d. |
| CHC1 | 0,176 | n.d. | n.d. | 2,989 | n.d. | 0,0071 | 0,033 | n.d. | 7,929 | n.d. | n.d. |
| MRT | 0,049 | n.d. | n.d. | 0,973 | n.d. | 0,0011 | 0,003 | n.d. | 0,311 | n.d. | n.d. |
| MRC1 | 0,106 | n.d. | n.d. | 4,943 | n.d. | 0,0038 | 0,032 | n.d. | 3,468 | n.d. | n.d. |
| MRC2 | 0,201 | n.d. | n.d. | 2,168 | n.d. | 0,0065 | 0,051 | n.d. | 4,718 | n.d. | n.d. |
| PT | 0,030 | n.d. | n.d. | 0,190 | n.d. | 0,0006 | 0,001 | n.d. | 0,429 | n.d. | n.d. |
| PC1 | 0,201 | n.d. | n.d. | 2,982 | n.d. | 0,0052 | 0,024 | n.d. | 5,024 | n.d. | n.d. |
| LT | 0,027 | n.d. | n.d. | 0,339 | n.d. | 0,0007 | 0,004 | n.d. | 0,712 | n.d. | n.d. |
| LC1 | 0,208 | n.d. | n.d. | 2,855 | n.d. | 0,0054 | 0,032 | n.d. | 6,636 | n.d. | n.d. |
| LMT | 0,025 | n.d. | n.d. | 0,314 | n.d. | 0,0008 | 0,003 | n.d. | 0,276 | n.d. | n.d. |
| LMC1 | 0,119 | n.d. | n.d. | 2,882 | n.d. | 0,0049 | 0,002 | n.d. | 6,014 | n.d. | n.d. |
| BT | 0,045 | n.d. | n.d. | 0,262 | n.d. | 0,0008 | 0,007 | n.d. | 0,358 | n.d. | n.d. |
| BC1 | 0,126 | n.d. | n.d. | 2,648 | n.d. | 0,0041 | 0,029 | n.d. | 4,513 | n.d. | n.d. |
| BC2 | 0,261 | n.d. | n.d. | 2,316 | n.d. | 0,0076 | 0,073 | n.d. | 5,806 | n.d. | n.d. |
| WET | 0,046 | n.d. | n.d. | 0,290 | n.d. | 0,0018 | 0,003 | n.d. | 0,510 | n.d. | n.d. |
| WEC1 | 0,105 | n.d. | n.d. | 2,900 | n.d. | 0,0035 | 0,019 | n.d. | 4,425 | n.d. | n.d. |
| WEC2 | 0,390 | n.d. | n.d. | 0,909 | n.d. | 0,0042 | 0,036 | n.d. | 6,636 | n.d. | n.d. |
| CAT | 0,041 | n.d. | n.d. | 0,206 | n.d. | 0,0009 | 0,002 | n.d. | 0,437 | n.d. | n.d. |
| CAC1 | 0,131 | n.d. | n.d. | 2,332 | n.d. | 0,0034 | 0,024 | n.d. | 4,272 | n.d. | n.d. |
| CAC2 | 0,234 | n.d. | n.d. | 2,435 | n.d. | 0,0091 | 0,050 | n.d. | 8,040 | n.d. | n.d. |
| FT | 0,049 | n.d. | n.d. | 0,430 | n.d. | 0,0012 | 0,003 | n.d. | 0,130 | n.d. | n.d. |
| FC1 | 0,183 | n.d. | n.d. | 3,663 | n.d. | 0,0060 | 0,017 | n.d. | 5,907 | n.d. | n.d. |
| FC2 | 0,293 | n.d. | n.d. | 3,027 | n.d. | 0,0087 | 0,022 | n.d. | 2,931 | n.d. | n.d. |
| MGT | 0,048 | n.d. | n.d. | 0,304 | n.d. | 0,0006 | 0,003 | n.d. | 1,093 | n.d. | n.d. |
| MGC1 | 0,114 | n.d. | n.d. | 2,583 | n.d. | 0,0027 | 0,031 | n.d. | 6,120 | n.d. | n.d. |
| MGC2 | 0,220 | n.d. | n.d. | 3,954 | n.d. | 0,0080 | 0,064 | n.d. | 4,938 | n.d. | n.d. |
| TEST CHT | 0,031 | n.d. | n.d. | 0,519 | n.d. | 0,0008 | 0,002 | n.d. | 0,149 | n.d. | n.d. |
| TEST LT | 0,028 | n.d. | n.d. | 0,348 | n.d. | 0,0008 | 0,003 | n.d. | 0,700 | n.d. | n.d. |
| TEST DUC1 | 0,200 | n.d. | n.d. | 2,924 | n.d. | 0,0041 | 0,038 | n.d. | 3,726 | n.d. | n.d. |
| TEST BC1 | 0,119 | n.d. | n.d. | 2,529 | n.d. | 0,0040 | 0,030 | n.d. | 6,800 | n.d. | n.d. |
| TEST FC1 | 0,149 | n.d. | n.d. | 3,510 | n.d. | 0,0057 | 0,016 | n.d. | 5,013 | n.d. | n.d. |

n. d.: no detectado

ESTUDIO DE LAS COMPONENTES PRINCIPALES

Con los datos obtenidos en los análisis de cada uno de los metales tanto en muestras de tabaco como en cenizas, se ha realizado un análisis de componentes principales.

En Figura 6 se representan las proyecciones de las muestras sobre la primera componente principal, la cual explica un 61% de la variabilidad de los datos, y permite diferenciar los distintos tipos de muestras analizadas (tabaco, cenizas por el procedimiento 1 y cenizas por el procedimiento 2).

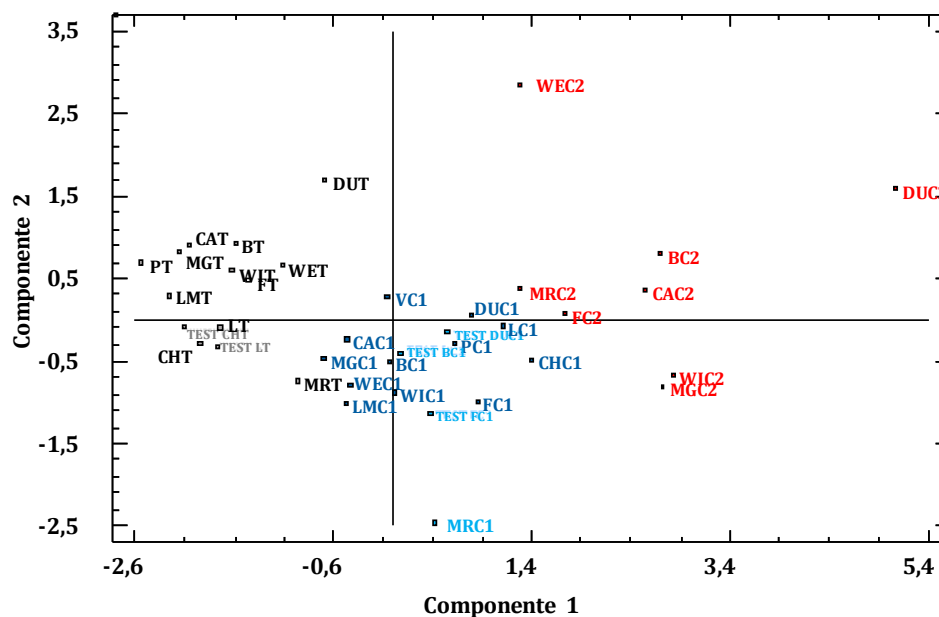


Figura 6. Representación de las muestras en el plano de las dos primeras componentes

Por esta razón, se realiza un análisis de las componentes principales a cada tipo de muestra.

COMPONENTES PRINCIPALES DE LAS MUESTRAS DE TABACO

Llevando a cabo el análisis de las componentes principales en las muestras de tabaco se ha obtenido que son las dos primeras componentes las que tienen un autovalor mayor a 1, explicando entre ellas el 64,6% de la varianza (Tabla 8). La primera componente explica el 40,7% de la variabilidad de los datos, mientras que la segunda explica el 23,9% (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de componentes principales para las muestras de tabaco

| Numero de componente | Autovalor | Porcentaje de varianza | Porcentaje acumulado |
|----------------------|-----------|------------------------|----------------------|
| 1 | 2,03 | 40,7 | 40,7 |
| 2 | 1,19 | 23,9 | 64,6 |

Para analizar los datos obtenidos, se ha empleado doble codificación al realizar el estudio de las proyecciones de las muestras de tabaco en las dos primeras componentes (Figura 7), por marca (código) y por distribuidora (colores).

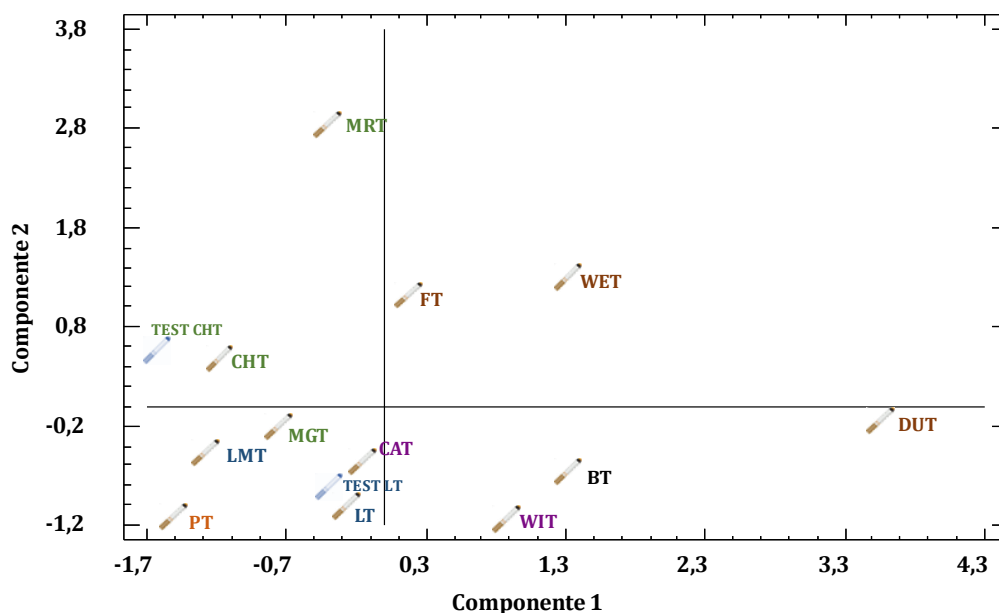


Figura 7. Representación de las muestras de tabaco en el plano de las dos primeras componentes.

Respecto a la posibilidad de predecir la marca concreta del tabaco analizado, se observa que las proyecciones de las muestras Test se encuentran próximas a las proyecciones del tabaco a las que se corresponden.

Además, analizando el gráfico, se comprueba que las muestras se encuentran distribuidas en función de su distribuidora. Así, las muestras correspondientes a British American Tobacco (azul) tienen valores negativos de ambas componentes. Philip Morris International (verde) se corresponde con valores negativos de la componente 1, pero el valor de la componente 2 depende de cada marca. Altadis (marrón) tienen con valores positivos de la componente 1 y positivos o cercanos a cero de la componente 2. Por último, las muestras de Japan International Tobacco (morado) tienen valores negativos en la componente 2 y positivos o próximos a cero en la componente 1.

Del resto de distribuidoras no se pueden ofrecer resultados concluyentes al haberse analizado solo una marca de cada una.

También se analizó la distribución de las muestras etiquetándolas en función de la variedad de tabaco a la que se corresponden (Figura 8). Sin embargo, en este caso no se pudo alcanzar ninguna conclusión ya que la mayoría de las muestras eran de la variedad rubio (R) y solo se analizó una muestra del resto de variedades (negro, faria y natural).

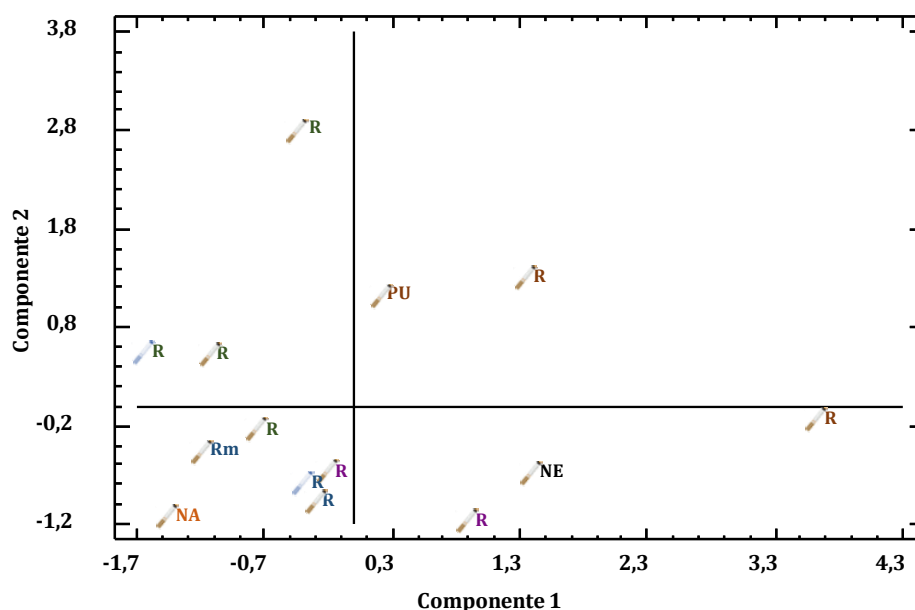


Figura 8. Representación de las muestras de tabaco en el plano de las dos primeras componentes, etiquetadas en función de la variedad de tabaco.

COMPONENTES PRINCIPALES DE LAS MUESTRAS DE CENIZA

Tras el estudio de las muestras de tabaco, se procede al análisis de las componentes principales de las muestras de ceniza.

Al tratarse de muestras tratadas por procedimientos distintos, y al observarse anteriormente (Figura 6) las muestras se podían diferenciar bien entre ellos, se ha realizado el análisis de las componentes principales de cada procedimiento por separado.

PROCEDIMIENTO 1

En el análisis de las componentes principales de las muestras de ceniza tratadas mediante el procedimiento 1, se ha obtenido que las tres primeras componentes tienen un autovalor mayor a 1, explicando entre ellas el 85% de la varianza. La primera componente explica el 37,1% de la variabilidad de los datos, la segunda explica el 26,4% y la tercera el 21,5% (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de componentes principales para las muestras de ceniza (procedimiento 1)

| Número de componente | Autovalor | Porcentaje de varianza | Porcentaje acumulado |
|----------------------|-----------|------------------------|----------------------|
| 1 | 1,85 | 37,1 | 37,1 |
| 2 | 1,32 | 26,4 | 63,5 |
| 3 | 1,07 | 21,5 | 85,0 |

Al igual que en el caso de las muestras de tabaco, se ha empleado doble codificación en el estudio de las proyecciones de las muestras de cenizas, por marca (código) y por distribuidora (colores).

En este caso son necesarias tres componentes, por lo que se realiza el estudio de las proyecciones con estas tres componentes.

Observando la proyección de las muestras en el espacio de las dos primeras componentes (Figura 9), se ve que no es posible identificar las muestras test y que no se puede clasificar las muestras en función de la distribuidora.

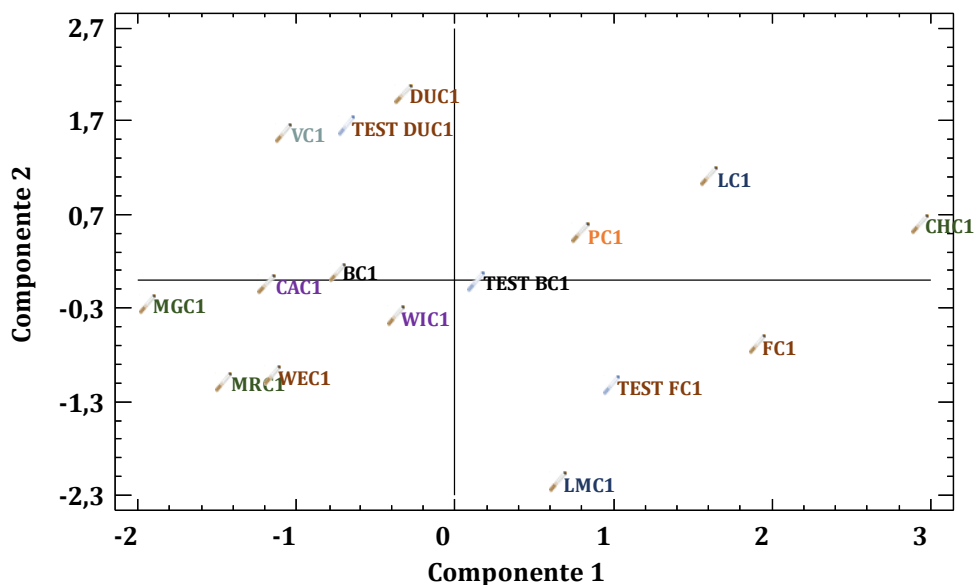


Figura 9. Representación de las muestras de ceniza en el plano de las dos primeras componentes

Sin embargo, cuando se realiza el estudio de las componentes 2 y 3, los resultados son distintos (Figura 10). En este caso, las muestras Test tienen una proyección similar a las muestras de ceniza a las que se corresponden, a excepción de la muestra y el test de la marca Bull Brand (BC1 y Test BC1 respectivamente), cuyas proyecciones en la componente 2 son aproximadamente cero en los dos casos, pero difieren en la componente 3.

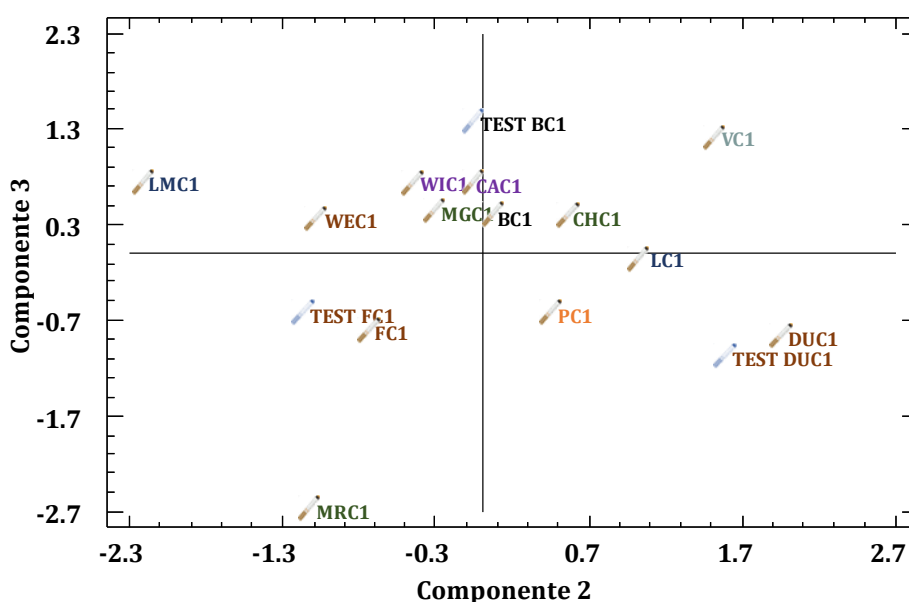


Figura 10. Representación de las muestras de ceniza en el plano de la segunda y tercera componente

Respecto a la agrupación en función de la distribuidora, resulta más complicado en el caso de las cenizas.

Las dos muestras correspondientes a la distribuidora Japan International Tobacco (morado) tienen valores positivos en la componente 3, pero difieren en la componente 2. En el caso de las marcas de la distribuidora Philip Morris International (verde) tienen valores iguales en la componente 3, y valores distintos en la componente 2. Dentro de las muestras de esta distribuidora, se observa el comportamiento anómalo de la muestra MRC1, cuya proyección aparece con valores muy negativos de ambas componentes. Las proyecciones de las muestras analizadas de British American Tobacco (azul) tienen valores similares en la componente 3, pero distintos en la componente 2, posiblemente debido a la presencia del mentol en la muestra LMC1.

Del resto de muestras no se puede apreciar una distribución concreta ya que, como es el caso de las muestras de Altadis (marrón), no se encuentran agrupadas o, como es el caso del resto de distribuidoras, solo se ha analizado una muestra.

A continuación, se analizan las proyecciones de las muestras en las componentes 2 y 3, etiquetadas en función de la variedad de tabaco (Figura 11), donde se puede intuir una posible distribución de las muestras de ceniza.

La muestra de la variedad virginia (V) aparece con valores positivos de las componentes 2 y 3, mientras que la proyección de la muestra de la variedad natural (NA) tiene valores positivos de la componente 2 y negativos de la componente 3. La variedad faria (FA) aparece a valores negativos de ambas componentes.

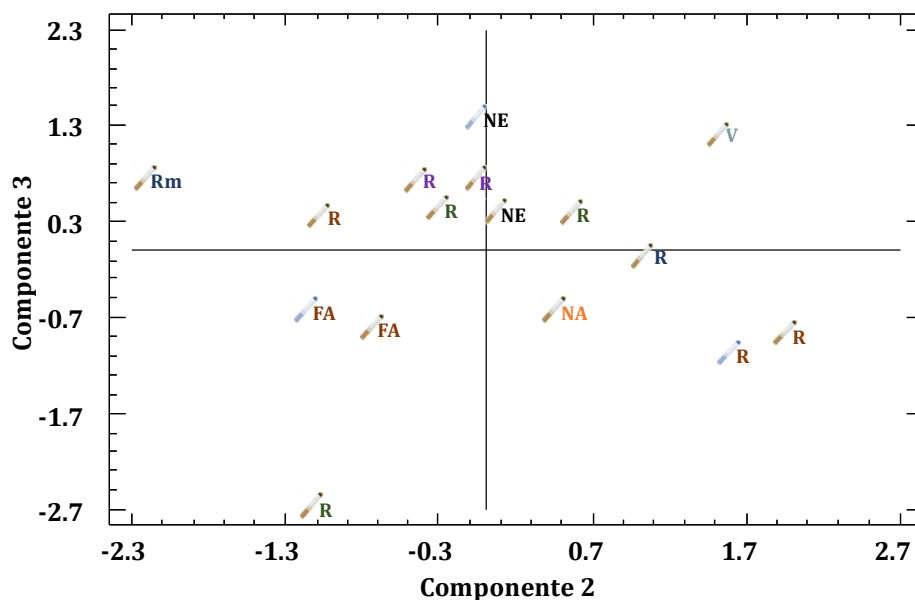


Figura 11. Representación de las muestras de ceniza en el plano de la segunda y tercera componente, etiquetadas en función de la variedad de tabaco

En el caso de las cenizas obtenidas en el consumo de tabaco negro (NE), no se puede determinar con exactitud si se logra diferenciar del resto o no, ya que la muestra y su correspondiente test varían el valor de su proyección en la componente 3.

Por último, en el caso de la variedad de tabaco rubio (R), se observa cierto comportamiento lineal entre las muestras de ceniza, a excepción de la muestra MRC1 que, como se apuntó anteriormente, presenta un comportamiento anómalo. Dentro de la variedad rubio, se encuentra diferenciada la muestra mentolada (Rm), que aparece con valores negativos muy grandes.

PROCEDIMIENTO 2

Al realizar el análisis de las componentes principales en las muestras de tabaco se ha obtenido que son las dos primeras componentes las que tienen un autovalor mayor a 1, explicando entre ellas el 79,9% de la varianza. La primera componente explica el 49,7% de la variabilidad de los datos, mientras que la segunda explica el 30,2% (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de componentes principales para las muestras de tabaco

| Numero de componente | Autovalor | Porcentaje de varianza | Porcentaje acumulado |
|----------------------|-----------|------------------------|----------------------|
| 1 | 2,49 | 49,7 | 49,7 |
| 2 | 1,51 | 30,2 | 79,9 |

Al igual que en los análisis anteriores, se ha empleado doble codificación al realizar el estudio de las proyecciones de las muestras de tabaco en las dos primeras componentes (Figura 12), por marca (código) y por distribuidora (colores).

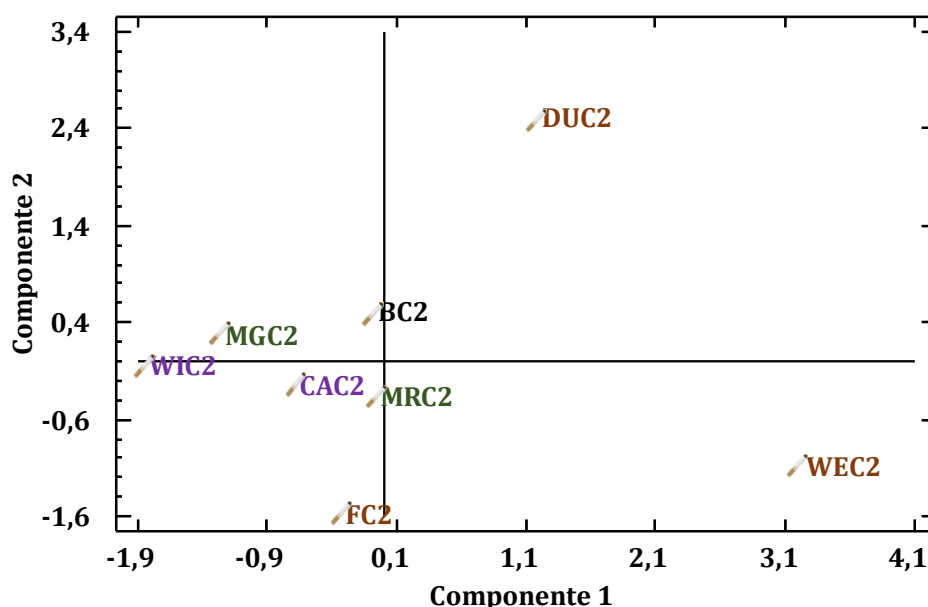


Figura 12. Representación de las muestras de ceniza en el plano de las dos primeras componentes

El número de muestras analizadas realizadas por este procedimiento es menor que en los casos anteriores. Sin embargo, también se observa cierta agrupación de las muestras en función de la distribuidora.

En el caso de las muestras obtenidas de marcas de Japan International Tobacco (morado), ambas tienen valores similares en la componente 2, aunque difieren en la componente 1. Para las muestras de la distribuidora Philip Morris International (verde), el comportamiento es similar al anterior mencionado, aunque en este caso las muestras tienen valores también diferentes en la componente 2.

Para la distribuidora Altadis (marrón) no hay una clara agrupación de las muestras, ya que las tres están muy separadas entre sí, con valores de las dos componentes muy diferentes.

Por último, no se puede determinar con exactitud si se puede diferenciar la distribuidora Bull Brand del resto, ya que al haberse analizado solo una marca, no se puede concluir nada exacto.

CONCLUSIONS

From the experimental results obtained the following conclusions have been reached:

1. The concentration in the tobacco and ash samples was determined by atomic absorption spectroscopy (Ca, Zn and Fe) and by flame emission spectroscopy (Na and K), not being able to determine the concentration of the remaining metals. Since the presence of these other metals has been found in the literature, it must be assumed that the limit of detection of the techniques employed is not low enough to analyze them.
2. The measurement methods have been validated, obtaining that the models were valid for all the metals, except for calcium. This lack of validity is obtained with the Lack-of-fit test, possibly due to the precision in the measurements of the replicates made.
3. The identification of the test samples with their corresponding brand has been done correctly in both tobacco and ash samples, except for the sample BC1 and its corresponding test.
4. The possibility of associating some of the distributors analyzed, for the tobacco and ash samples, in the projection of the principal components has been verified. The lack of a higher number of samples from the other distributors makes the possibility of identification only theoretical.
5. When samples are identified by tobacco variety, no conclusive results have been obtained, due to the lack of tobacco and ash samples of black, natural, virginia and faria varieties.
6. Some of the competences developed are:
 - a. To demonstrate capacity for analysis and synthesis.
 - b. To solve problems effectively.
 - c. To control the expression and understanding of a foreign language, preferably English.

- d. To express correctly (both oral and written) in Spanish.
- e. To relate the fundamentals of analytical techniques (electrochemistry, optics, etc.) to their applications.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cornago Ramírez P, Esteban Santos S. Química forense. UNED 2016;
2. Conan Doyle A. Las aventuras de Sherlock Holmes, 42. Vol. 42. Bookclassic; 2004. 331 p.
3. Rubio Armendáriz C, Garcia T, Soler A, Gutiérrez Fernández ÁJ, Glez-Weller D, Luis González G, et al. Heavy metals in cigarettes for sale in Spain. Environ Res [Internet]. 2015;143:162–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2015.10.003>
4. Kazi TG, Jalbani N, Arain MB, Jamali MK, Afridi HI, Sarfraz RA, et al. Toxic metals distribution in different components of Pakistani and imported cigarettes by electrothermal atomic absorption spectrometer. J Hazard Mater. 2009;163(1):302–7.
5. Pérez-Bernal JL, Amigo JM, Fernández-Torres R, Bello MA, Callejón-Mochón M. Trace-metal distribution of cigarette ashes as marker of tobacco brands. Forensic Sci Int. 2011;204(1–3):119–25.
6. Giokas DL, Thanasoulis NC, Vlessidis AG. Multivariate chemometric discrimination of cigarette tobacco blends based on the UV-Vis spectrum of their hydrophilic extracts. J Hazard Mater [Internet]. 2011;185(1):86–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.126>
7. Rouessac F, Rouessac A. Análisis químico : métodos y técnicas instrumentales modernas. McGraw-Hill; 2003. 441 p.
8. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR, Cervantes González S, Anzures MB. Principios de análisis instrumental. Cengage Learning; 2008. XIII, 1038.
9. Miller JN, Miller JC. Estadística y quimiometría para química analítica. Prentice-Hall; 2002. 278 p.
10. STATGRAPHICS Centurion XVII Versión 17.1.12 (64 bit). Statpoint Technologies, Inc. 2015.