

Ficha Técnica

Microscopio confocal de reflexión: Un equipo dedicado y único en el país que brinda nuevas herramientas a líneas de investigación en materiales. Un caso en documentología forense

(Reflection confocal microscope: A dedicated and unique in the country that provides new tools for research in materials. A case in forensic document examination)

Por Carlos Mas (1), Leandro Cagliero (2), y Juan Domingo Zana Bock (3).

1. Dr. en Ciencias Químicas, Profesional Principal del CONICET, Dpto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Email: carlos@fcq.unc.edu.ar. 2. Dr. en Matemática, Facultad de Matemática, Astronomía y Física (FaMAF), Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba Argentina. Email: cagliero@famaf.unc.edu.ar. 3. Perito Calígrafo de la Policía Judicial de la Provincia de Córdoba. Gabinete Físico Mecánico, Secretaría Científica. Dirección General de Policía Judicial. Ministerio Público Fiscal. Poder Judicial de Córdoba. Email: Zanajuan@hotmail.com.

Resumen:

En la microscopía confocal de reflexión la imagen es formada por el reflejo del láser que incide sobre la superficie de la muestra y no con la luz que proviene de la muestra (fluorescencia) como ocurre en la microscopía confocal convencional. Empleando la reflexión es posible obtener la topografía del material semejante a lo que sería una imagen obtenida en un microscopio electrónico de barrido, con la gran ventaja de que no es necesario realizar una preparación previa de la muestra con baños metálicos o vacíos. Si la muestra es capaz de reflejar el láser entonces es posible de obtener su topografía. Esto abre un abanico de posibilidades al estudio de aquellos materiales donde su procesamiento podría afectar aspectos morfológicos o estructurales como es el caso de materiales dentales o piezas dentarias, entre otras. En el laboratorio LAMARX (*Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos X*), ubicado en la FAMAFA, fue recientemente instalado un microscopio de estas características el cual ha sido empleado en el estudio de materiales de áreas muy diversas tales como la antropología, odontología, agronomía, pasando por la física nuclear hasta estudios forenses. En el presente trabajo mostramos algunos resultados preliminares provenientes del área forense en el cual se analiza, mediante microscopía confocal de reflexión, los perfiles de altura de trazos entrecruzados realizados con un bolígrafo sobre un papel. El propósito es extraer parámetros geométricos, de estos perfiles que permitan predecir con posterioridad, la secuencia cronológica del entrecruzamiento.

Abstract:

In reflection confocal microscopy the image formation comes from the reflection of the incident laser over the sample surface in contrast to conventional confocal microscopy where the image is formed with the light that comes from the sample (fluorescence). Employing reflection is possible to obtain the topography of the material similar to a scanning electron microscope with the great advantage that is not necessary a prior preparation of the sample with metal baths or vacuums. If the sample is capable of reflecting the laser then is possible to obtain its topology. This opens a range of possibilities to the study of materials where a previous processing of the sample could affect morphological or structural aspects such as dental materials or teeth, among others. In LAMARX laboratory (Laboratory of Electron Microscopy and X-ray Analysis), located at FAMAFA, a microscope of this type was recently installed which has been used to study materials from very different areas such as anthropology, dentistry, agriculture, and from nuclear physics to justice. The present work shows some preliminary results coming from forensic area using reflection confocal microscopy where height profiles of crossing lines on paper are investigated. The purpose is to find parameters to predict, in cases of suspect legality, to determine the chronological sequence of homogenous crossing lines.

Palabras clave

Microscopía confocal de reflexión, documentología, tiempos de ejecución de trazos, forense.



Microscopio confocal de reflexión, OLS 4000 (Olympus)

La microscopía confocal de reflexión es un método no destructivo en la adquisición de imágenes y ha ido ganando terreno en los últimos años en el estudio de superficies de materiales opacos, duros o semiduros. Las muestras a observar no necesitan un tratamiento previo por lo que representa un aspecto muy atractivo para materiales cuyo procesamiento previo afecta directamente el parámetro que se pretende analizar o simplemente porque evita la adulteración de la muestra, característica altamente valorada en el ámbito de la justicia donde las pruebas documentales sospechadas de adulteraciones deben permanecer inalterables durante el proceso de peritaje judicial, salvo raras excepciones.

El confocal de reflexión emplea un láser de corta longitud de onda (405nm), que combinado con precisos movimientos motorizados del barrido, del lente objetivo y de eliminación mecánica de luz proveniente de planos desenfocados, permite obtener imágenes de alta resolución lateral (120nm) y axial (10nm). Configurado correctamente, un microscopio confocal de reflexión puede servir como un perfilómetro óptico sin contacto aunque con mayor resolución.

Un difícil caso en documentología forense, disciplina que tiene por objeto de estudio el análisis de documentos modernos, públicos o privados con el fin de establecer su autenticidad o falsedad, es la determinación de la secuencia temporal de ejecución de dos líneas realizadas por elementos escritores semejantes. La determinación del orden de líneas que se cruzan es de gran interés en casos de sospechas de que el contenido de un documento ha sido alterado mediante la adición de una parte del mismo en un tiempo posterior, por ejemplo en testamentos o casos de firma en blanco. Por lo tanto, la determinación de la secuencia temporal del cruce puede proporcionar información importante en la investigación del fraude [1].

Numerosos tipos de técnicas y microscopías han sido empleadas en el análisis del entrecruzamiento de trazos [2, 3, 4, 5, 6, 7], sin embargo los análisis no

son conclusivos sino más bien que muestran a la técnica empleada como una herramienta potencial a desarrollar para la predicción del orden de ejecución. Sin embargo para la justicia el peritaje debe ser categórico ya que solamente son tomadas las "certezas" como elementos probatorios. Algunos de estas técnicas poseen la desventaja de destruir la prueba evidencial, como es el caso de la microscopía electrónica. Si bien la perfilometría ha sido la técnica que mejor se ajusta al estudio de estos entrecruzamientos tampoco ha sido conclusiva ni ha señalado los límites dentro de los cuales la técnica es aplicable con absoluta "certeza" en el análisis.

La reciente llegada a la Universidad Nacional de Córdoba de este microscopio confocal para materiales de la marca Olympus (Modelo LEXT 4000) permite la exploración del entrecruzamiento de trazos dado que aporta poderosas herramientas de análisis cuantitativos de la superficie. En el presente estudio preliminar este microscopio fue empleado para reconstruir en 3D la intersección de dos trazos realizados con el mismo bolígrafo sobre un papel de gramaje estándar. Posteriormente los perfiles de altura de dichos trazos fueron obtenidos y analizados y comparados cuantitativamente en diversos puntos mediante el software del microscopio con el propósito de verificar diferencias en la ejecución entre el primero y el segundo.

Adquisición de las imágenes de entrecruzamiento

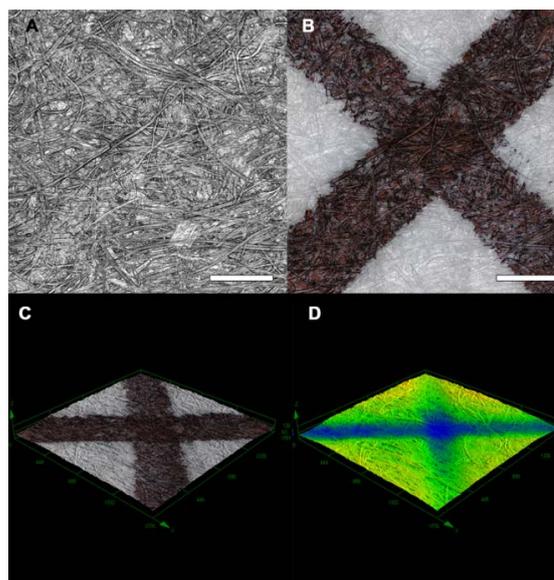


Figura 1: A Imagen 2D confocal; B Imagen color 2D de cámara digital (CCD); C Vista 3D confocal+CCD; D Vista 3D pseudocolor

El microscopio confocal de reflexión toma dos imágenes en cada adquisición 3D (pila de imágenes), la imagen del reflejo del láser sobre la muestra (imagen confocal) y la imagen a color de la muestra adquirida por una cámara digital. El software en su vista 3D permite mostrar en diferentes ángulos ambas imágenes (**Fig. 1**). La información topográfica de la imagen está contenida en la imagen confocal, la cual está formada a partir de una pila de imágenes donde cada imagen es obtenida cada $0,4 \mu\text{m}$ de movimiento axial de la lente objetivo hacia la muestra. En cada imagen el láser barre una determinada cantidad de área de la muestra y la intensidad reflejada es llevada a los píxeles finales seleccionados en los parámetros de adquisición. La pila de imágenes totales representa aproximadamente unos $250 \mu\text{m}$ de profundidad de la muestra. La imagen confocal final es en blanco y negro la que puede posteriormente ser pseudocoloreada con diferentes gradientes o tonalidades de colores y brillos.

Perfiles de los trazos

El software permite trazar una línea a lo largo de cualquier dirección dentro de la imagen y obtener su perfil en alturas (μm). La figura 2A muestra el entrecruzamiento de dos trazos y la línea roja a lo

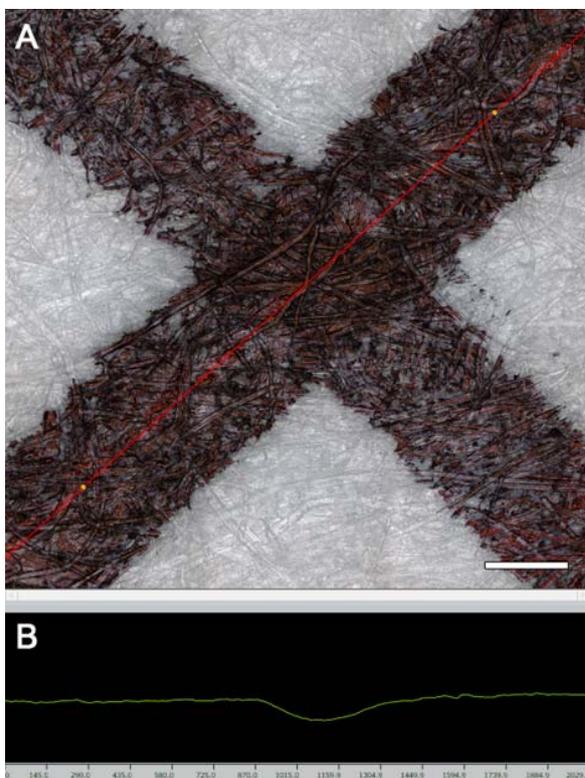


Figura 2. A Imagen 2D (CCD) del entrecruzamiento, la línea roja indica a lo largo de donde se mostrará su perfil de alturas. B Perfil de altura a lo largo de la línea roja. La depresión representa la marca del surco generado por el trazo opuesto. Barra $250 \mu\text{m}$

largo de uno de ellos revela su perfil de alturas, en amarillo, mas abajo; (**Fig. 2B**).

Comparación de perfiles

Diez entrecruzamientos fueron realizados en papel de 80 g de gramaje donde la secuencia de cada trazo era conocida y cuyos perfiles fueron obtenidos, analizados y comparados entre sí en diferentes porciones y orientaciones de los mismos. De una comparación rápida entre ellos es claro detectar a simple vista la mayor elevación o pendiente a cada lado de la depresión del perfil del segundo trazo, (**Fig. 3B**). El software del microscopio permite cuantificar esta elevación, (**Fig. 4**).

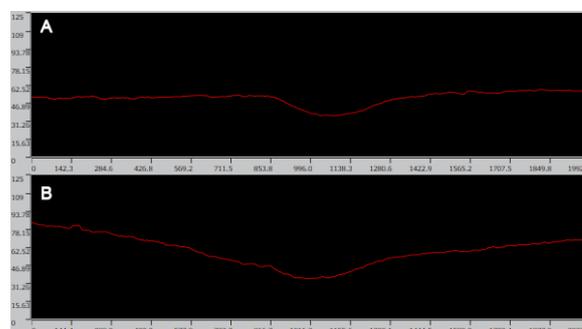


Figura 3. Perfiles de alturas de líneas trazadas a lo largo del entrecruzamiento. A Perfil a lo largo del primer trazo. B Perfil a lo largo del segundo trazo.

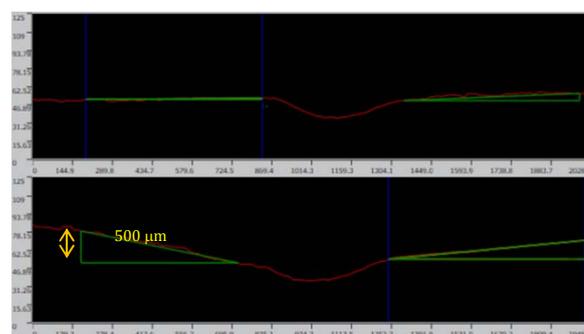


Figura 4. Determinación de la altura de la elevación del perfil, con respecto a la horizontal, a los costados del valle medidos a $500 \mu\text{m}$ del inicio del cruce. A Perfil a lo largo del primer trazo elevación a cada lado: $-2,3 \pm 0,3$ y $8,3 \pm 0,8 \mu\text{m}$ respectivamente. B Perfil a lo largo del segundo trazo. Elevación a cada lado: $31,9 \pm 1,1 \mu\text{m}$ (flecha amarilla) y $13,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$ respectivamente.

El segundo parámetro diferencial detectado entre ellos es la curvatura de una elipse que se ajusta a la depresión de los perfiles, (Fig. 5). Al trazar manualmente dicha elipse, el software arroja el recíproco de la curvatura de la elipse trazada (en su punto inferior). Nosotros nos referiremos a este número como el radio de la elipse.

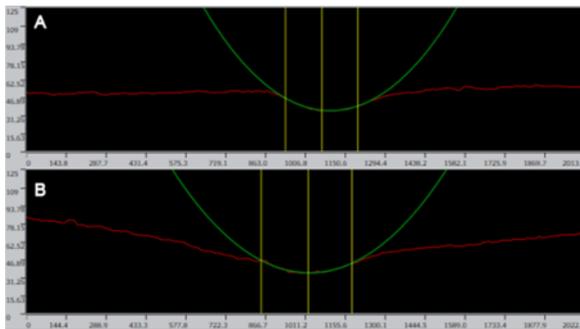


Figura 5. Ajuste manual de una elipse a lo largo de la depresión del perfil. Cálculo del radio. **A** Radio de la elipse del primer trazo: $(117 \pm 2) \cdot 10^3 \mu\text{m}$. **B** Radio de la elipse del segundo trazo: $(130 \pm 8) \cdot 10^3 \mu\text{m}$ (tres medidas independientes para cada elipse).

Comparación de la elevación de los perfiles de altura.

La elevación del perfil de altura fue medida a $500 \mu\text{m}$ antes del entrecruzamiento y ambos valores sumados para cada trazo y comparados entre sí. La Figura 6 muestra la comparación entre el primer (Trazo 1) y segundo trazo (Trazo 2). Notar que el segundo trazo muestra siempre una mayor elevación en relación al primero.

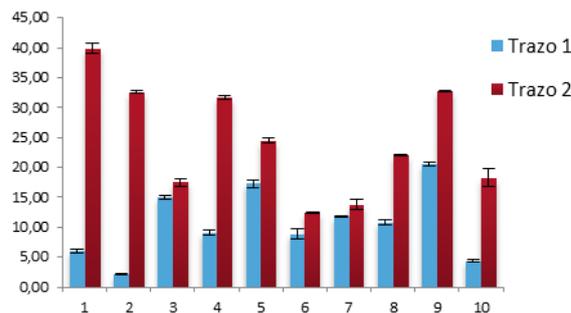


Figura 6. Suma de la elevación del perfil de alturas para cada trazo a $500 \mu\text{m}$ del entrecruzamiento con respecto a la horizontal. Trazo 1 es el trazo que se realizó primero.

Comparación del radio de elipses en la zona del entrecruzamiento.

En el perfil de alturas a lo largo de cada trazo, en la zona del entrecruzamiento, es posible definir manualmente una elipse que se ajusta a la depresión generada por el trazo opuesto en el perfil

en estudio (Fig. 5). Una vez definida la elipse, el software arroja el valor del radio de la misma. La comparación de dichos radios entre el primer y segundo trazo, en los diez casos analizados, muestra que hay diferencias (Fig. 7).

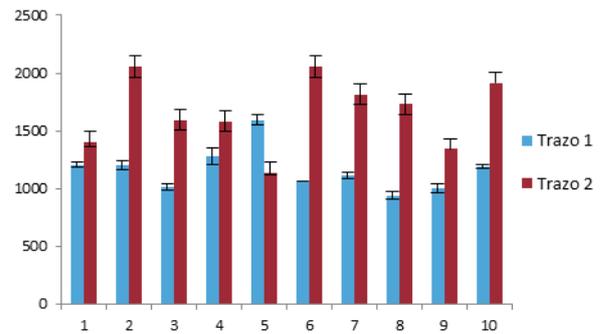


Figura 7. Comparación de los radios de las elipses entre el primer (Trazo 1) y segundo trazo (Trazo 2) trazadas en la depresión del entrecruzamiento.

De la totalidad de los casos analizados solo uno dio la situación inversa a la tendencia general. En la mayoría de los casos el radio de la elipse 1 es inferior al de la elipse 2. Un tercer parámetro fue analizado también pero el mismo no será comentado en este trabajo por restricciones de espacio. Este último parámetro sirve como elemento decisivo en caso de encontrar disparidad entre los otros dos elementos analizados previamente en los perfiles.

Un modelo matemático para los perfiles

Con el objetivo de estudiar la geometría de los trazos, modelamos los perfiles usando una función de la forma:

$$f(x) = ax + b - Ae^{-B(x-v)^2}$$

donde a , b , $A > 0$, $B > 0$ y v son parámetros a determinar. El gráfico de f (para valores genéricos de a , b , $A > 0$, $B > 0$ y v) es como se muestra en el figura 8.

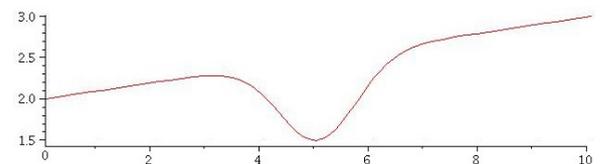


Figura 8. Función matemática del tipo $f(x) = ax + b - Ae^{-B(x-v)^2}$

En la función f el sumando $ax + b$ corresponde a una recta que representa el perfil inicial que tenía el

papel antes de que se hicieran los trazos, y el sumando $-As - Bix - v^2$ corresponde a una gaussiana que representa la depresión realizada por el trazo opuesto.

Para obtener los valores de a , b , $A > 0$, $B > 0$ y v que mejor se ajustan a cada perfil utilizamos el algoritmo de Gauss-Newton para cuadrados mínimos. En todos los casos, a excepción de uno, el valor de B en el perfil a lo largo del primer trazo fue significativamente mayor que el valor de B en el correspondiente perfil a lo largo del segundo trazo. Esto es consecuente con lo observado en las pendientes y en los radios de las elipses. En el caso excepcional mencionado anteriormente, el error del ajuste de cuadrados mínimos es especialmente grande, lo cual induciría a pensar que la muestra no es del todo adecuada.

Conclusiones:

El análisis de las diferencias geométricas encontradas en cada perfil de altura muestra diferencias de elevación en los mismos en las cercanías del entrecruzamiento. Para cuantificar dicha elevación la altura del perfil fue medida a 500 μm antes del entrecruzamiento, medida con respecto a la horizontal (**Fig. 4**). También fue encontrado que la depresión generada por el segundo trazo sobre el primero deja en el perfil del segundo trazo una elipse cuyo radio es mayor en el perfil del primer trazo.

En el primer caso las diferencias de alturas del perfil son debidas a que el segundo trazo ya no se realiza sobre una superficie plana del papel, como es el caso para el primer trazo, sino sobre una superficie con una depresión en "v" generada por el primer trazo. Esta depresión "v" le otorga al papel una rigidez que afecta al segundo trazo y que no existía al realizar el primer trazo. Esta deformación del primer trazo es mantenida en las cercanías al costado de su trayectoria (500 μm) según nuestras observaciones experimentales. Las elevaciones del perfil con respecto a la horizontal siempre fueron mayores para el segundo trazo que para el primero, en algunos casos hasta 16 veces superior.

En cuanto al radio de una elipse ajustada al perfil de altura de los trazos la misma es explicada debido a que el segundo trazo disminuye la pendiente del borde del primer trazo al impactar en la zona del entrecruzamiento. Esto hace que se genere una depresión con bordes de menor pendiente en el entrecruzamiento sobre el segundo trazo más que sobre el primero, lo que hace que la elipse se ajuste al perfil de altura con un radio mayor.

Si bien las diferencias de los radios no son tan pronunciadas como las elevaciones de pendientes, en 9 de 10 casos se encontró esta diferencia a favor del segundo trazo (**Fig. 7**) en situaciones hasta el doble del valor. El modelo matemático para ajustar los perfiles con una función que contemple sus ingredientes geométricos tiene la virtud de que es independiente de las herramientas del software del microscopio y del ajuste manual. Además, permite elaborar criterios para descartar muestras que no estén debidamente realizadas. En caso de tener diferencias entre valores opuestos de la altura y del radio otros parámetros, independientes de los ya analizados, deben ser comparados y tenidos en cuenta a los anteriores para establecer el orden de ejecución de los trazos. Otro parámetro que tiene que ver con la caída de las pendientes de cada trazo antes, después y en el entrecruzamiento fue analizado como un tercer parámetro que ayudar a decidir el orden de ejecución de los trazos, esto no fue mostrado en este trabajo por límites de espacio. Empleando este parámetro fue posible determinar correctamente el orden de los trazos en la totalidad de los casos analizados.

El aspecto cuantitativo de la microscopía confocal en modo reflexión representa una poderosa herramienta para analizar documentos sospechados de adulteración en procesos judiciales. Actualmente un manuscrito con mayor detalle de esta metodología está siendo redactado para ser presentado a revistas del área con referato internacional.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) V. Berx, J. De Kinder, A 3D view on the 'crossing lines' problem in document investigation, Proc. SPIE 4709 (2002) 102–110.
- 2) P.A. Waeschle, Examination of line crossing by scanning electron microscopy, J. Forensic Sci. 24 (1979) 569–578.
- 3) S. Tollkamp, H.G. Fackler, Use of low voltage SEM in the detection of forgeries, Int. J. Forensic Doc. Examiners 2 (1996) 333–341.
- 4) J. De Kinder, V. Berx. The application of profilometry in the analysis of lines crossing J. Am. Soc. Quest. Doc. Exam., 8 (1) (2005), pp. 1–8
- 5) S. Kasas, A. Khanmy-Vital, G. Dietler, Examination of line crossings by atomic force microscopy, Forensic Sci. Int. 119 (2001) 290–298.
- 6) V. Berx, J. De Kinder A 3D view on the 'crossing lines' problem in document investigation Proc. SPIE, 4709 (2002), pp. 102–110
- 7) Potentiality of 3D laser profilometry to determine the sequence of homogenous crossing lines on questioned documents Giuseppe Schirripa Spagnolo Forensic Science International 164 (2006) 102–109