

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

INVESTIGACIÓN POR ELECTROFORESIS CAPILAR, DE RESIDUOS
GENERADOS POR DISPARAR UN ARMA DE FUEGO.

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ERNESTO BERNAL MORALES



TUTOR: ALMA LUISA REVILLA VAZQUEZ AÑO: 2005

m343961



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



BIÓL. FRANCISCO INCERA UGALDE

Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado

Presente

Me es grato informarle que el alumno **ERNESTO BERNAL MORALES**, con número de cuenta 87541678, presentará su examen para optar por el grado de Maestro en Ciencias, quien defenderá el proyecto de investigación titulado: **"Investigación por Electroforesis Capilar de residuos generados por disparar un arma de fuego"**, ante el siguiente jurado:

Presidente	Dr. Eugenio Octavio Reyes Salas	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. María Guadalupe Albarrán Sánchez	Inst. de Ciencias Nucleares, UNAM
Secretario	Dra. Josefina de Gyves Marciniak	Facultad de Química, UNAM
Primer suplente	Dra. Teresa Ramírez Silva	UAM-Iztapalapa
Segundo suplente	Dra. Lourdes Pacheco Hernández	Univ. Autónoma del Estado de Hidalgo

Nota: Se recuerda a los miembros del jurado que el plazo máximo para revisión de la tesis es de 30 días naturales a partir de la recepción de la misma.

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, D.F. a 06 de diciembre de 2004.

Atentamente.

DR. MIGUEL COSTAS BASÍN
Coordinador del Programa

c.c.p. Integrantes del Jurado
Interesado
Expediente
Sección Escolar de la Coordinación de Posgrados, Facultad de Química

Agradecimientos

- ⊕ Deseo agradecer el apoyo, paciencia y asesoría de la Dra. Alma Revilla y la Dra. Gabriela Vargas, así como su amistad a los compañeros del Laboratorio L-401 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M.
- ⊕ Agradezco al ex – director del Servicio Médico Forense, Dr. José Ramón Fernández Cáceres las facilidades laborales proporcionadas para el ingreso al programa de posgrado en Ciencias Químicas de la U.N.A.M.
- ⊕ Las sustancias, metil centralita y etil centralita utilizadas en este trabajo fueron generosamente proporcionadas por el Ing. Nimrichtr de Explosia a.s. Pardubice-Semtím República Checa.
- ⊕ Las facilidades para la realización de las pruebas de disparo utilizadas en este trabajo fueron generosamente proporcionadas por el Capitán José García del Colegio de Seguridad Pública del Estado de Morelos y al Comandante Gabriel Sucar del Stand de tiro en Balbuena de la Secretaría de Seguridad Pública.
- ⊕ Deseo agradecer el tiempo dedicado para la revisión de este trabajo y las observaciones respecto al mismo vertidas por cada miembro del jurado y que sin excepción contribuyeron a mejorar la calidad del trabajo presentado.
- ⊕ Finalmente deseo agradecer los comentarios, muestras de apoyo e interés de las siguientes personas: Q.F.B. Adrián Waldo Capetillo, Q.F.B. Sergio Vera, Biol. Arturo Cortes, así como del personal de fines de semana del Servicio Médico Forense del D.F.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos L-401, Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán, UNAM, Av. Primero de mayo s/n., Cuautitlán Izcalli, 54740, Edo. de México, México.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Antecedentes.....	3
1.- Introducción.....	3
2.- Eventos ocurridos al disparar un arma de fuego.....	4
3.- Fuentes de residuos generados por disparar un arma de fuego....	7
4.- Técnicas para analizar los residuos generados por disparar un arma de fuego.....	9
5.- Depósito de Residuos.....	14
6.- Persistencia de los Residuos.....	15
7.- Toma de Muestra.....	15
8.- Electroforesis Capilar.(EC).....	18
9.- Instrumentación de la Electroforesis Capilar.....	19
10.- Clasificación de los modos de la Electroforesis Capilar.....	21
11.- Conceptos Básicos de Electroforesis Capilar.....	23
12.- Estrategias para el análisis de los residuos orgánicos generados por disparar un arma de fuego por Electroforesis Capilar.....	30
13.- Cromatografía Micelar Capilar Electrocinética.(CMCE).....	34
14.- Estrategias para el análisis de los Residuos Inorgánicos generados por disparar un arma de fuego por Electroforesis Capilar.....	38
15.- Electroforesis Capilar de Zona (ECZ).....	38
Objetivo General.....	59
Objetivo Particular.....	59
Materiales y Métodos.....	60
1.- Instrumentación.....	60
2.- Reactivos.....	62
3.- Preparación de Muestras.....	63
Resultados.....	66
1.- Desarrollo del Método Analítico.....	66
2.- Validación del Método Analítico.....	82
3.- Aplicación.....	91
Conclusiones.....	131
Perspectivas.....	133
Índice de Tablas.....	i
Índice de Figuras.....	ii-iii
Anexos.....	iv-v
Bibliografía.....	vi-ix

Glosario de Símbolos

Técnicas Analíticas	Abreviatura
Microscopia electrónica de barrido con difracción de energía de rayos X	MEB/DEX
Análisis por activación neutrónica	AAN
Espectroscopia de absorción atómica electrotérmica	EAA-ET
Espectroscopia de Absorción Atómica por generación de hidruros	EAA-GH
Espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado por inducción	EEA-PAI
Plasma acoplado por inducción acoplado a espectrometría de masas	PAI-EM
Electromigración	EM
Electroforesis Capilar	EC
Electroforesis Capilar de Zona	ECZ
Cromatografía Micelar Capilar Electrocinética	CMCE
Electrocromatografía Capilar	ECC
Electroforesis Capilar Quiral	ECQ
Electroforesis Capilar en Geles	ECG
Enfoque isoelectrico Capilar	EIC
Isotacoforesis Capilar	ITC
Ultravioleta	UV
Fluorescencia inducida por láser	FIL
Cromatografía de Gases	CG
Sustancias Utilizadas	Abreviatura
Nitroglicerina	Ng
Resorcinol	res
2, 3- Dinitrotolueno	2,3- DNT
2, 4- Dinitrotolueno	2,4- DNT
2, 6- Dinitrotolueno	2,6- DNT
Metil ftalato	MF
Etil Ftalato	EF
Butil Ftalato	BF
Difenilamina	DPA
Metil Centralita	MC
Etil Centralita	EC
Hierro	Fe
Antimonio	Sb
Bario	Ba
Calcio	Ca
Magnesio	Mg
Aluminio	Al
Níquel	Ni
Zinc	Zn
Plomo	Pb
Cobre	Cu

Dodecil sulfato de sodio	SDS
Cloruro de cetil metil amonio	CTAC
Bromuro de cetil trimetil amonio	CTAB
N- dodecil- N, N- dimetil amonio -3- propano sulfonato	SB 12
3- (3- colmidopropil) dimetil amonio -3- propano sulfonato	CHAPS
Polioxietilen 20 sorbitano monooleato	TWEEN 20
Dodecil polietilenglicol eter	BRIJ 35
Tris- [hidroxi- metil] amino meteno	TRIS
Ácido N- 2- hidroxi etil piperazina- N'-2- etan- sulfónico	HEPES
Agua	H ₂ O
Alcohol	R-OH
Acetona	(CH ₃) ₂ CO
Eter etílico	(C ₂ H ₅) ₂ O
Benceno	C ₆ H ₆
Cloroformo	CHCl ₃
Disulfuro de Carbono	CS ₂
Tetracloruro de carbono	CTC
Ác. Etilen diamino tetracético	EDTA
Ác. Ciclohexano diamino tetracético	CDTA
Ác. Dietilen triamino pentaacético	DTPA
Ác. Trietilen tetramino hexaacético	TTHA
Ác. Nitrilo triacético	NTA
Hidroxido de sodio	NaOH
Ácido clorhídrico	HCl
Ligante	-L
Metal	M-
Hidroxi	-OH-
Protón	-H-
Otros	Abreviatura
Punto isoelectrico	pI
Flujo Electroosmótico	FEO
Movilidad Electroforetica	μ _E
Movilidad Aparente	μ _{ap}
Movilidad Promedio	μ̄
Movilidad del flujo electroosmótico	μ _{FEO}
Tiempo de migración	t
Tiempo de migración de las micelas	t _m
Tiempo de migración de un componente no retenido por las micelas	t ₀
Retención relativa	α
Factor de capacidad	K'
Potencial de iones hidrogeno	pH
Resolución	Rs
Platos teóricos	N
Potencial de la constante de acidez	pKa
Concentración Micelar Crítica	CMC

Constante de Complejación	K_{MY}
Diámetro interno	D.I.
Longitud del Capilar	L
Distancia al detector	l
Límite de detección	LD
Media	\bar{X}
Desviación estándar	S
Coefficiente de variación	CV
Promedio de lecturas del Blanco	X_b
Pendiente de la curva	m
Ordenada al origen	b
Coefficiente de correlación	r
Error de la correlación	Se
Análisis de la Varianza	ANOVA
Factor de Concentración	ϕ
3.14151692	π
Estados Unidos de América	EUA
Cromatografía de Líquidos	HPLC
American Chemical Society	ACS

Parte de este trabajo ha sido aceptado para su publicación en:

1.- Bernal Morales E., Revilla Vázquez A.L., “Simultaneous determination of inorganic and organic gunshot residues by capillary electrophoresis” *J. Chromatogr. A*, **1061 (2004) 225-233.**

Además de ser presentado en los siguientes Congresos Nacionales e Internacionales:

1.- HPCE 2003

San Diego, California U.S.A.

Cartel: “Capillary Electrophoresis Method to determine Gunshot residues”

17 – 23 de Enero del 2003

2.- XXXVIII Congreso Mexicano de Química

Ixtapa – Zihuatanejo, México

Cartel: Determinación de Residuos Generados por disparar un arma de fuego por Cromatografía Micelar Capilar Electrocinética”

21 – 25 Septiembre del 2003

3.- LACE 2003

México, D.F.

Cartel: “Simultaneous Determination of Organic and Inorganic Gunshot residues by Micellar electrokinetic capillary chromatography”

5 – 9 de Diciembre del 2003

Simultaneous determination of inorganic and organic gunshot residues by capillary electrophoresis

Ernesto Bernal Morales^{a,b}, Alma L. Revilla Vázquez^{a,*}

^a *Laboratory of Analytical Method Development, FES-Cuautitlan, U.N.A.M., Avenida 1° de Mayo., Cuautitlán Izcalli, Estado de México 54740, Mexico*

^b *Forensic Medical Service of México City, Niños Heroes No. 102, Mexico City 06720, México*

Received 14 June 2004; received in revised form 13 October 2004; accepted 18 October 2004

Abstract

A capillary electrophoresis method was developed to analyze simultaneously 11 organic and 10 inorganic components of gunshot residues as a cheaper and possibly more specific method comparing to traditional techniques. Pre-capillary complexation and simultaneously a micellar phase were combined to determine not only the metal but also the organic residues from a firearm. In order to test the possibility to apply the developed method to real cases, residues from shot samples from different firearms were analyzed and their results were compared with those obtained with electrothermal atomic absorption spectroscopy, an established technique for gunshot residue analysis. Good agreement between both techniques for lead was found.

© 2004 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Capillary electrophoresis; Gunshot residues; Explosives; Metal complexes; Micellar electro-kinetic chromatography

1. Introduction

Gunshot residues are produced when a firearm is discharged; these residues can be deposited on the hands of the perpetrator. In targets and weapons, these residues correspond to unburned powder, particles from the primer and case of the cartridge and also, metals from the barrel of the gun [1–4].

The analysis of gunshot residues is one of the most important tests in forensic science. It has been used to estimate firing distances, to identify bullet holes and the most important task, to determine whether or not a person has discharged a firearm [1–4]. Nevertheless, the results from those tests have been controversial because of the lack of specificity in most of the traditional techniques used to do it. Since the work of Harrison and Gilroy, gunshot analysis has been based on the determination of heavy metals (usually lead, barium and antimony), which originate from the primer of

the cartridge. Several techniques of elemental analysis have been used such as color reactions, neutron activation analysis (NAA), electrothermal atomic absorption spectroscopy (ETAAS), and inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS) [1–4]. The most accepted technique at the moment is scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray analysis (SEM-EDX), which combines a morphological (SEM) and elemental (EDX) identification of the metal residues [1]. Although it is considered specific, heavy metal analysis offers a moderate diagnostic sensitivity, requires expensive instrumentation and is highly demanding in terms of professional skills, manpower, maintenance and service. As a result of this, its application as a routine technique is difficult. Besides, it has been recently found that some particles can be misidentified with gunshot residues, decreasing the specificity of (SEM-EDX) analysis [5]. Additionally, an emerging problem is given by the modern trend to produce primers free of heavy metals; this would lead to obtain false negatives [6]. For the reasons described above, there is a need of a fast, cheap and specific technique that can be used routinely in laboratories with high load of work.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 232003; fax: +52 55 58 682491.
E-mail address: almarv@servidor.unam.mx (A.L. Revilla Vázquez).

Resumen

Se desarrolló un método por electroforesis capilar capaz de detectar once residuos orgánicos y diez residuos inorgánicos provenientes de disparar un arma de fuego, afín de estudiar la posibilidad de utilizarlo como una alternativa más barata y posiblemente más específica a las técnicas actualmente utilizadas en los laboratorios forenses. Complejación pre-capilar de los residuos inorgánicos y una fase micelar fueron utilizadas simultáneamente, para lograr la separación de todos los residuos estudiados en una sola corrida. Para poder aplicar el método desarrollado a casos reales se estudiaron factores como: toma y procesamiento de las muestras así como la presencia de residuos en personas que no han disparado el arma y el depósito de los residuos en las manos del perpetrador. Se encontró que algunos residuos estudiados pueden ser utilizados como marcadores de haber disparado un arma bajo las condiciones en las que se realizaron las pruebas. Finalmente se compararon los resultados obtenidos con técnicas más tradicionales para analizar los residuos, encontrándose una buena correlación entre ambas técnicas.

Abstract

A capillary electrophoresis method was developed to analyze simultaneously eleven organic and ten inorganic components of gunshot residues as a cheaper and possibly more specific method comparing to traditional techniques. Pre-capillary complexation and simultaneously a micellar phase were combined to determine not only the metal but also the organic residues from a firearm. In order to test the possibility to apply the developed method to real cases, residues from shot samples from different firearms were analyzed and their results were compared with those obtained with electro-thermal atomic absorption spectroscopy, an established technique for gunshot residue analysis. Good agreement between both techniques for lead was found.

Antecedentes

1.-Introducción

La investigación de los residuos generados al disparar un arma un arma de fuego es una de las actividades más importantes en el área forense; el estudio de estos residuos se ha utilizado para determinar distancias de disparo, si una herida u orificio fue producido por disparo de arma de fuego y, lo más importante, para determinar si una persona accionó dicha arma [1]. Estos residuos, por su naturaleza química, se dividen en residuos orgánicos e inorgánicos.

En los laboratorios de química legal usualmente se considera como más significativa la búsqueda de residuos inorgánicos siendo los más específicos los provenientes del iniciador del cartucho como son plomo, bario y antimonio [2], aunque también se pueden encontrar otros metales como aluminio, calcio, hierro, silicio, potasio, zirconio, magnesio, titanio, zinc, níquel cobre, etc, los cuales se consideran menos significativos ya que no se producen en todas las armas y a que pueden provenir de del medio ambiente [1,3].

Las técnicas más utilizadas [4] para realizar este análisis son: a).- microscopia electrónica de barrido con difracción de energía de rayos X (MEB/DEX), la cual es una técnica muy sensible y específica; sin embargo, su aplicación en el análisis rutinario está limitada por su alto costo y por sus elevados tiempos de análisis, b).- análisis por activación neutrónica (AAN), cuyo uso ha decaído, debido a que sólo identifica bario y antimonio y a la necesidad de contar con personal altamente entrenado y c).- espectroscopia de absorción atómica electrotérmica (EAA-ET), que es la técnica más utilizada en el análisis rutinario, las dos últimas técnicas se consideran poco específicas, debido a que son incapaces de distinguir entre los residuos provenientes de un arma de fuego y la contaminación ambiental (falsos positivos). Un problema adicional que afecta a todas las técnicas es la tendencia entre los fabricantes de municiones, por cuestiones ambientales, a eliminar el uso de metales en sus productos (falsos negativos). Todo esto ha llevado a aplicar ciertos

critérios para aumentar la especificidad del análisis, los que involucran la toma de muestra, presencia de ciertos metales, aunque también se ha propuesto el análisis simultáneo de los residuos orgánicos e inorgánicos [1]. Se ha propuesto diversas metodologías para el análisis de los residuos orgánicos pero ninguna de ellas ha logrado aceptación dentro de los laboratorios forenses.

En este estudio se propone el análisis simultáneo de los residuos orgánicos e inorgánicos por electroforesis capilar como una opción de bajo costo, rápida y con adecuada especificidad.

2.-Eventos ocurridos al disparar un arma de fuego

Para conocer la naturaleza química de los residuos generados al disparar un arma de fuego es necesario conocer los eventos que suceden al disparar una de ellas. Al accionar el gatillo, se libera el seguro del arma provocando que el martillo se dirija hacia delante para golpear la aguja de disparo, la cual a su vez golpea el iniciador de la munición, este al ser hecho de un material suave se deforma y es empujado al interior del cartucho hasta chocar con una parte inamovible y dura del iniciador llamada yunque (Fig. 1), esto provoca que el explosivo que se encuentra en el iniciador explote, provocando que la presión y la temperatura pasen de condiciones ambientales a 1000 kPa y 2000 °C respectivamente en unos segundos.

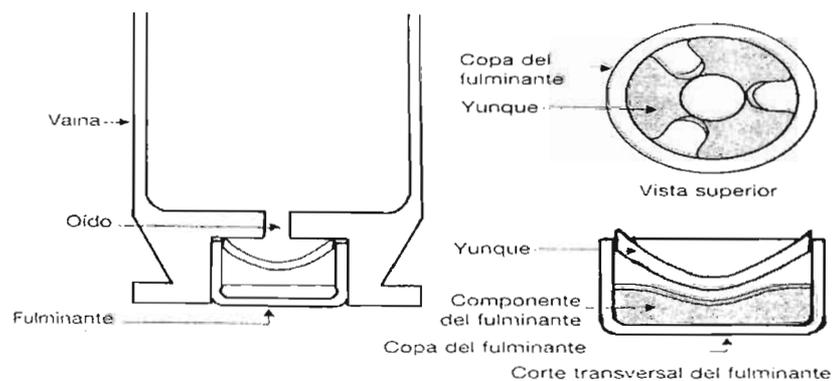


Figura 1 Partes de un iniciador [5].

El calor de esta explosión hace que la pólvora que se encuentra en el cartucho deflagre (arda muy rápidamente) provocando otro aumento en la presión y la temperatura; es ésta la energía que expulsa a la bala del arma junto con una gran cantidad de gases y pólvora sin quemar. Este calor provoca también que los componentes inorgánicos del iniciador vaporicen, los que con la posterior expansión y el enfriamiento subsiguiente al dejar el arma recondensan en forma de gotas (Fig. 2) [2, 3, 5].

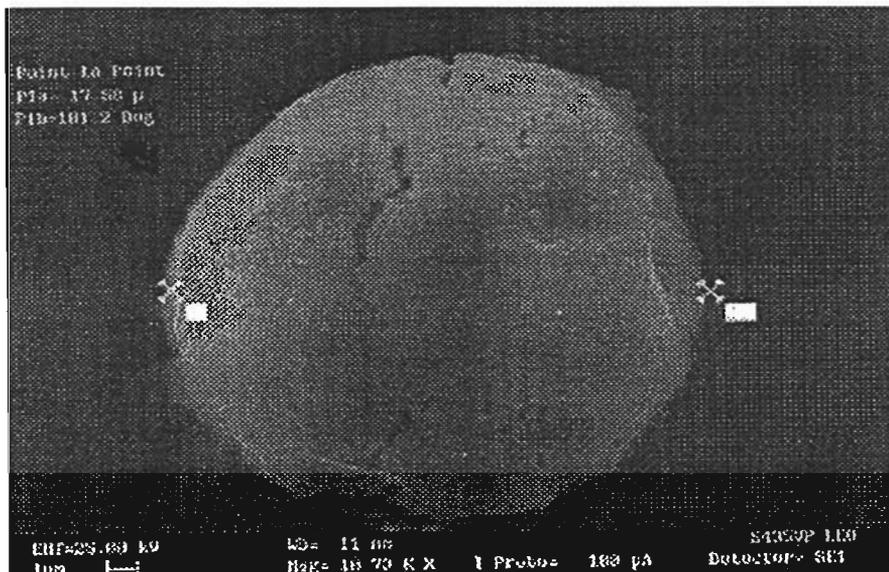


Figura 2 Imagen por MEB/DEX de un residuo generado por disparar una pistola Pietro Berreta calibre 7.65 mm, con munición Fiocchi [3].

Estos productos son los que se conocen colectivamente con el nombre de “residuos generados por disparar un arma de fuego” o “residuos por descarga de casquillo”. Estos residuos pueden seguir la trayectoria de la bala en cuyo caso se llaman residuos anteriores (downrange residues) y están formados usualmente por pólvora sin consumir y metales provenientes de la bala y/o el casquillo, o pueden salir de la parte trasera del arma (Fig. 3), conociéndose como residuos posteriores (uprange residues), los que provienen del iniciador del cartucho [2]. Estos últimos residuos se depositan en pequeñas cantidades en el dorso de la mano, pelo, cara y ropa de la persona que disparó y si la distancia de disparo no es muy grande se depositan en la piel y ropa de la persona que recibe el disparo.

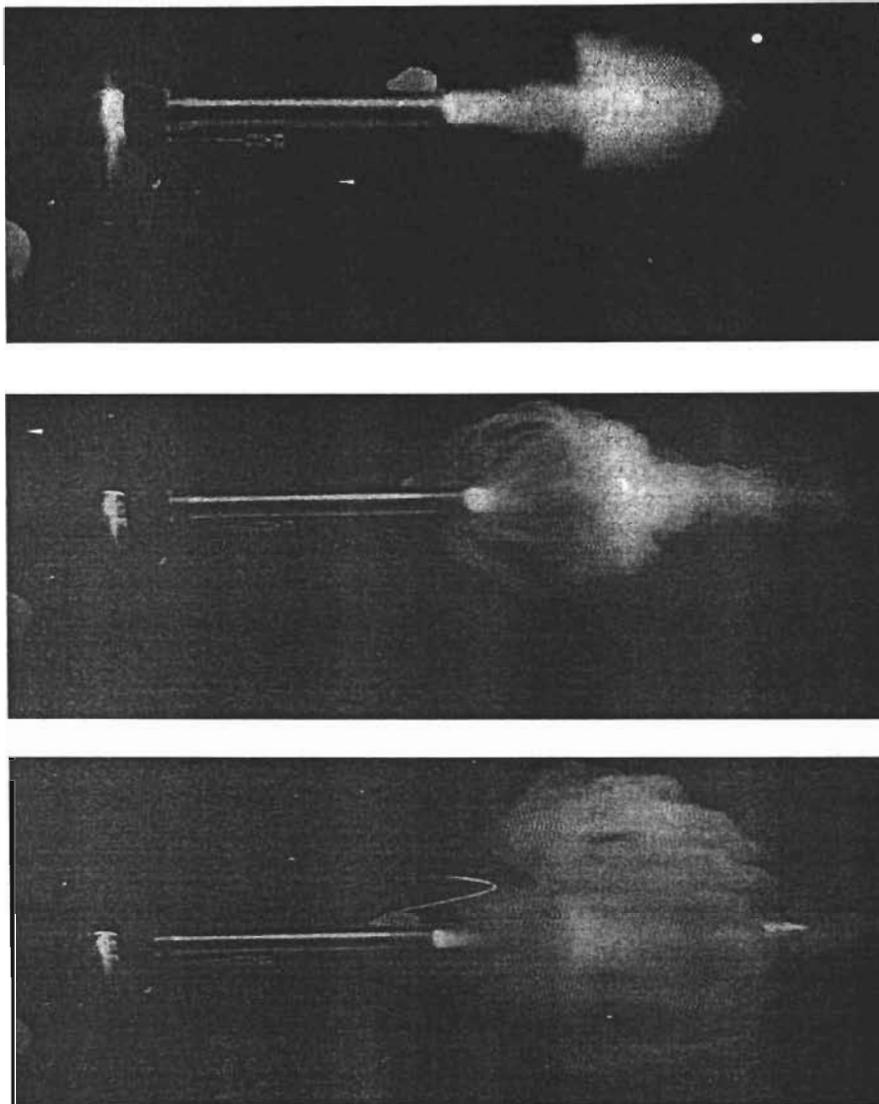


Figura 3 Secuencia de un disparo de un arma de fuego [5].

Estos residuos son utilizados en la criminalística para estimar distancias de disparo, identificar si un orificio fue producido por un disparo de arma de fuego (residuos anteriores) y, sobre todo, para determinar si una persona disparó o no un arma de fuego (residuos posteriores). [1,2].

3.- Fuentes de los residuos generados por disparar un arma de fuego

Los residuos por disparar un arma provienen de los distintos compartimientos de la munición (Fig. 4). La fuente más importante de estos residuos es el iniciador de la munición; estos contienen cuatro componentes básicos: el explosivo iniciador, un agente oxidante, combustible y un sensibilizador (Tabla 1). Cada uno de ellos contribuye a los residuos una vez que se ha disparado un arma. El explosivo iniciador más usado es el estifnato de plomo; aunque se han utilizado azida de plomo y fulminato de mercurio.

Los agentes oxidantes se utilizan en los iniciadores para incrementar el calor de la explosión. El nitrato de bario es el más utilizado pero también se han utilizado peróxido de bario, nitrato de plomo o peróxido de plomo [1]. Como combustible se utiliza comúnmente sulfuro de antimonio, pero también pueden usarse silicato de calcio, tiocianato de plomo, aluminio, zirconio, magnesio y titanio en polvo. El agente sensibilizador más utilizado es pentaeritrol tetraaceno; el tetril y el trinitrotolueno son menos utilizados.

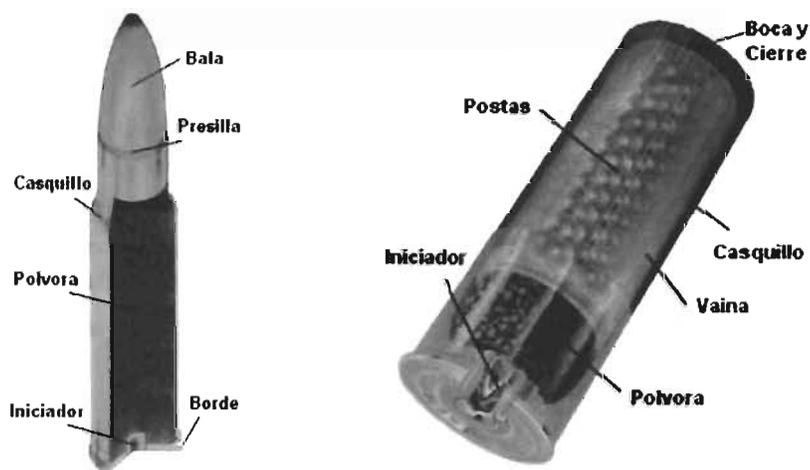


Figura 4 Partes de una munición y un proyectil de perdigones.

Otra fuente muy importante de residuos es la pólvora (Tabla 1); la pólvora utilizada en las municiones es la llamada pólvora sin humo la cual se clasifica en 1.- pólvora de base sencilla cuando contiene nitrocelulosa, 2.- pólvora de base doble cuando contiene nitrocelulosa y nitroglicerina y 3.- pólvora de base triple cuando a la de base doble se le

agrega nitroguanidina, esta última es de menor relevancia en México ya que solo se comercializa en Europa. Además de los componentes explosivos, la pólvora sin humo contiene una serie de aditivos, los cuales cumplen diversas funciones, ya sea como estabilizadores, lubricantes, inhibidores de la flama, enfriadores, etc. Estos aditivos se encuentran en bajas concentraciones pero pueden ser importantes en el análisis de los residuos generados por disparar un arma de fuego o para distinguir entre distintos tipos de municiones.

Los estabilizadores más comunes son la difenilamina, las centralitas (derivados de la difenil urea) y el resorcinol. La difenilamina se encuentra formando el 1% de la pólvora sin humo y pueden encontrarse productos de descomposición de ésta como N-nitrosodifenilamina y 2-nitrodifenilamina y 4-nitrodifenilamina aunque su importancia es muy pequeña dada la baja concentración en la que se encuentran. Entre las centralitas la más utilizada es la etil centralita aunque también se usa la metil centralita.

Tabla 1 Componentes de las municiones [1].

PARTE DE LA MUNICIÓN	USO	COMPONENTE
Iniciador	Explosivo iniciador	Estifnato de plomo, azida de plomo, fulminato de mercurio
	Agentes oxidantes	Nitrato de bario, peroxido de bario, nitrato de plomo, peroxido de plomo etc.
	Combustible	Sulfuro de antimonio, tiocianato de plomo, aluminio, magnesio, zirconio, titanio
	Sensibilizador	pentaeritrol tetranitrato
Pólvora sin humo	Pólvora	Nitrocelulosa, nitroglicerina, nitroguanidina
	Plastificadores	Ftalatos, triacetina
	Estabilizadores	Difenilamina, centralitas
	Lubricantes	Grafito
	Inhibidores de la flama	Trinitrotolueno
Bala		Plomo, antimonio, cobre, etc.
Casquillo		Cobre, zinc

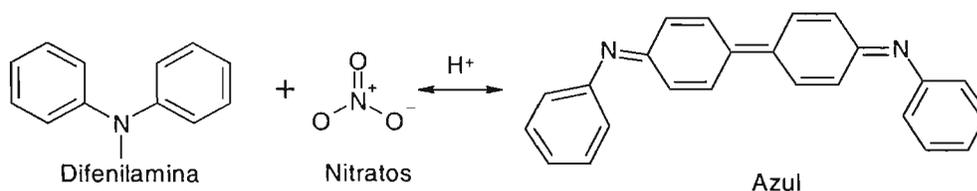
En el proceso de la fabricación de la pólvora se agregan otras sustancias como son: los plastificadores, para poder manejarla más fácilmente; entre los plastificadores más

utilizados se encuentran los ftalatos y la triacetina. A manera de lubricante los granos de pólvora se encuentran recubiertos de grafito. Aparte de las sustancias anteriores, ciertas pólvoras especiales incorporan trinitrotolueno como supresor de flama.

Otra fuente de residuos es el casquillo, el cual está compuesto usualmente de cobre, níquel, hierro, aluminio, zinc y la bala de la munición (Tabla 1) la cual es de plomo pudiendo estar recubierta de cobre y zinc [1].

4.- Técnicas para analizar los residuos generados por disparar un arma de fuego.

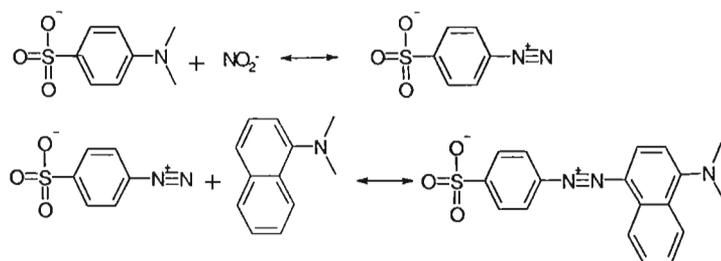
El primer método utilizado para analizar los residuos generados por disparar un arma de fuego fue la prueba de la parafina o la prueba dérmica de nitratos, la cual fue introducida en los Estados Unidos en 1933 por Teodoro González de los Laboratorios de Identificación Criminal en la Ciudad de México; esta técnica buscaba nitratos en la mano de los sospechosos de haber disparado un arma, en ella se hacía un molde vertiendo parafina derretida en las manos de los sospechosos, cuando la parafina solidifica se retira el molde de la mano y se agrega en él, una solución 0.2% de difenilamina en ácido sulfúrico al 70%, la presencia de residuos se hace evidente mediante una coloración azul, debida a la formación de la N',N'-difenilbenzidina.



Sin embargo, esta prueba producía una gran cantidad de falsos positivos dada la amplia distribución de nitratos en la naturaleza y a que diversas sustancias oxidantes dan la reacción positiva; además, se demostró que algunas personas que habían disparado un arma

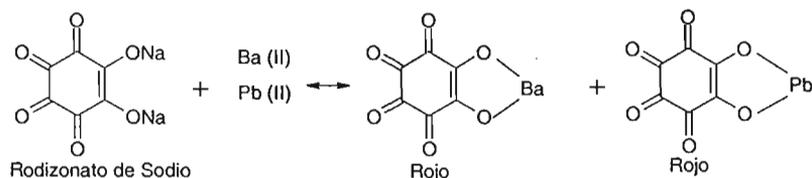
de fuego daban la prueba como negativa; debido a ello esta prueba cayó pronto en desuso [2,3].

Para superar las deficiencias de la prueba de la parafina se implementó la prueba de Greiss, la que en vez de buscar nitratos determina nitritos, los cuales, al estar menos distribuidos en la naturaleza que los nitratos hacen la prueba un poco más específica que la prueba de la parafina; la prueba de Greiss consiste en un acoplamiento diazo entre sulfonato aminobenceno y naftilamina, mediante la siguiente secuencia de reacciones:



Una variante de la prueba de Greiss, la prueba de Walker, se utiliza comúnmente para identificar si un orificio o herida fue producida por un arma de fuego [2].

El primer estudio sistemático para la determinación de los residuos lo llevaron a cabo Harrison y Gilroy en 1959. Llegaron a la conclusión de que los residuos que daban una evidencia más contundente eran los metales provenientes del iniciador, es decir, plomo, bario y antimonio e implementaron una técnica para su detección mediante una reacción con desarrollo de color utilizando como reactivos rodizonato de sodio y yoduro de trifenilmetil arsonio.



Esta prueba es más específica que las anteriores, pero tiene la desventaja de requerir personal debidamente adiestrado, de no poder contar con un registro del análisis, de buscar el metal total y ser una prueba cualitativa y, por tanto, no poder distinguir entre niveles de

fondo normales y los niveles asociados con un disparo. En relación con los problemas anteriores se sabe que las manos de personas con ciertas ocupaciones tienen niveles elevados de plomo, bario y antimonio dado el uso que hacen de ciertos materiales (Tabla 2) [1-3, 5].

No obstante, la prueba de Harrison y Gilroy, al establecer claramente la búsqueda de plomo, bario y antimonio como los componentes más significativos para el análisis de los residuos, permitió que bajo sus mismos criterios se pudieran utilizar técnicas de análisis instrumental.

Tabla 2 Fuentes normales de bario, antimonio y plomo [2].

BARIO	ANTIMONIO	PLOMO
Pintura	Pintura	Pintura
Grasa	Lacas	Vidrio
Hule	Enameles	Gasolina
Papel	Baterías	Baterías
Veneno de Ratas	Pewter	Pewter
Fotoceldas	Aleaciones de níquel, plomo, cobre, etc.	Velas
Madera	Tipos de Imprenta	Tinta de impresión
Fuegos ratificales	Cerillos	Cerámica vidriada
Aceite Lubricante	Maquillaje	Soldadura
Tinta de impresión	Mezclas pirotécnicas	Filtro de carros
Frenos de autos		Plomos de carros
Vidrio		Tubería
Protectores solares		

La primera de estas pruebas es el análisis por activación neutrónica (AAN), sin embargo, esta técnica fue utilizada por poco tiempo debido a que requiere de un reactor nuclear, radioisótopos y todo lo que esto conlleva para su implementación además, carece de la sensibilidad adecuada para el plomo, por lo cual se utiliza para identificar únicamente bario y antimonio [2-3,5].

En la actualidad las técnicas instrumentales más utilizadas en los laboratorios legales para el análisis de los residuos del iniciador son la espectrofotometría de absorción atómica electroterma (EAA-ET) y la microscopía electrónica de barrido con dispersión de energía de rayos X (MEB-DEX); en ambas técnicas se busca plomo, bario y antimonio [4].

La EAA-ET permite la detección de concentraciones muy pequeñas de metales por lo que es adecuada para este análisis, sin embargo, en la EAA-ET se determina el metal total, por lo que tiene problemas de especificidad por la contaminación ambiental y como se mencionó anteriormente, ciertas actividades provocan que las personas que las llevan a cabo tengan rastros de metal en las manos. Sin embargo, al ser una técnica ampliamente utilizada existen valores de referencia para cada metal y para distintos tipos de arma. Singer et. al. recopilaron los valores de referencia utilizados en los laboratorios forenses de los Estados Unidos para la técnica de EAA-ET, encontrando distintos criterios en su estudio [4]. Otros estudios realizados con otros métodos de análisis y diferentes técnicas de muestreo proporcionan valores de referencia diferentes (Tabla 3).

Tabla 3 Valores de referencia* de plomo, bario y antimonio en personas que han disparado un arma de fuego, por EAA-ET y AAN.

ARMA	Plomo (μg)		Bario (μg)		Antimonio (μg)	
	+	-	+	-	+	-
0.38 revólver [6]	13-326	1-100	0.2-1.4	0-0.45	0.35-5.9	0-0.5
0.22 revólver [6]	3.8-10.5	0.94-9.9	0-0.2	0-0.08	0.01-0.02	0-0.02
0.45 pistola [6]	23-66	3.6-30	0.32-16	0-0.3	0.12-0.42	0-0.35
Varias [5]	>0.8		>0.15		>0.035	
Varias [2]	49	20	1.8	0.8	0.22	0.08
Varias (NAA) [3]			4	0.1	1	0.03
Varias (ET-AAS) [4] en mg/L	>0.5		>0.3-0.5		>0.05	

*Valores obtenidos bajo distintas condiciones de muestreo.

La microscopía electrónica de barrido tiene la ventaja de que además de identificar a los residuos metálicos del iniciador, por un análisis por dispersión de energía de rayos X (DEX) también los identifica por su forma, con la ayuda de la microscopía electrónica (MEB). Esta forma es característica y consiste en esferas con un diámetro de 0.1 a 35 micras, y es debida al proceso de calentamiento y enfriamiento súbito que sufren los metales del iniciador durante el disparo, esto le da a esta técnica una especificidad de la que carecen las otras técnicas al poder discriminar entre el metal proveniente del iniciador y el de otras fuentes [3]. El principal problema de esta técnica es el tiempo que requiere para dar

un resultado (hasta 8 horas), lo que la hace poco práctica en laboratorios con grandes cargas de trabajo, además es una técnica muy costosa que requiere de personal adiestrado para su uso y no se cuentan con criterios claros para dar un dictamen. Por si esto fuera poco, recientemente se han encontrado residuos de otras fuentes, principalmente provenientes de automóviles que pueden ser confundidos con los residuos provenientes de un disparo [7,8].

Se han utilizado otras técnicas para el análisis de los residuos del iniciador como espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (EEA-PAI), PAI acoplado a espectrometría de masas (PAI-EM) y voltamperometría anódica de pulsos pero ninguna de estas a encontrado aceptación en los laboratorios forenses; en los dos primeros casos por el alto costo operativo de la técnica y en el tercero porque no puede identificar bario [2, 3].

Todas las técnicas que se abocan a la búsqueda de plomo, antimonio y bario enfrentan en la actualidad el problema de que los fabricantes de municiones en el mundo tienden a eliminar por cuestiones ambientales el uso de estos metales en sus iniciadores lo cual llevaría a una gran cantidad de falsos negativos [9].

A diferencia de lo anterior la composición de la pólvora sin humo no ha cambiado con el tiempo; se han implementado métodos para buscar los residuos orgánicos producidos por el disparo usando diferentes técnicas como cromatografía de gases, cromatografía de gases-espectrometría de masas, cromatografía de líquidos-detección electroquímica y electroforesis capilar. De los estudios anteriores se concluye que los residuos orgánicos consisten en pólvora sin quemar, y por tanto, tienen la misma composición; por lo que podrían utilizarse para identificar la marca del cartucho con el que se efectuó el disparo. De lo anterior se deduce que el componente que se encuentra en mayor cantidad es la nitrocelulosa, sin embargo, al usarse esta ampliamente en lacas y pinturas y al degradarse con el tiempo la hacen poco adecuada para el análisis, por lo cual se considera como más significativa la presencia de la nitroglicerina; ya que su único uso comercial es en productos farmacéuticos. Otros componentes importantes son los estabilizadores de la pólvora, como la etil centralita y la difenilamina acotando que en la pólvora solamente se encuentra uno de

ellos; también se ha mencionado la presencia de los isómeros del dinitrotolueno como un componente importante para esta prueba [1].

5.- Depósito de los residuos

Cuando un arma es disparada, los residuos se depositan en los objetos cercanos al perpetrador. La cantidad de estos residuos depositada depende de muchos factores:

- a.- Tipo de arma (revólver, pistola, arma larga, etc.)
- b.- Calibre y puerto de eyección del arma.
- c.- Estado del arma.
- d.- Mano que realizó los disparos.
- e.- Número de disparos efectuados.
- f.- La cantidad de aceite y humedad en la zona de maculación.
- g.- Dirección y fuerza de las corrientes de aire.

Estos residuos provienen de:

- a.- Fugas de huecos en el mecanismo de disparo.
- b.- Emisión y expulsión del cartucho
- c.- La nube del disparo.

Los residuos se depositan, en el caso de revólveres y pistolas preferentemente en el área de la red de la mano que disparó el arma; cuando se disparan armas largas los residuos se encuentran en el área del brazo y cara. La presencia de éstos residuos en la palma de la mano es indicativo de haber manipulado un arma; Todo lo anterior se debe tomar en cuenta para implementar la metodología de toma de muestra [1, 10].

El efecto de los factores anteriormente mencionados es tal que a pesar de efectuarse un disparo, puede no encontrarse residuos bajo ciertas circunstancias o encontrarse en cantidades muy disímiles, esto último dificulta el establecer valores de referencia.

Por otro lado si el arma se encuentra lo suficientemente cerca del blanco, los residuos se depositarán en el blanco en un círculo alrededor del orificio de entrada, estos residuos se utilizan para determinar si un orificio proviene de un arma de fuego y determinar distancias de disparo, dado que el radio de este depósito depende de la distancia de disparo. Estos residuos no aparecen cuando la distancia de disparo es menor a 1.2 cm. debido a que no hay espacio para su depósito o bien cuando la distancia de disparo es muy grande y los residuos se dispersan en un radio muy amplio.

6.-Persistencia de los residuos

Los residuos no persisten mucho tiempo en las personas vivas y se pierden continuamente como resultado de las actividades normales de una persona, pero permanecen más tiempo en las manos de una persona fallecida. Esto aumenta la dificultad en la interpretación de los resultados e impide la generalización de los casos.

Se ha reportado que la actividad normal de una persona lleva a una pérdida significativa de estos residuos al cabo de dos horas. Otras actividades como lavarse las manos con agua y jabón, meter las manos en los bolsillos del pantalón, restregarse las manos en la ropa, etc. llevan a la pérdida parcial o total de estos residuos. En ropa, cara y manos de personas fallecidas estos residuos persisten por más tiempo, todo lo anterior indica que la pérdida de estos residuos es debida a la actividad física y no a la degradación química; lo anterior determina la importancia del muestreo, el cual debe hacerse lo más rápido posible [1, 2].

7.- Toma de muestra

Existen diferentes métodos para efectuar la toma de muestra; los cuales dependen del tipo de residuos que se van a analizar y la técnica para realizar el análisis.

La pérdida de residuos con el tiempo obliga a que la toma de muestra sea rápida y sencilla, a fin de tener mayores probabilidades de capturar los residuos. Por lo que personal con poco entrenamiento pueda tomar llegar a tomar la muestra.

Las formas de muestreo más comunes son:

- a.- Cinta adhesiva. Esta técnica de muestreo se utiliza cuando la técnica de análisis es microscopía electrónica de barrido (MEB/DEX), en ella la cinta adhesiva se presiona en el área de interés. Esta técnica también se ha utilizado para tomar la muestra para analizarla por electroforesis capilar, después de recuperar los residuos con un disolvente adecuado, evaporación de este y disolución en el buffer de corrida [1,10-11].
- b.- Frotamiento. Usando comúnmente tela de algodón, cotonetes de algodón, papel filtro, etc. Para el análisis de metales por EAA-ET la toma de muestra se hace usualmente frotando tela de algodón embebida en ácido nítrico diluido en el área de interés, cuando se buscan los residuos orgánicos se utilizan disolventes orgánicos o incluso agua. El método más común para recuperar los residuos de la tela es lixiviación con un disolvente adecuado; esto puede realizarse mediante 1.- Extracción directa, 2.- Constricción con un tubo, 3.- Exprimiendo 4.- Compresión en una jeringa, 5.- Centrifugación y microfiltración [1,6,12-13].
- c.- Agitar la mano que efectuó el disparo en bolsa llena con un disolvente adecuado. Esta técnica se ha utilizado para buscar metales usando ácido nítrico diluido [6].
- d.- Levantamiento por vacío. Se utiliza para levantar residuos orgánicos de la tela, los residuos posteriormente son extraídos por un disolvente adecuado [1].
- e.- Parafina y otros levantamientos con películas. En esta técnica se aplica una película o un molde en la mano que efectuó el disparo y los residuos se adhieren a la película, la cual es levantada y analizada. Las sustancias más utilizadas en esta técnica son la parafina, colodión, acetato de celulosa, etc. Estos métodos han caído en desuso debido a que son muy tardados y dificultan el análisis [6].

Debido a todo lo anterior, la toma de muestra para el análisis de estos residuos implica cinco tomas, las cuales se toman en la palma y en la parte de atrás de cada mano, además de un blanco (Fig. 5). La prueba se interpreta en función del análisis de las cinco muestras a fin de diferenciar un resultado positivo de la contaminación ambiental, de la manipulación de un arma, etc. Además, cada caso se maneja de manera individual, todo esto debido a todos los factores descritos con anterioridad y que impiden una interpretación directa [5].

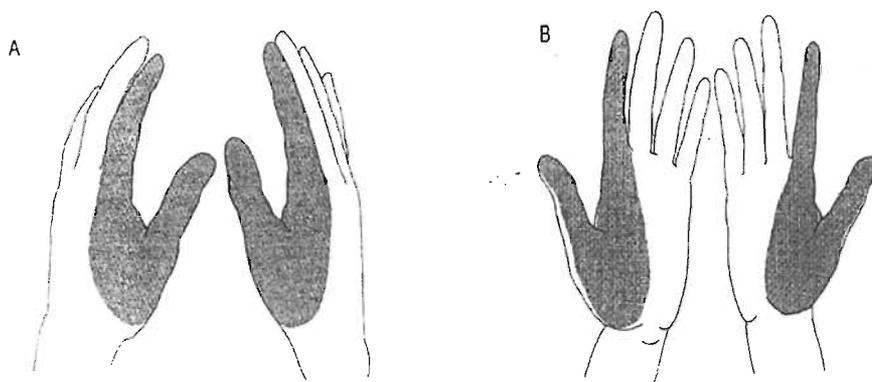


Figura 5 Zona de fricción en (A) el dorso de la mano y (B) palma de la mano [5].

8.- Electroforesis Capilar

Las técnicas de separación de electroforesis se basan en las distintas movilidades de sustancias con carga eléctrica, bajo la influencia de un campo eléctrico, en un medio conductor. Cuando se aplica un campo eléctrico a una solución de iones, cada uno de ellos se dirige al electrodo de carga opuesta con una velocidad que depende no solo del campo eléctrico aplicado sino también de la carga del ión, su tamaño y la forma del mismo; las diferencias en estos factores determinan la movilidad y, por tanto, la separación de las sustancias.

Históricamente la electroforesis fue introducida en 1937, por Tiselius [14]. Hasta la fecha es ampliamente utilizada para el análisis de proteínas utilizando para ello medios de soporte como geles, papel, celulosa, etc. Este material de soporte provee de soporte físico y estabilidad mecánica al buffer. Sin embargo, estos medios de soporte limitan la intensidad del campo eléctrico que se puede aplicar, debido a que la cantidad de calor producida al manejar voltajes elevados (calor de Joule) puede llegar a derretirlos. Esto restringe a la electroforesis en gel en cuanto a resolución y eficiencia y con ello a su aplicabilidad.

Para superar estos problemas se buscó realizar la técnica en un sistema que eliminara el calor eficientemente. En 1967 Hjerten [15], propuso realizar la electroforesis en tubos, debido a que esta forma geométrica disipa mejor el calor, además las paredes del tubo proveen el soporte necesario al electrolito, lo que permite eliminar el uso de los geles. Sin embargo, los tubos utilizados no eran lo suficientemente delgados para disipar el calor eficientemente y no fue hasta la década de los ochentas, cuando estuvieron disponibles capilares de sílice fundida, que la técnica de electroforesis capilar pudo ser implementada.

La técnica de electroforesis capilar provee de ciertas características que la hacen muy atractiva como son: alta resolución y eficacia (hasta millones de platos teóricos), rapidez de análisis, uso de poca muestra (nanolitros), capacidad de miniaturización y automatización. Debido a ello se han desarrollado gran variedad de aplicaciones, siendo su principal problema los límites de detección, problema inherente al uso de capilares y detectores espectrofotométricos en línea [16].

9.- Instrumentación de la Electroforesis capilar

Como se mencionó anteriormente, la aparición de los capilares de sílice fundida permitió la posibilidad de construir aparatos comerciales de electroforesis capilar. Estos esencialmente consisten de un depósito para la muestra, dos depósitos que contienen la solución conductora; en cada uno de estos depósitos se encuentran sumergidos los electrodos y los extremos de un capilar de sílice fundida, un sistema de detección con la sensibilidad adecuada, un sistema de refrigeración adecuado, una fuente de poder de alto voltaje y por último un sistema para procesar los datos (Fig. 6).

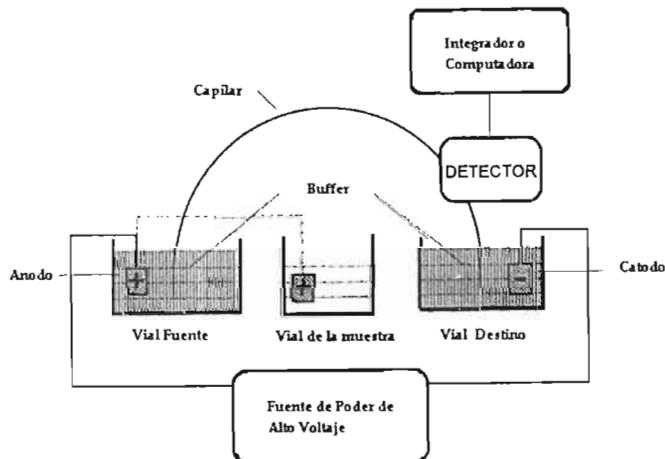


Figura 6 Componentes básicos de un equipo de electroforesis capilar [17].

La electroforesis capilar se lleva a cabo siguiendo los siguientes pasos: a).- Llenar el capilar con la solución conductora, b).- Introducir la muestra en un extremo del capilar, c).- Sumergir los extremos del capilar en los reservorios de la solución conductora y d).- Aplicar un campo eléctrico por medio de los electrodos. Los solutos, entonces comienzan a migrar hasta llegar al detector cuya señal es transformada por el sistema procesador de datos en una gráfica conocida con el nombre de electroferograma [17].

9.1 Inyección de la muestra

Debido al volumen manejado, uno de los problemas más importantes en el diseño de los aparatos de electroforesis capilar, es la precisión y reproducibilidad de la inyección; las formas de inyección más usadas son la inyección hidrodinámica, la que puede hacerse por sifoneo, presión y vacío, y la inyección electrocinética en la cual se aplica un campo eléctrico al vial de la muestra por un pequeño periodo de tiempo (Fig. 7).

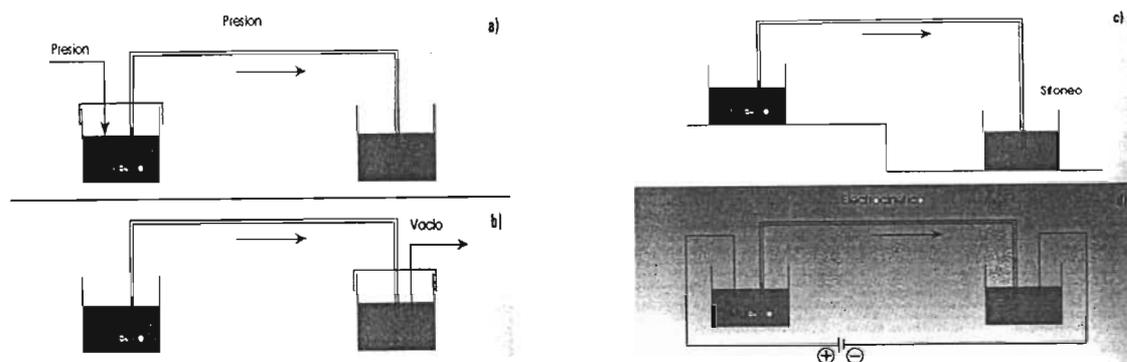


Figura 7 Modos de Introducción de muestra en la electroforesis capilar. a.- Hidrodinámica (presión), b.- Hidrodinámica (vacío), c.- Hidrodinámica (sifoneo), d).- Electrocinética [18].

9.2 Capilares

Se han probado capilares de distintos materiales, pero los de sílice fundida son los más utilizados. Las dimensiones de estos capilares van de 20 a 150 micras de diámetro interno y se encuentran cubiertos por una capa de poliimida para darles flexibilidad; una ventaja adicional de los capilares de sílice fundida es que pueden utilizarse como celda de detección espectrofotométrica dado que la sílice es transparente a la luz ultravioleta y visible lo que permite la detección en la columna; para ello es necesario eliminar la poliimida en el sitio de detección.

9.3 Detectores

Una desventaja de la electroforesis capilar respecto a otras técnicas más establecidas es el limitado número de detectores disponibles en los aparatos comerciales.

Los detectores más utilizados son los de ultravioleta y fluorescencia inducida por láser (FIL) aunque pueden acoplarse otros como el de espectrometría de masas, cuando se necesita información sobre la estructura de los analitos. En la actualidad se busca acoplar otros detectores sin embargo, la mayoría se encuentran en etapa de experimentación.

9.4 Fuentes de Poder

La fuente de poder debe proveer un campo eléctrico estable a lo largo del capilar; se pueden aplicar voltajes de hasta 30 kV y corrientes de 300 μ A [17-19]. En condiciones normales (polaridad normal) el ánodo se encuentra del lado donde se inyecta la muestra. Sin embargo, es posible cambiar la polaridad de los electrodos (polaridad reversa). Esto se lleva a cabo mediante una fuente de poder dual, en éstas fuentes de poder, los electrodos de alto voltaje y tierra permanecen fijos; el cambio de polaridad se efectúa por medio del electrodo de alto voltaje, que puede ser positivo (polaridad normal) o negativo (polaridad reversa, es decir, el cátodo estará del lado de introducción de la muestra).

10.- Clasificación de los modos de electroforesis capilar.

En un principio la electroforesis capilar solamente se aplicaba para el análisis de sustancias con carga eléctrica sin embargo, con el tiempo se han implementado distintos modos de operación que han aumentado el espectro de sustancias que se pueden analizar.

La manera más aceptada de clasificar estos modos se basa en la naturaleza del electrolito. Con base en lo anterior los tipos de electroforesis capilar se dividen en: sistema continuo y discontinuo. En los sistemas continuos, el electrolito soporte provee un medio conductor a lo largo del capilar; la composición del electrolito puede ser constante, lo que implica un campo eléctrico constante y movilidades individuales iguales, dando como resultado un proceso cinético; si la composición del electrolito no es constante a lo largo del capilar, el campo eléctrico y las movilidades de las sustancias varían a lo largo del capilar hasta llegar a un estado estable y se clasificará como un proceso estable (Tabla 4).

En los sistemas discontinuos las muestra migra en una zona, entre dos distintos electrolitos (Tabla 4).

Tabla 4 Clasificación de modos de electroforesis capilar según el tipo de electrolito.

Electroforesis capilar	Sistema Continuo	Proceso cinético	Electromigración (EM) Electroforesis capilar de zona (ECZ)
			EM+Partición Cromatografía micelar capilar electrocinética (CMCE) Electrocromatografía capilar (ECC) Electroforesis capilar quiral (ECQ)
			Tamizado Electroforesis capilar de geles (ECG)
	Proceso estable	Diferencias en punto isoeléctrico (pI) Enfoque isoeléctrico capilar (EIC)	
	Sistema Discontinuo	Isotacoforesis Capilar (ITC)	

Otra clasificación se basa en el aporte del flujo electroosmótico al proceso de separación (Tabla 5) [16]. En la electroforesis capilar hay dos fuerzas que contribuyen al movimiento de las sustancias, una es la movilidad de las sustancias en un campo eléctrico y la otra es el flujo electroosmótico, el cual puede seguir la misma dirección de la sustancia bajo el campo eléctrico, la dirección contraria o no existir.

Tabla 5 Clasificación de los modos de electroforesis capilar según el flujo electroosmótico.

Electroforesis capilar	Coelectroosmosis	ECZ
		CMCE
		ECC
	Contraelectroosmosis	ECZ, CMCE
	Sin electroósmosis	ECZ
		EIC
ECG		

Otra clasificación se basa en la aplicación de cada modo de operación [16] (Tabla 6).

Tabla 6 Clasificación de la electroforesis capilar por su aplicación.

MODO DE ELECTROFORESIS CAPILAR	APLICACIÓN
Electroforesis capilar de zona (ECZ)	Iones, etc.
Cromatografía micelar electrocinética (CMCE)	Substancias neutras
Electroforesis capilar quiral (ECQ)	Moléculas quirales
Electro cromatografía capilar (ECC)	Moléculas pequeñas
Electroforesis capilar en gel (ECQ)	Moléculas grandes
Enfoque isoléctrico capilar (EIC)	Proteínas, péptidos
Isotacoforesis capilar (ITC)	Iones

11.- Conceptos básicos de electroforesis capilar

11.1 Movilidad electroforética

Cuando se aplica un campo eléctrico sobre una sustancia con carga eléctrica ésta migrará hacia el electrodo con el signo contrario; este movimiento depende de la carga de la sustancia (q) y de la intensidad del campo aplicado (E); a este movimiento se opone una fuerza de fricción, que es proporcional a la velocidad de la partícula (V_{ef}), el radio hidrodinámico (r) y la viscosidad del medio (η).

$$\text{Fuerza eléctrica} = Eq$$

$$\text{Fuerza de fricción} = 6\pi\eta r V_{ef}$$

Cuando las dos fuerzas se igualan, la partícula viaja a una velocidad constante.

$$Eq = 6\pi\eta r V_{ef}$$

$$V_{ef} = Eq / 6\pi\eta r$$

Si definimos la movilidad electroforética (μ_E) como:

$$\mu_E = q / 6\pi\eta r$$

$$V_{ef} = \mu_E E = \mu_E V / L \text{ dado que } E = V / L$$

Donde V es el voltaje aplicado y L la longitud total del capilar.

Cada partícula cargada en solución está rodeada por una esfera iónica que se encuentra ordenada en dos capas, una compacta e inmóvil y otra difusa. La capa compacta está formada por los contraiones que rodean la partícula en cuestión, mientras que la capa difusa está compuesta de contraiones solvatados. El potencial eléctrico que se produce entre la partícula cargada y la interfase de las dos capas está dado por el potencial zeta (ζ). La movilidad del ion está relacionada con el potencial zeta por la ecuación:

$$\mu_E = \varepsilon \zeta / 4\pi\eta$$

Donde η es la viscosidad del electrolito y ε la constante dieléctrica del medio. La ecuación anterior puede expresarse en términos de velocidad como:

$$V_{ef} = \varepsilon \zeta E / 4\pi\eta$$

El potencial zeta está directamente relacionado con la anchura de la doble capa (r_D) por medio de la ley de Debye-Huckel [20].

$$r_D = (\varepsilon k T / 8\pi e^2 I)^{1/2}$$

Donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura, e la carga del protón e I la fuerza iónica de la solución. Por lo que la anchura de la doble capa disminuirá a medida que aumenta la fuerza iónica (concentración del electrolito soporte).

Por tanto, los principales factores que determinan la movilidad de una sustancia son: la carga y tamaño de esta, y la viscosidad, la constante dieléctrica y la fuerza iónica del medio.

11.2 Flujo Electroosmótico (FEO)

Uno de los factores más importantes en la electroforesis capilar es el flujo electroosmótico (FEO). El fenómeno de la electroósmosis en capilares de sílice fundida se refiere a la propulsión del disolvente en un tubo bajo la influencia de un campo eléctrico, este se debe a que los capilares de sílice fundida, tienen paredes con grupos silanol los que

a valores de pH mayores de 3 se encuentran ionizados mediante el equilibrio ácido-base:
[16-20] (Fig. 8)

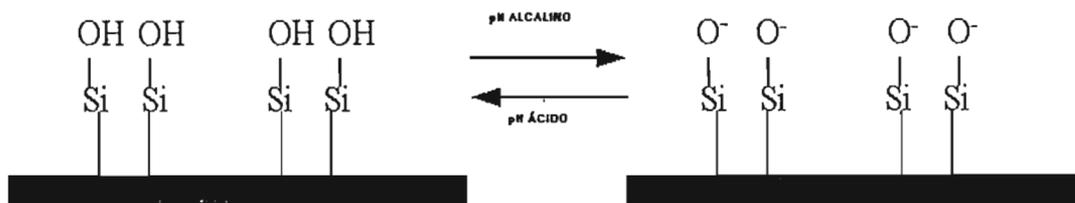


Figura 8 Equilibrio ácido base grupos silanol [19].

Cuando se agrega un electrolito en condiciones alcalinas, dentro del capilar, la carga eléctrica de la pared del capilar producirá que los cationes del electrolito se ordenen en forma de una doble capa; al aplicarse un campo eléctrico, los contraiones del grupo silanol en la capa difusa de carga positiva se dirigirán al cátodo arrastrando al grueso de la solución con ellos (Fig. 9).

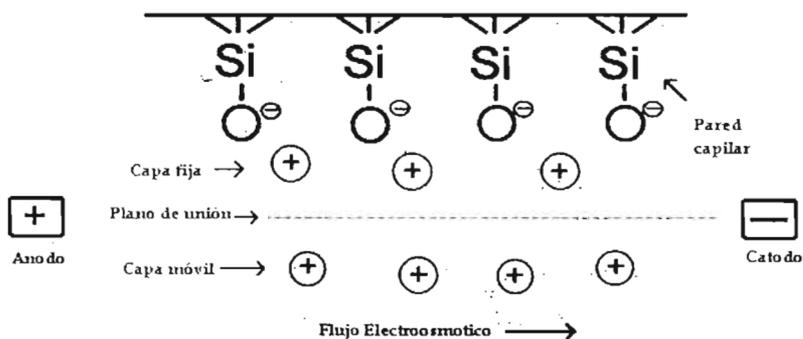


Figura 9 Representación del flujo electrosmótico [17].

El flujo electrosmótico puede ser utilizado para arrastrar partículas con carga negativa hacia el cátodo y así analizarlas simultáneamente con sustancias con carga positiva.

Las ecuaciones del flujo electrosmótico son equivalentes a las de movilidad electroforética expuestas anteriormente.

En la presencia de flujo electroosmótico la movilidad aparente es la suma de la movilidad de este, más el de la sustancia, en consecuencia la ecuación de la velocidad es equivalente [16].

$$\mu_{ap} = \mu_E + \mu_{FEO}$$

$$V = V_{ef} + V_{FEO}$$

Esta movilidad aparente se puede medir experimentalmente mediante la ecuación:

$$\mu_{ap} = lL/tV$$

Donde l es la distancia al punto de detección, L es la longitud total del capilar, V el voltaje aplicado y t el tiempo que la sustancia tarda en llegar al detector. En los métodos donde se anula el flujo electroosmótico, la movilidad aparente es igual a la movilidad electroforética de la sustancia.

La velocidad del flujo electroosmótico depende de varios factores entre los que se encuentra:

a.- La magnitud del potencial zeta, el cual está dado por la ecuación de Helmholtz-Smoluchowski:

$$\zeta = 4\pi\eta\mu_{FEO}/\epsilon$$

Por lo que, la magnitud del potencial zeta depende de la viscosidad y la constante dieléctrica del medio, pero, también depende, por la ley de Debye- Huckel de la anchura de la doble capa, la cual depende de la fuerza iónica del medio, es decir la concentración del electrolito soporte y la temperatura.

b.- Al depender de las propiedades ácido-base de los grupos silanol el flujo electroosmótico depende del pH. A valores de pH bajos donde los grupos silanol no se encuentran disociados, no hay flujo electroosmótico y comienza a aparecer conforme estos grupos se ionizan.

c.- La presencia de disolventes orgánicos como metanol y acetonitrilo disminuye el flujo electroosmótico al cambiar la constante dieléctrica y viscosidad del electrolito.

- d.- Debido a que la capa compacta de la doble capa está formada por los contraiones de los grupos silanol, la naturaleza de estos y en específico su tamaño, alterarán el grosor de esta capa, el flujo electroosmótico aumenta de manera inversa al tamaño de los contraiones.
- e.- La velocidad del flujo electroosmótico varía de manera proporcional al voltaje aplicado.

Los factores anteriores pueden ser manipulados para aumentar o disminuir el flujo electroosmótico pero éste también puede eliminarse si se requiere bajo las siguientes condiciones:

- a.- Usar pH ácidos en el electrolito soporte.
- b.- Recubrir los grupos silanol con polímeros como metilcelulosa o poliacrilamida
- c.- Derivatizar los grupos silanol de la pared del capilar.
- d.- Agregar surfactantes catiónicos [16].

11.3 Eficiencia y Resolución

Al ser la electroforesis capilar una técnica de separación, la mayoría de los conceptos utilizados en esta área pueden aplicarse a ella, como son: la resolución, platos teóricos, etc.

Uno de los factores que tienen más efecto sobre la eficiencia es el flujo electroosmótico, el cual se caracteriza por presentar una forma plana, a diferencia del flujo laminar producto de los líquidos movidos por presión (Fig. 10), consecuentemente el flujo electroosmótico tiene un efecto mínimo en la resistencia de transferencia de masa, dando como resultado una menor difusión del analito y, por tanto, un mayor número de platos teóricos, y en consecuencia una mayor eficiencia que en los sistemas cromatográficos.

De acuerdo a la ecuación de Einstein si una banda infinitesimal difunde por un tiempo (t), la varianza espacial (σ^2_L) estará dada por:

$$\sigma^2_L = 2Dt$$

Donde D es el coeficiente de difusión del soluto. La eficacia en la separación de un sistema electroforético se expresa en función del número de platos teóricos (N) por:

$$N=L^2/\sigma^2_L$$

Combinado las ecuaciones anteriores tenemos:

$$N=L^2/2Dt$$

Como $t=L^2/\mu V$

$$N = \mu V/2D$$

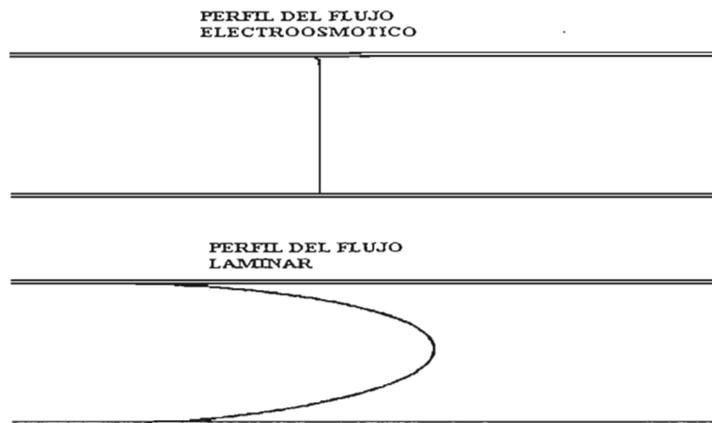


Figura 10 Perfil del flujo de fluidos bajo distintos tipos de flujo [19].

El número de platos teóricos se determina experimentalmente mediante la ecuación:

$$N=16(t/w)^2$$

Donde t es el tiempo de migración y w la anchura del pico en su base.

Otros factores que intervienen en la difusión de las sustancias son:

- a.- Volumen de inyección. Para reducir al mínimo el efecto de este parámetro en la difusión se considera que se debe de inyectar menos del 1% de la longitud del capilar.
- b.- Difusión. En electroforesis capilar la principal fuente de difusión es la longitudinal
- c.- Dispersión por electromigración. Es típica de la electroforesis capilar y ocurre cuando la movilidad electroforética de la sustancia es diferente a la del electrolito conductor. Ésta puede ser mayor (lo que produce picos “cabeceados”) o menor (dando lugar a picos “coleados”). La electrodispersión es un proceso de dispersión que ocurre por los cambios en los campos eléctricos locales en la zona de migración respecto al electrolito conductor.

Puede ser minimizado disminuyendo la diferencia en movilidades entre el analito y el electrolito conductor o disminuyendo la concentración de las zonas de migración

d.- Calor de Joule o calentamiento óhmico es el nombre dado a la generación de calor causada por las colisiones entre partículas de soluto y electrolito como resultado de las corrientes de conducción eléctricas. Este calor se produce al aplicar voltajes elevados y produce ensanchamiento de las zonas de migración debido a gradientes de temperatura y cambios locales de viscosidad. Debido a que el calor se disipa mejor en la superficie del capilar, la temperatura en el centro del capilar es mayor a la de la superficie por lo que la viscosidad del electrolito será menor y los solutos migrarán más rápido en el centro del capilar que en la superficie; como consecuencia se producirá un ensanchamiento de la banda. Por ello es importante contar con un sistema que disipe bien el calor producido.

e.- Interacciones pared-soluto. Las interacciones entre la pared del capilar y el soluto, producirán un ensanchamiento de la banda, picos coleados y baja reproducibilidad. Estas interacciones se dan principalmente entre la pared del capilar cargada negativamente y solutos cargados positivamente como las proteínas. Para evitar éste fenómeno se puede cambiar el pH del electrolito, aumentar la concentración del electrolito conductor; pero con más frecuencia lo que se hace es recubrir la pared del capilar mediante polimeros de poliacrilamida o metilcelulosa.

La resolución entre dos sustancias está en función de sus tiempos de migración (t) y la anchura de los picos obtenidos (w), desde el punto de vista cromatográfico la resolución (R_s) está dada por:

$$R_s = (t_2 - t_1) / 0.5(w_1 + w_2)$$

Tomando en cuenta los factores de dispersión anteriores y las ecuaciones de eficiencia se puede llegar a una ecuación que nos describa la resolución en términos electroforéticos [16]. Donde μ con gorro representa a la movilidad promedio de las sustancias separadas

$$R_s = \frac{(\mu_{E2} - \mu_{E1}) N^{1/2}}{4(\bar{\mu} - \mu_{FEO})}$$
$$R_s = 0.177(\mu_{E2} - \mu_{E1}) \left(\frac{V}{D(\bar{\mu} - \mu_{FEO})} \right)^{1/2}$$

12.- Estrategias para el análisis de los Residuos Orgánicos generados por disparar un arma de fuego por Electroforesis Capilar

En la electroforesis capilar, como en cualquier otra técnica analítica, es importante conocer las propiedades fisicoquímicas de las sustancias a analizar para de esta manera saber cual de los distintos modos de electroforesis capilar proporcionará los mejores resultados y predecir el resultado del análisis. En el caso de la electroforesis capilar los factores más importantes a tomar en cuenta son la carga del analito y su tamaño.

12.1 Propiedades Fisicoquímicas de los Residuos Orgánicos.

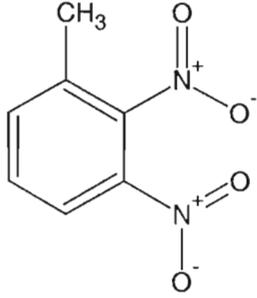
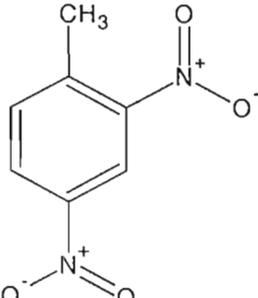
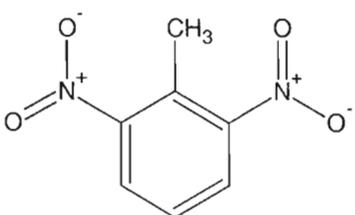
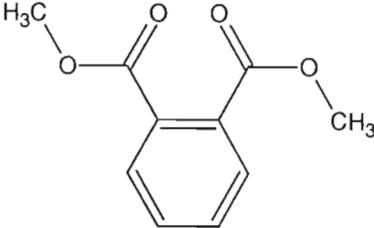
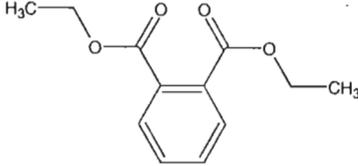
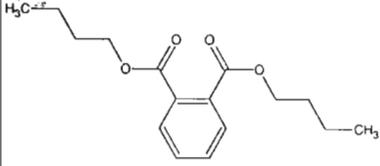
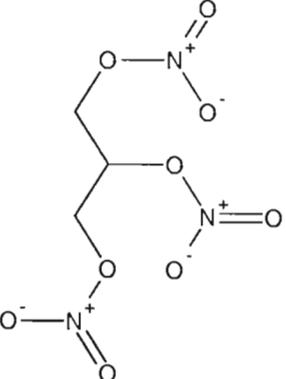
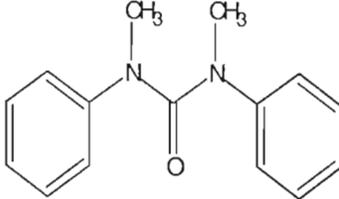
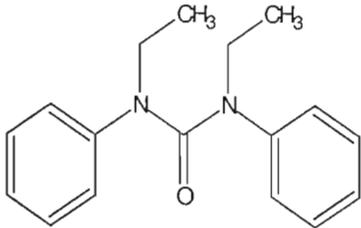
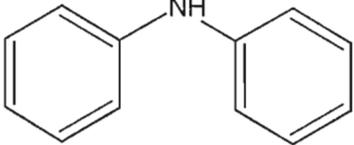
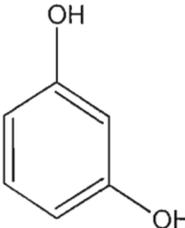
Como se puede ver en la tabla 7, la mayoría de los residuos orgánicos carecen de protones ionizables, con la excepción de la difenilamina ($pK_a = 0.78$) y el resorcinol ($pK_{a1} = 9.45$ y $pK_{a2} = 10.63$), por lo que, con la excepción del resorcinol, carecen de carga eléctrica en el intervalo de pH en el que se trabaja la electroforesis capilar.

Otras propiedades importantes para el análisis son el peso molecular (P.M.) ya que éste determina el tamaño de la molécula. La densidad (δ), la solubilidad en distintos disolventes y los puntos de fusión (P.F.) y ebullición (P.E) son importantes para la preparación de la muestra y estándares [13, 21] (Tablas 8 y 9). Además, es importante mencionar que muchas de estas sustancias se descomponen por la acción de la luz o el calor (ej. Nitroglicerina).

12.2 Estrategia utilizada para analizar los residuos orgánicos generados por disparar un arma de fuego.

Como se mencionó anteriormente se han aplicado diferentes técnicas para analizar los residuos orgánicos generados por disparar un arma de fuego sin embargo, ninguno de estos métodos ha encontrado aceptación dentro del área forense [1], no así en el ambiental donde existe el método EPA 8330 que utiliza cromatografía de líquidos [22].

Tabla 7 Estructura Química de los residuos orgánicos* por disparar un arma de fuego.

<p>2,3- Dinitrotolueno (2,3- DNT)</p> 	<p>2,4- Dinitrotolueno (2,4- DNT)</p> 	<p>2,6- Dinitrotolueno (2,6- DNT)</p> 
<p>Dimetil Ftalato (MF)</p> 	<p>Diethyl Ftalato (EF)</p> 	<p>Dibutil Ftalato (BF)</p> 
<p>Nitroglicerina (Ng)</p> 	<p>Metil Centralita (MC)</p> 	<p>Etil Centralita (EC)</p> 
<p>Difenilamina (DPA)</p> 	<p>Resorcinol (res)</p> 	

* Entre paréntesis, abreviatura utilizada para cada residuo.

Esto no ha impedido que se hayan aplicado otras técnicas para su estudio, entre ellas se cuenta la electroforesis capilar. Dado que la mayoría de los residuos orgánicos son sustancias neutras la técnica de electroforesis capilar a elegir para su análisis es la cromatografía micelar electrocinética. Se ha encontrado en todas las técnicas utilizadas que la separación está condicionada por la separación de los isómeros del dinitrotolueno puesto que tienen el mismo peso molecular (tamaño), sin embargo, las estructuras tienen formas diferentes (Tabla 7) lo que sugiere que pueden ser separados. De hecho, el análisis de estos residuos se ha llevado a cabo previamente por cromatografía micelar electrocinética en muestras de origen ambiental [22, 23] y forense [24]. Para ello, usualmente se han utilizado micelas aniónicas de dodecil sulfato de sodio (SDS) y una solución reguladora de boratos o fosfatos con pH alcalino y polaridad normal para que el flujo electroosmótico arrastre las micelas aniónicas hacia el detector. Bajo estas condiciones se logra la separación de los isómeros del dinitrotolueno; una opción para mejorar la separación es el uso de aditivos químicos (ej. Ciclodextrinas) [25].

Tabla 8 Propiedades Fisicoquímicas de los residuos orgánicos [21].

Sustancia	No. CAS	P.M.	δ (g/ml.)	P.F. (°C)	P.E. (°C)	Sensible a la luz
Nitroglicerina	35-63-0	227.09	1.599	2.8/13.5	50-60 (desc.)	X
Resorcinol	108-46-3	111	1.272	109.11	280	√
2,4- dinitrotolueno	121-14-2	182.14	1.321	71	300 (desc.)	X
2,6 - dinitrotolueno	606-20-2	182.14	1.283	66	260 (desc)	X
2,3- dinitrotolueno	602-01-2	182.14		63		X
Dimetil Ftalato		194.19	1.196	5.5	283.7	X
Dietil Ftalato	84-66-2	222.44	1.232	-40.5	295	X
Dibutil Ftalato	84-74-2	278.35	1.046	-35	340	X
Difenilamina	122-39-4	169.22	1.16	52.9	302	√
Dimetil centralita	611-92-7	240.3		122	350	X
Dietil centralita	85-98-3	268.35		79		X

Northrop [10, 26] demostró la posibilidad de analizar los residuos orgánicos dejados por disparar un arma de fuego por electroforesis capilar. Entre los hallazgos más importantes que reporta, se encuentra que la técnica posee límites de detección adecuados y la ausencia de estas sustancias en personas que no han disparado un arma; lo que permite

omitir el establecer valores mínimos para cada residuo a diferencia del análisis de los residuos metálicos. Esto sugiere que la electroforesis capilar puede ser un método de análisis más específico que el análisis elemental.

Tabla 9 Solubilidad de los residuos orgánicos en diferentes disolventes [13, 21]

SUSTANCIA	H ₂ O	R-OH	(C ₂ H ₅) ₂ O	(CH ₃) ₂ CO	C ₆ H ₆	CHCl ₃	CS ₂	CTC
Nitroglicerina	2 (1/800)	3 (1/118)	5	4	3	4	2	
Resorcinol	3 (1/0.9)	3	3		2	2		5
2,4- dinitrotolueno	1	3	3	4	3	3	3	
2,6 - dinitrotolueno	1	3				3		
2,3- dinitrotolueno	1	3	3			2		
Dimetil Ftalato	1 (1/233)	5	5		3			2
Dietil Ftalato	1	5	5	3	3			3
Dibutil Ftalato	1 (1/2500)	3	5		5			3
Difenilamina	1	4 (1/2.2)	3	4	4	2		4
Dimetil centralita	4	4	2	4	2	4	2	
Dietil centralita	1	4				3		

Nota: 1 Insoluble, 2 Ligeramente insoluble, 3.- Soluble, 4.- Muy Soluble, 5.- Miscible.

Por último, la electroforesis capilar ofrece sobre otras técnicas utilizadas para determinar los residuos generados por disparar una arma de fuego, la posibilidad de utilizarse para realizar otros análisis dentro del área forense, por lo que no es necesario adquirir un aparato para realizar un análisis en específico, como sucede con EAA-ET y MEB-DEX, lo que contribuiría a disminuir los costos de operación de los laboratorios forenses. La electroforesis capilar ha encontrado gran aplicación en diferentes ramas de las ciencias forenses como son: la genética forense, análisis de drogas e iones en muestras biológicas, análisis de explosivos, droga requisada [27, 28] por mencionar algunos. Esto aunado a otras ventajas inherentes a la electroforesis capilar como son [18]: aplicabilidad, alta eficiencia en la separación, tiempos de análisis cortos, posibilidad de analizar volúmenes muy pequeños de muestra, instrumentación y desarrollo de métodos simple, costos de operación bajos, ayudaría a incrementar la productividad del laboratorio. Además

se encuentra la posibilidad a futuro de automatización y miniaturización (Chips) lo que llevaría a tener instrumentos muy rápidos, pequeños y capaces de funcionar sin atención y directamente en la escena del crimen.

Por último se ha establecido dentro del marco legal la necesidad de realizar un análisis por dos técnicas confirmativas con fundamentos diferentes para tener la seguridad de tener un resultado sostenible dentro del marco legal (análisis ortogonales), en esta situación la electroforesis capilar al tener un mecanismo de separación diferente a las técnicas cromatográficas comúnmente utilizadas dentro de los laboratorios forenses permite su uso en análisis ortogonales complementarios.

13.- Cromatografía micelar capilar electrocinética (CMCE)

En el presente trabajo se empleará la cromatografía micelar capilar electrocinética para separar los residuos orgánicos. Por lo que a continuación se describirán los factores más importantes para el desarrollo y aplicación de la técnica.

La cromatografía micelar capilar electrocinética (CMCE) es un modo de electroforesis capilar utilizado para separar sustancias neutras en la cual se agregan surfactantes al electrolito soporte para formar dos fases: una pseudo estacionaria e hidrofóbica formada por las micelas y otra móvil e hidrofílica. La separación de las sustancias neutras se lleva a cabo por medio de la partición de la sustancia neutra entre estas dos fases de un modo similar a los procesos cromatográficos.

Los agentes surfactantes son moléculas con una parte hidrofóbica y una hidrofílica; cuando se colocan en un medio acuoso las moléculas del surfactante orientan sus partes hidrofílicas hacia el medio acuoso y esconden su parte hidrofóbica, de ésta manera forman diversas estructuras (monocapas, bicapas, etc.). Cuando el agente surfactante se adiciona al electrolito soporte en una concentración superior de su concentración micelar crítica (CMC) la parte hidrofóbica del surfactante se orienta hacia el interior formando así un núcleo hidrofóbico y sus partes hidrofílicas se orientan hacia el medio acuoso, formándose

así una micela (Fig. 11). Estas micelas pueden tener distintas formas, tamaños, carga, los cuales dependen del agente surfactante utilizado para formarlas (Tabla 10).

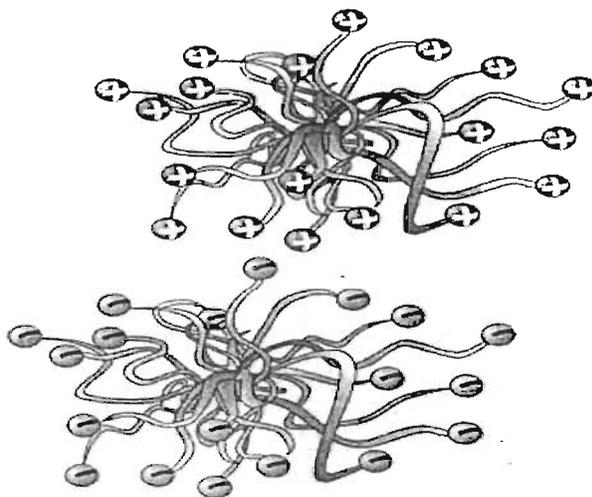


Figura 11 Micelas aniónicas y catiónicas [18].

Cuando se aplica un voltaje positivo, las micelas aniónicas y neutras no migrarán hacia el detector del equipo, y no podrían ser analizadas, por ello es necesario utilizar un pH alcalino con el fin de que el flujo electroosmótico las arrastre hacia el detector (Fig. 12).

En la cromatografía micelar capilar electrocinética todos los analitos migran en un tiempo (t) que está entre aquellos que al ser muy polares no interactúan con la micela y que equivalen a un marcador de tiempo cero (t_0) (ej. Etanol) y aquellos que al ser muy afines a la micela (ej. Sudan III), migran al mismo tiempo que las micelas (t_m); el tiempo entre ambos extremos es conocido como la ventana analítica y es uno de los parámetros más importantes en CMCE.

Al tener la CMCE un mecanismo de separación semejante a la cromatografía, la teoría de ambas es muy parecida, agregándose únicamente un valor correspondiente al tiempo de migración de las micelas (t_m).

Para partículas neutras el factor de capacidad k' está dado por:

$$k' = t - t_0 / t_0 (1 - t/t_m)$$

y la resolución (Rs) por:

$$R_s = (N^{1/2}/4)(\alpha - 1/\alpha)(k'/1 + k') \{1 - (t_0/t_m)/1 + (t_0/t_m)k'\}$$

Donde N representa el número de platos teóricos como medida de la eficiencia de la separación y α la retención relativa.

Tabla 10 Características más importantes de algunos surfactantes.

SURFACTANTE	CMC (mM)	NÚMERO DE AGREGACIÓN
Aniónico		
Dodecil sulfato de litio	8.77	
Dodecil sulfato de sodio	8.10	62
Tetradecil sulfato de sodio	2.20	138
Dodecanato de sodio	24.00	56
Colato de sodio	14.00	3
Deoxicolato de sodio	5.00	4-10
Taurodeoxicolato de sodio	3.00	8
Cationico		
Cloruro de cetiltrimetil amonio (CTAC)	1.3	
Bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB)	0.92	23
Cloruro de dodecil amonio	15.00	55
Zwitter iónicos		
N-dodecil-N,N-dimetilamonio -3- propano sulfonato (sulfobetaina SB 12)	3.3	55
3-(3-colamidopropil) dimetilamonio -3- propano sulfonato (CHAPS)	4.2-6.3	9-10
No ionico		
Octil glucosido	25.00	27
Digitonina	0.67-0.73	60
n- dodecil glucosido	0.19	
n- dodecil maltosido	0.19	98
Dodecil polietilenglicol eter (BRIJ 35)	0.09	40
Polioxietileno 20 sorbitano monooleato (TWEEN 20)	0.01	
Polioxietileno 20 sorbitano monolaurato (TWEEN 20)	0.01	
Triton X-100	0.24	

Para poder ser utilizados en la electroforesis capilar los surfactantes deben de reunir ciertas características:

- a.- Ser solubles en el buffer.
- b.- Producir soluciones con baja viscosidad.
- c.- Ser invisibles al detector utilizado.

Los surfactantes no deben utilizarse a concentraciones elevadas debido al aumento en viscosidad y corriente producido, además la concentración del buffer debe ser al menos 10 mM mayor para asegurar el pH del electrolito.

En CMCE un factor importante es la concentración de surfactante ya que este determina la relación de fases: a medida que se aumenta la concentración de surfactante aumenta la ventana analítica y el factor de capacidad de los analitos lo que mejora las separaciones, en detrimento esto aumenta el tiempo de análisis.

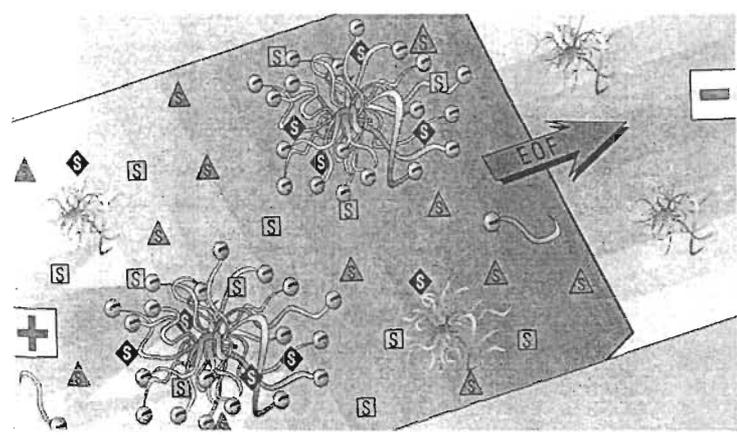


Figura 12 Representación del proceso de separación por cromatografía micelar electrocinética [18].

Otro factor que puede aumentar la ventana analítica es la disminución del flujo electroosmótico.

Para mejorar las separaciones se pueden agregar disolventes orgánicos y urea, los cuales además de ayudar a disolver analitos no polares, cambian el flujo electroosmótico, y la naturaleza de la fase acuosa cambiando por lo tanto el fenómeno de partición [16, 18].

14.- Estrategias para el análisis de los Residuos Inorgánicos generados por disparar un arma de fuego por Electroforesis Capilar

Como los iones metálicos poseen carga eléctrica, pueden ser analizados por electroforesis capilar de zona, por tanto las propiedades más importantes a considerar, para realizar su separación son la carga y el tamaño del ión metálico. (Tabla 11) [3].

Tabla 11 Propiedades Físicoquímicas de los elementos presentes con mayor frecuencia en los residuos generados por disparar un arma de fuego.

Elemento y grado de oxidación	Símbolo Químico	Número atómico	Masa atómica	P.F. (°C)	P.E. (°C)	Radio Iónico (Å)
Aluminio III	Al	13	26.98	660	2519	0.5
Antimonio III	Sb	51	121.75	631	1587	2.45
Bario II	Ba	56	137.34	727	1897	1.35
Calcio II	Ca	20	40.08	842	1484	0.99
Cobre II	Cu	29	63.54	1085	2562	0.69
Hierro III	Fe	26	55.85	1538	2861	0.64
Plomo II	Pb	82	207.19	328	1749	1.2
Magnesio II	Mg	12	24.31	650	1090	0.65
Níquel II	Ni	28	58.71	1453	2730	0.72
Zinc II	Zn	30	65.37	420	907	0.74
Estaño II	Sn	50	118.69	232	2602	1.12
Mercurio II	Hg	80	200.59	-39	357	1.10

15.- Electroforesis capilar de zona (ECZ)

Dado que los residuos metálicos van a ser analizados por electroforesis capilar de zona es necesario describir cuales son los parámetros experimentales determinantes para el desarrollo del método.

La electroforesis capilar de zona (ECZ) es el modo de uso clásico de la electroforesis capilar y los conceptos antes descritos se desarrollaron a partir de ella. En este modo de uso se separan las sustancias sobre la base de las diferencias en sus movilidades bajo un campo eléctrico.

En la electroforesis capilar de zona la composición del electrolito permanece constante a lo largo del capilar; el electrolito provee un medio conductor de la electricidad y un medio tamponado. Cuando se introduce la muestra al capilar, las sustancias con carga eléctrica migran en zonas discretas bajo un campo eléctrico hacia el electrodo con carga opuesta a diferentes velocidades las cuales dependen de su movilidad, esto permite su separación; sustancias neutras no son afectadas por el campo eléctrico y por ello no es posible separarlas con esta técnica.

De acuerdo a las ecuaciones anteriormente descritas, los principales factores que pueden manipularse para mejorar una separación son: el pH, viscosidad y concentración del electrolito soporte, además de la presencia de aditivos; estos parámetros tienen un efecto directo ya sea sobre la movilidad del analito o sobre el flujo electroosmótico.

El primer paso en el desarrollo de métodos con ECZ consiste en asegurar una fuerza iónica adecuada, para evitar la absorción del analito en las paredes del capilar, a medida que se aumenta la fuerza iónica, la eficiencia de los picos obtenidos aumenta, debido a que disminuye esta absorción, hasta llegar a un punto óptimo, a partir del cual la eficiencia disminuirá producto de la dispersión producida por el calor de Joule.

El pH al cual se lleva a cabo la separación es muy importante dado que determina, las interacciones analito - pared del capilar, la velocidad del flujo electroosmótico y, sobretodo, la carga de los analitos. En efecto, la separación de especies ionizables como ácidos y bases débiles es dependiente del pH, pues éste determina el grado de ionización de cada soluto y, por tanto, la movilidad de cada analito. En consecuencia, sustancias con diferencias mínimas en su pK_a pueden ser separadas.

Otro factor importante a optimizar es el tipo y concentración de solución reguladora; el tipo de solución reguladora tiene un efecto directo sobre el flujo electroosmótico. La concentración de buffer, por otra parte modifica la movilidad de flujo electroosmótico y regula las interacciones de los analitos con la superficie del capilar, lo que produce cambios en la eficiencia del sistema y en consecuencia en la resolución. Además de que también modifica la corriente generada y ésta, a su vez, influye en la cantidad de calor producido.

Para lograr la separación de dos sustancias se pueden usar modificadores químicos, que pueden ser orgánicos, inorgánicos. Estos modificadores interactúan con diversos componentes del sistema electroforético (capilar, muestra, etc.), y de esta manera cambian la selectividad de la separación. De entre estos modificadores, destacan los quirales (ej. Ciclodextrinas), debido a su capacidad de separar sustancias con centros quirales. Otros modificadores se utilizan para disolver sustancias no polares, mientras que otros sirven como electrolito de fondo en la detección indirecta.

La longitud (L) y el diámetro interno (D.I.) del capilar afectan la separación debido a que una mayor longitud determina más platos teóricos, lo que mejora la separación; a menor diámetro interno el sistema puede disipar mejor el calor de Joule producido lo que mejora la eficiencia y la resolución obtenida.

Por último, la temperatura y el voltaje tienen un efecto sobre la separación que depende en el primer caso, por su efecto sobre la viscosidad, y en el segundo caso, directamente en la ecuación de la resolución [20].

15.1.-Electroforesis Capilar de Zona de Iones metálicos.

Aunque en un principio la electroforesis capilar se utilizó para el análisis de macromoléculas, sus ventajas llevaron a su aplicación a moléculas pequeñas. Sin embargo, su aplicación al análisis de iones metálicos estaba limitada por la poca diferencia en las movilidades de iones metálicos con la misma carga y porque los cationes no absorben luz en la región del ultravioleta del espectro electromagnético. Estos problemas se superaron mediante la introducción de un agente complejante, lo que permite manipular la selectividad y facilitar la detección. Por ello, las separaciones de iones metálicos por electroforesis capilar se dividen de acuerdo a la estabilidad termodinámica de los complejos formados; los complejantes utilizados se dividen en complejantes débiles y fuertes [29-30].

Se utiliza un complejante débil ($K_{MY} < 5$) como tartrato, ftalato, lactato, etc., para manipular la selectividad de la separación; para ello es necesario que existan equilibrios

rápidos. En esta técnica, el complejante se agrega al electrolito soporte. Es decir, la reacción de complejación se lleva a cabo en el capilar. En estas separaciones el ión metálico se encuentra con carga positiva y es separado en condiciones coelectrosmóticas; el orden de elusión va del analito con mayor carga positiva al que tiene menor. La selectividad de la separación está dada porque cuando hay varias formas del metal y existen equilibrios rápidos entre ellos, la movilidad del analito está definida como el promedio en peso de las movilidades de cada una de las formas; bajo estas condiciones la selectividad puede ser manipulada al cambiar la concentración de complejante y el pH del electrolito de corrida dado que esto provoca cambios en los equilibrios de complejación y por lo tanto en la carga global del analito [30]. Sin embargo, debido a que la mayor parte del ión metálico se encuentra sin complejar, la detección por espectroscopia ultravioleta sería imposible, por lo que se utiliza detección UV indirecta, mediante un electrolito soporte que absorba en el UV (Tabla 12) [30]. Esto último ha limitado su aplicación debido a la pobre sensibilidad inherente a los métodos de detección indirecta, junto a la dependencia de la matriz y del catión en el electrolito soporte, pues el catión debe tener una movilidad semejante a la del analito para lograr las condiciones de sensibilidad adecuadas [29].

Los complejantes fuertes ($K_{MY} > 10$) usualmente forman complejos con carga negativa (aunque existen neutros y catiónicos) por lo que usualmente se analizan en forma contraelectrosmótica. En este caso la complejación se lleva a cabo antes de introducir la muestra al capilar, es decir, complejación precapilar, aunque en función de la fuerza del complejante es necesario agregar una pequeña cantidad de complejante al electrolito soporte para evitar la disociación del complejo en el capilar [29-30].

El reactivo utilizado para la complejación precapilar debe reunir las siguientes características:

- 1.- Pureza elevada
- 2.- Debe formar complejos estables con relación 1:1 con la mayoría de los metales
- 3.- Los complejos formados deben ser estables el tiempo que dure la corrida
- 4.- La longitud de onda de absorción del complejo y el complejante debe ser diferente, además de poseer elevados valores de absorptividad molar para obtener así los mejores límites de detección [29].

Al estar todo el ión metálico complejado, no es necesario utilizar detección indirecta, lo que mejora los límites de detección de esta técnica. Sin embargo, esto puede complicar la manipulación de la selectividad de la separación, esto puede llevarse a cabo por disociación de grupos funcionales del ligando, intercambio de moléculas de agua en el complejo, asociación o intercambio de iones en el electrolito de corrida. Otra manera de manipular la selectividad es por medio de aditivos como surfactantes, por medio de interacciones par iónico o de partición. Entre los surfactantes, el más utilizado es el SDS y sales de amonio de cadena larga, aunque estos solamente producen cambios en la selectividad cuando el agente complejante es hidrofóbico; cuando es altamente cargado no produce cambios en la selectividad, de lo que se deduce que actúa por un mecanismo de partición y, cuando los complejos y las micelas tienen carga opuesta, por formación de pares iónicos. Otras estrategias utilizadas para manipular la selectividad es agregando disolventes orgánicos al electrolito soporte lo que tiene efecto sobre el flujo electroosmótico, la adsorción de los metales en el capilar y solubilización de complejos hidrófobos (Tabla 12) [30].

Tabla 12 Características de las separaciones de iones metálicos por electroforesis capilar [30].

	COMPLEJANTE DEBIL	COMPLEJANTE FUERTE
Ejemplo de Ligandos	ác. cítrico, láctico, fitatos etc.	Cianuro, ácidos aminocarboxílicos, Colorantes azo, quinolina, ditiocarbamatos etc.
Grado de Complejación	Parcial	Total
Método de formación del Complejo	En el capilar	Antes del capilar, usualmente se usa con complejación en el capilar
Detección	Indirecta	Directa
Manejo de la selectividad	Complejación con el ligando	-Influencia del metal en el pKa del ligando -Formación de complejos mixtos, metal-hidroxo-ligando -Asociación de iones -Intercambio iónico
Voltaje de la Separación	+	+,-
Cinética de la complejación	Rápida	Rápida, lenta

Los factores que tienen un efecto más importante en la movilidad electroforética de los complejos metálicos son: la carga del complejo (determinado por el pH), el tamaño del complejo, constante de estabilidad del complejo (los complejos más estables son más lentos), concentración y pH del electrolito soporte [29].

Una de las preocupaciones más importantes en el análisis de iones metálicos en particular y en la electroforesis capilar en general, son los altos límites de detección inherente al uso de capilares. Para superar este problema se han implementado varias estrategias (Tabla 13), entre las que se encuentra el uso de agentes complejantes con alta absorptividad molar, elegir la longitud de onda de lectura óptima, usar métodos de detección más sensibles que el ultravioleta, celdas con mayor paso óptico y aplicación de técnicas de preconcentración en el capilar como el apilamiento y la amplificación de campo y técnicas de preconcentración fuera del capilar como la extracción en fase sólida, etc [29-34].

Tabla 13 Sensibilidad obtenida por distintos métodos de detección y por técnicas para aumentar la sensibilidad para el análisis de metales por electroforesis capilar (31-32).

MÉTODO	SENSIBILIDAD (M)	AUMENTO RESPECTO A DETECCIÓN CON UV
Fluorescencia directa	10^{-6} - 10^{-7}	10
Fluorescencia Indirecta	10^{-5} - 10^{-7}	
Quimioluminiscencia	10^{-6} - 10^{-12}	10 - 10^6
Espectroscopia de emisión atómica	10^{-6} - 10^{-8}	10-100
Conductividad	10^{-6} - 10^{-7}	5-10
Amperometría	10^{-7} - 10^{-8}	10-100
Potenciometría	10^{-5} - 10^{-6}	0
PAI-EM	10^{-6} - 10^{-10}	10 - 10^4
Espectrometría de Masas-Electrospray	10^{-5} - 10^{-6}	0
Apilamiento		30-100
Amplificación de campo		50-1000
Isotacoforesis transitoria		10-500
Extracción en fase sólida		100-1000
Membranas		50-500
Derivación química	10^{-6} - 10^{-7}	10
Ultravioleta	10^{-5} - 10^{-6}	0

Dentro de las técnicas de preconcentración tienen especial importancia los métodos de concentración en el capilar ya que son característicos de la electroforesis capilar; el más simple de ellos, el “apilamiento”, ocurre cuando la zona donde se encuentra la muestra se coloca entre dos zonas de buffer y tiene una fuerza iónica menor a la del buffer de corrida, cuando se aplica el voltaje la fuerza del campo eléctrico en la zona de la muestra es mayor que en el resto del capilar esto provoca que los iones de la muestra se muevan más rápido hasta alcanzar la frontera entre las dos zonas donde se concentran (Fig. 13).

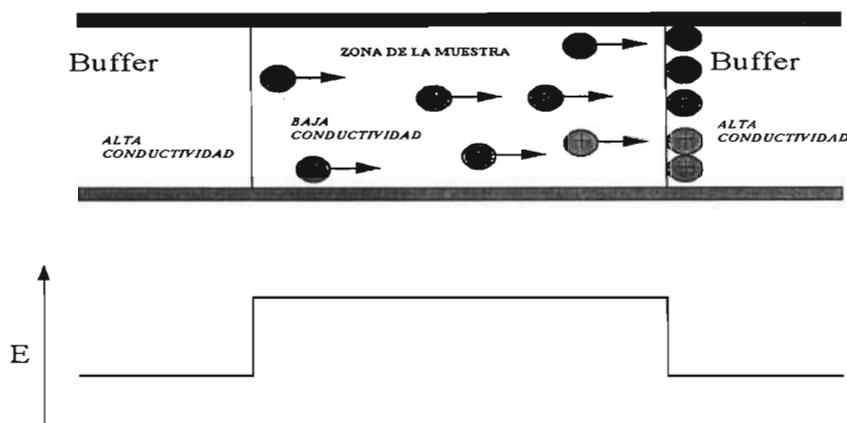


Figura 13 Esquema del proceso de apilamiento [19].

Otra técnica de concentración que puede utilizarse para el estudio de iones metálicos es la isotacoforesis transitoria, en esta técnica la zona de la muestra se inyecta entre dos zonas, una con un electrolito líder de alta movilidad y otra con un electrolito terminal de baja movilidad, al aplicarse el voltaje, los iones en la muestra se separan de acuerdo a su movilidad y se mueven como zonas sin diluirse con el electrolito de corrida, por lo que, en un principio se concentran y, posteriormente al diluirse los electrolitos líder y terminal en el electrolito soporte empieza la electroforesis de zona, con los iones ya concentrados.

La técnica de preconcentración que proporciona los mejores factores de enriquecimiento es la amplificación de campo (Tabla 13); en ella el capilar se llena por presión con la muestra en una solución con baja fuerza iónica, al aplicarse un voltaje negativo, los aniones se dirigen a la frontera entre la zona de la muestra y el electrolito soporte, donde se concentran; mientras que la matriz y los cationes son expulsados del capilar, por acción del flujo electroosmótico producido, procediéndose así hasta eliminar la

matriz, entonces se cambia la polaridad del voltaje para comenzar la separación (Fig. 14). Para cationes es necesario el uso de capilares modificados para cambiar la dirección del flujo electroosmótico. Debido a que se puede llenar el capilar entero con esta técnica se pueden lograr factores de enriquecimiento hasta de 1000 (32-34).

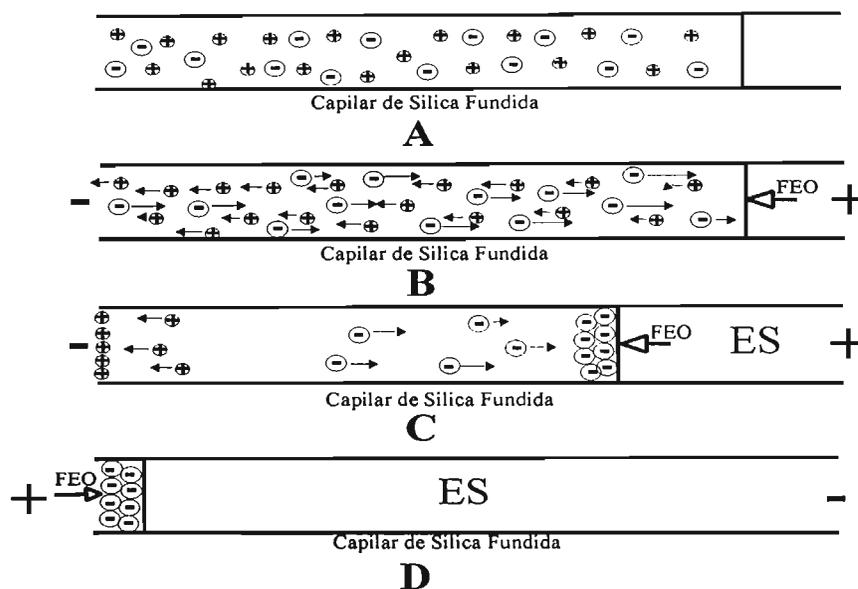


Figura 14 Representación esquemática del proceso de la técnica de preconcentración por amplificación de campo. A.- inyección hidrodinámica B, C.- Bombo de agua D.- separación bajo polaridad normal. ES Electrolito Soporte.

15.2 Estrategia utilizada para analizar los residuos metálicos generados por disparar un arma de fuego.

Los residuos metálicos pueden ser analizados por electroforesis capilar de zona utilizando un agente complejante para manipular la selectividad de la separación y facilitar la detección [29].

De entre los dos tipos de complejación existente (en capilar y fuera del capilar) se eligió la complejación fuera del capilar debido a que los residuos buscados se depositan en las zonas de maculación en cantidades de micro a nanogramos por lo que es necesario contar con los mejores límites de detección posibles; además, dado que la complejación en

el capilar proporciona límites de detección menores que fuera de la columna, su uso fue desechado.

Los reactivos utilizados para realizar la complejación fuera de la columna deben tener ciertas características como la de formar complejos estables con estequiometría 1:1 con todos los metales bajo estudio, ser lo suficientemente estables como para no disociarse durante el análisis (cinética de disociación lenta) y formar complejos solubles en agua [30].

De entre los factores anteriores se consideró como más importante la capacidad de formar complejos estables con todos los metales bajo estudio ya que estos metales provienen de distintos bloques de la tabla periódica (metales alcalino-terreos, de transición, de no transición y el antimonio como no metal), lo que implica distintas propiedades químicas, y dificulta encontrar un complejante para todos. Una familia de agentes complejantes que forma complejos estables con todos los metales presentes en los residuos metálicos generados por disparar un arma de fuego son los ácidos aminopolicarboxílicos (Tabla 14); este grupo de reactivos cumplen con los requisitos antes descritos, con el único inconveniente de tener coeficientes de absorción molar ($10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) menores en comparación con otros reactivos. Entre los reactivos más utilizados se encuentran el EDTA, CDTA, DTPA, NTA y TTHA [29, 35]. Estos complejantes reaccionan con los iones metálicos formando complejos 1:1 con carga usualmente negativa, estos pueden ser analizados de diferentes maneras; con polaridad normal o reversa y tanto de manera coelectroosmótica, como contraelectroosmótica.

Dado que el análisis de los residuos orgánicos se realiza usando cromatografía micelar electrocinética usando SDS a un pH alcalino y polaridad normal, si se quiere hacer el análisis conjunto de residuos orgánicos y metálicos es necesario utilizar electroforesis de zona contraelectroosmótica para el análisis de los residuos metálicos. Esto limita el uso de algunos de los reactivos anteriores como el DTPA y el TTHA pues forman complejos con carga negativa muy elevada con los iones metálicos bajo estudio, los que serían atraídos fuertemente hacia el ánodo, lo que en las condiciones anteriores se traduciría en tiempos de análisis elevados. El uso de NTA se desechó dado que formaría quelatos sin carga con los

metales con carga +3 (hierro, antimonio y aluminio) y por ello no podrían ser resueltos por electroforesis capilar de zona.

Tabla 14 Características de algunos ácidos aminopolicarboxílicos utilizados como agentes complejantes [35].

Reactivo	Abreviatura	No. de grupos carboxilo (n _{COOH})	No. de grupos metileno (n _{CH2})	No. de nitrógenos terciarios (n _N)
Ác. Etilen diamino tetracético	EDTA	4	6	2
Ác. Ciclohexano diamino tetracético	CDTA	4	10	2
Ác. Dietilen triamino pentaacético	DTPA	5	9	3
Ác. Trietilen tetramino hexaacético	TTHA	6	12	4
Ác. Nitrilo triacético	NTA	3	3	1

De lo anterior, se deduce que los ácidos aminopolicarboxílicos que pueden utilizarse para hacer la complejación son el EDTA y el CDTA [35]. Los factores que determinan la movilidad electroforética de estos complejos son [36]:

- a.- La carga del quelato.
- b.- El tamaño del quelato.
- c.- La constante de formación del complejo.

Como el factor más importante es la carga del quelato es necesario elaborar los diagramas de distribución de especies de los metales bajo estudio con CDTA y EDTA (Figuras 15-16) para conocer la carga del quelato en diferentes condiciones de pH, tipo de quelato, etc., y encontrar las condiciones óptimas para separar los residuos metálicos. Para ello se utilizaron las constantes de complejación y acidez reportadas por Sucha y Kotrly (Tabla 15) [37], éstos diagramas de especie se elaboraron para una concentración de metal 5×10^{-5} M en solución acuosa en cada caso y una concentración de ligante de 5×10^{-3} M por lo que se puede asumir que el sistema se encuentra amortiguado por las especies CDTA y EDTA.

Tabla 15 Constantes de complejación de los metales bajo estudio con ácidos aminopolicarboxílicos (fuerza iónica 0 a 0.1).

ELEMENTO	EDTA				CDTA		
	MY	MHY/ MY.H	MOHY/ MY.OH	M(OH) ₂ Y/ MOHY.OH	MY	MHY/ MY.H	MOHY/ MY.OH
Hidrógeno	K _{H1} 11.014, K _{H2} 6.32, K _{H3} 2.66, K _{H4} 2, K _{H5} 1.5				K _{H1} 12.4, K _{H2} 6.15, K _{H3} 3.53, K _{H4} 2.42		
Aluminio III	16.3	2.5	8.06	3.98	19.5	2.00	6.37
Antimonio III	31.54	1.02	8.24	7.46	29.5		
Bario II	7.78	4.57			8.69	6.86	
Calcio II	11.00	3.18			13.20		
Cobre II	18.80	3.0	2.5		22.00	3.1	
Hierro III	25.00	1.3	6.46	4.54	30.00		4.25
Plomo II	18.04	2.8			20.38	2.8	
Magnesio II	9.12	3.85			11.02		
Niquel II	18.62	3.2	1.8		20.03	2.74	
Zinc II	16.5	3.0	2.1		19.37	2.9	

Éstas condiciones pueden no coincidir con las condiciones experimentales que se puedan utilizar, puesto que se usaron solamente para establecer las condiciones iniciales de pH, y concentración de CDTA y EDTA.

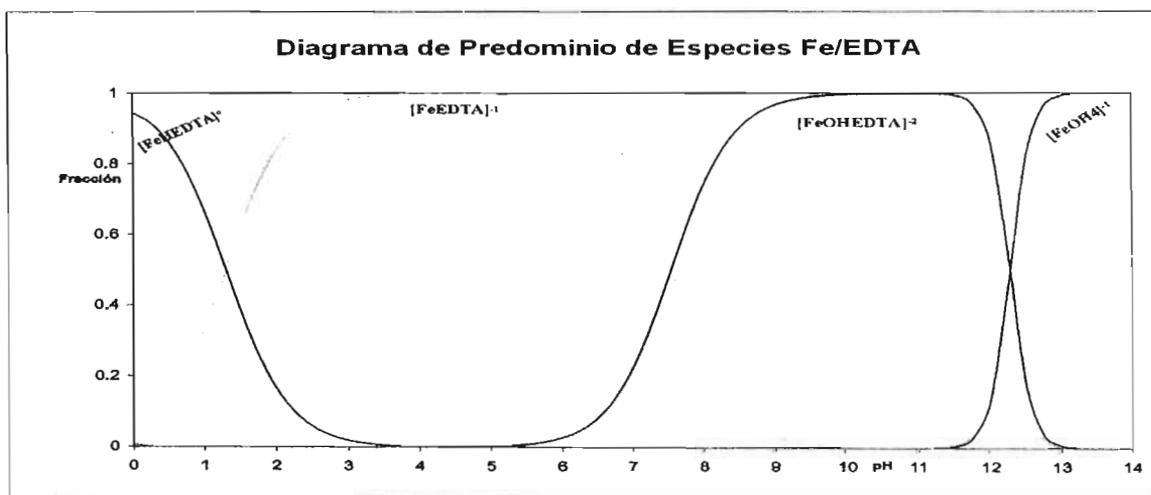


Figura 15 Diagramas de distribución de especies de EDTA con los metales bajo estudio (continua).

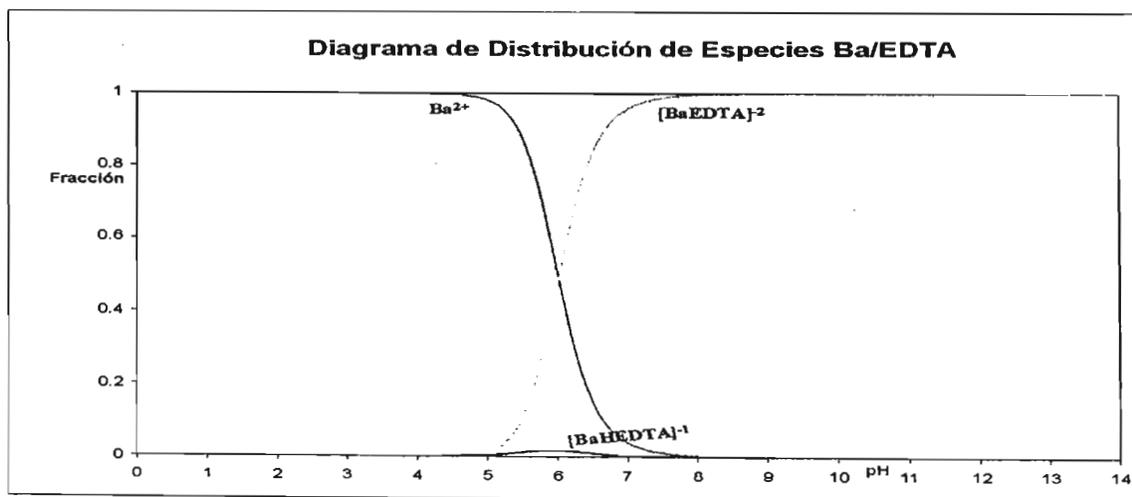
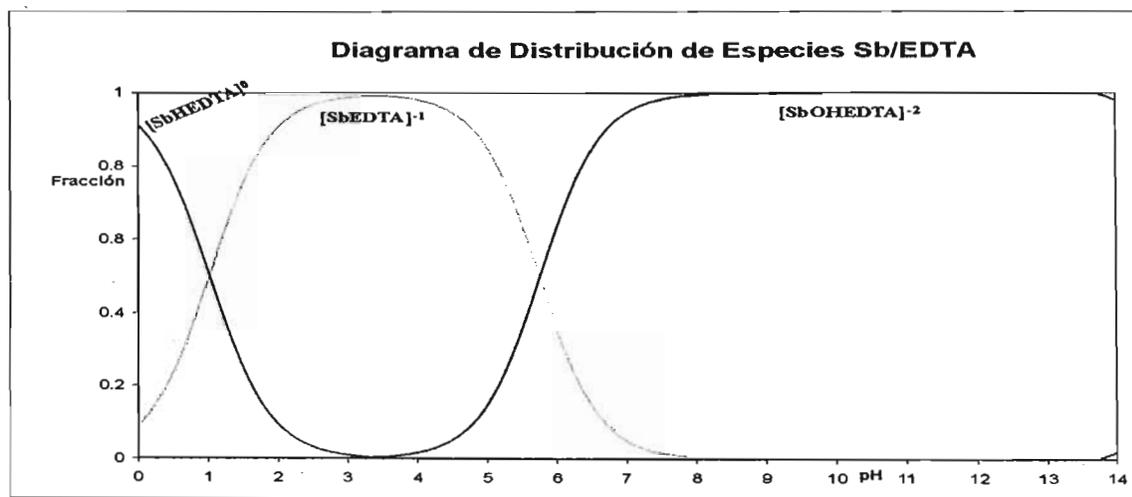
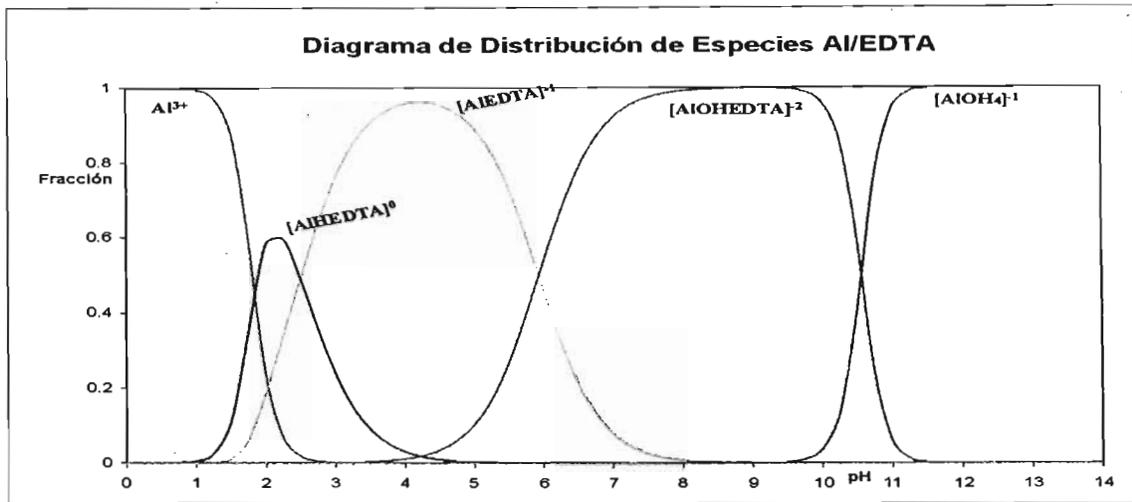


Figura 15 Diagramas de distribución de especies de EDTA con los metales bajo estudio (continua).

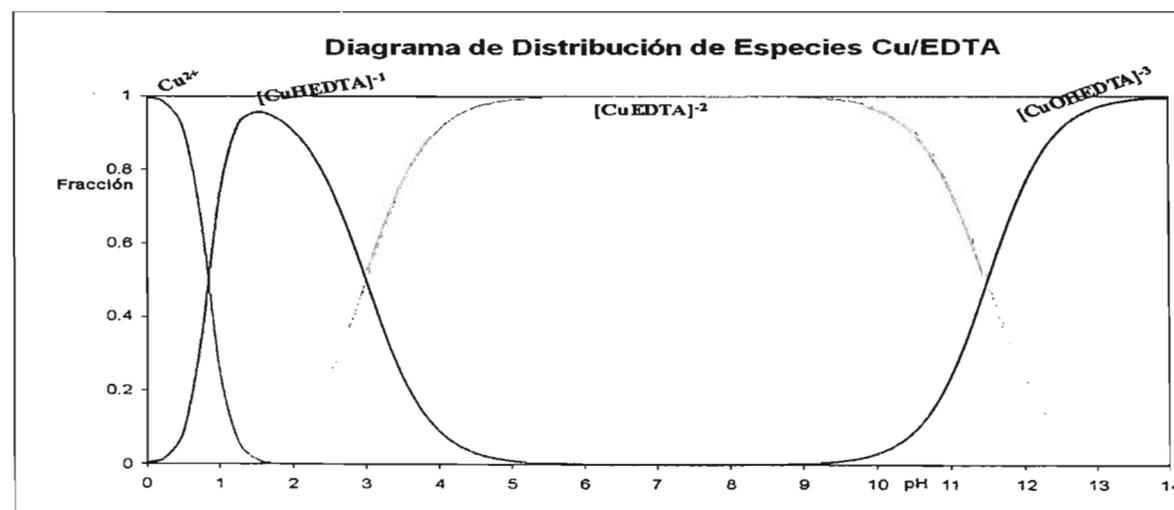
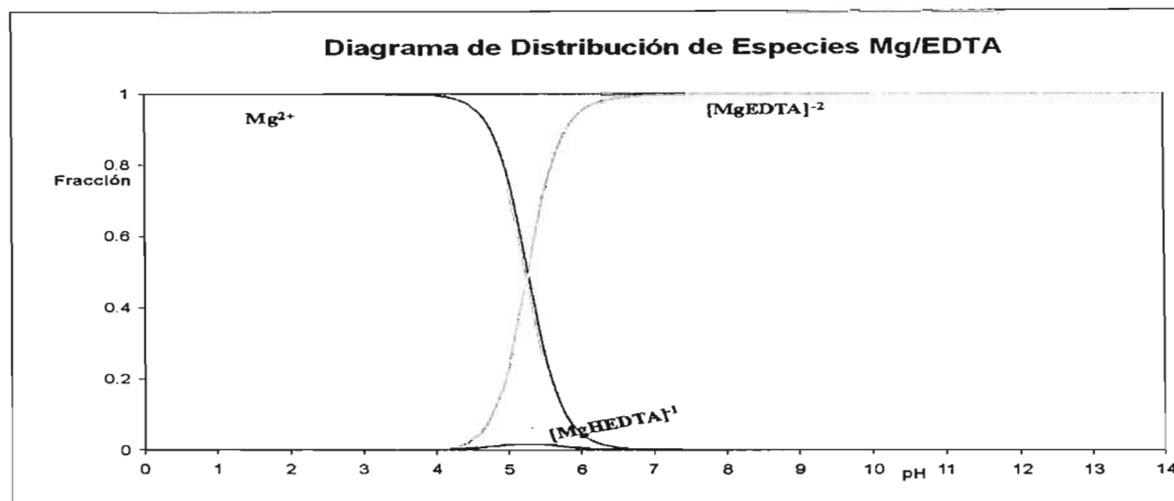
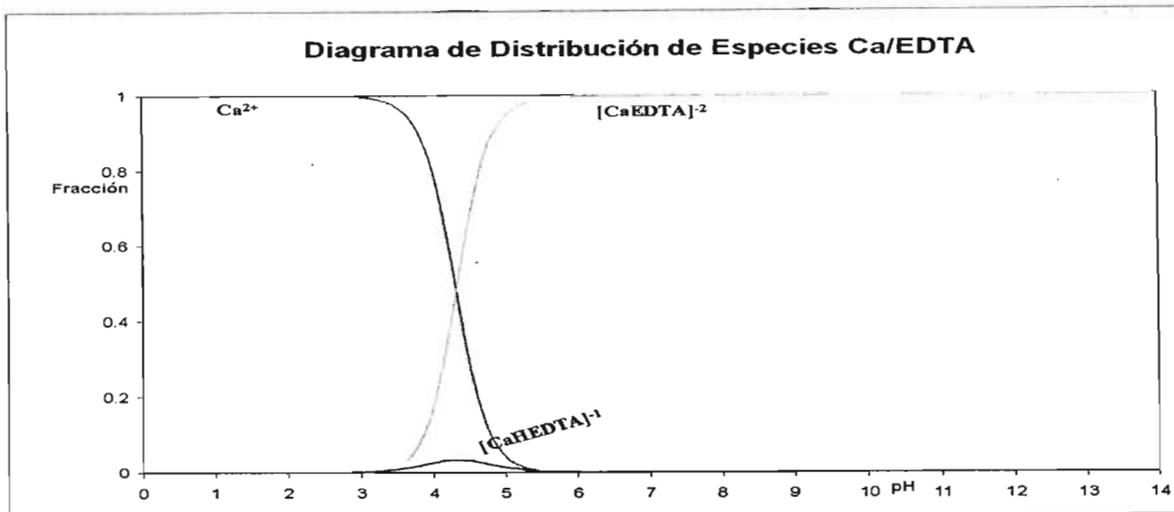


Figura 15 Diagramas de distribución de especies de EDTA con los metales bajo estudio (continua).

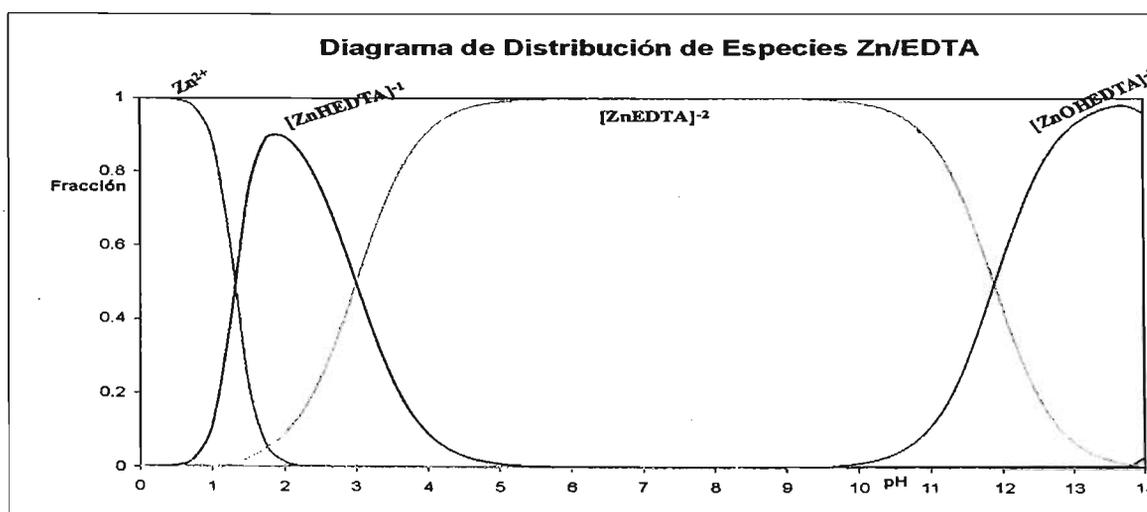
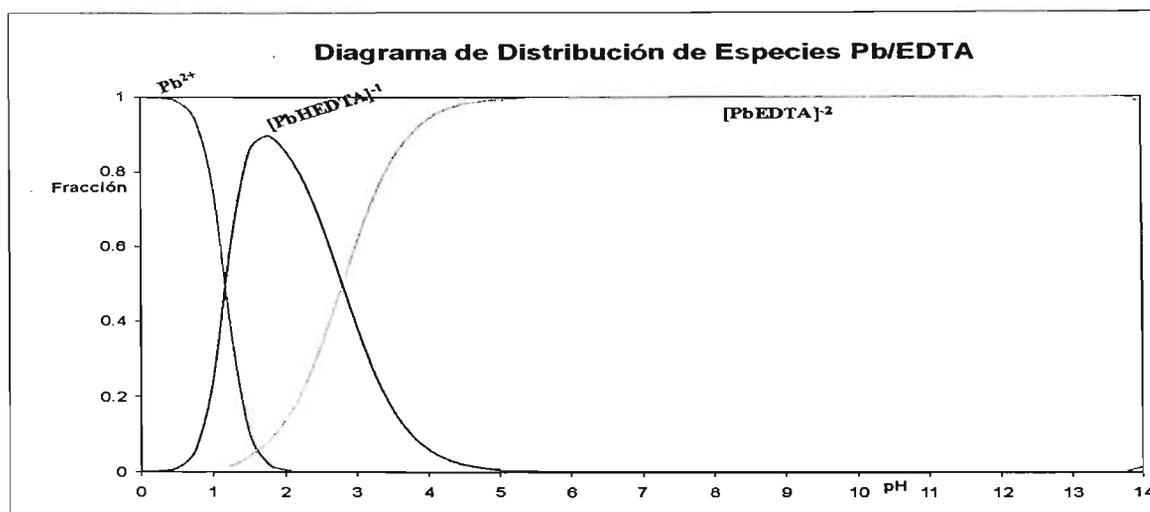
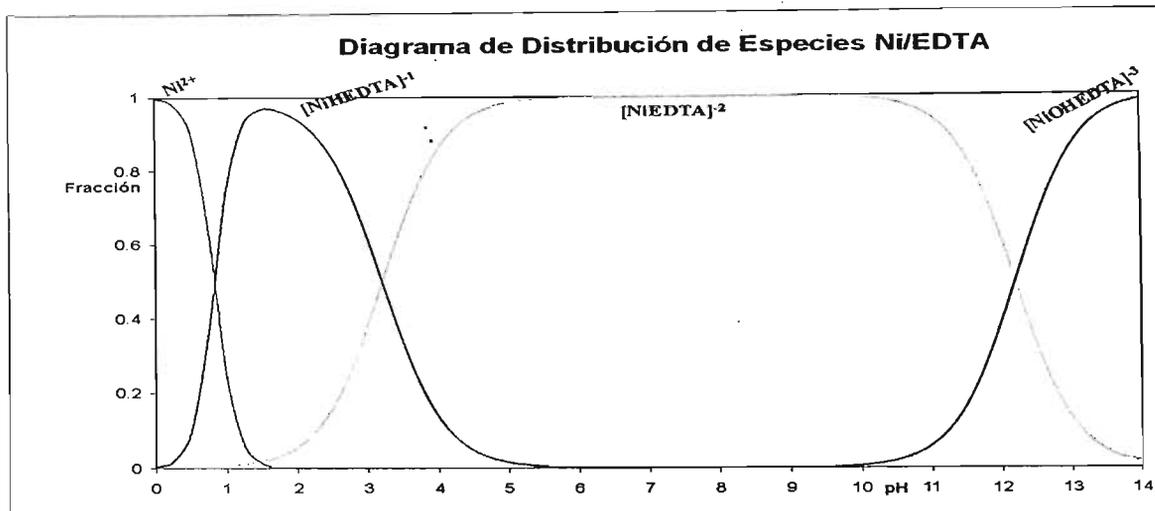


Figura 15 Diagramas de distribución de especies de EDTA con los metales bajo estudio.

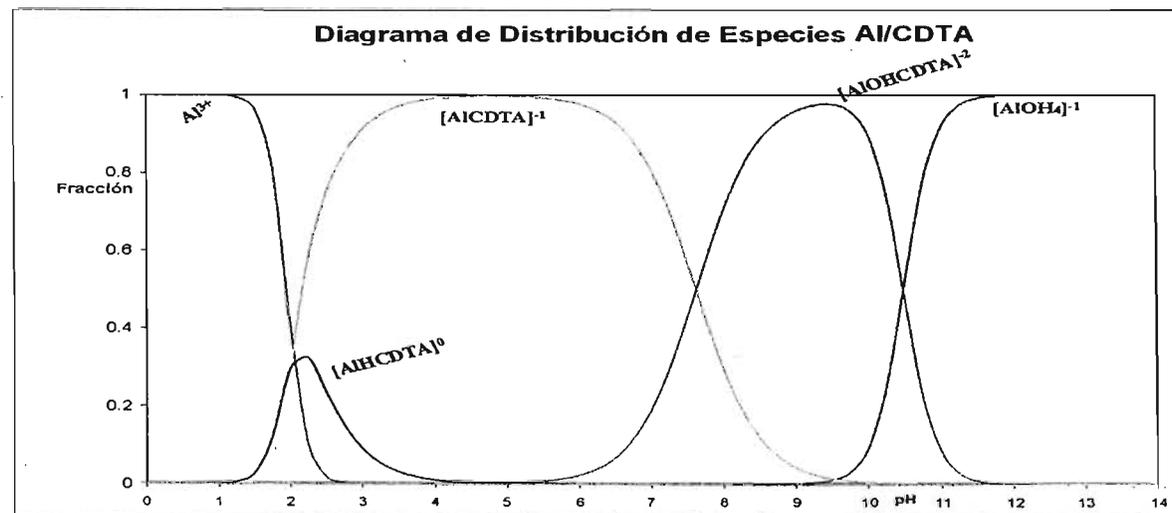
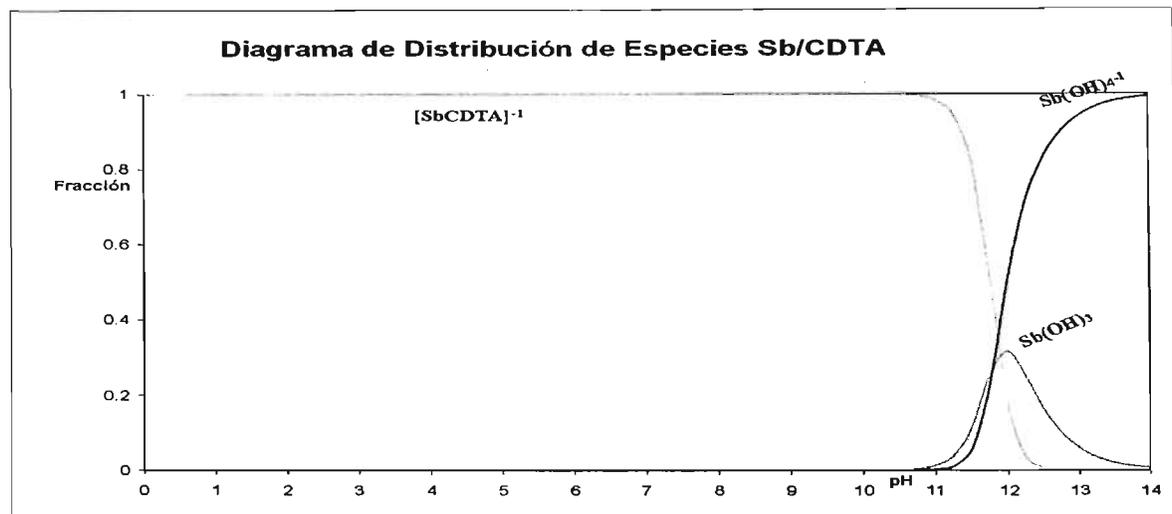
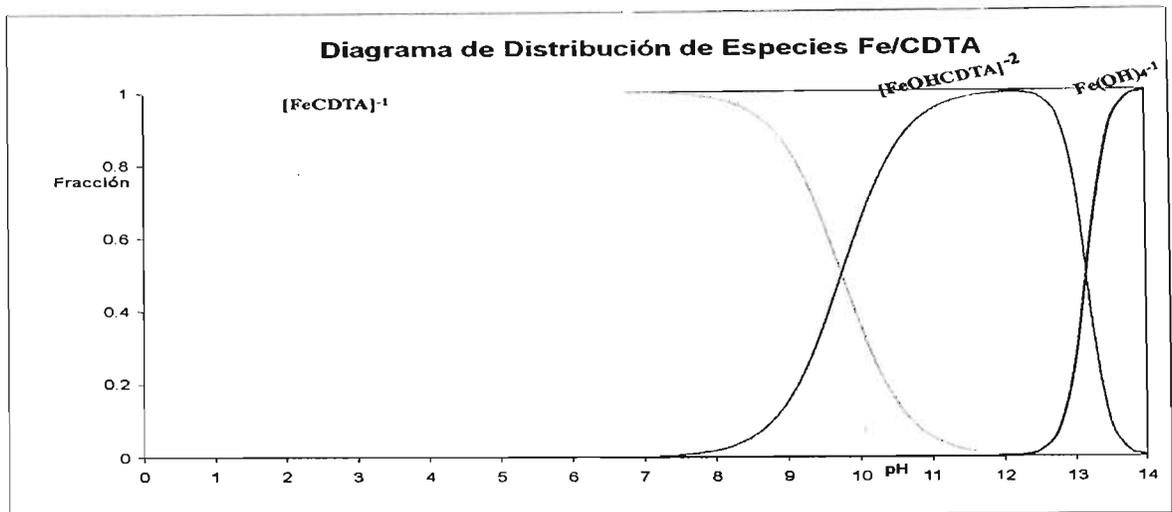


Figura 16 Diagramas de distribución de especies de CDTA con los metales bajo estudio (continua).

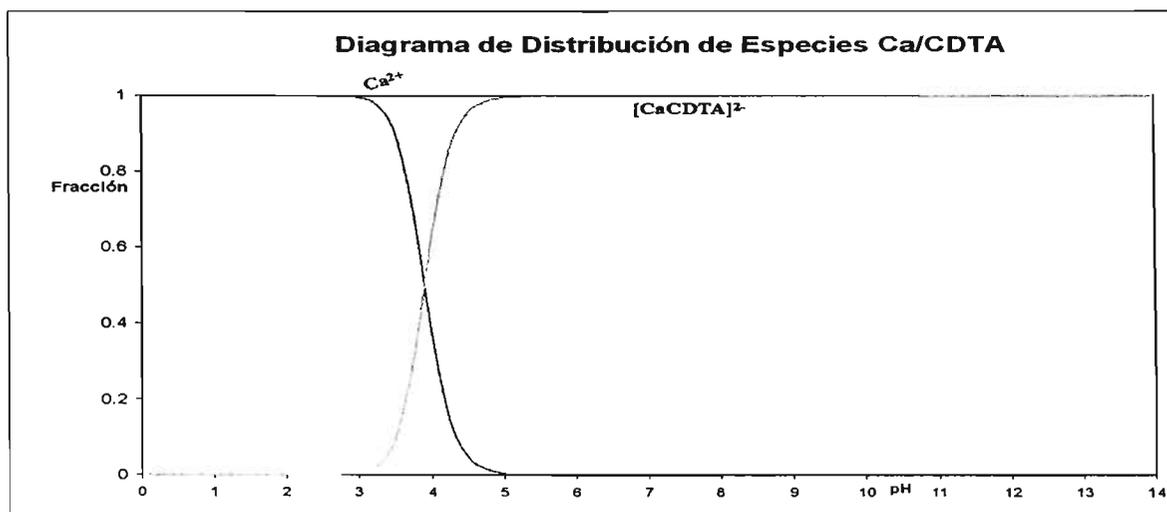
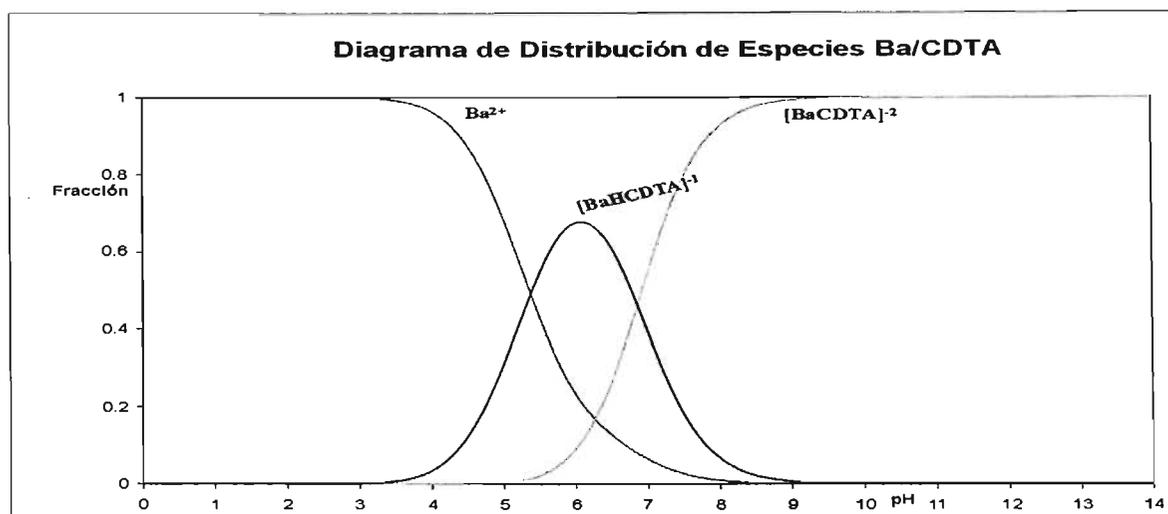
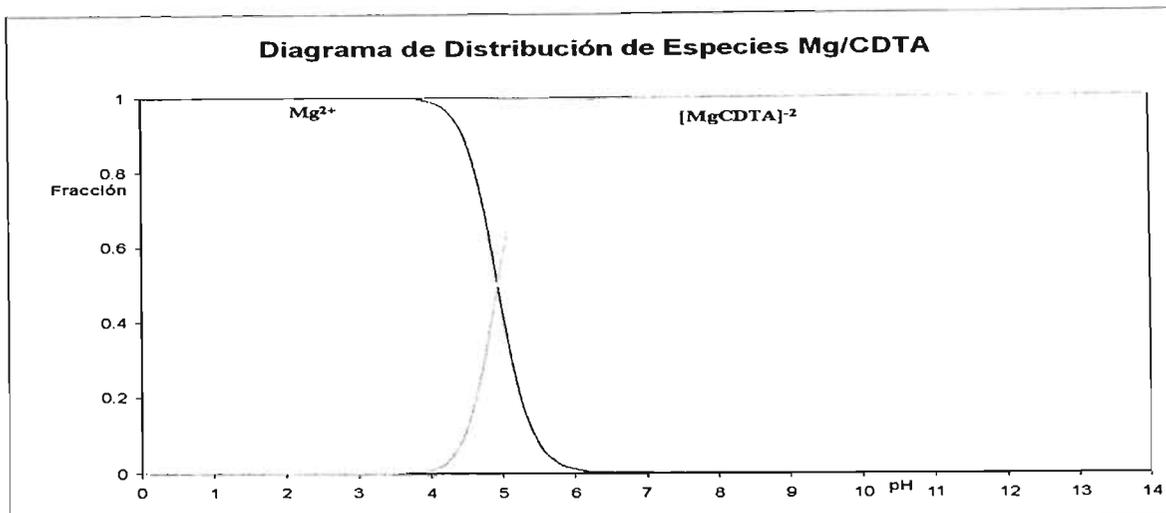


Figura 16 Diagramas de distribución de especies de CDTA con los metales bajo estudio (continua).

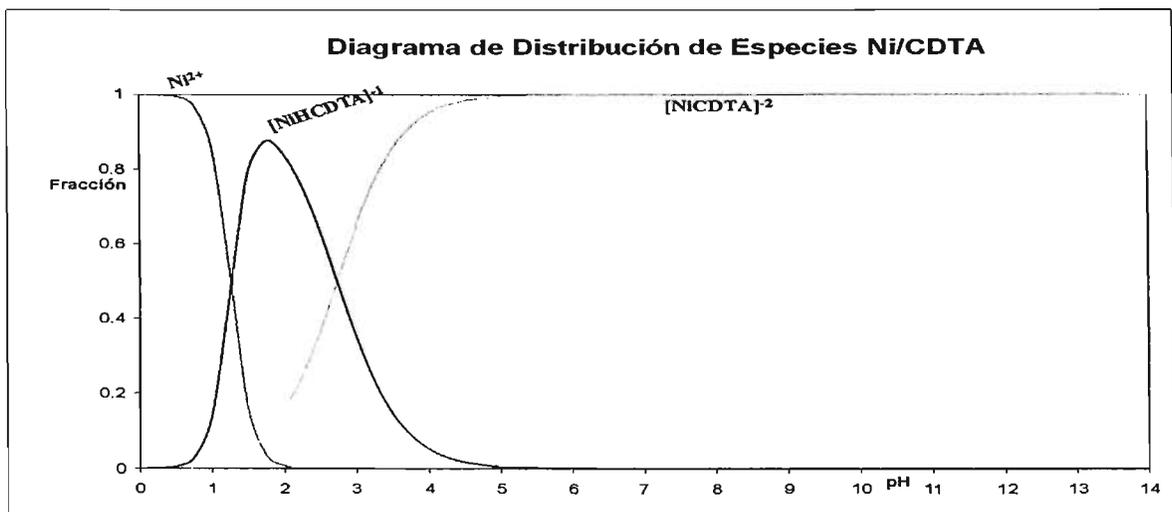
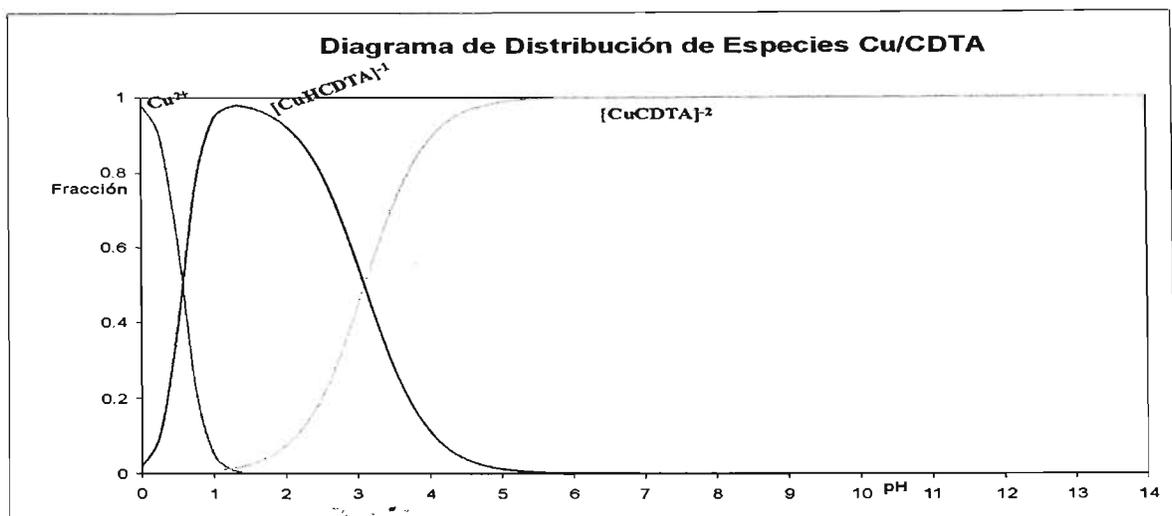
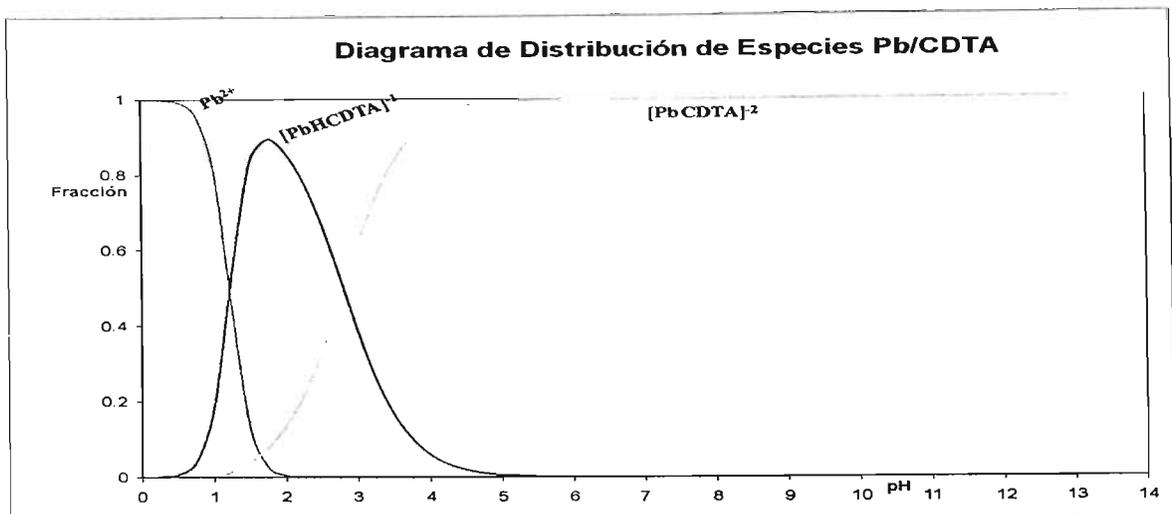


Figura 16 Diagramas de distribución de especies de CDTA con los metales bajo estudio (continua).

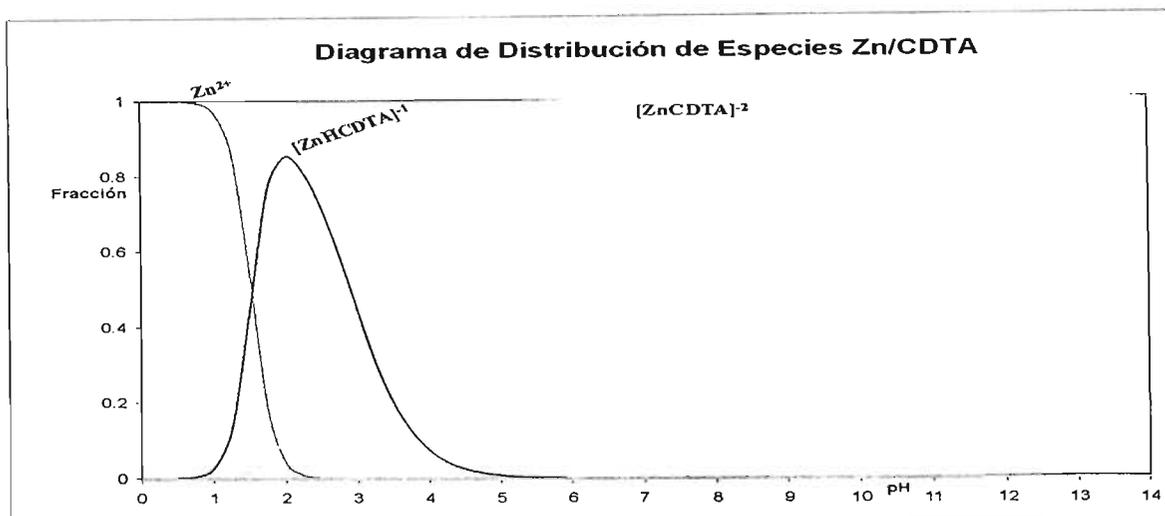


Figura 16 Diagramas de distribución de especies de CDTA con los metales bajo estudio.

El hecho de que los complejos con CDTA son más estables que los de EDTA se traduce en mejores límites de detección, ya que la cantidad de complejante que se pondrá en el electrolito soporte será menor y se disminuirá el ruido de fondo. Sin embargo, el CDTA no forma complejos del tipo $M(OH)Y$ con la mayoría de los metales bajo estudio por lo que el manejo de la selectividad será más difícil que con el EDTA donde a pH elevados se forman estos complejos, lo que cambia la carga del complejo y de esta manera la selectividad de la separación.

Para que una sustancia pueda ser analizada por ECZ debe de poseer carga eléctrica, debido a ello el intervalo de pH donde existan especies sin carga no es utilizable; la presencia de los metales como quelatos permite su detección por espectroscopia ultravioleta, que es el detector más común en los equipos de electroforesis capilar, por lo que es deseable que los metales se encuentren en esta forma.

De los diagramas de distribución de especies se concluye:

- 1.- El pH mínimo en el cual se debe de realizar la separación de los metales bajo estudio es entre 7 y 8 dado que a valores menores la fracción del complejo BaY disminuye, a favor del ión metálico lo que impediría su detección por espectroscopia ultravioleta.
- 2.- El pH máximo donde se puede llevar a cabo la separación es de aproximadamente 10; este valor se debe a que a valores mayores de pH, la fracción de los complejos de metales

con carga III con CDTA y EDTA disminuyen a favor de complejos $M(OH)_4$, los cuales son invisibles a la detección por espectroscopia ultravioleta, lo que impediría su detección.

3.- Los metales más difíciles de separar son plomo, níquel, zinc y cobre, debido a que poseen los diagramas de especies más parecidos.

Lo anterior determina que el pH de trabajo esté entre 8 y 10, por lo que para efectuar la separación de los residuos metálicos se debe utilizar la electroforesis capilar de zona con polaridad normal y condiciones contra electroosmóticas.

Los amortiguadores más utilizados en estas condiciones son boratos, TRIS (Tris-[hidroxi-metil] amino meteno), tricina HEPES (ácido N- 2- hidroxi-etil piperazina- N'-2-etan-sulfónico), fosfatos, entre otros. Se ha reportado que usando boratos como electrolito soporte el CDTA proporciona mejores separaciones que el EDTA para el caso de los lantánidos [35].

Dado que el análisis de los residuos orgánicos, puede realizarse bajo condiciones semejantes, por medio de cromatografía micelar electrocinética mediante micelas aniónicas como fase pseudoestacionaria, teóricamente es posible hacer el análisis conjunto de residuos orgánicos y metálicos; siempre y cuando las micelas aniónicas no alteren la separación de los complejos, lo que es de esperar, dado el carácter hidrofílico de estos.

Aplicando los principios anteriores se ha reportado [38] la separación de algunos de los metales bajo estudio, utilizando un capilar de sílice fundida de 75 micras de diámetro interno y 50 cm de longitud recubierto de poliimida, aplicando un voltaje de 15 kV utilizando como electrolito soporte una solución con Boratos 10 mM, CDTA 1mM a un pH=9.

Las movilidades obtenidas por éste método, se compararon con las movilidades teóricas obtenidas mediante la fórmula de análisis de regresión multi-variable propuesta por Timerbaev et. al. [36] para el estudio de los lantánidos (Tabla 16), obtenida a partir de correlacionar factores como la carga del quelato (Z), la constante de formación del mismo (β), el pH del electrolito y el tamaño del complejo (determinado por el número de grupos

hidroxilo (n_{COOH}), metilo (n_{CH_2}) y amino (n_{N}), con la movilidad experimental de los complejos formados entre los ácidos poliaminocarboxílicos con los lantánidos.

$$\text{Log}\mu_e = -2.575 + 0.51 * Z + 0.0041 * \text{Log}\beta - 0.285 * n_{\text{COOH}} - 0.016 * n_{\text{CH}_2} - 0.141 * n_{\text{N}} - 0.077 * \text{Log}(1+10^{\text{pK}-\text{pH}})$$

La diferencia entre el valor experimental y teórico revela que en la fórmula empleada, no se tomaron en cuenta todos los factores para realizar una mejor aproximación para el caso de los complejos utilizados; de entre los factores que no se tomaron en cuenta para el estudio anterior, se encuentra la naturaleza química y concentración de la solución reguladora, radio iónicos del metal, los que tuvieron poco peso en el caso de los complejos formados entre los ácidos poliaminocarboxílicos y los metales lantánidos, pero no en el caso de los metales bajo estudio.

Tabla 16 Movilidad de Complejos metálicos [36, 38].

Complejo (M-CDTA)	Movilidad Experimental. ($10^5 \cdot \text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{s}$) [38]	Movilidad Teórica. ($10^5 \cdot \text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{s}$) [36]
Aluminio III	41.1	79.4
Antimonio III	20.7	29.8
Bario II	37.4	79.2
Calcio II	38.3	82.6
Cobre II	41.6	89.8
Hierro III	24.5	35.7
Plomo II	39.4	88.4
Magnesio II	39.4	80.9
Níquel II	41.3	88.1
Zinc II	43.7	87.6

Los resultados indican que la separación entre varios de los metales no se lleva a cabo experimentalmente, por lo que es necesario hacer ajustes al método anterior para tener un método adecuado para el análisis de los residuos metálicos.

Sin embargo los datos experimentales como la estimación teórica nos permiten predecir cuales son los metales más difíciles de separar, entre los que podemos incluir a el plomo, níquel y zinc. Lo que coincide con lo anteriormente expuesto por los diagramas de

distribución de especies, además de que experimentalmente no se logró la separación entre los complejos de magnesio y plomo y aluminio cobre y níquel según las condiciones reportadas en [38].

Dado que los complejos Metal-CDTA no forman complejos mixtos hidroxos será necesario buscar otros medios para manipular la selectividad tales como cambios en la composición del electrolito soporte (aditivos, concentración) o en el equipo (longitud del capilar, voltaje), etc.

Objetivo General

Desarrollar un método por electroforesis capilar capaz de identificar y cuantificar en una sola corrida, los residuos inorgánicos y orgánicos más comunes generados por disparar un arma de fuego.

Objetivos Particulares

- Evaluar las ventajas y limitaciones de la electroforesis capilar para identificar y cuantificar en una sola corrida residuos orgánicos e inorgánicos generados por disparar un arma de fuego.
- Aplicar el método de Electroforesis Capilar desarrollado a muestras reales y comparar los resultados con las técnicas utilizadas en la actualidad en las procuradurías de la Republica
- Optimizar la toma de muestra para el método de electroforesis capilar desarrollado.
- Relacionar los resultados obtenidos al estudiar los residuos orgánicos e inorgánicos para proponer un criterio que permita discriminar muestras positivas de negativas.
- Estudiar la posibilidad de utilizar el método por electroforesis capilar desarrollado, como un método de rutina de bajo costo en los laboratorios de las Procuradurías de Justicia de México.

Materiales y Métodos

1.- Instrumentación

1.1 Electroforesis Capilar

Los experimentos se realizaron en un sistema de electroforesis capilar P/ACE™ MDQ (Beckman Coulter Fullerton, EUA.) (Fig. 17) equipado con un detector ultravioleta de arreglo de diodos; capaz de aplicar voltajes de hasta 30 kV e introducir la muestra al capilar por medio de inyección hidrodinámica y electrocinética.

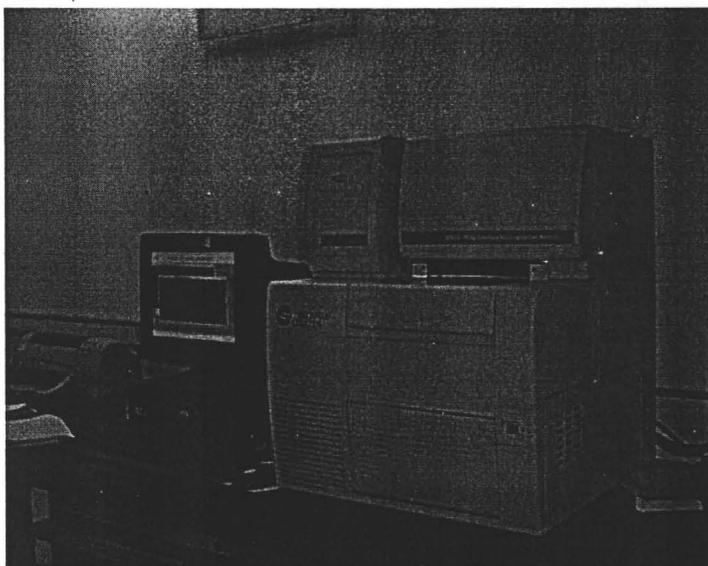


Figura 17 Equipo de Electroforesis capilar Beckman P/ACE™ MDQ.

Se usaron capilares de sílice fundida (Polymicro technologies Arizona, USA) con distintos diámetros interno (50, 75 y 100 μm de D.I.). Los capilares nuevos se condicionan introduciendo por medio de una presión 13.79 kPa las siguientes sustancias, mediante el siguiente esquema de lavado [39]:

- 1.- Etanol grado HPLC por 10 minutos
- 2.- Acido clorhídrico 0.1 N por 10 minutos
- 3.- Agua desionizada por 2 minutos

- 4.- NaOH 1 N a 40 °C por 5 minutos
- 5.- NaOH 1 N a 25 °C por 5 minutos
- 6.- Agua desionizada por 2 minutos
- 7.- Electrolito soporte por 2 minutos

Entre corridas se utiliza el siguiente lavado:

- 1.- Agua desionizada por 1 minuto
- 2.- NaOH 0.1 N a 25 °C por 1 minuto
- 2.- Agua desionizada por 2 minutos
- 3.- Electrolito soporte por 2 minutos

1.2 Métodos Espectrofotométricos

Se utilizaron equipos de espectrofotometría de absorción atómica Varian Spectra AA 800 con horno de grafito y sistema de generador de vapor VGA 77 (Palo Alto EUA) y Perkin Elmer SIMAA 6000 con automuestrador AS-72 y sistema de generación de hidruros MHS-10 (Norwalk, EUA) (Fig. 18), y un equipo de plasma acoplado por inducción (PAI) Thermo Jarrel Ash IRIS Advantage (EUA).

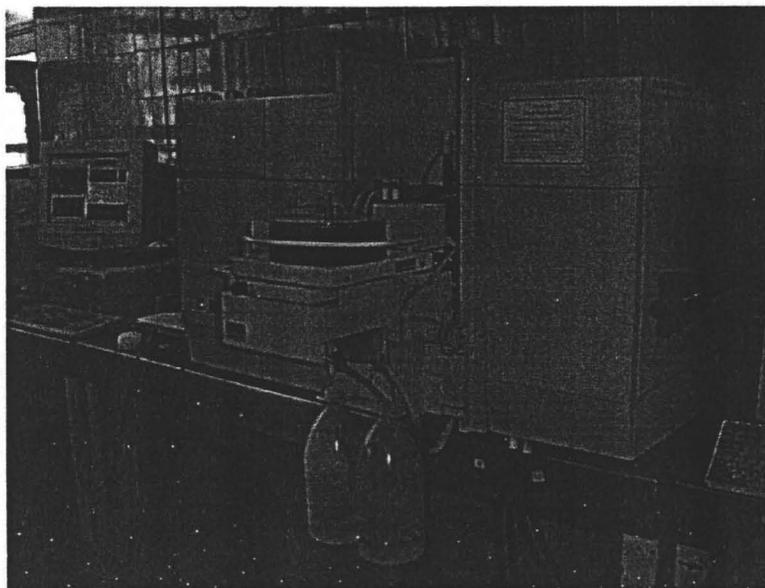


Figura 18 Equipo de Espectrofotometría de Absorción atómica electrotérmica Perkin Elmer 6000.

1.3 Otros

Sonicador Elma Transonic T 570 (Alemania).

Todos los reactivos fueron pesados en una balanza analítica Boeco (Alemania).

2.- Reactivos

2.1 Reactivos y patrones utilizados

Patrones de residuos orgánicos: Nitroglicerina (se obtuvo a partir de Nitradisc un medicamento de Searle), resorcinol 99%, 2,4 dinitrotolueno 99.4%, 2,6-dinitrotolueno 99.6%, 2,3- dinitrotolueno 99.9%, metil ftalato 99.8%, etil ftalato 99.7%, butil ftalato 99.8% (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) difenilamina ACS., resorcinol 99-100%, (J.T. Baker, Xalostoc, México) etil centralita y metil centralita.

Patrones 1000 mg/L de plomo, bario, antimonio, cobre, zinc, níquel, hierro, aluminio, calcio y magnesio (High Purity Standards, Charleston, EUA).

Otros reactivos utilizados: borato de sodio 100.8%, fosfato dibásico de sodio, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico ácido nítrico reactivos grado ACS, metanol, etanol, acetonitrilo y acetona grado HPLC (J.T.Baker, Xalostoc, Mexico), SDS 99% (dodecil sulfato de sodio), ácido ciclohexano diamino tetracético , CDTA 99% (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA).

2.2 Preparación de soluciones patrón y reactivos.

Se prepararon soluciones patrón 10 mM en etanol, a partir de los patrones orgánicos. A partir de estas soluciones y los patrones de 1000 mg/L de los metales se prepararon los patrones de trabajo en una solución de boratos y CDTA como agente

complejante. La concentración de CDTA fue 2.5 veces la concentración total de metales, esto con el fin de asegurar la complejación total de los residuos metálicos [38].

El electrolito de corrida se preparó disolviendo la cantidad adecuada de borato de sodio, SDS y CDTA para obtener la concentración deseada. El CDTA se agrega al final con el fin de que el borato de sodio ayude a su disolución. El pH del electrolito se mide por medio de un pH metro Hanna HI 931401 (Sarmeola di Rubano, Italia) y se ajusta cuando sea necesario por medio de soluciones diluidas de NaOH y HCl. Para la preparación de todos los reactivos se utilizó agua destilada y desionizada.

3.- Preparación de Muestras.

Una vez efectuado el disparo se tomaron muestras por medio de las técnicas de frotamiento y cinta adhesiva [1] a partir de la zona de maculación (Fig. 19 c).

En la técnica de frotamiento, los residuos son tomados frotando un pedazo de tela de algodón de 4 cm² embebida en un disolvente adecuado en las zonas de muestreo (palma y dorso de ambas manos). Los residuos (Fig. 19) son extraídos de la tela por sonicación por 5 minutos en 2 ml de disolvente; cuando el disolvente es una solución acuosa se incorpora borato de sodio y el agente complejante como parte de su composición [38] en una concentración 2.5 veces la concentración de metales esperada. Cuando es un disolvente orgánico, se procede a evaporar este, bajo una atmósfera de nitrógeno, previa adición de 20 µl de etilenglicol con el fin de evitar la evaporación total de la muestra. Por último se reconstituye la muestra con 2 ml de una solución de 0.005 M de CDTA y 0.004 M de boratos.

En la técnica por cinta adhesiva, para tomar los residuos, se coloca la cinta adhesiva en las zonas de muestreo y se retira en un solo movimiento, a continuación los residuos son extraídos por sonicación por 5 minutos en 4 ml de un disolvente orgánico, a continuación se procede a evaporar la muestra en una atmósfera de nitrógeno previa adición de 20 µl de etilenglicol para evitar la evaporación total de la muestra. Una vez terminada la fase de

evaporación se reconstituye la muestra con 180 μ l de una solución 0.005 M de CDTA y 0.004 M de boratos.

Además de las muestras anteriores se tomaron muestras del cartucho percutido y de la zona circundante al orificio producido por el proyectil por medio de un hisopo embebido en etanol; procesándose las muestras como en el caso de las muestras tomadas por cinta adhesiva.

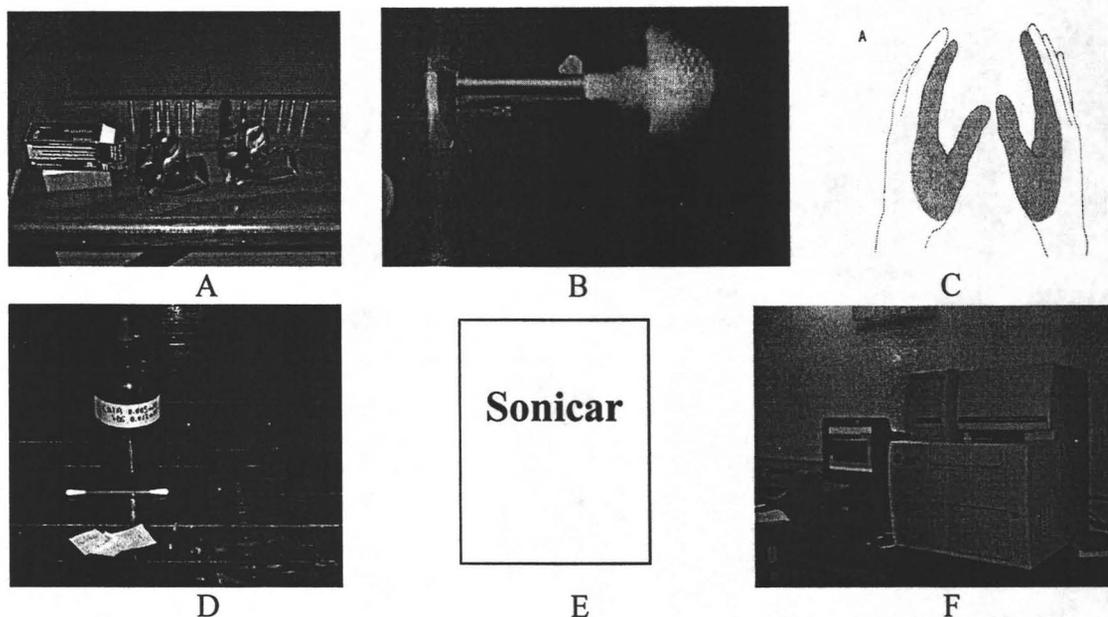


Figura 19 Secuencia efectuada en la toma de muestra. A.- Equipo necesario para efectuar el disparo. B.- Disparo. C.- Zona de maculación. D.- Reactivo y material de la toma de muestra. E.- Sonicación. F.- Análisis.

Para comparar las técnicas de electroforesis capilar y EAA-ET, ambas técnicas fueron utilizadas para analizar muestras provenientes de personas que efectuaron un disparo con un revólver 38 mm, tomadas mediante la técnica de frotamiento, utilizando los disolventes que proporcionaron las mejores recuperaciones por la técnica de electroforesis capilar. Para realizar la cuantificación de plomo por EAA-ET se prepararon soluciones patrón de plomo con concentraciones de 0.1 mg/L, 0.5 mg/L y 2 mg/L en 0.2 % de ácido nítrico, a partir de la solución patrón 1000 mg/L de plomo. A continuación, y con la ayuda del automuestrador del equipo de EAA-ET se elaboraron los distintos puntos de una curva de calibración para plomo(Fig. 20), mediante la mezcla en distintas proporciones de las

soluciones patrón de plomo preparadas, con una solución de ácido nítrico 0.2 %, además, en cada caso se agregó 5 µl de fosfato dibásico de amonio como modificador químico, lo que equivale a agregar 50 ng de fosfato dibásico de amonio. Cada punto de la curva es analizado por triplicado utilizando los parámetros de operación recomendados por el manual de operación del equipo de EAA-ET (Tabla 17) [40].

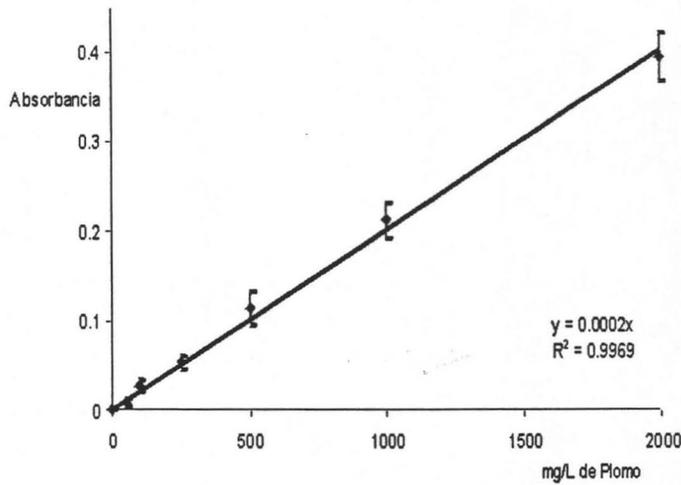


Figura 20 Curva de Calibración de plomo por EAA-ET

Las muestras provenientes de las personas que efectuaron los disparos fueron analizadas, mediante los mismos parámetros de operación, utilizados para realizar la curva de calibración.

Tabla 17 Parámetro de operación del equipo de EAA-ET, utilizados para la determinación de plomo [40].

PARAMETROS	VALOR
Corriente de la lámpara	10 miliamperes
Longitud de onda	283.3 nm
Ancho de la abertura	0.7 nm
Modificador Químico	0.050 mg NH ₄ H ₂ PO ₄ en 5 µl
Diluyente	13 µl de 0.2 % ácido Nítrico
Muestra	2 µl
Temperatura de Pirolisis	850 °C
Temperatura de Atomización	1500 °C, por 3 segundos
Limpieza	2600 °C,

Resultados

1.- Desarrollo del Método Analítico

El desarrollo del método analítico en electroforesis capilar involucra optimizar distintos parámetros con el fin de lograr la separación de los analitos bajo estudio. Dado que en el presente trabajo se utilizará la electroforesis capilar de zona (ECZ) y la cromatografía micelar capilar electrocinética (CMCE), los parámetros a optimizar se pueden categorizar en:

A.- Composición del Electrolito de separación

A.1.- pH del electrolito.

A.2.- Concentración del electrolito.

A.3.- Presencia y concentración de aditivos (en el caso de CMCE la concentración y tipo de surfactante).

B.- Columna capilar

B.1 Longitud del capilar.

B.2. Diámetro del capilar.

C.- Voltaje aplicado

D.- Temperatura

1.1 Composición del Electrolito de Separación.

1.1.1 pH del electrolito de separación.

Previamente, se estableció con los diagramas de predominio de especies que el sistema a utilizar involucra el uso de un pH entre 8 y 10 por lo que se iniciaron los experimentos con un buffer de boratos 10 mM, utilizando CDTA como agente complejante. Estudios previos [35], indican que una solución reguladora de boratos es el óptimo para la separación de cationes bajo las condiciones mencionadas.

El factor que tiene un efecto más importante en la selectividad de la separación en la electroforesis capilar de zona (ECZ) es el pH del electrolito soporte dado el efecto que tiene en el grado de ionización de los analitos y en el flujo electroosmótico.

Por lo que, se estudió el efecto del pH del electrolito soporte, en la separación de los complejos metálicos en el intervalo de pH elegido con un buffer 10 mM de boratos; sin embargo, no hubo cambio en la selectividad de la separación (datos no presentados). Esto puede explicarse a partir de los diagramas de especies de los metales con CDTA (Fig. 16) donde se puede ver que no hay cambio en la especie predominante en el intervalo de pH estudiado para los metales con carga +2, en consecuencia éstos mantienen su carga en el intervalo estudiado y, por tanto, no se afecta su separación. La única especie que cambió su selectividad fue el Fe(III)-CDTA debido a la formación de complejos mixtos del tipo Fe(OH)CDTA, que provocan un cambio en la carga del complejo de -2 a -1, lo que produce un aumento en su movilidad aparente debido a las condiciones contraelectroosmóticas utilizadas. La especie Al(III)-CDTA también forma complejos mixtos hidroxilo, pero no se advirtió cambio en su selectividad. Es importante resaltar que bajo las condiciones anteriores, solamente se obtienen ocho de los diez picos esperados en la muestra estándar. Los complejos que “comigran” en las condiciones anteriores son los complejos de CDTA con plomo, zinc y níquel.

1.1.2 Concentración del Electrolito

Optimizar la concentración de boratos en el electrolito soporte es un paso importante en la electroforesis capilar, pues concentraciones bajas de electrolito llevan a la absorción del analito en las paredes del capilar, por otro lado, concentraciones elevadas de electrolito resultan contraproducentes debido al incremento de la corriente producida y la generación de calor de Joule, lo que implica pérdida en la eficiencia del sistema. Para encontrar la concentración óptima se trazó una curva de concentración de boratos contra la eficiencia expresada como el número de platos teóricos (Fig. 20).

De la gráfica se puede deducir que la concentración óptima está entre 25 y 35 mM de boratos para la mayoría de los complejos. Sin embargo, el hallazgo más importante es

que los cambios en la concentración de boratos producen cambios selectivos en la movilidad de los complejos metálicos, que no pueden explicarse totalmente por el cambio en el flujo electroosmótico (que influiría por igual a todos los complejos), por lo que la concentración de boratos puede ser un factor vital para lograr la separación de los residuos metálicos. Para ello se analizó el efecto de la concentración de boratos sobre la resolución de los pares de complejos más problemáticos (Fig. 21) obteniéndose la separación de dichos complejos (resolución mayor a 1) a una concentración 40 mM de boratos.

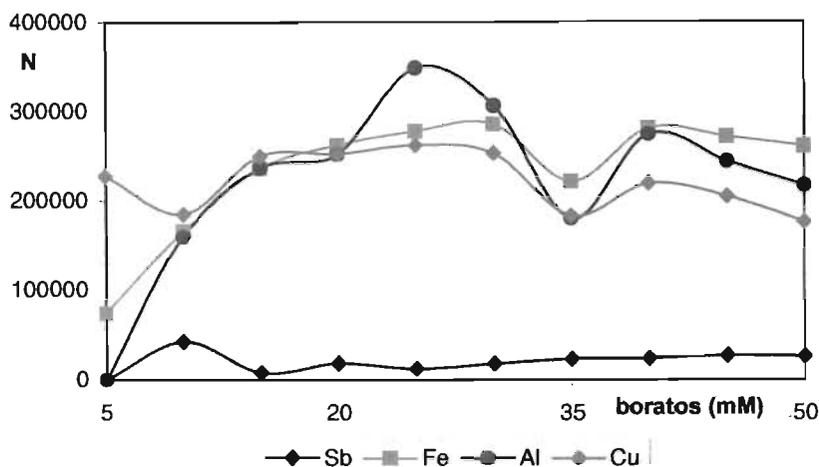


Figura 21 Efecto de la concentración de boratos en la eficiencia del sistema. Condiciones de electroforesis capilar: capilar 79.2 cm de longitud total (L), 75 micras de diámetro interno (D.I.), inyección hidrodinámica 3.45 kPa, por 5 segundos, detección UV a 214 nm, voltaje 30 kV, Electrolito pH=9.2.

A fin de mantener esta separación, en los siguientes experimentos se utilizara un electrolito soporte de boratos 40 mM a un pH=9.2.

El efecto de los boratos en el cambio de selectividad de los distintos complejos se relaciona con interacciones entre los boratos con los complejos metálicos. Este tipo de interacciones se han reportado entre los boratos y compuestos poli hidroxilados [41]. Esto produce, aparentemente un cambio en la constante condicional de formación de complejos y un consecuente cambio en la relación carga/ masa del complejo y en su selectividad [36].

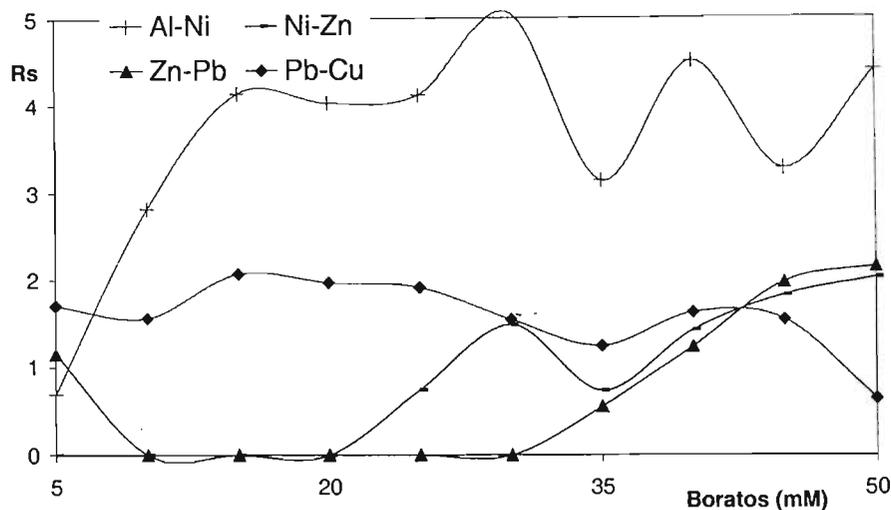


Figura 22 Efecto de la concentración de boratos en la resolución de los complejos metálicos. Condiciones de electroforesis capilar: capilar 79.2 cm de longitud total, 75 micras de D.I., inyección hidrodinámica 3.45 kPa, por 5 segundos, detección UV a 214 nm, voltaje 30 kV, Electrolito pH=9.2. Concentración de Pb, Al y Zn 10 mg/L, Cu y Ni 20 mg/L

1.1.3 Presencia de Aditivos

1.1.3.1 Surfactantes

Dado que los residuos generados por disparar un arma de fuego carecen en su mayoría de propiedades ácido-base, es necesario adicionar al electrolito soporte una fase micelar para efectuar la separación por medio de un fenómeno de partición.

Las condiciones encontradas para la separación de los residuos metálicos coinciden con las condiciones utilizadas en la cromatografía micelar capilar electrocinética (CMCE) es decir pH alcalino, flujo electroosmótico elevado, etc. Por lo que teóricamente podrían utilizarse dichas condiciones para separar simultáneamente los residuos orgánicos e inorgánicos.

Para iniciar los experimentos se utilizó un surfactante aniónico ampliamente utilizado, como el dodecil sulfato de sodio (SDS). En estas condiciones tanto los complejos

metálicos como las micelas de SDS tienen carga negativa por lo que se analizarán en condiciones contraelectroosmóticas.

Se ha reportado que las micelas pueden interactuar con algunos complejos metálicos, sobretodo cuando el ligante es lipofílico [29-31]; esto puede ocasionar cambios en la selectividad de la separación de los cationes, por lo que es necesario verificar que no existan interacciones entre las micelas y los complejos con el fin de que no se pierda la separación de los residuos metálicos. Para ello se corrió la mezcla estándar de los complejos metálicos bajo las condiciones de separación y 25 mM de SDS. Se encontró que el SDS, no modifica los tiempos de migración de los quelatos, por lo que no altera la selectividad de su separación; esto se debe a que el CDTA es un ligante altamente cargado y, en consecuencia hidrofílico, por lo que no interactúa con las micelas. El único efecto encontrado fue un aumento en la eficiencia y, por tanto, en la resolución de los complejos metálicos debido al aumento que produce el SDS en la viscosidad del electrolito de corrida. Esto prueba que los mecanismos de separación de la ECZ y la CMCE pueden ser utilizados simultáneamente y de manera independiente.

La separación de los residuos orgánicos, incluyendo los isómeros de dinitrotolueno, se obtuvo a concentraciones de SDS mayores a 15 mM y la separación simultánea de todos los residuos se dio a concentraciones de 16 mM y por encima de 25 mM (Fig. 22). En los siguientes experimentos, se utilizará una concentración de 16 mM con el fin de obtener tiempos de análisis más cortos.

Dado que las movilidades de los quelatos no se vieron alteradas por la presencia de los residuos orgánicos, las interacciones entre éstos y los iones metálicos se consideran despreciables, en comparación con la existente con el CDTA.

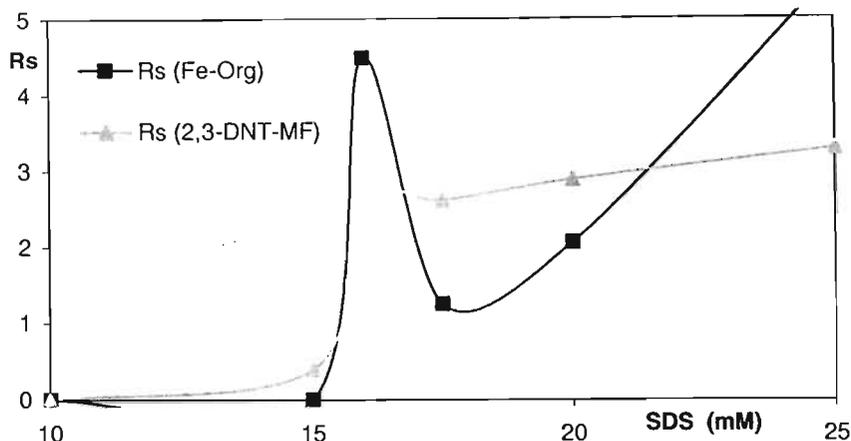


Figura 23 Efecto de la concentración de SDS en la separación del par de sustancias más conflictivo. Condiciones de electroforesis capilar: capilar 79.2 cm de L, D.I. de 75 micras, inyección hidrodinámica 3.45 kPa, por 5 segundos, detección UV a 214 nm, voltaje 30 kV, Electrolito soporte: 40 mM Boratos, pH=9.2.

1.1.3.2 Otros

Por último, se ha informado [29- 30, 35] la necesidad, cuando se utiliza complejación precapilar, de adicionar complejante al electrolito de separación para evitar la separación de los quelatos. Sin embargo, como el CDTA absorbe ligeramente por debajo de 230 nm, es necesario agregar la menor cantidad posible, para que no afecte la detección de los quelatos. Para ello, se estudió el efecto de la concentración de CDTA en el electrolito soporte sobre la estabilidad de los quelatos formados (Fig. 23).

Los complejos de bario, calcio y magnesio se disocian dentro del capilar cuando no se agrega CDTA al electrolito soporte; esto coincide con el hecho de que, estos metales tienen constantes de complejación más pequeñas que las de otros metales (Tabla 15). Como el bario es uno de los residuos más importantes, se determinó que es necesario agregar CDTA en una concentración de 0.5 mM al electrolito de separación. Esta concentración es menor a la utilizada cuando se usan otros agentes complejantes como EDTA (lo que se explica porque los complejos con CDTA son más estables).

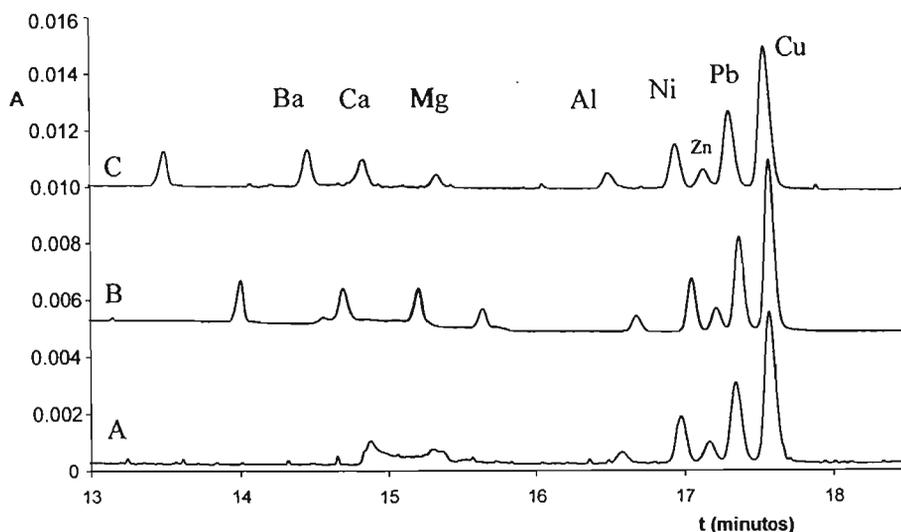


Figura 24 Efecto de la concentración de CDTA en el electrolito soporte en la estabilidad de los complejos metálicos. A.- 0 mM CDTA, B.- 0.5 mM CDTA, C.- 1.0 mM CDTA. Condiciones 40 mM boratos, 16 mM SDS, pH=9.2, capilar 79.2 cm de L, D.I. de 75 micras, inyección hidrodinámica 3.45 kPa, por 5 segundos, detección UV a 214 nm. voltaje 30 kV. Concentración de Pb, Ni, Ca, Mg, Al y Zn 10 mg/L, Ba, Cu y Ni 20 mg/L

1.2 Columna capilar

Los principales parámetros del capilar que se pueden manipular son la longitud y el diámetro interno del capilar. El tamaño del capilar mejora las separaciones por el consiguiente aumento en el número de platos teóricos; sin embargo esto tiene un efecto nocivo sobre el tiempo de análisis. Capilares de 50 cm. (longitud de capilar más utilizada) no permiten la separación de las sustancias bajo estudio, debido a que el tiempo de corrida resulta muy corto para la separación (alrededor de 5 minutos). Se optó por fijar el tamaño del capilar para obtener la mayor cantidad de platos teóricos, que es el parámetro más importante para la separación.

Para estudiar el efecto del diámetro interno del capilar, se utilizaron capilares con un diámetro interno de 50, 75 y 100 micras. El uso de capilares de 100 micras de diámetro fue descartado dado que produce corrientes elevadas en las condiciones de trabajo utilizadas (217 μ A). De entre el capilar de 50 y 75 micras se eligió este último pues permite mejores límites de detección.

1.3 Voltaje

En la electroforesis capilar se recomienda utilizar el máximo voltaje posible pues proporciona mejor resolución. Sin embargo, aplicar un exceso de voltaje puede resultar en generación de calor de Joule y deteriorar la resolución obtenida. Para estudiar esto se realizó una gráfica de corriente en función de voltaje (Fig. 24). En condiciones óptimas la relación es lineal; la generación de calor de Joule se visualiza cuando se pierde la linealidad en la relación.

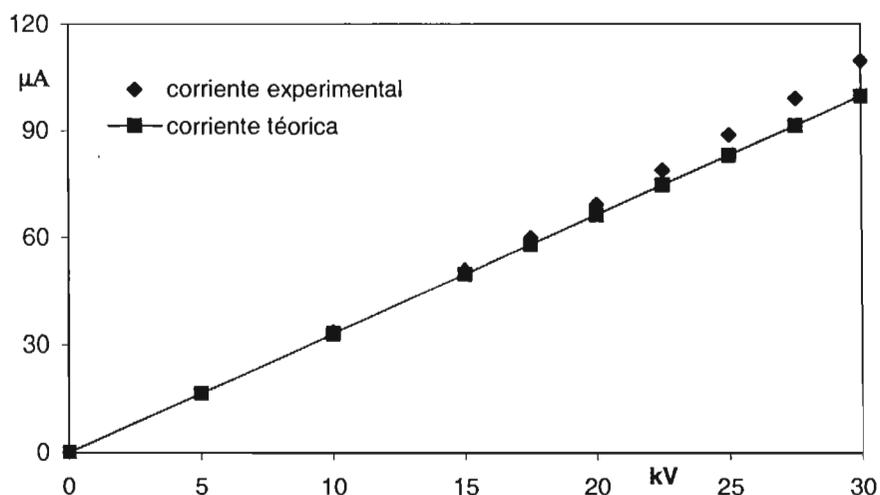


Figura 25 Relación voltaje – corriente. Electrolito soporte 40 mM Boratos, 16 mM SDS, 0.5 mM CDTA pH=9.2, capilar: Longitud total de 79.2 cm, D.I. de 75 micras, inyección hidrodinámica 3.45 kPa, por 5 segundos, detección UV a 214 nm

De la figura 24 se puede deducir que el voltaje óptimo de la separación es de 20 kV, sin embargo, experimentalmente un voltaje de 30 kV produjo más platos teóricos, y en consecuencia mejor resolución y tiempos de análisis más cortos, por lo que se utilizará en los siguientes experimentos.

1.4 Temperatura

La temperatura utilizada fue de 25 °C dado que es la temperatura más utilizada en la electroforesis capilar, su valor no se estudió dado el poco efecto que tiene en la separación en comparación con los parámetros anteriores.

Bajo las condiciones anteriores se logró la separación de todos los residuos bajo estudio (Fig. 25). La resolución obtenida fue mayor a 1 en todos los casos y se obtuvieron alrededor de 300,000 platos teóricos para la mayoría de los residuos metálicos (excepto antimonio) y de 100,000 para los residuos orgánicos (Tabla 18).

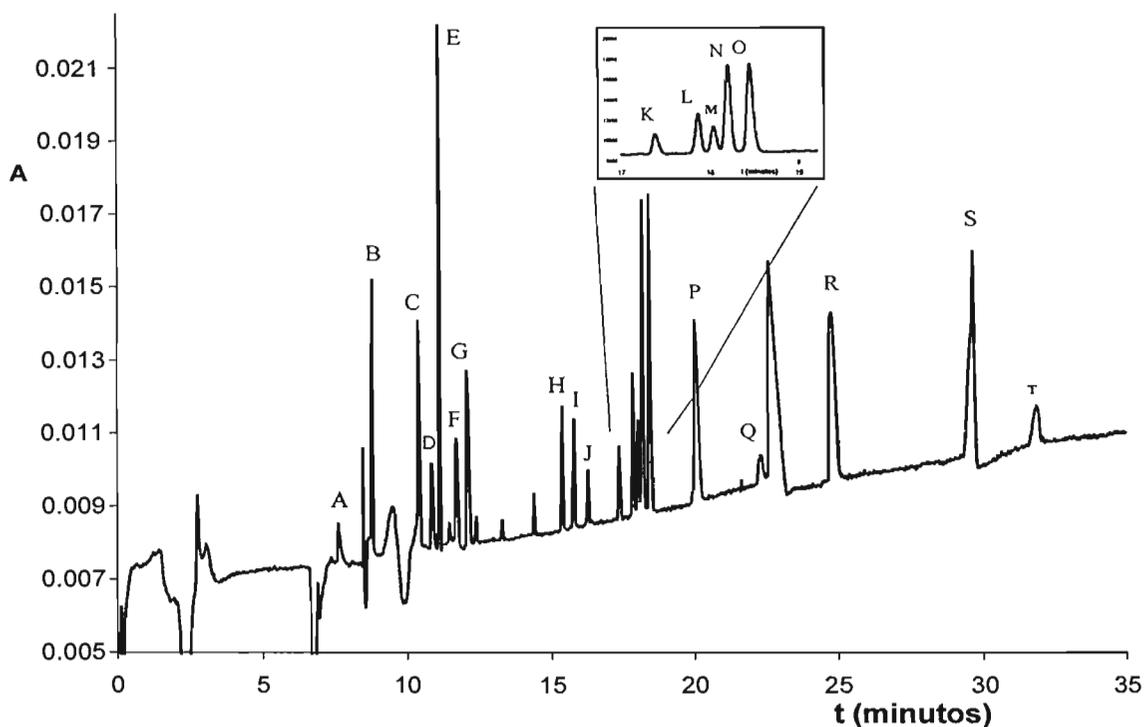


Figura 26 Separación simultánea de los residuos orgánicos e inorgánicos. Electrolito soporte: 40 mM Boratos, 16 mM SDS, 0.5 mM CDTA, pH= 9.2, capilar: L de 79.2 cm, longitud al detector (l) de 69.0 cm, D.I. de 75 µm, inyección Hidrodinámica: 3.45 kPa por 5 segundos. Detección UV a 200 nm. Concentración de residuos (mg/L): A.-Sb: 30, B.-Resorcinol: 11.1, C.- 2,4-DNT: 10.93, D.- 2,6-DNT: 14.57, E.- Fe: 10, F.- 2,3-DNT: 18.2, G.- MF: 6.0, H.- Ba: 30, I.-Ca: 20, J.- Mg: 20, K.- Al: 20, L.- Ni: 20, M.- Zn: 10, N.- Pb: 10, O.- Cu: 20, P.- EF: 17.78, Q.- DPA: 16.9, R.- MC: 14.4, S.- EC: 22.56, T.- BF: 10.

Tabla 18 Parámetros más significativos de la mejor separación obtenida

Residuos	T(min.)	N	Rs	Residuos	T(min.)	N	Rs
Sb	7.56	17371	1.52	Al	17.54	302815	9.58
Nitroglicerina	8.49	80722		Ni	18.03	334768	3.30
Resorcinol	8.84	107582	2.24	Zn	18.21	353579	1.52
2,4-DNT	10.51	93558	2.11	Pb	18.38	326848	1.38
2,6-DNT	10.99	103090	3.24	Cu	18.62	304752	1.71
Fe	11.22	304570	5.27	Etil ftalato	20.34	84355	6.80
2,3-DNT	11.85	111650	2.27	Difenilamina	22.66	98536	9.28
Metil ftalato	12.22	90088	2.28	Metil centralita	25.18	73111	7.19*
Ba	15.50	247131	6.96	Etil centralita	30.13	97675	14.52
Ca	15.92	311701	4.84	Butil ftalato	32.45	75554	6.92
Mg	16.41	330500	4.30				

* Resolución respecto al pico de CDTA

1.5 Optimización de la detección

Dadas las concentraciones en las que se encuentran los residuos es conveniente obtener los mejores límites de detección posibles para ello se pueden seguir diversas estrategias como son [42]:

A.- Elegir la longitud de onda de lectura óptima.

B.- Optimizar la introducción de la muestra al sistema.

C.- Aplicar técnicas de preconcentración en línea o fuera de línea

1.5.1 Selección de la Longitud de Onda

Una de las maneras más simples de mejorar la sensibilidad del sistema involucra encontrar la mejor longitud de onda de lectura. Esto se determinó con un detector de arreglo de diodos. Se encontró que la sensibilidad del sistema se incrementa para la mayoría de los residuos a una longitud de onda de 200 nm (Tabla 19). En estas condiciones se incrementa la línea base pero en una mayor proporción la señal de los residuos. Por lo que se elige utilizar una longitud de onda de lectura de 200 nm, dado que entre los residuos que incrementan su sensibilidad en mayor proporción se encuentran algunos que son considerados muy importantes (nitroglicerina, antimonio, difenilamina, etc.).

Tabla 19 Sensibilidades relativas de algunos residuos a diferentes longitudes de onda.

Longitud de onda (nm.)	Sb	Res	2,6-DNT	Fe	MF	Ba	Al	Pb	Cu	DPA	EC
200	6.8	1.8	1.5	1	3.8	2.6	3.2	2.8	1	2.1	1.9
205	3.7	1.4	1.3	1	2.2	2.1	2.1	2.2	1	1.5	1.5
214*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
254	0	0.2	0.6	1	0.2	0	0	0.6	1.1	0.3	0.5

*Sensibilidades relativas a la altura de pico obtenida a 214 nm para cada residuo.

1.5.2 Optimización de la introducción de la muestra.

Otra manera para mejorar los límites de sensibilidad es incrementando la cantidad de muestra introducida al capilar, sin embargo, introducir una cantidad excesiva lleva a una pérdida en la eficiencia del sistema; esto usualmente sucede cuando se introduce 1% de la longitud total del capilar.

Idealmente, a un incremento en la cantidad de muestra introducida, le corresponde un aumento proporcional en las señales obtenidas; esto sucede hasta el momento en que, la zona de inyección, se vuelve mayor que la dispersión del sistema, lo que se traduce en la

pérdida de esta proporcionalidad, y la consiguiente disminución en la eficiencia del sistema. Para determinar la máxima cantidad de muestra que se puede introducir al sistema por medio de inyección hidrodinámica se fijó la presión en 3.45 kPa y se cambió el tiempo en el cual se aplicó ésta presión (Fig. 26).

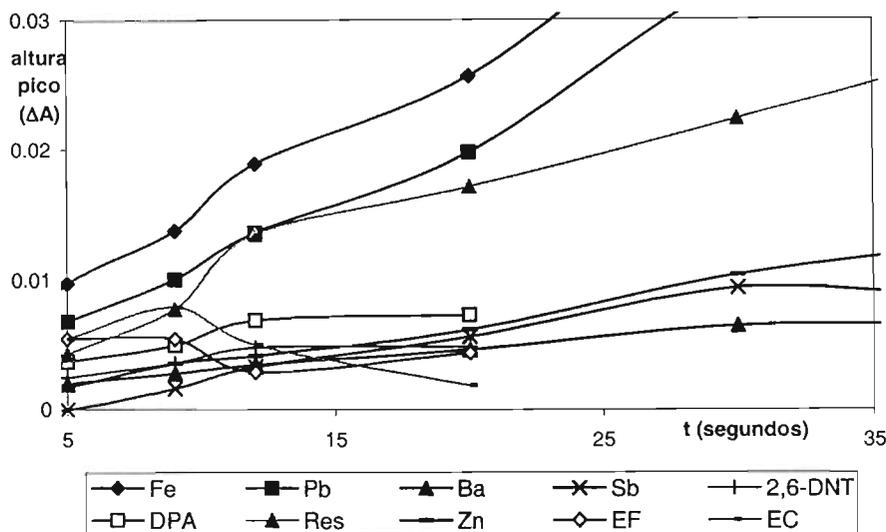


Figura 27 Efecto del tiempo de inyección en la sensibilidad de algunos residuos. Electrolito soporte: 40 mM Boratos, 16 mM. SDS, 0.5 mM CDTA, pH= 9.2, capilar: 79.2 cm de longitud total, 69.0 cm, de longitud al detector, D.I. de 75 μ m, inyección Hidrodinámica: 3.45 kPa, Detección UV a 205 nm*. Concentración de residuos (mg/L): Sb: 30, Resorcinol: 11.1, 2,6-DNT: 14.57, Fe: 10, Ba: 30, Zn: 10, Pb: 10, EF: 17.78, DPA: 16.9 y EC: 22.56.

* Experimentos realizados antes de determinar que la longitud de onda óptima es de 200 nm

En la gráfica 26 se puede observar que para los residuos metálicos, existe una relación lineal entre la cantidad de muestra introducida, con la señal obtenida hasta un tiempo de inyección de 20 segundos, por lo que no se altera en demasía la resolución de los residuos metálicos, a mayores tiempos de inyección, se pierde esta relación lineal, debido a que la muestra introducida ya no produce un aumento en la altura, sino en el ancho de los picos, con la consiguiente pérdida en la eficiencia y resolución del sistema (Fig. 27). Para los residuos orgánicos, la eficiencia del sistema se deteriora a menores tiempos de inyección, llevando a una pérdida en la resolución e incluso, la presencia de picos dobles (Fig. 27). Por lo que si se quiere realizar la detección simultánea de residuos orgánicos e

inorgánicos, es necesario limitar el tiempo de inyección hidrodinámica a 5 segundos, cuando se utiliza una presión de 3.45 kPa, esto equivale a inyectar 19 nl de muestra.

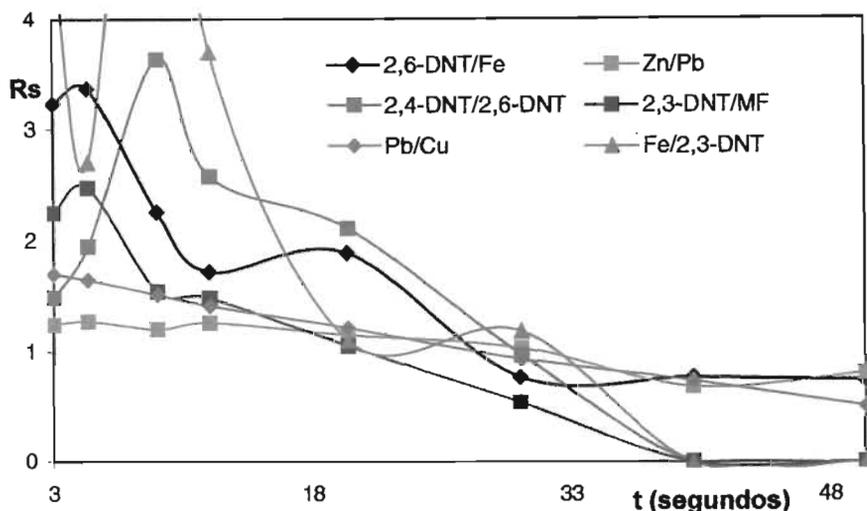


Figura 28 Efecto del tiempo de inyección hidrodinámica en la resolución de la separación. Electrolito soporte: 40 mM Boratos , 16 mM. SDS, 0.5 mM CDTA, pH= 9.2, capilar: 79.2 cm de longitud total, 69.0 cm, de longitud al detector, D.I. de 75 μ m, inyección Hidrodinámica: 3.45 kPa, Detección UV a 205 nm*. Concentración de residuos (mg/L): 2,4-DNT: 10.93, 2,6-DNT: 14.57, Fe: 10, 2,3-DNT: 18.2, MF: 6.0, Zn: 10, Pb: 10, Cu: 20.

* Experimentos realizados antes de determinar que la longitud de onda óptima es de 200 nm.

El sistema de electroforesis capilar cuenta además con inyección electrocinética, por lo que se exploró la posibilidad de utilizar este tipo de inyección. Este tipo de inyección de muestra, no está recomendado para sustancias neutras, como es el caso de los analitos orgánicos utilizados; sin embargo los complejos metálicos al tener carga negativa podrían ser inyectados aplicando un voltaje negativo.

Al usar voltaje negativo, ningún residuo fue detectado, esto se piensa es debido al flujo electroosmótico, el cual al ir en dirección contraria y tener una movilidad mayor a los residuos analizados impide su introducción en el capilar. Debido a lo anterior se decidió cambiar la polaridad del voltaje de inyección a positivo; para que el flujo electroosmótico introduzca los residuos al capilar, bajo estas condiciones se logró la inyección de todos los residuos; por lo que se estudió este tipo de inyección fijando el tiempo en 20 segundos y

cambiando el voltaje de 1 kV a 10 kV (máximo permitido por el equipo), los resultados son muy semejantes a los obtenidos por inyección hidrodinámica caracterizados por una rápida pérdida de eficiencia y resolución para los residuos orgánicos, mientras que los residuos metálicos pueden ser inyectado en una mayor cantidad sin afectar la eficiencia del sistema (Fig. 28).

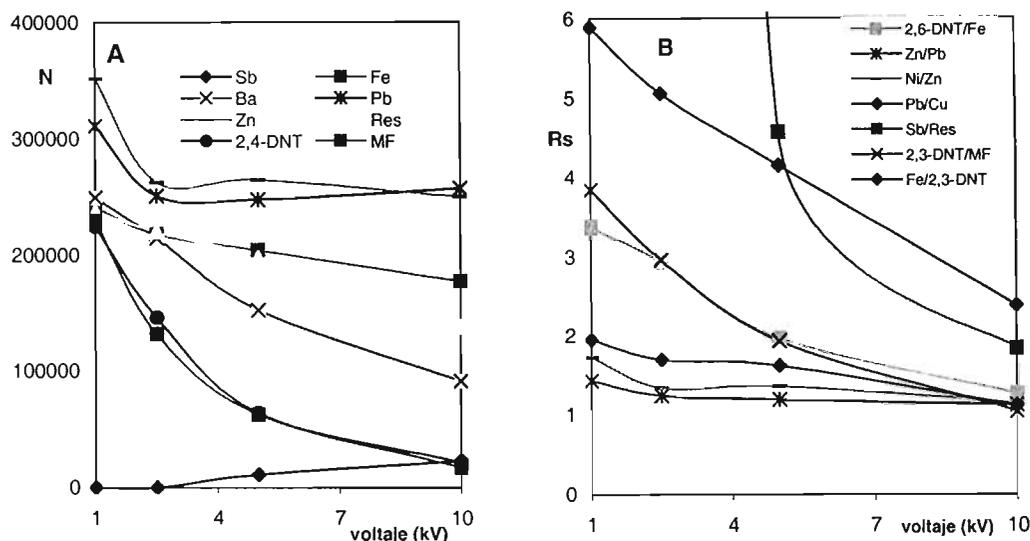


Figura 29 Efecto del voltaje de la inyección electrocinética en A.- Eficiencia y B.- Resolución de la separación. Electrolito soporte: 40 mM Boratos , 16 mM. SDS, 0.5 mM CDTA, pH= 9.2, capilar: 79.2 cm de longitud total, 69.0 cm, de longitud al detector, D.I. de 75 μ m, inyección electrocinética por 20 segundos. Detección UV a 214 nm*. Concentración de residuos (mg/L): Sb: 30, Resorcinol: 11.1, 2,4-DNT: 10.93, 2,6-DNT: 14.57, Fe: 10, 2,3-DNT: 18.2, MF: 6.0, Ba: 30, Ni: 20, Zn: 10, Pb: 10 y Cu: 20. * Experimentos realizados antes de determinar que la longitud de onda óptima es de 200 nm.

Se eligió utilizar en los siguientes experimentos la inyección hidrodinámica pues la inyección electrocinética es muy dependiente de la matriz [43], lo que la vuelve poco reproducible en muestras reales, además, la inyección electrocinética altera la composición de la muestra, cuando las sustancias se encuentran en ésta, en bajas concentraciones, lo que imposibilita inyectar varias veces una misma muestra.

1.5.3 Técnicas de preconcentración en línea

Una de las principales ventajas de la electroforesis capilar es poder aplicar técnicas de preconcentración en línea tales como apilamiento, isotacoforesis transiente y amplificación de campo. El apilamiento ocurre de manera natural al introducir la muestra en una disolución con menor fuerza iónica que el electrolito de corrida, entre mayor sea la diferencia, mayor será el apilamiento (Fig. 29).

En la figura 29 se puede ver que el efecto de apilamiento es visible en todos los residuos. Sin embargo, como la concentración del electrolito soporte determina la separación de los complejos metálicos, no es posible cambiarla, por lo que no se puede utilizar el fenómeno de apilamiento para mejorar los límites de detección. El único factor que se puede manipular es la concentración de boratos en la muestra, obteniéndose, el máximo de apilamiento cuando la muestra se prepara en agua.

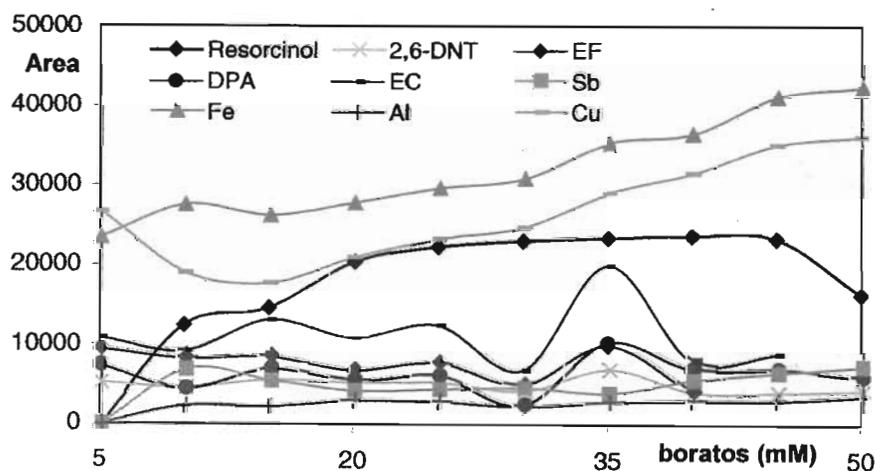


Figura 30 Apilamiento de algunos residuos a diferentes concentraciones de boratos. Electrolito soporte: 16 mM SDS, 0.5 mM CDTA, pH=9.2, capilar: 79.2 cm de longitud total, 69.0 cm, de longitud al detector, D.I. de 75 μ m, inyección Hidrodinámica: 3.45 kPa por 5 s. Detección UV a 214 nm. Concentración de residuos (mg/L): Sb: 30, Resorcinol: 11.1, 2,6-DNT: 14.57, Fe: 10, Al: 20, Cu: 20, EF: 17.78, DPA: 16.9 y EC: 22.56.

Sin embargo, con el apilamiento el aumento de la señal es marginal. Mediante la técnica de amplificación de campo se puede mejorar la señal hasta en tres órdenes de magnitud [32-34]. El principal problema de la amplificación de campo radica en que cuando se utiliza de manera convencional solo puede concentrar partículas con carga eléctrica.

Para realizar el estudio de amplificación de campo se llenó el 50% del capilar hidrodinámicamente con una solución patrón de 1 mg/l de metales y 10^{-5} M de residuos orgánicos, preparada en una solución 0.4 mM de boratos, 0.05 mM de CDTA, pH=9.2; Estas condiciones teóricamente proporcionan un factor de enriquecimiento de 100.

Como se esperaba, solamente se concentraron los analitos con carga eléctrica negativa (quelatos, resorcinol) en las condiciones manejadas (Tabla 20). Los residuos con menor movilidad se concentran mejor y los que tienen más movilidad como Sb-CDTA y resorcinol se concentran menos, debido a pérdidas durante el bombeo del agua fuera del capilar. Sin embargo, el aumento de la señal obtenida produce una pérdida en la resolución de algunos residuos y una consecuente pérdida en el factor de concentración obtenido (Ni-Zn, Zn-Pb). A pesar de esto, la concentración de campo podría ser una buena opción para detectar antimonio. Para estudiar esta posibilidad, se elaboraron curvas de calibración, de los residuos que se pueden concentrar y a partir de estas curvas, se calcularon los límites de detección (LD) en base a la ecuación $LD = X_b + 3se$. Cabe mencionar que el aumento en la señal obtenida no corresponde con una mejora equivalente en el límite de detección. Esto se debe a una mayor variabilidad en el método lo que aumenta el error de la correlación (se) y por lo tanto a un consiguiente aumento en el LD. En consecuencia la técnica de amplificación de campo tampoco proporciona, la sensibilidad necesaria para detectar la cantidad de antimonio presente en los residuos por disparar un arma de fuego.

Tabla 20 Grado de concentración obtenido por amplificación de campo

Sustancia	Sb	Rs	Fe	Ba	Ca	Al	Zn	Ni	Pb	Cu
Factor de concentración*	31.4	88.2	92.4	72.8	86.6	83	88.8	98.1	87.3	5.54
LD (mg/L)	1.745	0.346	0.04	0.373	0.093	0.199	0.142	0.080	0.087	0.035

* Respecto a inyección hidrodinámica 3.45 kPa por 5 segundos.

2.- Validación del Método analítico

Para efectuar la validación se realizaron los siguientes estudios [43]:

- a.- Selectividad
- b.- Reproducibilidad
- c.- Linealidad
- d.- Límites de detección y cuantificación.

2.1 Selectividad

La selectividad se estudió mediante el cálculo de la pureza de pico, por medio del detector de arreglo de diodos; para ello se obtuvieron espectros a 1/5 y 4/5 de cada pico y se compararon con un espectro obtenido en el cenit del pico, dado que la pureza del pico es mayor a 0.95 para todos los residuos podemos decir que cada pico corresponde a un analito (Tabla 21).

El detector de arreglo de diodos fue utilizado para obtener los espectros de todos los residuos bajo estudio (Fig. 30).

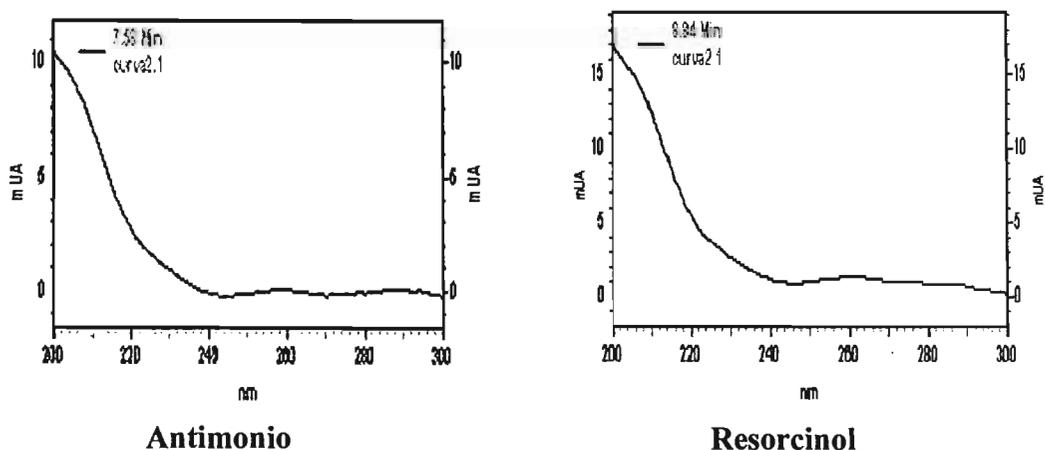


Figura 31 Espectros ultravioleta de los residuos orgánicos y los complejos metálicos detectados en las condiciones de separación (continua).

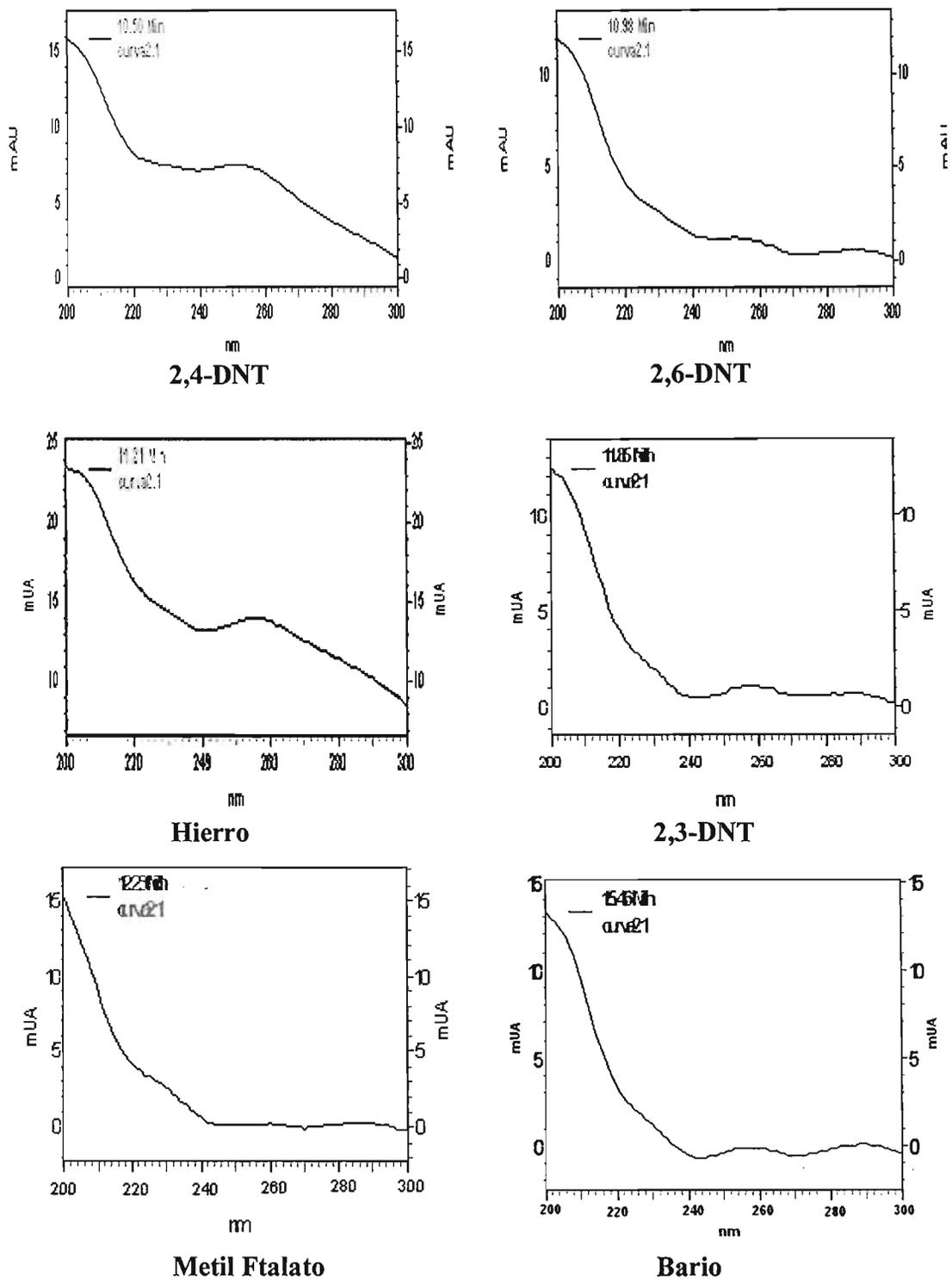
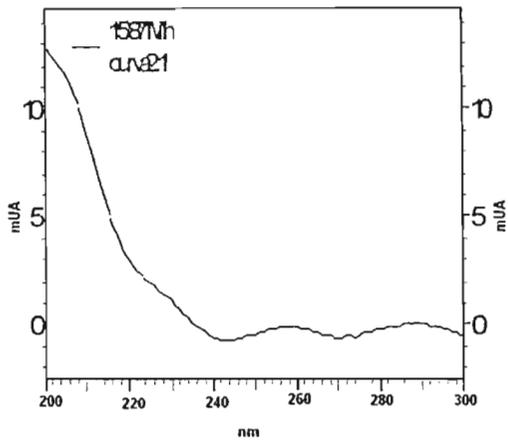
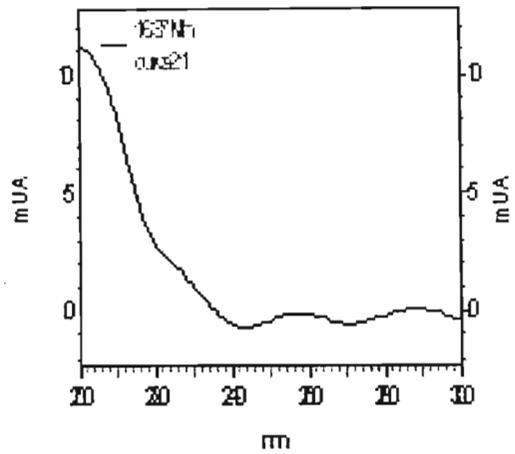


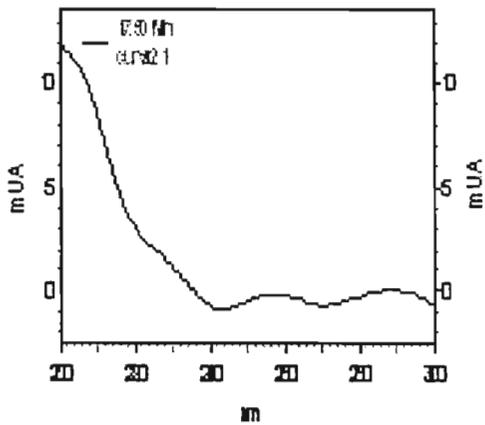
Figura 31 Espectros ultravioleta de los residuos orgánicos y los complejos metálicos en las condiciones de separación (continua).



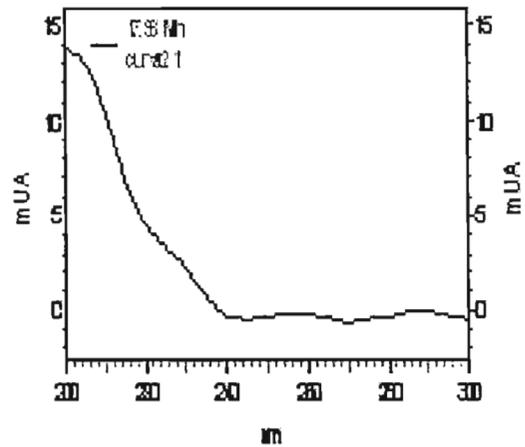
Calcio



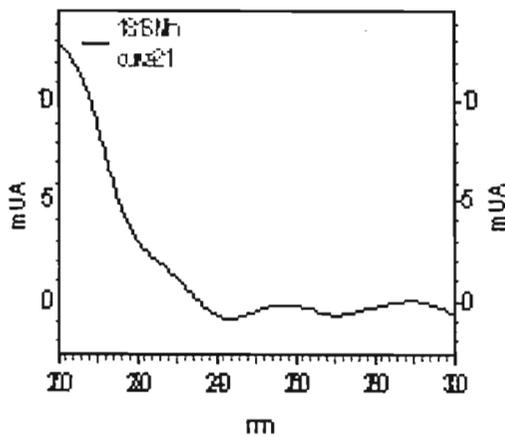
Magnesio



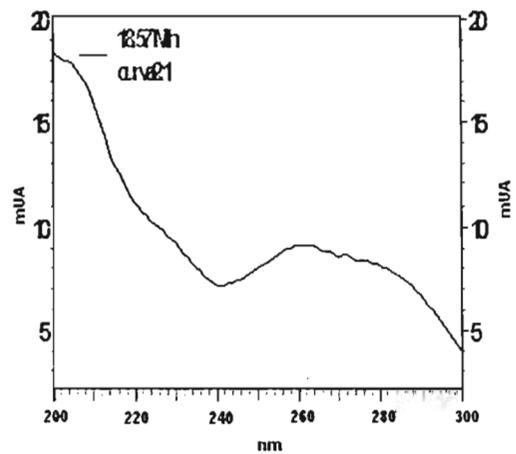
Aluminio



Níquel

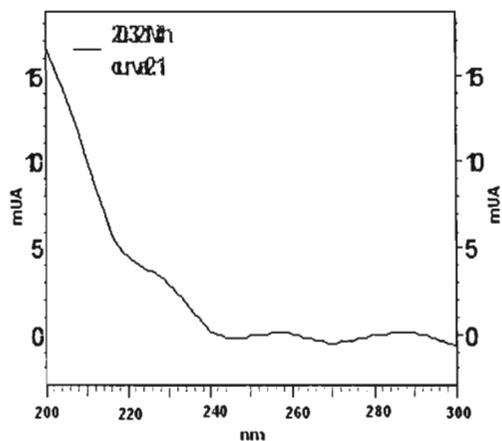


Zinc

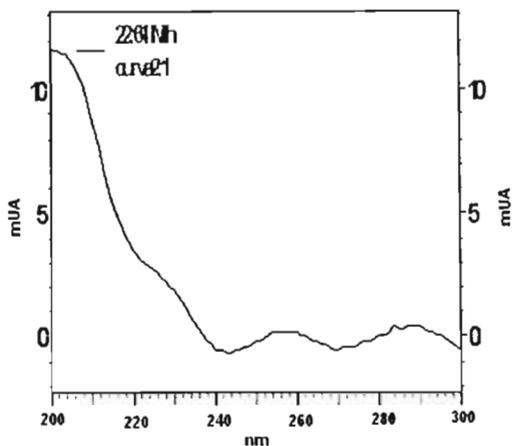


Cobre

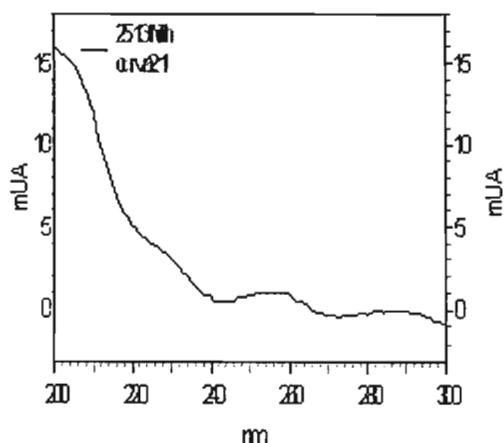
Figura 31 Espectros ultravioleta de los residuos orgánicos y los complejos metálicos en las condiciones de separación (continua).



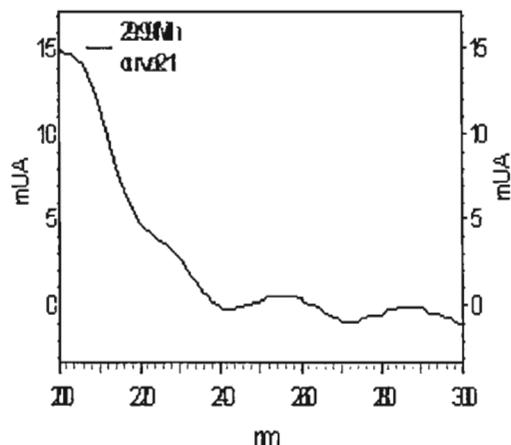
Etil Ftalato



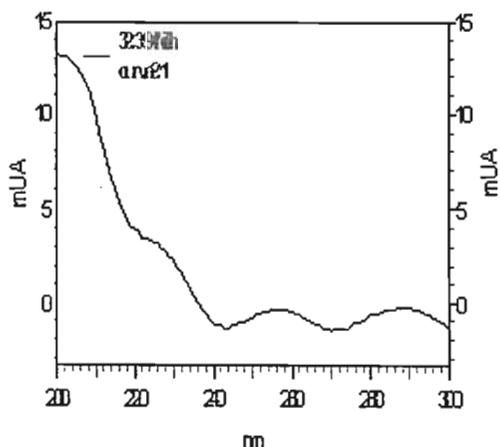
Difenilamina



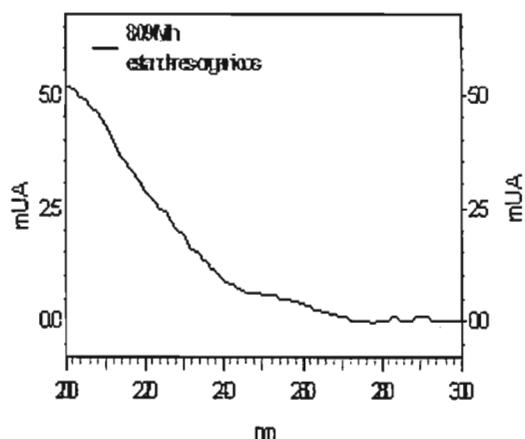
Metil Centralita



Etil Centralita

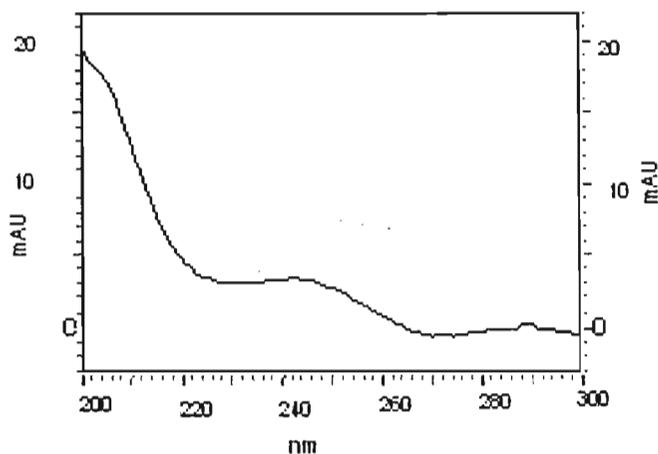


Butil Ftalato



Nitroglicerina

Figura 31 Espectros ultravioleta de los residuos orgánicos y los complejos metálicos en las condiciones de separación (continua).



Plomo

Figura 31 Espectros ultravioleta de los residuos orgánicos y los complejos metálicos en las condiciones de separación.

2.2 Reproducibilidad

Para estudiar la reproducibilidad del método, se inyectó el patrón de trabajo 6 veces el mismo día, el coeficiente de variabilidad obtenida en el tiempo de migración fue menor del 1% para todos los residuos y la reproducibilidad obtenida en cuanto al área fue menor al 5% para la mayoría de los residuos. Valores mayores se obtuvieron cuando la concentración utilizada de analito se encontraba cerca de su límite de detección o porque los picos aparecen en zonas donde se presentan fluctuaciones en la línea base (Tabla 21).

2.3. Linealidad, límites de detección y cuantificación del método.

Para realizar la cuantificación de los residuos es necesario estudiar la linealidad y los límites de detección del método, para ello se trazaron curvas de calibración de los distintos residuos a partir del patrón de trabajo. Se obtuvo una correlación mayor a 0.99 a lo largo de tres órdenes de magnitud para la mayoría de los residuos. Valores menores se deben a la poca reproducibilidad obtenida para algunos residuos por las causas antes descritas. Los valores de la ordenada al origen fueron cercanos a cero para la mayoría de los residuos con excepción de los complejos de antimonio y calcio. El primero se debe a

que se obtuvo un pico “coleado” el cual dificulta su integración a bajas concentraciones y el segundo presumiblemente se debe a la presencia de trazas de calcio en el agua “desionizada” utilizada.

Tabla 21 Selectividad y reproducibilidad del método (n=6).

ANALITO	TIEMPO DE MIGRACIÓN (MINUTOS)	$-\mu_E 10^{-5}$ (cm ² /s*V)	CV (%) TIEMPO	CV (%) AREA	PUREZA DE PICO
Sb	7.56	4.328	0,31	12,20	0.9999
Nitroglicerina	8.49	9.379	0.65	2.46	0.9984
Resorcinol	8.84	10.201	0.34	3.85	0.9959
2,4-DNT	10.51	15.743	0.27	5.37	0.9623
2,6- DNT	10.99	17.005	0.30	2.66	0.9980
Fe	11.22	17.576	0.25	2.28	0.9945
2,3- DNT	11.85	19.037	0.32	2.04	0.9897
Metil ftalato	12.22	19.824	0.33	1.66	0.9952
Ba	15.50	25.142	0.29	2.27	0.9995
Ca	15.92	25.657	0.29	1.78	0.9991
Mg	16.41	26.239	0.29	3.66	0.9998
Al	17.54	27.441	0.35	5.43	0.9999
Ni	18.03	27.916	0.33	1.62	0.9982
Zn	18.21	28.085	0.33	1.42	0.9994
Pb	18.38	28.241	0.34	1.34	0.9867
Cu	18.62	28.455	0.34	1.74	0.9768
Etil ftalato	20.34	29.852	0.52	1.95	0.9965
Difenilamina	22.66	31.395	0.52	17.95	0.9927
Metil centralita	25.18	32.751	0.65	5.08	0.9955
Etil centralita	30.13	34.754	0.73	8.62	0.9969
Butil ftalato	32.45	35.483	0.72	13.22	0.9997

Los límites de detección de los residuos se obtuvieron a partir de las curvas de calibración de cada residuo, al aplicar la formula $LD = X_b + 3\sigma$ [44].

Si se considera que las curvas de calibración tienen la formula general:

$$y = mx + b$$

Donde y representa la variable dependiente, x la variable independiente, m la pendiente de la curva de calibración y b la ordenada al origen, entonces X_b corresponde al valor de la ordenada al origen y σ es el error de la correlación (Se) el cual se calcula a partir de la curva de calibración mediante la formula:

$$Se^2 = \frac{\left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right) - \frac{[(\sum xy - \frac{(\sum y \sum x)}{n})]^2}{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n})}}{n-2}$$

Donde n es el número de niveles de calibración. Todos los cálculos se hicieron con un 95 % de confianza, usando de 5 a 6 niveles de calibración según el residuo.

Los límites de detección obtenidos se encuentran en el orden de cientos de microgramos por litro para la mayoría de los residuos (Tabla 22).

Los residuos más estudiados corresponden a plomo, bario y antimonio para los cuales se han determinado valores de corte utilizando EAA-ET; la media de estos valores de corte son de 0.5 mg/L para el plomo, 0.4 mg/L para el bario y 0.05 mg/L para el antimonio; la media del límite inferior de calibración es de 0.25 mg/L para bario y plomo y 0.02 mg/L para antimonio [4]; por tanto, el método desarrollado es adecuado para la cuantificación del plomo presente en los residuos dejados por disparar pero no para bario y antimonio. El valor buscado para bario puede obtenerse inyectando más muestra con la consiguiente pérdida en eficiencia para los residuos orgánicos. Para antimonio es necesario mejorar el límite de detección tres órdenes de magnitud por lo que se deben de aplicar una combinación de diversas técnicas de preconcentración en línea y fuera de línea.

Tabla 22 Parámetros relativos a la curva de calibración

Analito	m	b	r ²	LD (mg/L)
Sb	921 +/- 127	-11771 +/- 5704	0.9902	10.942
Nitroglicerina	3312 +/- 299	4118 +/- 2041	0,9975	1,299
Resorcinol	2518 +/- 68	89 +/- 375	0.9997	0.109
2,4-DNT	2969 +/- 391	-966 +/- 3033	0.9981	0.702
2,6 DNT	1262 +/- 67	-143 +/- 1044	0.9985	1.770
Fe	4032 +/- 48.5	445 +/- 301	0.9999	0.110
2,3- DNT	1887 +/- 191	-1933 +/- 3309	0.9970	2.782
Metil ftalato	3654 +/- 124	-45 +/- 632	0.9994	0.361
Ba	577 +/- 18	-4 +/- 323	0.9995	0.845
Ca	720 +/- 50	1844 +/- 663	0.9975	1.264
Mg	370 +/- 20	353 +/- 264	0.9985	0.980
Al	737 +/- 17	369 +/- 233	0.9997	0.434
Ni	1087 +/- 34	58 +/- 447	0.9994	0.565
Zn	1600 +/- 65	-23 +/- 407	0.9991	0.370
Pb	5090 +/- 103	39 +/- 606	0.9998	0.186
Cu	2241 +/- 71	438 +/- 928	0.9995	0.576
Etil Ftalato	4798 +/- 179	79 +/- 1804	0.9992	0.455
Difenilamina	7308 +/- 678	1293 +/- 8277	0.9975	2.387
Metil Centralita	5852 +/- 246	266 +/- 1223	0.9990	0.553
Etil Centralita	5363 +/- 204	-488 +/- 2502	0.9992	0.561
Butil Ftalato	2797 +/- 2515.6	-4567 +/- 15011	0.940	4.083

2.4 Robustez

Existen diferentes factores que pueden afectar la determinación de los residuos, entre los factores más importantes están aquellos derivados de la matriz, se observó que cambios en la viscosidad de las muestras (ej. muestras concentradas), llevan a cambios en la cantidad de muestra introducida al sistema [39] y en los tiempos de retención obtenidos; este efecto se vuelve notorio cuando la muestra se concentra y por tanto, su composición es muy diferente a la de las soluciones patrón; se ha reportado [45], para el caso de los residuos orgánicos, que estos cambios son superados mediante una calibración con estándar interno.

Otro problema puede ocurrir cuando la cantidad total de metal en la muestra supera la cantidad de CDTA utilizado para realizar la complejación precapilar. Para estudiar este efecto, se adicionó a la solución patrón cantidades crecientes de algunos metales ampliamente distribuidos en la naturaleza. Para el caso de calcio se pudo analizar concentraciones de calcio de hasta 300 mg/L, sin presentarse un efecto negativo sobre los demás residuos metálicos, por encima de este valor se observa la progresiva desaparición de la señal de bario. En el caso de metales como hierro y plomo, puede realizarse la determinación de todos los residuos, sin problemas hasta un valor de 200 mg/L, por encima de esta cantidad, se observa la desaparición del pico de bario, junto con la aparición de un pico a 13.5 minutos para el caso del hierro, o para el caso del plomo, un cambio en la forma del pico de bario.

Un factor que puede observarse a concentraciones menores es la pérdida de la resolución obtenida, entre varios pares de picos, principalmente el par zinc, plomo, en este caso concentraciones de 60 mg/L de cualquiera de los dos metales, lleva a una pérdida en la resolución entre ambos picos y por tanto, a errores en la cuantificación. Otros factores que pueden afectar la cuantificación se discutirán más adelante.

3.- Aplicación

Antes de aplicar el método desarrollado al estudio de muestras reales es necesario optimizar la toma de muestra, de entre las distintas tomas de muestras de los residuos, se escogió la toma de muestras por frotamiento y por cinta adhesiva ya que son las técnicas más utilizadas para el análisis de los residuos por MEB-DEX y EAA-ET.

3.1 Toma de Muestra

Para optimizar la toma de muestra se estudiaron las recuperaciones obtenidas por medio de la técnica de frotamiento y por la técnica de cinta adhesiva. Para estudiar la primera se colocaron en la mano, 50 μg de algunos de los residuos y se calculó la recuperación bajo distintos disolventes de acuerdo a la metodología explicada en materiales y métodos [12]. Para estudiar la toma de muestra por medio de cinta adhesiva se aplicaron 10 μg de algunos residuos en la mano y se calculó la recuperación obtenida al utilizar distintos disolventes orgánicos [1, 6, 26].

En el caso de la técnica de frotamiento las mejores recuperaciones se encontraron cuando se utilizó CDTA 5 mM con SDS 12.5 mM como disolvente para embeber la tela de frotamiento y para realizar la lixiviación (Tabla 23).

Trabajos anteriores mencionan a la acetona como el mejor disolvente para extraer los residuos orgánicos por la técnica de frotamiento, seguida de agua, ciclohexano, etanol, solución reguladora y detergente [12]. Sin embargo, en este trabajo se obtuvo mejor resultado con la combinación de agente complejante y detergente, sobre todo cuando se utiliza como disolvente en la sonicación. Para el estudio de metales por EAA-ET se suele utilizar ácido nítrico al 2 % para recuperar los residuos metálicos, pero se encontró que el ácido nítrico reacciona con los residuos orgánicos por lo que su uso no es recomendado. El agua por sí sola no extrae los residuos metálicos, pero al incorporar CDTA y SDS se mejora la recuperación de los metales.

Tabla 23 Porcentaje de Recuperación de los residuos dejados por disparar una arma de fuego por la técnica de frotamiento.

TOMA DE MUESTRA		ETIL	2,3-	ETIL	Fe	Pb	Ba
Toma	Sonicar	FTALATO	DNT	CENTRALITA			
H ₂ O	H ₂ O	19	13	-	-	7	-
H ₂ O	CDTA	15.0	14.5	2	16	17	15
HNO ₃	CDTA	20	17.6	-	18	32	10
HNO ₃	HNO ₃	-	-	-	12	14	8
CDTA	CDTA	22	18.6	2	12.6	25	10
CDTA- SDS	CDTA	17.5	9.5	1	17	36	7
CDTA-SDS	CDTA-SDS	60	-	105	47	29	92
CDTA	CDTA-SDS	47	-	110	34	33	99
HNO ₃	CDTA-SDS	77	-	144	22	17	5
Acetona	Acetona	8.8	1.7	3.5	2.2	-	-

Respecto a la técnica de cinta adhesiva, la extracción con metanol consigue buenas recuperaciones tanto para los residuos orgánicos como para los inorgánicos (Tabla 24).

En la técnica por cinta adhesiva, no se recuperaron residuos al utilizar acetonitrilo como disolvente. Cuando se utilizó cloroformo se obtuvieron buenas recuperaciones para los residuos inorgánicos, pero no con los orgánicos, esto se debe a que el cloroformo disuelve el pegamento de la cinta adhesiva, lo que garantiza recuperaciones óptimas para los residuos hidrofílicos, pero al evaporar la muestra el pegamento vuelve a solidificarse atrapando a los residuos orgánicos; el metanol recupera ambos tipos de residuo por lo que se utilizará para la toma de muestra (Tabla 24). Con esta toma de muestra se identificaron más sustancias interferentes (aluminio y butil ftalato) que con la técnica de frotamiento, sin embargo, esta técnica permite concentrar la muestra dentro de su procedimiento.

En situaciones reales, la mano de un sospechoso, puede estar contaminada con diversas sustancias, como sangre, crema de manos, grasa, etc. Por lo que se estudio el efecto de dichas sustancias, sobre la recuperación de los residuos por ambas técnicas (Tabla 25).

Tabla 24 Recuperación (μg) de los residuos dejados por disparar un arma de fuego por la técnica de cinta adhesiva.

TOMA DE MUESTRA	ACETONITRILO		METANOL		CLOROFORMO	
	-	+	-	+	-	+
Sb	-	-	-	-	-	-
Fe	-	-	0.092	0.627	0.048	1.251
Pb	-	-	-	1.341	-	1.963
Cu	-	-	0.142	1.248	0.250	4.494
Ba	-	-	-	1.160	-	2.118
Nitroglicerina	-	-	-	1.769	-	-
23- DNT	-	-	-	1.972	-	0.938
Etil ftalato	-	-	-	5.089	-	0.465
Difenil Amina	-	-	-	1.527	-	-
Etil Centralita	-	-	-	5.075	-	-

Cantidad aplicada: residuos inorgánicos y Nitroglicerina 10 μg , 2,3-DNT 18.2 μg , Etil ftalato 22.2 μg , Difenil amina 16.9 μg , etil centralita 26.8 μg .

Tabla 25 Efecto de diversos contaminantes, en el porcentaje de recuperación de las toma de muestra.

	Toma de Muestra	Ba	Fe	Pb	Ng	2,4-DNT	EF	DPA	EC
Mano limpia	Frotamiento	51.2	40.6	47.2	0	4.6	21	2.8	23.5
	Cinta adhesiva	11.6	6.3	13.4	17.7	10.8	22.9	5.2	14.8
Mano con crema	Frotamiento	27.3	30.2	32.7	0	5.9	31	12	53.1
	Cinta adhesiva	11.2	6.2	9.2	0	0	0	0	0
Mano con aceite	Frotamiento	8.7	24.6	17.6	2.3	4.6	24	0	22.3
	Cinta adhesiva	0	12.2	15	0	0	4.6	0	15.2
Mano con sangre	Frotamiento	13.2	20.7	21.5	3.6	4.7	21.6	23	21.9
	Cinta adhesiva	0	8.4	17.3	0	0	14.5	0	12.5

En los electroferogramas de muestras contaminadas con sangre y con crema tomadas con la técnica de frotamiento, se observaron picos no identificados, diferentes a los encontrados en una mano limpia, sin embargo, ninguno interfirió con la determinación de los residuos buscados. La presencia de los distintos contaminantes probados tuvo un efecto adverso para la recuperación de los residuos metálicos, no así para los orgánicos, que

tuvieron recuperaciones similares, a excepción de la mano contaminada con crema, donde al parecer este contaminante ayudo a la recuperación de los residuos orgánicos.

Las muestras tomadas por cinta adhesiva mostraron recuperaciones menores, a las tomadas por frotamiento, además de ser más afectadas por la presencia de contaminantes, estos dificultan la toma de muestra, al impedir que la cinta adhesiva se adhiera a la zona de muestreo, lo anterior coincide con un estudio previo [11], donde se encontró que la sangre impide la recuperación de los residuos de muestras de tela. Otro problema observado, es el cambio en los tiempos de retención de los residuos, producido por la concentración de la muestra y el consecuente cambio en la matriz; esto hace necesario el uso de un estándar interno, para realizar la calibración.

En ambos casos se busca obtener las mejores recuperaciones y los mejores límites de detección por lo que en ambos casos se aplicarán técnicas de preconcentración ya sea eliminando el disolvente por evaporación o por medio de técnicas de extracción.

3.2 Posibilidad de contaminación ambiental y ocupacional

Como se ha mencionado, uno de los principales problemas dentro del análisis de los residuos, sobre todo los metálicos, es la posibilidad de contaminación ambiental y ocupacional. Para ello, mediante la toma de muestra por frotamiento y el método de electroforesis capilar desarrollado, se estudió la presencia de residuos en las manos (dorso y palma), así como de una zona de la piel no expuesta al medio ambiente (blanco), de personas con diferentes actividades, se hizo énfasis en personas con ocupaciones consideradas como de alto riesgo de contaminación para el análisis de residuos metálicos (Tabla 26). Los residuos orgánicos, al estar menos distribuidos en la naturaleza, tienen menos posibilidad de sufrir contaminación, por lo que su presencia puede ser más concluyente con el hecho de haber disparado una arma de fuego.

De los resultados anteriores se puede concluir que el análisis de los residuos metálicos (plomo, bario y antimonio) es susceptible a la contaminación ambiental lo que hace difícil su aplicación en personas con ocupaciones que impliquen el uso de metales. Sin

embargo, en ninguna de las muestras analizadas se encontró la presencia de los residuos orgánicos más importantes (Nitroglicerina, centralitas, difenilamina). Esto puede ser resultado de que el límite de detección del método es insuficiente para detectarlos pero también puede ser, como se indica en el trabajo de Northrop [26], a que su uso esta circunscrito a industrias muy especializadas; por lo que su presencia en personas que no han accionado un arma es mínima; en consecuencia, su sola presencia sería un mejor indicador de haber disparado un arma y aumentaría la especificidad del análisis.

Tabla 26 Presencia de residuos en personas que no han disparado un arma. Muestras tomadas mediante la técnica de frotamiento.

TRABAJO	MUESTRA	Residuos Encontrados (mg/L)										
		Fe	2,3 - DNT	Ba	Ca	Mg	Al	Zn	Pb	Cu	EF	DFA
Secretaria	Blanco	1,229	-	-	27,122	-	0,274	0,611	-	0,493	0,513	-
	Palmar	1,605	-	-	27,814	-	-	0,747	-	1,839	0,933	-
	Dorsal	0,767	-	-	33,469	-	-	1,099	-	0,892	0,802	-
Pintor	Blanco	2,314	-	-	25,749	-	1,009	2,429	-	2,232	0,459	0,866
	Palmar	2,689	-	-	15,670	-	0,976	1,132	-	0,907	0,521	-
	Dorsal	2,679	-	-	15,852	-	0,435	1,214	-	0,811	0,603	-
Montador de Anuncios	Blanco	6,984	-	-	36,879	-	1,490	2,236	-	8,355	0,882	0,785
	Palmar	9,762	-	-	90,654	-	5,212	10,008	1,795	10,034	-	-
	Dorsal	26,820	2,387	-	99,943	-	7,966	7,555	1,290	16,326	0,697	-
Impresor	Blanco	1,667	-	-	23,980	-	-	0,518	-	1,148	0,799	-
	Palmar	4,310	-	-	41,411	-	-	1,237	0,181	5,172	-	-
	Dorsal	3,615	-	-	41,424	-	-	1,131	0,133	4,497	0,948	-
Soldador	Blanco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Palmar	25,953	-	5,381	105,966	-	1,718	18,177	1,340	6,238	0,601	0,732
	Dorsal	42,532	-	6,534	83,117	-	-	4,994	-	3,634	-	-
Repartidor de metales	Blanco	4,460	-	-	15,892	-	-	0,500	0,352	0,816	0,830	-
	Palmar	56,611	6,422	9,882	41,139	-	3,895	1,406	0,151	4,441	0,767	-
	Dorsal	21,202	-	2,303	40,168	-	1,470	1,112	0,133	4,835	0,849	1,287
Policía	Blanco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Palmar	4,938	-	-	40,184	-	-	1,846	0,128	4,806	0,892	-
	Dorsal	2,250	-	-	51,657	-	-	1,088	0,231	9,368	0,824	-
Químico	Blanco	-	-	-	96,669	-	2,883	5,751	0,322	-	0,576	-
	Palmar	0,111	-	-	77,397	-	-	4,569	0,152	-	0,663	-
	Dorsal	0,196	-	-	109,331	-	3,056	7,41	0,321	-	-	-
Electricista	Blanco	7,104	-	-	33,179	3,759	1,440	0,990	0,138	1,822	0,821	1,099
	Palmar	32,5	3,168	12,334	72,812	16,631	7,271	-	1,520	7,539	0,552	2,322
	Dorsal	31,232	2,554	11,061	50,969	14,352	7,034	5,195	3,648	0,744	-	1,453

El análisis de estas muestras, junto con el estudio, sobre el efecto de diversos contaminantes sobre la toma de muestra, proporciona información acerca de que residuos pueden estar presentes en condiciones normales y de posibles interferencias en el análisis; en la mayoría de las muestras analizadas se encontró la presencia de calcio, hierro y magnesio y se encontraron interferencias que afectan la cuantificación e identificación de magnesio, calcio y cobre. La interferencia que afecta al cobre puede ser eliminada con la ayuda del detector de arreglo de diodos realizando la cuantificación a 254 nm donde se encontró que esta no absorbe. Los demás residuos no fueron afectados. En la técnica por cinta adhesiva se obtuvieron resultados semejantes con la excepción de la presencia de butil ftalato y aluminio provenientes de la cinta adhesiva.

3.3. Análisis de muestras reales

Bajo las condiciones anteriores se analizaron muestras provenientes de disparos de las zonas de maculación (dorsal), de la zona palmar y de un blanco (zona de la piel donde no hubo maculación), del cartucho y de ser posible de donde incidió el disparo.

Las armas utilizadas para realizar los ensayos son:

- Revólver Orbea Hnos. Calibre 32 mm., munición Fiocchi Smith & Wesson,
- Revólver Smith & Wesson calibre 38 mm., munición El Aguila
- Pistola de 22 mm con cartuchos El Aguila.

Se tomaron muestras después de un disparo y a los tres disparos, cuando fue posible. Las muestras fueron tomadas por medio de las técnicas de frotamiento y cinta adhesiva, con el fin de encontrar las más apropiada.

3.3.1.1 Análisis de muestras reales tomadas por la técnica de frotamiento

Se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 27) por la técnica de frotamiento (Fig. 31-34).

En el caso de la determinación de los metales alcalino y alcalinotérreos en la muestra provenientes de los cartuchos, se observó que la cantidad de CDTA utilizada para complejar los metales fue insuficiente, lo que provocó que los complejos de estos metales se perdieran dentro del capilar y con ello impidió su determinación, esto se debe a que la muestra tiene más iones metálicos que las provenientes de las manos por lo que si se requiere hacer el análisis de los metales del cartucho es necesario realizar la lixiviación en una solución más concentrada de CDTA; de cualquier manera, ninguna de las muestras provenientes de la mano presentó este comportamiento.

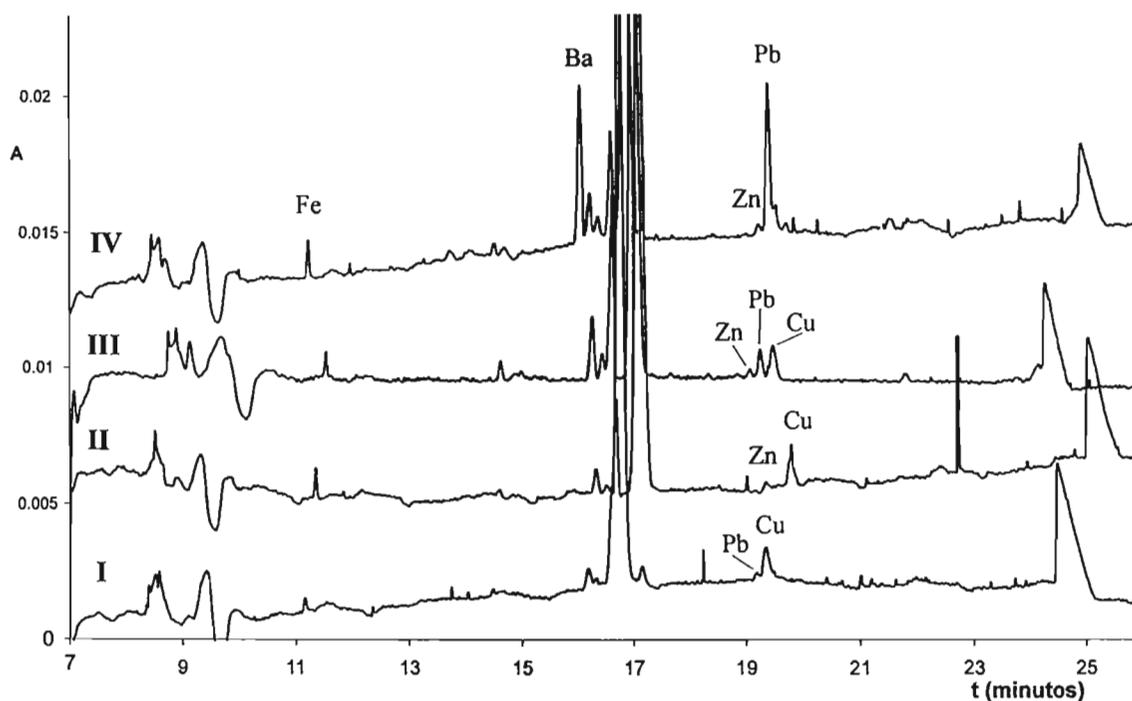


Figura 32 Electroferogramas bajo condiciones óptimas provenientes del análisis de muestras de disparo de un arma Orbea Hnos. calibre 32 mm. I.- Blanco, II.- Palmar, III.- Dorsal un disparo, IV.- Dorsal tres disparos. Toma de muestra por frotamiento. Electrolito soporte: 40 mM Boratos, 16 mM SDS, 0.5 mM CDTA, pH= 9.2, capilar: L de 79.2 cm, longitud al detector (l) de 69.0 cm, D.I. de 75 μ m, inyección Hidrodinámica: 3.45 kPa por 5 segundos. Detección UV a 200 nm.

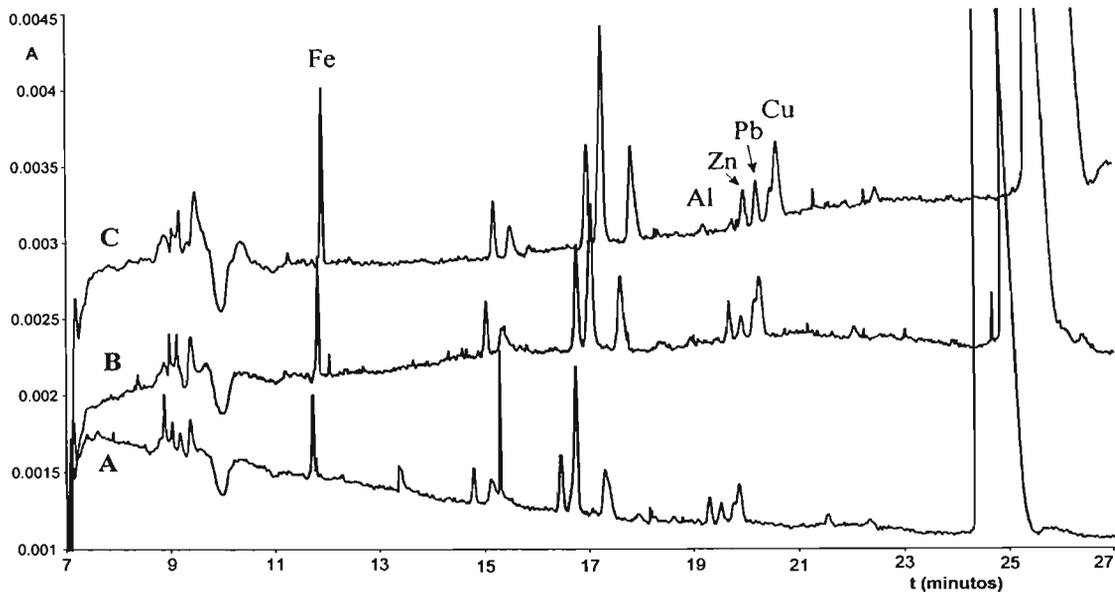


Figura 33 Electroferogramas bajo condiciones óptimas provenientes del análisis de muestras de disparo de un arma Smith & Wesson calibre 38 mm. A.- Blanco, B.- Palmar, C.- Dorsal un disparo. Toma de muestra por frotamiento. Electrolito soporte: 40 mM Boratos, 16 mM SDS, 0.5 mM CDTA, pH= 9.2, capilar: L de 79.2 cm, l de 69.0 cm, D.I. de 75 μ m, inyección Hidrodinámica: 3.45 kPa por 5 segundos. Detección UV a 200 nm.

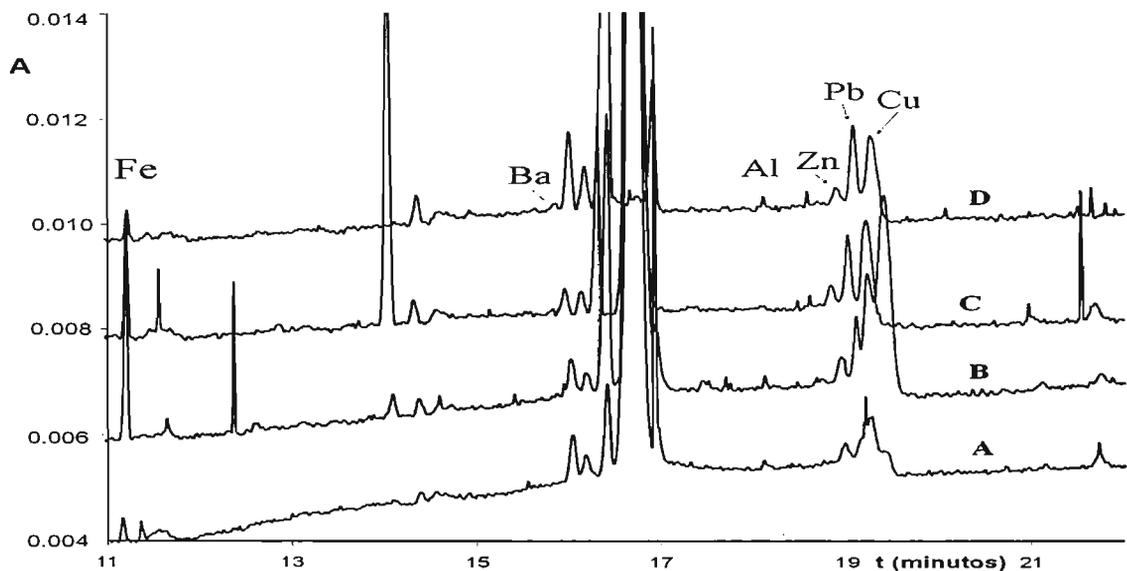


Figura 34 Electroferogramas bajo condiciones óptimas provenientes del análisis de muestras de disparo de un revólver. calibre 22 mm. A.- Blanco, B.- Palmar, C.- Dorsal un disparo, D.- Dorsal tres disparos. Toma de muestra por frotamiento. Electrolito soporte: 40 mM Boratos, 16 mM SDS, 0.5 mM CDTA, pH= 9.2, capilar: L de 79.2 cm, l de 69.0 cm, D.I. de 75 μ m, inyección Hidrodinámica: 3.45 kPa por 5 segundos. Detección UV a 200 nm.

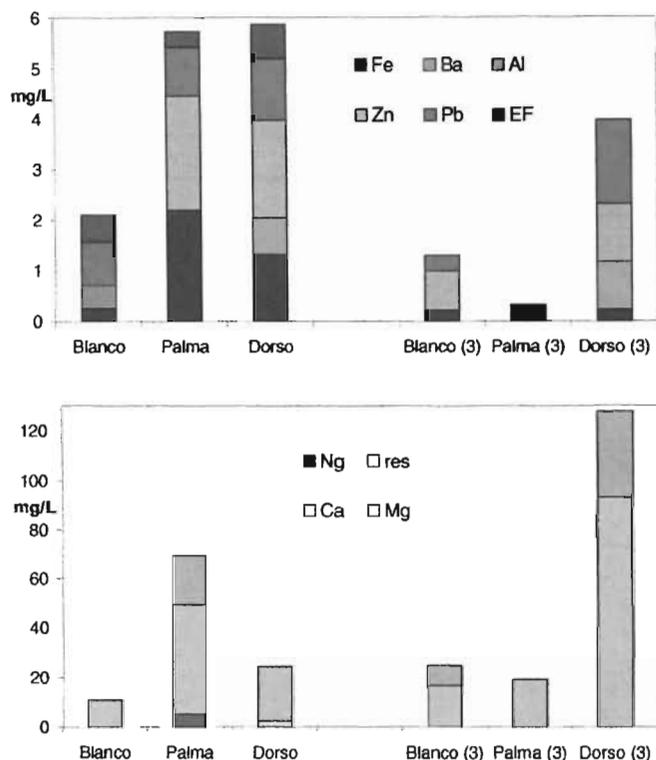


Figura 35 Resultado del análisis de dos ensayos provenientes de dos disparos de una pistola 22 mm tomadas por la técnica de frotamiento. El número de disparos realizados antes de tomar las respectivas muestras se encuentra indicado entre paréntesis.

Estas mismas muestras fueron analizadas mediante la técnica más aceptada por las procuradurías de México, EAA-ET para la determinación de plomo bario y antimonio, los resultados obtenidos se compararon por las dos técnicas por medio de un estudio estadístico (Tabla 28), para saber si existe una diferencia significativa entre las dos técnicas y entre las distintas regiones de la mano analizadas; pues los residuos se depositan preferentemente en el dorso de la mano. Sin embargo, en el caso de bario no fue posible realizar esta comparación, debido a que la técnica de electroforesis capilar no tiene los límites de detección adecuados para su determinación; la comparación de antimonio entre las dos técnicas, no se realizó por las mismas causa y porque el volumen obtenido dificulta su análisis por medio espectroscopía de absorción atómica por generación de hidruros (EAA-GH).

Tabla 27 Análisis de residuos encontrados en cartuchos y en personas que dispararon un revólver 38 mm (n = 9-10).

Residuo (mg/L)	Blanco n=10		Palma n=9		Dorso n=9		Cartucho n=9	
	x	CV	x	CV	x	CV	x	CV
Sb	-	-	-	-	-	-	-	-
Ng	-	-	-	-	-	-	7.213 (66%)	59.6
res	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4- DNT	-	-	-	-	-	-	-	-
2,6- DNT	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe	0.511 (100%)	48.4	0.629 (100%)	63.3	0.613 (100%)	46.4	0.365 (100%)	61.9
2,3- DNT	-	-	-	-	-	-	-	-
MF	-	-	-	-	-	-	-	-
Ba	-	-	-	-	-	-	ND	-
Ca	16.794 (100%)	44.6	32.043 (100%)	32.2	32.046 (100%)	24.2	ND	-
Mg	-	-	-	-	-	-	ND	-
Al	1.629 (60%)	84.3	0.814 (78%)	83.0	0.63 (44%)	126.3	15.833 (100%)	65.6
Ni	-	-	-	-	-	-	-	-
Zn	2.172 (100%)	30.4	2.174 (100%)	12.6	2.070 (100%)	26.7	4.290 (100%)	37.0
Pb	0.498 (100%)	41.7	0.703 (100%)	44.0	0.810 (100%)	40.9	35.735 (100%)	12.1
EF	-	-	-	-	0.49 (22%)	-	2.107 (100%)	61.2
DPA	-	-	-	-	-	-	-	-
MC	-	-	-	-	-	-	-	-
EC	-	-	-	-	-	-	16.138 (100%)	34.1
BF	-	-	-	-	-	-	-	-

Números entre paréntesis indican la frecuencia de depósito.

ND: No determinado.

Tabla 28 Comparación estadística de la determinación de plomo (mg/L) provenientes de disparos de un revólver 38 mm de distintas partes de la mano por EC y EAA-ET.

	Cuenta	Promedio	Varianza	desviación estándar
Blanco EC	9	0.497778	0.0485579	0.220359
Palma EC	8	0.70325	0.109313	0.330625
Dorso EC	9	0.809889	0.123247	0.351065
Blanco EAA-ET	10	0.5181	0.0703628	0.26526
Palma EAA-ET	8	0.831375	0.182397	0.42708
Dorso EAAET	9	0.975111	0.120791	0.34755
		Lectura Mínima	Lectura Máxima	Intervalo
Blanco EC		0.205	0.815	0.61
Palma EC		0.284	1.159	0.875
Dorso EC		0.512	1.502	0.99
Blanco EAA-ET		0.11	1.026	0.916
Palma EAA-ET		0.321	1.781	1.46
Dorso EAA-ET		0.661	1.799	1.138

Tabla ANOVA (Nivel de confianza del 95%)

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Df	cuadrados principales	F-Radio	Valor P
Entre grupos	1.61155	5	0.32231	3.02	0.0191
En grupos	5.016	44	0.106723		
Total (Corr.)	6.62755	52			

Dado que el valor P de la prueba F es menor a 0.05 existe una diferencia estadística entre las medias de los seis grupos con un 95 % de confiabilidad. Para determinar cuales grupos son diferentes es necesario aplicar una prueba de intervalos múltiples

Prueba de intervalos múltiples

Método: Menor diferencia significativa de Fisher (95%)

	Cuenta	Media	Grupos Homogéneos
Blanco EC	9	0.497778	X
Blanco EAA-ET	10	0.5181	XX
Palma EC	8	0.70325	XXX
Palma EAA-ET	8	0.831375	X
Dorso EC	9	0.809889	XX
Dorso EAA-ET	9	0.975111	X

Continua.....

Contraste	Diferencia	Limites +/-
Blanco EC – Palma EC	-0.205472	0.319346
Blanco EC – Dorso EC	*-0.312111	0.309811
Blanco EC - Blanco EAA-ET	-0.0203222	0.301966
Palma EC – Dorso EC	-0.106639	0.319346
Palma EC – Palma EAA-ET	-0.128125	0.328604
Dorso EC - Dorso EAA-ET	-0.165222	0.309811
Blanco EAA-ET–Palma EAA-ET	*-0.313275	0.311741
Blanco EAA-ET- Dorso EAA-ET	*-0.457011	0.301966
Palma EAA-ET–Dorso EAA-ET	-0.143736	0.319346

* Indica una diferencia estadística significativa

La primera parte de la tabla 28 muestra la estadística univariable para la determinación del plomo depositado por disparar un revólver calibre 38 mm, en distintas zonas de la mano (blanco, palma que efectuó el disparo y dorso de la mano que efectuó el disparo), analizadas por EC y EAA-ET, los valores de la media obtenidos para una misma zona por EAA-ET son ligeramente mayores a los obtenidos, para las mismas zonas por EC (Fig. 35), así mismo, se encontró una mayor cantidad de plomo en el dorso de la mano que accionó el arma, seguido del encontrado en la palma que efectuó el disparo, mientras que la cantidad presente en los blancos realizados fue menor, esto coincide con el patrón esperado. La dispersión de las mediciones provenientes de palma y dorso fue muy semejantes para ambas técnicas, y mayor a la dispersión de las medidas de los blancos (Fig. 35), esto puede deberse a que a la dispersión de la cantidad de plomo presente en los blancos, se agrega la dispersión del plomo depositado al disparar un arma.

Para determinar, si la cantidad encontrada en las distintas zonas de la mano y por diferentes técnicas es igual o diferente, se realizó un análisis de varianza de los seis grupos muestreados, el cual se encuentra en la segunda parte de la tabla 28, este dio como resultado que los grupos analizados no presentan la misma media; para determinar que grupo presenta un media diferente se realizó un análisis de intervalos múltiples, el cual aparece en la última parte de la tabla 28, este muestra la presencia de tres grupos homogéneos, estos grupos se caracterizan por tener la misma media con un 95 % de confianza; se identifico que la cantidad de plomo encontrada en el dorso de la mano que

disparó un arma, tanto por EC y EAA-ET, es significativamente mayor, a la presente en sus respectivos blancos, está diferencia se debe al plomo depositado como resultado de accionar un revólver calibre 38 mm, por tanto, el plomo es un buen indicador de haber disparado este tipo de arma, sin embargo no se encontró diferencia entre la cantidad depositada entre el dorso y la palma por ninguna de las dos técnicas; esto último puede ser importante para implementar la toma de muestra ya que sería posible tomar los residuos de toda la mano en vez de dividirla en secciones.

Por otro lado, no se encontró una diferencia significativa entre los resultados obtenidos para el análisis de plomo generado por disparar un arma de fuego por EC y EAA-ET, para ninguna de las zonas de la mano estudiadas. Por lo que es indistinto utilizar la EC y EAA-ET para el análisis de plomo proveniente de disparar un arma.

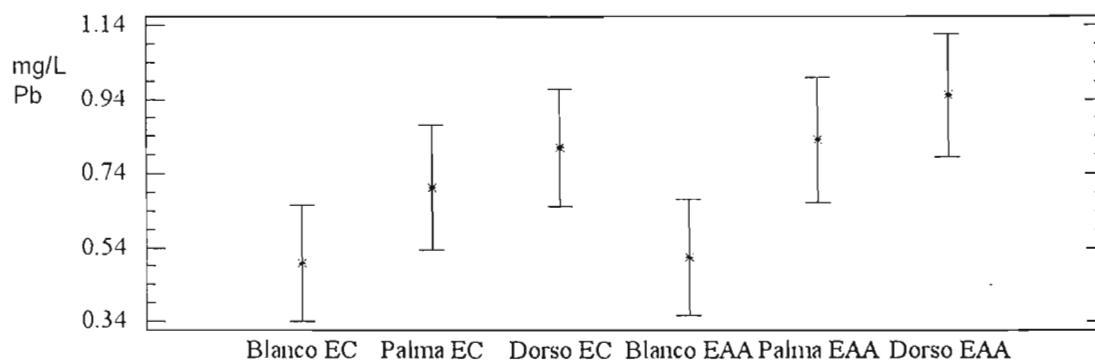


Figura 36 Medias (asterisco) e intervalos al 95% de menor diferencia significativa (líneas) para la determinación de plomo depositado por efectuar un disparo con un revólver calibre 38 mm en distintas partes de la mano por EAA-ET y EC.

Este mismo comportamiento se encontró con otros residuos metálicos tales como calcio (Fig. 36), por lo que podría utilizarse como indicador de disparar un arma una arma de fuego, bajo las condiciones utilizadas, además de plomo, bario y antimonio; en otros residuos como zinc y hierro no se encontró una diferencia estadística entre las tres regiones analizadas lo que indica que no hay relación entre la cantidad encontrada y el haber disparado un arma. Residuos como aluminio, níquel y magnesio no fueron detectados en

todas las muestras independientemente de la región de la mano analizada por lo que su presencia tampoco guarda relación con el hecho de disparar un revólver 38 mm.

Por último a pesar de que bario y antimonio se sabe que sí guardan relación con disparar un arma de fuego, no fueron detectados por encontrarse en una cantidad por debajo del límite de detección del método en el caso del revólver 38 mm. Sin embargo, fue detectado bario en muestras provenientes del dorso de la mano de personas que dispararon una pistola 22 mm, esto puede deberse a diferencias en la composición de los iniciadores de los cartuchos utilizados

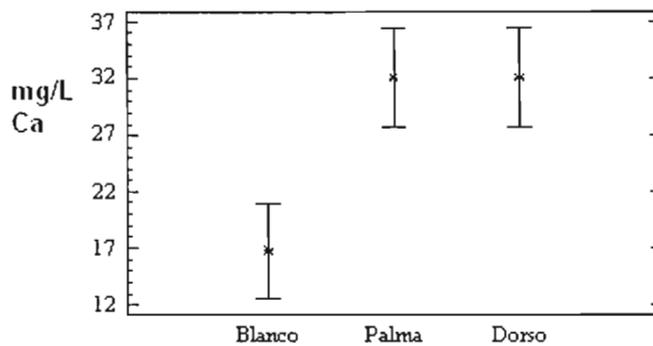


Figura 37 Medias (asterisco) e intervalos al 95% de menor diferencia significativa (líneas) para la determinación de calcio depositado por efectuar un disparo con un revólver calibre 38 mm en distintas partes de la mano por EC.

Es necesario indicar que los residuos orgánicos más importantes (nitroglicerina, difenilamina y etil centralita) no fueron detectados en las manos de las personas que dispararon un arma, a diferencia de en los cartuchos utilizados. Esto puede deberse a que los residuos orgánicos deben depositarse en cantidades mínimas. Por lo que es necesario mejorar el límite de detección de la técnica para los residuos orgánicos y algunos metales como bario y antimonio ya sea por eliminación del disolvente utilizado, técnicas de extracción, etc.

En las pruebas con un revólver calibre 32 mm (Fig. 31), a diferencia de los disparos con revólver calibre 38 mm, se encontró resorcinol y bario en dorso y palma de la mano que efectuó uno y tres disparos; mientras que las muestras blanco fueron negativas para

estas sustancias. Esto probablemente se debe al estado (antigüedad) del arma utilizada para el ensayo. Sin embargo, al efectuar posteriormente el ensayo en tres ocasiones con el fin de realizar un análisis estadístico, no se encontró la presencia de bario en ninguno de los ensayos (Fig. 37). La explicación puede encontrarse en la presencia de viento en el momento de efectuar el segundo ensayo.

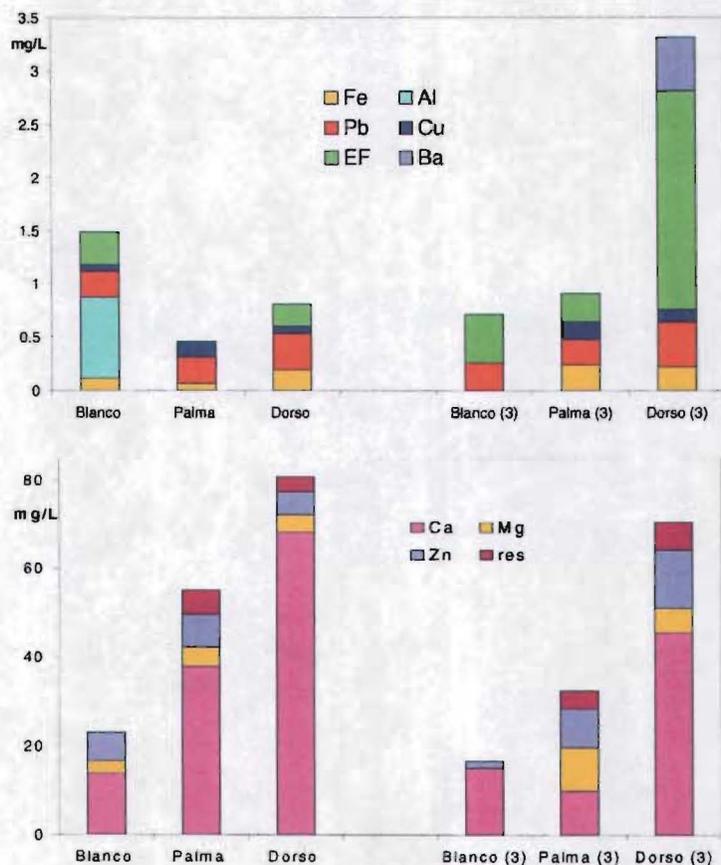


Figura 38 Resultado del análisis de muestras provenientes de disparos de una revólver 32 mm tomadas por la técnica de frotamiento N=3; nota: entre paréntesis el número de disparos.

La presencia de viento también, afectó el resultado de otros residuos, esto se traduce en recuperaciones menores a las obtenidas por un revólver 38 mm para la mayoría de los residuos e incluso la ausencia de residuos, en algunos ensayos (ej. hierro, cobre, resorcinol, magnesio).

Sin embargo, los resultados obtenidos con un revólver 32 mm, fueron semejantes a los encontrados con el revólver 38 mm, pues se detecto una mayor cantidad de plomo y calcio en el dorso de la mano que disparó el arma respecto a otras zonas de la mano.

Además, y a diferencia de las pruebas con calibre 38 mm, se detectó en algunos ensayos la presencia de resorcinol y bario en la mano que efectuó el disparo y no en los blancos realizados, por tanto, su presencia en la mano que efectuó el disparo podría utilizarse como marcador de haber accionado un arma. Para dilucidar la importancia de plomo y bario, se procedió a efectuar el estudio de ANOVA (Tabla 29) para la cantidad en distintas partes de la mano.

Tabla 29 Análisis estadístico de la determinación de plomo (mg/L) provenientes de un disparo de un revólver 32 mm de distintas partes de la mano por Electroforesis capilar.

Tabla ANOVA (Nivel de Confianza 95%)					
Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de Cuadrados	Df	cuadrado de la media	Radio -F	Valor -P
Entre grupos	0.0806788	4	0.0201697	2.02	0.1561
En grupos	0.120021	12	0.0100018		
Total (Corr.)	0.2007	16			

Dado que el valor P de la prueba F es mayor a 0.05 no existe una diferencia estadística entre las medias de los seis grupos con un 95 % de confiabilidad. Para determinar cuales grupos son diferentes es necesario aplicar una prueba de rangos múltiples

Prueba de Intervalos Múltiples

Método: Menor diferencia significativa de Fisher (95%)			
	Cuenta	Media	Grupos Homogéneos
Blanco	5	0.245	X
Palma 1 disparo	3	0.245667	XX
Palma 3 disparos	3	0.239	XX
Dorso 1 disparo	3	0.344	XX
Dorso 3 disparos	3	0.419667	X

Contraste	Diferencia	Limites +/-
Blanco – Palma (1)	0.00033333	0.159132
Blanco – Dorso (1)	-0.099	0.159132
Blanco – Palma (3)	0.006	0.159132
Blanco – Dorso (3)	*-0.171133	0.159132

Continua.....

Palma (1) – Dorso (1)	-0.0993333	0.177916
Palma (3) – Dorso (3)	-0.177333	0.177916
Dorso (1) – Dorso (3)	-0.0723333	0.177916

* Denota una diferencia estadística significativa.

Se estudió la cantidad depositada de plomo en la palma y dorso de la mano que efectuó de uno a tres disparos, de un revólver 32 mm, así como de un blanco. A diferencia de los ensayos realizados con un revolver 38 mm, la cantidad (media) de plomo depositado en la palma que efectuó el disparo es muy parecida, a la encontrada en los blancos (Tabla 29). La cantidad depositada de plomo en el dorso cuando se efectúa uno y tres disparos fue mayor a la encontrada en la palma y en los blancos. El análisis de la varianza estableció que la media de los 5 grupos analizados es la misma, sin embargo, un análisis de intervalos múltiples (Tabla 29), demostró que existe una diferencia significativa entre la cantidad de plomo depositada en el dorso de la mano, cuando se efectuaron tres disparos y la cantidad encontrada en los blancos, con un 95 % de confianza; también hubo una diferencia entre la cantidad depositada al efectuar un disparo, sin embargo esta no fue suficiente para ser significativamente diferente (Fig. 38).

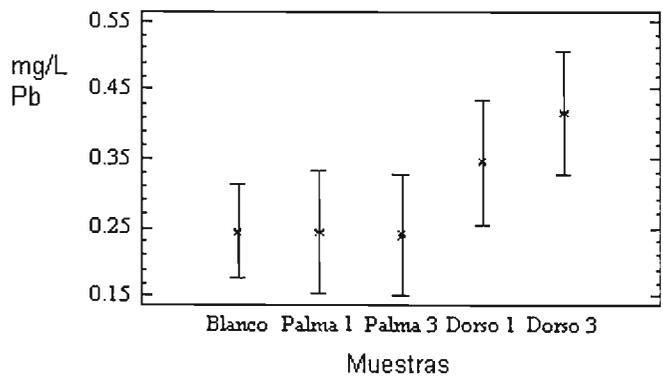


Figura 39. Medias (asterisco) e intervalos al 95% de menor diferencia significativa (líneas) para la determinación de plomo depositado por efectuar disparos (número de disparos indicado a la derecha de la zona muestreada) con un revólver calibre 32 mm en distintas partes de la mano EC.

El análisis estadístico de la cantidad de calcio encontrado, no reveló diferencias significativas entre las distintas zonas muestreadas, esto se debe a la gran variabilidad de los resultados obtenidos, tal vez provocado por las condiciones ambientales antes descritas.

3.3.1.2 Extracción y análisis por separado de residuos tomados por frotamiento.

Con el fin de obtener mejores límites de detección se procedió a realizar una extracción líquido – líquido de los residuos orgánicos con acetato de etilo de las muestras provenientes de disparar un revólver 32 mm. El análisis de los residuos orgánicos se repitió, después de evaporar la fase orgánica y reconstituir la muestra con una solución 0.4 mM de Boratos, 12 mM de SDS. El análisis de los residuos inorgánicos se repitió por separado a partir de la fase acuosa de la extracción. En el caso del análisis por electroforesis capilar de los residuos orgánicos, se cambió la composición del electrolito soporte, debido a que la separación obtenida no depende de la concentración de boratos, sino de la de SDS, por tanto, se mantuvo la concentración de SDS y la concentración de boratos se disminuyó a 20 mM con el fin de asegurar el pH utilizado, además se eliminó el CDTA del electrolito soporte. Para los residuos inorgánicos presentes en la fase acuosa se conservó el electrolito soporte, cambiando la inyección hidrodinámica a 3.45 kPa por 15 segundos; debido a que la eficiencia de los residuos metálicos no se ve afectada al inyectar más muestra, como se mencionó anteriormente.

El análisis de los residuos inorgánicos no aporta mejores resultados ya que se identificaron los mismos residuos; ni bario, ni antimonio fueron detectados, en el primer caso puede ser por la ausencia de este en la muestra y en el último porque no se ha llegado aun al límite de detección deseado (se calculó que el volumen de la muestra tendría que reducirse a 4 μ l para poder detectar el antimonio). Sin embargo, se confirmó la presencia de resorcinol, el cual fue encontrado en la palma y dorso de personas que dispararon un revólver 32 mm pero no en los blancos (Fig. 39) (Tabla 30).

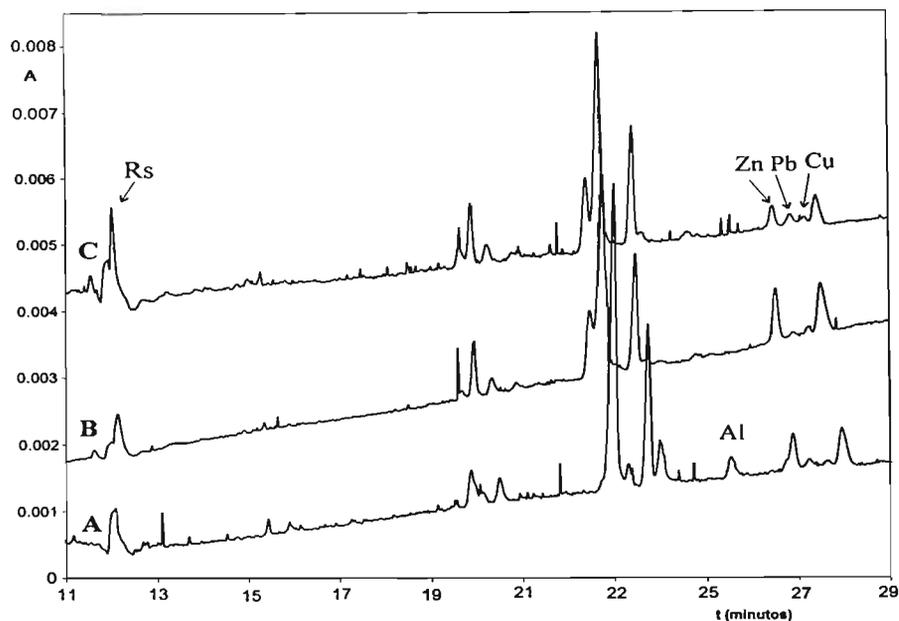


Figura 40 Determinación de los residuos generados por disparar un revólver 32 mm que permanecen en la fase acuosa posterior a extracción de residuos orgánicos con acetato de etilo; A.- Blanco, B.- Palma de la mano que disparó el arma, C.- Dorso de la mano que disparó el arma. Toma de muestra por frotamiento. Electrolito soporte: 40 mM Boratos, 16 mM SDS, 0.5 mM CDTA, pH= 9.2, capilar: L de 79.2 cm, l de 69.0 cm, D.I. de 75 μ m, inyección Hidrodinámica: 3.45 kPa por 15 segundos. Detección UV a 200 nm.

Se encontró que los resultados para los residuos inorgánicos no coinciden en todos los casos antes y después del proceso de extracción (Tabla 30). Las pérdidas pueden deberse a disociación de los complejos menos estables durante la extracción (magnesio), mientras que en el caso de las ganancias pueden deberse a contaminación durante el proceso de extracción (Pb, Cu y algunas muestras de Zn, Ca) provenientes incluso del acetato de etilo utilizado para hacer la extracción, por lo que es necesario buscar otras opciones de preconcentración

En el caso de los residuos orgánicos, el disminuir 10 veces el volumen de muestra permitió identificar la presencia de 2, 3- dinitrotolueno en la mayoría de las muestras analizadas incluyendo blancos aunque su presencia fue mayor en las muestras de dorso (Tabla 31).

Tabla 30 Determinación (mg/L) de residuos inorgánicos^ψ y resorcinol después de extracción de los residuos orgánicos con acetato de etilo

Ensayo	Blanco			Blanco			Palmar			Palmar			Dorso			Dorso		
	1			3			1			3			1			3		
No. Disparos																		
Proceso	+	*	Φ	+	*	Φ	+	*	Φ	+	*	Φ	+	*	Φ	+	*	Φ
Fe	0.139	0.133	0.96	0	0.236	∞	0.194	0.316	1.63	0	0.42	∞	0.417	0.979	2.35	0.537	0.454	0.85
							0	0.406	∞	0.417	0.189	0.45	0.159	0.306	1.92	0.132	0.221	1.67
							0	0.674	∞	0.306	0.162	0.53	0	0.584	∞	0	0.324	∞
Ca	7.19	6.42	0.89	146.3	5.407	0.04	29.09	25.79	0.89	9.12	6.97	0.76	156.1	51.7	0.33	38.23	30.92	0.81
							8.29	9.43	1.14	10.38	91.04	8.77	1.713	56.06	32.7	48.70	54.91	1.13
							76.14	73.28	0.96	10.47	10.93	1.04	48.07	73.18	1.52	49.72	25.63	0.52
Mg	6.127	0	0	0	4.89	∞	13.11	6.09	0.46	0	0		0	0		0	0	
							0	0	0	0	0		11.79	0	0	0	0	
							0	5.959	∞	29.99	3,634	0.12	0	0		16.49	8.528	0.52
Zn	7.819	7.559	0.97	1.629	4.308	2,64	2.718	3.552	1.31	3.748	3.547	0.95	4.29	3.713	0.87	16.86	14.67	0.87
							3.176	4.792	1.51	4.29	19.322	4.50	6.863	7.395	1.08	5.525	5.31	0.96
							16.026	18.253	1.14	18.203	6.14	0.34	4.757	20.96	4.41	17.33	8.363	0.48
Pb	0.172	0.378	2.20	0.258	0.368	1.43	0.254	0.512	2.02	0.117	0.498	4.25	0.359	0.343	0.96	0.373	0.524	1.4
							0.282	0.684	2.43	0.359	0.584	1.63	0.357	0.708	1.98	0.276	0.577	2.09
							0.198	0.744	3.76	0.241	0.477	1.98	0.316	0.854	2.70	0.61	1.252	2.05
Cu	0	9.193	∞	0.455	12.76	28	0	11.496	∞	0	4.724	∞	0	9,438	∞	0	6.192	∞
							0.216	17.598	81.5	0.312	18.08	58	0.143	11.733	82	0,242	7.433	31
							0.151	19.84	131	0	6.537	∞	0	13.613	∞	0	11.52	∞
Rs	0	0		0	0		0	2.458	∞	0	9.41	∞	0	4.442	∞	8.928	14.52	1.63
							0	1.358	∞	2.165	0	0	0	8.5	∞	2.308	0	0
							16.402	6.613	0.40	10.11	0	0	10.224	7.52	0.74	7.402	2.29	0.31

+ Análisis previo a la extracción con acetato de etilo, *Después de extracción con acetato de etilo. Φ Comparación entre ambos procedimientos.ψ Sb y Bario no detectados, Al y Ni solamente en algunas muestras.

Tabla 31 Concentración en mg/L de 2,3 - dinitrotolueno encontrado después de disparar un revólver 32 mm. Antes y después de un proceso de extracción.

Zona muestreada	No. Ensayo	2,3-DNT		Factor de concentración
		Antes Extracción	Después de extracción	
Blanco (1)	1	1.209	7.638	6.32
Blanco (3)	1	ND	2.229	∞
Palma (1)	1	ND	ND	-
	2	ND	2.073	∞
	3	ND	4.073	∞
Palma (3)	1	ND	ND	-
	2	ND	7.32	∞
	3	ND	26.706	∞
Dorso (1)	1	ND	ND	-
	2	ND	17.455	∞
	3	ND	ND	-
Dorso (3)	1	ND	ND	-
	2	1.636	24.88	15.21
	3	ND	ND	-

Numero entre paréntesis indica número de disparos

ND: no detectado

En algunos casos se observó un enriquecimiento mayor al esperado, esto puede deberse a que los electroferogramas obtenidos para los residuos orgánicos después de la extracción son más limpios y la integración en consecuencia mejor. Otros residuos como el resorcinol permanecieron en la fase acuosa por lo que no fueron identificados en la fase orgánica. Al analizar con más cuidado las muestras analizadas previo a la extracción fue posible identificar un pico muy pequeño equivalente al encontrado después de la extracción (Fig. 40).

Debido a que un paso de preconcentración permitió identificar otros residuos, se probaron distintas técnicas de muestreo que permiten concentrar la muestra. En la primera de ellas se aplicó la técnica de frotamiento con un paso de preconcentración por evaporación. Por último se probó la técnica de muestreo por cinta adhesiva debido a que concentra la muestra dentro de su procedimiento. Se volvieron a realizar pruebas de disparo con un revólver 38 mm Smith and Wesson munición El Aguila, comparando los resultados con el fin de encontrar la técnica de muestreo óptima para la electroforesis capilar. Además

se estudió la distribución de los residuos depositados después de un disparo en las diferentes zonas de la mano que efectuó un disparo y de la que no lo hizo.

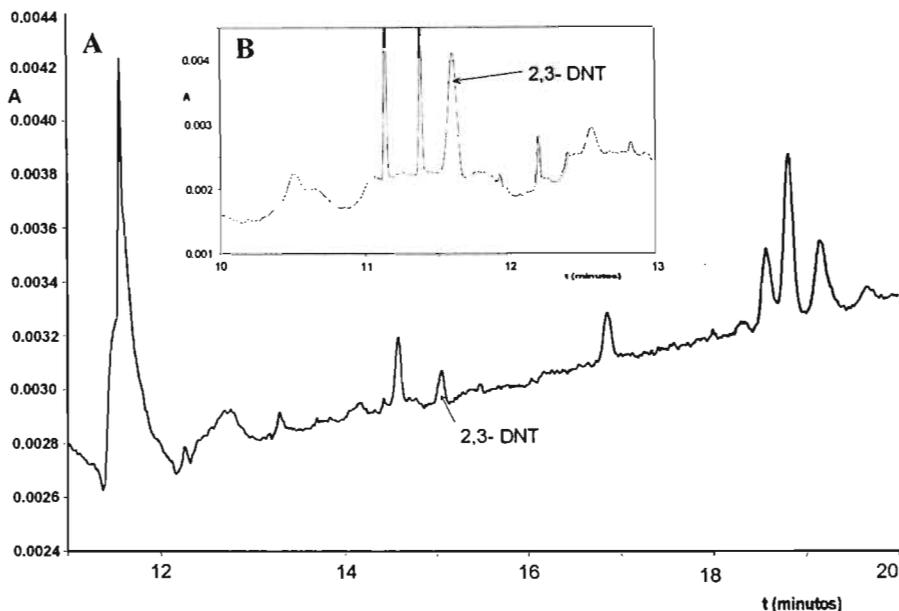


Figura 41 Determinación de 2,3 – dinitrotolueno antes y después de extracción con acetato de etilo A.-Antes de extracción con acetato de etilo, volumen final de la muestra: 2 ml. Electrolito soporte: 40 mM Boratos, 16 mM SDS, 0.5 mM CDTA, pH= 9.2, capilar: L de 79.2 cm, longitud al detector, l de 69.0 cm, D.I. de 75 μ m, inyección Hidrodinámica: 3.45 kPa por 5 segundos. Detección UV a 200 nm. B.- Después de extracción, volumen final 0.2 ml Electrolito soporte: 15 mM SDS, 20 mM Boratos pH=9.2, inyección hidrodinámica 3.45 kPa por 5 segundos. Detección UV a 200 nm.

Identificar otros residuos fue difícil debido a que otras impurezas fueron concentradas e impidieron identificar a residuos considerados como importantes, como es el caso de las centralitas.

3.3.1.3 Análisis de muestras reales tomadas por la técnica de frotamiento seguido de un paso de preconcentración por evaporación.

Para el análisis de las muestras por evaporación se hizo un estudio de la distribución de los residuos depositados después de disparar un arma, tanto en la mano que dispara como en la que no dispara; los residuos encontrados después de pre-concentrar la muestra por evaporación se pueden clasificar en:

- A).- Aquellos que no fueron detectados (Sb, Ba, Nitroglicerina)
- B).- Aquellos que fueron identificados en algunas muestras sin una preferencia clara por una zona de la mano (Ni, Al, 2,4- Dinitrotolueno) y que por lo tanto no están relacionados con hecho de disparar un arma.
- C).- Aquellos que fueron encontrados en todas las muestras, incluyendo blancos (Pb, Cu, Fe, Zn, Ca, Mg, etil ftalato)
- D).- Aquellos que fueron encontrados preferentemente en muestras tomadas del dorso de la mano que disparó pero también en blancos (metil ftalato, resorcinol, 2,3- Dinitrotolueno, 2,6- Dinitrotolueno, difenilamina)
- E).- Aquellos que únicamente fueron encontrados en algunas muestras tomados del dorso de la mano que disparó (centralitas).

De lo anterior se puede concluir:

- a).- La presencia de las centralitas en el dorso de la mano es un indicador muy específico de haber disparado un arma, pues no se encontró en ningún blanco, sin embargo su utilidad está limitada debido a que solamente se encontró en un ensayo de once realizados (Fig. 41).
- b).- Para conocer la importancia de los residuos especificados en los puntos D y C es necesario realizar un análisis estadístico de los datos obtenidos.
- c).- Los residuos obtenidos en el punto B no están relacionados con el hecho de disparar un arma pero su detección puede ser importantes en otras condiciones (calibre, munición, etc.)
- d).- Algunos residuos como nitroglicerina y antimonio no fueron detectados por encontrarse en cantidades mínimas (Sb) o porque no formen parte de los residuos (Ba).

En el caso de los residuos presentes en todas las regiones de la mano se encontraron los siguientes resultados generales:

- a).- Existe una gran variabilidad (coeficientes de variación de 30 al 100) entre la cantidad de residuos encontrados de persona a persona.
- b).- En un ensayo, puede existir una diferencia entre la cantidad encontrada en el dorso y la palma que no efectuó el disparo; por lo que no pueden utilizarse ambas zonas indistintamente como blancos. Aunque tomando en cuenta todos los ensayos no existe una diferencia estadística entre ambos blancos.

c).- La cantidad de residuo encontrada en la palma que efectuó un disparo de la que no, es muy semejante aunque existen diferencias en algunos ensayos, esto puede indicar contaminación ambiental en una de las manos. En algunos residuos orgánicos existió una diferencia estadística significativa entre la mano que disparo y la que no.

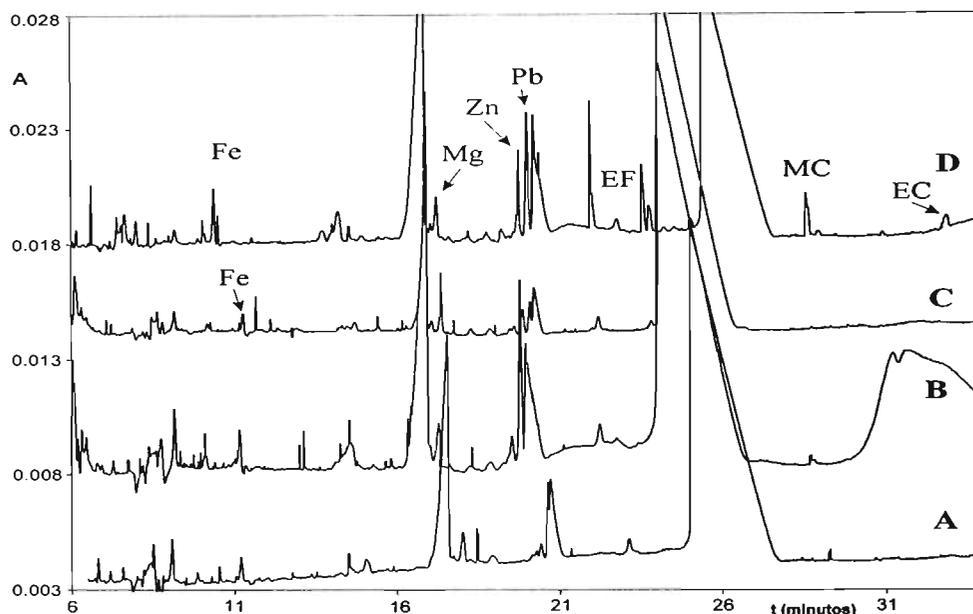


Figura 42 Determinación de residuos generados por disparar un revólver 38 mm, tomadas mediante la técnica de frotamiento y preconcentración por evaporación. A.- Palma de la mano que no disparó el arma, B.- Dorso de la mano que no disparó C.- Palma de la mano que disparó el arma, D.- Dorso de la mano que disparó el arma. Electrolito soporte: 40 mM Boratos, 16 mM SDS, 0.5 mM CDTA, pH= 9.2, capilar: L de 79.2 cm, l de 69.0 cm, D.I. de 75 μ m, inyección Hidrodinámica: 3.45 kPa por 15 segundos. Detección UV a 200 nm.

3.3.1.3.1 Plomo y otros residuos inorgánicos

La cantidad de plomo encontrada en el blanco dorsal es distinta del blanco palmar en la mayoría de los casos, aunque la media de ambas zonas sea muy parecida, por lo que no pueden utilizarse como blanco en forma indistinta. Al disparar un revólver los residuos por disparar un arma se depositan en la región dorsal de la mano, la cantidad de plomo depositada en esta zona es mayor en casi todos los ensayos; con excepción de los ensayos 2, 3 y 4, donde se encontró más plomo en otras zonas de la mano (Tabla 32) por otro lado,

la cantidad de plomo encontrado en el dorso de la mano que disparó un arma fue siempre mayor a la encontrada en la misma región de la mano que no disparó el arma.

Tabla 32 Resultados obtenidos de Plomo (μg) depositado después de disparar un revólver calibre 38 mm en distintas regiones de la mano.

ENSAYO	BLANCO PALMAR	BLANCO DORSAL	PALMAR	DORSAL
1	1.28	0.764	1.548	2.171
2	0.523	0	1.605	1.084
3	0.334	0.241	0.579	0.267
4	1.698	0.336	0.601	1.551
5	Dato Anómalo	0.802	2.148	2.834
6	0.274	0.685	0.326	1.842
7	1.479	1.929	1.369	2.349
8	0.174	0.186	0.462	1.616
9	0.409	0.154	0.686	0.721
10	1.589	1.478	2.676	3.366
11	1.584	3.616	0.838	4.145

Para determinar si las mediciones de las distintas zonas de la mano son significativamente diferentes se efectuó un análisis estadístico mediante el programa Statgraphics (Tabla 33).

Tabla 33 Análisis estadístico de la determinación de plomo (μg) provenientes de un disparo de un revólver 38 mm de distintas partes de la mano tomadas por frotamiento y con preconcentración por evaporación.

Cuenta	Promedio	Varianza	
Blanco Palmar	10	0.934400	0.407745
Blanco Dorsal	11	0.926455	1.14649
Palma	11	1.167090	0.582726
Dorso	11	1.99509	1.31655
Total	43	1.26323	1.01071
	Desviación Estándar	Valor Mínimo	Valor Máximo
Blanco Palmar	0.638549	0.174	1.698
Blanco Dorsal	1.07074	0.0	3.616
Palma	0.763365	0.326	2.676
Dorso	1.14741	0.267	4.145

Continua.....

Total	1.00534	0.0	4.145		
Tabla ANOVA					
Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de Cuadrados	Df	Cuadrado de la media	F-Radio	p-Valor
Entre grupos	8.32238	3	2.77413	3.17	0.0348
En grupos	34.1274	39	0.875061		
Total (Corr.)	42.4498	42			
<p>Dado que el p-valor es menor que 0.05, existe una diferencia estadística entre la media de las 4 variables con un 95% de nivel de confianza. Para determinar cuales medias son diferentes de las otras se realizó una prueba de rangos múltiples.</p>					
Prueba de intervalos múltiples					
Método: Menor diferencia significativa de Fisher (95% de confianza)					
	Cuenta	Media	Grupos Homogéneos		
Blanco Dorsal	11	0.926455	X		
Blanco Palmar	10	0.9344	X		
Palma	11	1.16709	X		
Dorso	11	1.99509	X		
Contraste		Diferencia	+/- Limites		
Blanco Palmar - Blanco Dorsal		0.00794545	0.826728		
Blanco Palmar - Palma		-0.23269	0.826728		
Blanco Palmar - Dorso		*-1.06069	0.826728		
Blanco Dorsal - Dorso		*-1.06864	0.806804		
Palma - Dorso		*-0.828	0.806804		
* Señala una diferencia estadística con un 95% de nivel de confianza.					

La cantidad de plomo encontrada en las distintas regiones de la mano que no efectuó un disparo presenta una gran variabilidad entre persona y persona, lo que dificulta el establecer valores de referencia para este metal, este comportamiento se encontró con todos los residuos detectados y dificulta la comparación de los resultados obtenidos entre las distintas regiones

Al dispararse un arma los residuos se depositan en una zona determinada de la mano que efectuó el disparo, en el caso de revólveres y pistolas esta zona es el dorso de la mano.

Mediante el análisis de varianza de las cuatro regiones muestreadas, se determinó que las medias de los distintos grupos, es diferente con un 95 % de confianza. La prueba de intervalos múltiples, identifica la presencia de dos grupos homogéneos, caracterizados por tener medias estadísticamente iguales. En uno grupo se encuentran las determinaciones de plomo en palma y dorso de la mano que no efectuó el disparo y la palma que si lo realizó, mientras que en el otro se encuentra la determinación de plomo en el dorso de la mano que acciono el arma. Por tanto, se encontró una diferencia significativa entre el plomo depositado en el dorso de la mano que accionó un revólver calibre 38 mm, de la otras zonas de la mano y de la mano que no efectuó el disparo (Fig. 42), lo que demuestra que la técnica de electroforesis capilar es capaz de detectar el plomo depositado en la mano después de disparar una arma de fuego.

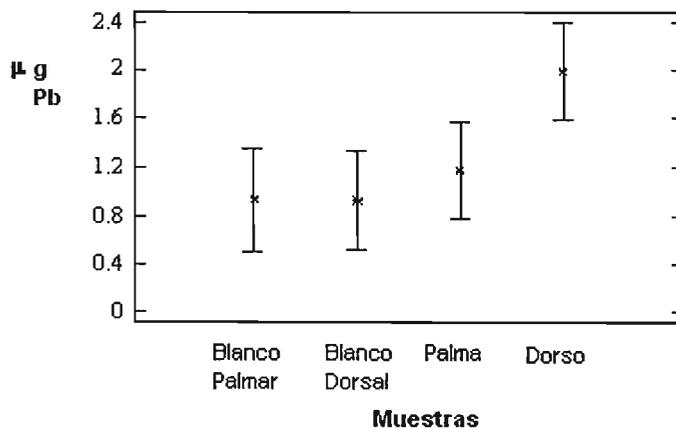


Figura 43 Medias (asterisco) e intervalos al 95% de menor diferencia significativa (líneas) para la determinación de plomo depositado por efectuar disparos con un revólver calibre 32 mm en distintas partes de la mano

El mismo análisis se repitió para los demás residuos inorgánicos que fueron detectados; se volvió a observar una gran variabilidad en los resultados, diferencias entre la cantidad de residuo encontrado en la palma y dorso de la mano que no disparó, pero se encontró una buena correlación entre la cantidad encontrada entre las palmas de las mano

que disparó y la que no disparó un arma. Al realizar el estudio de varianza de estos residuos no se encontró una diferencia significativa entre las diferentes zonas de ambas manos (Tabla 34).

Tabla 34 Análisis de varianza de residuos inorgánicos con un 95% de nivel de confianza (n=11).

Prueba F	Fe	Ca	Mg	Cu	Zn
p	0.2700	0.5570	0.5145	0.7469	0.7032

Cobre y zinc no tienen relación con el hecho de haber disparado un arma bajo las condiciones de arma y munición utilizadas. En el caso de hierro, calcio y magnesio se encontró más residuo en el dorso de la mano que efectuó el disparo sin que la diferencia fuera estadísticamente significativa (Fig. 43, 44); al analizar los datos individuales se encontraron algunos ensayos para cada metal que no dieron el resultado esperado lo que provoca que la media entre el dorso de la mano y las otras zonas de la mano no sea estadísticamente diferente.

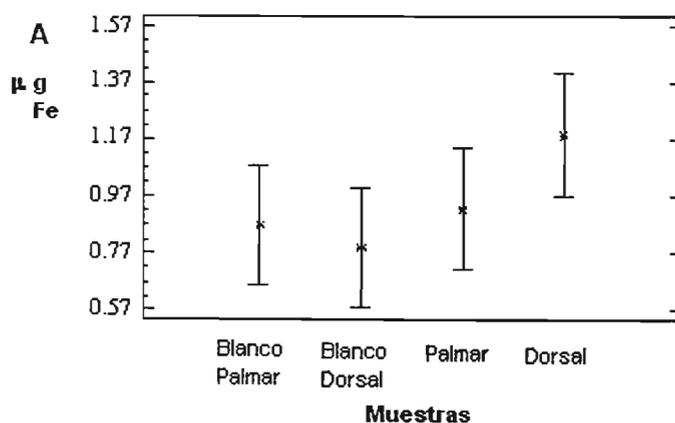


Figura 44 Medias (asterisco) e intervalos al 95% de menor diferencia significativa (líneas) para la determinación de Hierro depositado por efectuar disparos con un revólver calibre 38 mm en distintas partes de la mano.

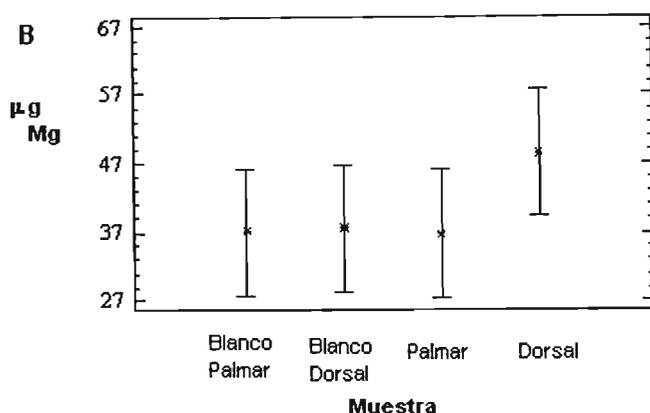


Figura 45 Medias (asterisco) e intervalos al 95% de menor diferencia significativa (líneas) para la determinación de magnesio depositado por efectuar disparos con un revólver calibre 38 mm en distintas partes de la mano.

Para evitar el efecto adverso de la variabilidad de los resultados se aplicó un valor “corregido” el cual se calcula restando al valor obtenido en la palma y dorso de la mano que no disparó el arma y que actúan como blancos de la zonas respectivas de la mano que efectuó el disparo y se repitió el análisis estadístico de los datos (Tabla 35).

Tabla 35 Análisis de varianza del valor “corregido” de residuos inorgánicos más significativos calculados con un 95% de nivel de confianza (n=11).

Prueba F	Pb		Fe		Ca		Mg*	
	palma	dorso	Palma	dorso	palma	dorso	palma	dorso
Valor “corregido” (µg)	0.135	1.069	0.061	0.399	1.420	49.004	-4.826	12.156
p	0.004		0.0781		0.3924		0.0713	

*n=10

Mediante el estudio del valor corregido se confirmó el valor de plomo como marcador de haber disparado un arma de fuego. El valor corregido de dorso para magnesio para todos los ensayos siempre fue mayor al de palma por lo que este valor puede utilizarse como marcador de haber disparado un arma, junto con el análisis de plomo, en el caso de hierro algunos ensayos (27%) no dieron el resultado esperado por lo que su uso como marcador debe de tomarse con más cuidado, lo anterior probablemente se debe a que la cantidad de hierro depositado es menor a la de plomo y magnesio.

3.3.1.3.2 Residuos Orgánicos

La detección de los residuos orgánicos fue más difícil ya que se encontraron en concentraciones muy bajas o por presencia de interferencias en los electroferogramas y su presencia no fue detectado en todos los ensayos. Sin embargo, la presencia de las centralitas se considera muy específica, debido a que no fueron detectadas en ningún blanco analizado, pero, el hecho de que solo se encontraron en el dorso de un ensayo, disminuye su utilidad.

Otros residuos no fueron detectados en el dorso de la mano que disparó y si en algunos blancos, por lo que su relación con disparar un arma es dudosa. Los residuos que se encontraron en la mayoría de las muestras fueron estudiados estadísticamente (Tabla 36).

Tabla 36 Análisis de varianza de residuos orgánicos con un 95% de nivel de confianza (n=11).

Prueba F	EF	MF	res	2,4-DNT	2,3-DNT*
p	0.8515	0.0343	0.0730	0.3580	0.0271

* Se comparó únicamente la mano que disparó el arma con la que no.

Para las condiciones de calibre de arma y munición utilizada se encontró que la cantidad de etil ftalato y 2,4- dinitrotolueno no tienen relación con disparar un revólver 38 mm. En el caso de metil ftalato y resorcinol si existe esta relación, debido a que se encontró más residuo en el dorso de la mano que disparó el arma o en la mano que disparó para el caso de 2,3 -dinitrotolueno (Fig. 45) sin embargo, su valor como marcador disminuye ya que en algunos ensayos (18% para 2,3- dinitrotolueno, 36% para metilftalato) se encontró residuo en la mano que no disparó el arma, mientras que en algunos ensayos no se encontraron residuos en la mano que disparó el arma para estos residuos (45% para 2,3- dinitrotolueno, 18% para metil ftalato y 18% para resorcinol). Es de notar que en las pruebas realizadas con un revólver calibre 32 mm no se detectó resorcinol en ningún blanco y sí en palma y dorso de la mano que disparó el arma; por lo que este residuo puede ser más importante que los otros ya que el pico obtenido es más visible que los otros mencionados. Para aclarar lo anterior se utilizó el valor “corregido” aplicado anteriormente con los residuos inorgánicos (Tabla 37).

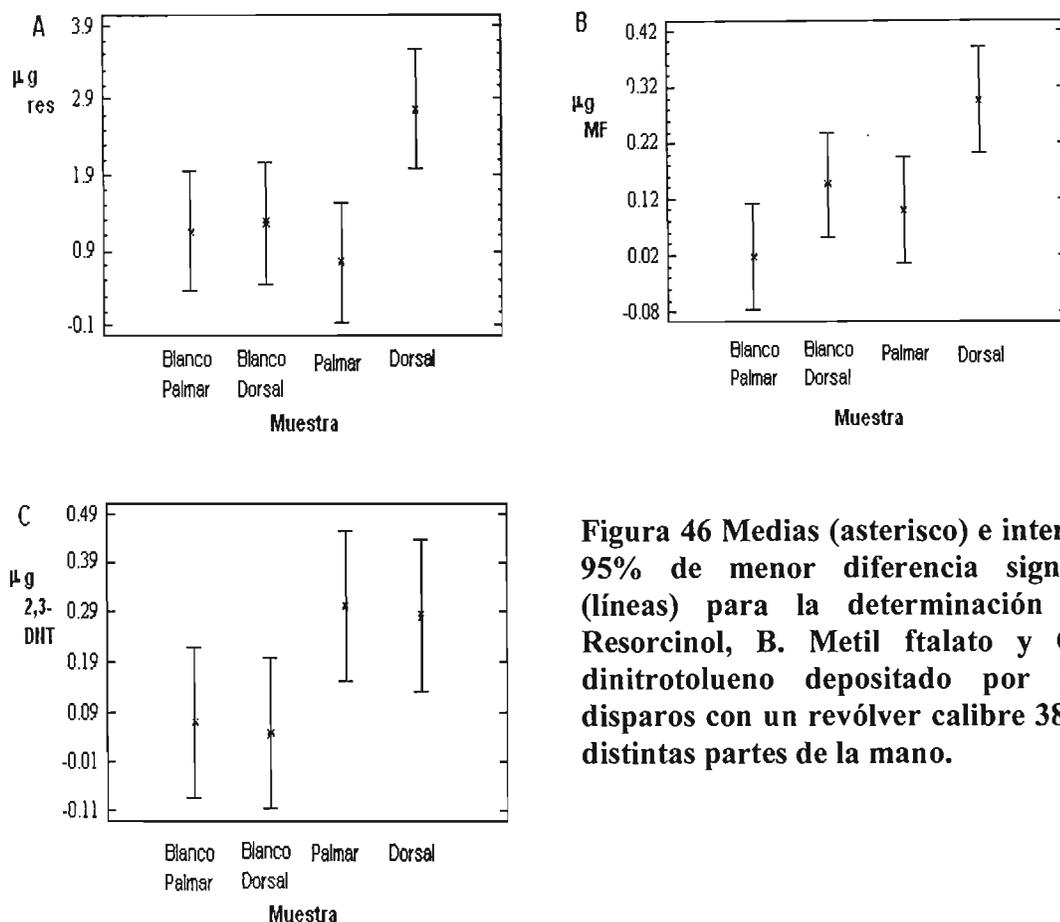


Figura 46 Medias (asterisco) e intervalos al 95% de menor diferencia significativa (líneas) para la determinación de A.- Resorcinol, B. Metil ftalato y C.- 2,3-dinitrotolueno depositado por efectuar disparos con un revólver calibre 38 mm en distintas partes de la mano.

Mediante este análisis se confirmó:

- a).- El 2,3 – dinitrotolueno se deposita en la mano que disparó el arma sin preferencia en alguna zona en especial. Por tanto, la presencia de 2,3- Dinitrotolueno en la mano que disparó un revólver 38 mm puede ser utilizado como marcador.
- b).- Los resultados obtenidos mediante el “valor corregido”, no facilitaron la interpretación de los resultados, esto se piensa, es a la presencia de metil ftalato en algunas muestras provenientes de blancos, por tanto, es necesario excluir está posibilidad, para usar el metil ftalato como marcador de disparar un arma.
- c).- El valor “corregido” de resorcinol puede utilizarse como marcador con ciertas reservas.

Dado que los residuos orgánicos no fueron encontrados en todas las muestras provenientes del dorso de la mano que disparo el arma, su aplicación como marcador, se

encuentra limitada y su uso debe estar basado en un análisis de las cuatro zonas de la mano y en conjunto con los residuos inorgánicos.

Tabla 37 Análisis de varianza del valor “corregido” de residuos orgánicos más significativos calculados con un 95% de nivel de confianza (n=11).

PRUEBA F	METIL FTALATO		2,3 -DNT		RESORCINOL	
	palma	Dorso	palma	dorso	palma	dorso
Valor “corregido” (µg)	0.096	0.228	0.233	0.240	-0.402	1.506
P	0.1810		0.9727		0.0090	

3.3.2. Análisis de muestras reales tomadas por la técnica de cinta adhesiva

La técnica de cinta adhesiva tiene como ventaja sobre la técnica de frotamiento que los residuos son concentrados durante el procesamiento normal de la muestra por lo que se obtienen mejores límites de detección. Esta técnica ha sido empleada para el análisis de residuos orgánicos por electroforesis capilar [26, 45], como para los residuos inorgánicos por MEB-DEX [1, 3, 5]. Se estudió la recuperación de residuos provenientes de disparar un revólver Smith & Wesson 38 mm con munición El Aguila. La técnica por cinta adhesiva provee mejores límites de detección al concentrar la muestra; sin embargo, la recuperación de los distintos residuos es menor a la técnica por frotamiento por lo que la ganancia obtenida es menor a la esperada; además, la presencia de interferencias impidió la detección de varios de los residuos buscados; otro problema consistió en que ha medida que la muestra se concentra, cambian los tiempos de migración de los residuos buscados, lo que dificulta su identificación.

Por los problemas anteriores el único residuo orgánico identificado con claridad fue el etil ftalato, otros residuos como los derivados del dinitrotolueno y el metil ftalato no fueron identificados en todas las muestras. Los residuos inorgánicos sí fueron identificados, pero en menor cantidad que en la técnica por frotamiento (Tabla 38). Además se observó una gran variabilidad en los resultados, lo que dificulta el análisis de los datos.

Al realizar el análisis individual de los ensayos no se encontró ningún residuo que de el resultado esperado en todos los ensayos, esto puede deberse a la variabilidad que tiene

esta técnica para tomar los residuos de una toma a otra. A continuación se realizó un análisis estadístico de los residuos más significativos (Tabla 39).

Tabla 38 Residuos encontrados por la técnica de cinta adhesiva (μg) después de disparos efectuados con un revolver calibre 38mm.

Residuo	Blanco Palmar	CV (%)	Blanco Dorsal	CV (%)	Palmar	CV (%)	Dorsal	CV (%)
EF	0.898 (100%)	27	0.463 (100%)	16	0.816 (100%)	48	1.072 (100%)	44
Fe	0.302 (100%)	78	0.232 (100%)	53	0.201	70	0.273	77
Ba	0.265 (29%)	186	0.397 (60%)	180	0.797 (56)	153	0.927 (89%)	73
Ca	6.145 (100%)	70	7.630 (100%)	64	9.344 (100%)	72	12.912 (100%)	69
Mg	1.680 (100%)	90	1.041 (100%)	114	3.098 (100%)	73	6.342 (100%)	78
Al	2.409 (100%)	48	2.223 (100%)	69	3.384 (100%)	54	4.312 (100%)	69
Zn	1.301 (100%)	93	1.569 (100%)	115	2.447 (100%)	114	2.922 (100%)	107
Pb	0.357 (100%)	139	0.254 (100%)	148	0.372 (100%)	124	0.345 (100%)	87
Cu	0.405 (100%)	58	0.377 (100%)	25	0.327 (100%)	48	0.469 (100%)	39

Número entre paréntesis: frecuencia de depósito.

Se encontró que residuos como plomo, cobre, hierro, zinc y 2,4 - dinitrotolueno aparentemente no tienen relación con el hecho de disparar un arma o la cantidad depositada es muy pequeña para que la diferencia sea significativamente diferente.

Tabla 39 Análisis de varianza de residuos más significativos (95% de nivel de confianza).

Prueba F	EF	2,4- DNT	Ba	Ca	Mg	Al	Zn	Pb	Cu
p	0.0664	0.7955	0.1815	0.3375	0.0236	0.2706	0.6184	0.7262	0.4667

Residuos como etil ftalato, magnesio, calcio y bario (Fig. 46) pueden utilizarse como marcadores pues la cantidad depositada en el dorso de la mano que disparó fue

superior a las otras regiones de la mano estudiadas sin ser esta diferencia significativamente diferente, pero su uso está limitado debido a que este resultado no se obtuvo en todos los ensayos; si se toma en cuenta que los ensayos se hicieron en condiciones ideales su uso en condiciones reales es dudoso. Respecto al bario, el hecho de que en la mayoría de los blancos no se le encontró (67%), puede aumentar su utilidad en caso de que los blancos resulten negativos y se detecte bario en la mano que disparó el arma.

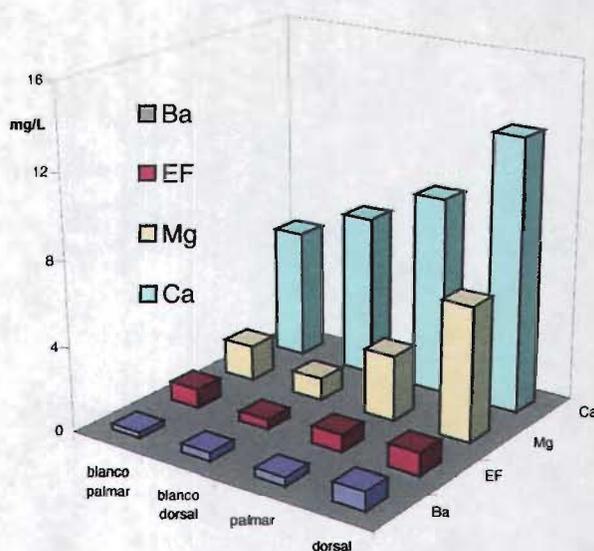


Figura 47 Determinación de la cantidad (μg) depositada de etil ftalato, magnesio, calcio y bario proveniente de disparar un revólver 38 mm. Muestreo por cinta adhesiva.

3.3.3 Comparación entre los distintos tipos de muestreo utilizados

Se compararon los resultados obtenidos por la toma de muestra por frotamiento, por frotamiento con un paso de preconcentración por evaporación y por cinta adhesiva (Tabla 40). Se encontró que los residuos identificados por la técnicas de frotamiento no son los mismos que los identificados por cinta adhesiva.

Tabla 40 Comparación (μg) de los resultados obtenidos para la determinación de residuos generados por disparar un arma de fuego por distintas técnicas de muestreo

RESIDUO	Región de la Mano	FROTAMIENTO	FROTAMIENTO CON PRECONCENTRACIÓN	CINTA ADHESIVA
Fe	Blanco Palmar	1.022	0.866	0.302
	Blanco Dorsal		0.788	0.232
	Palmar	1.258	0.927	0.201
	Dorsal	1.226	1.186	0.273
Ba	Blanco Palmar	ND	ND	0.265 (28%)
	Blanco Dorsal		ND	0.397 (60%)
	Palmar		ND	0.797 (56%)
	Dorsal		ND	0.927
Ca	Blanco Palmar	33.588	241.39	6.145
	Blanco Dorsal		258.77	7.630
	Palmar	64.086	242.81	9.344
	Dorsal	64.092	307.77	12.912
Mg	Blanco Palmar	3.258 (55%)	37.061	1.680
	Blanco Dorsal		37.550	1.041
	Palmar	1.628 (64%)	36.725	3.098
	Dorsal	ND	48.528	6.342
Al	Blanco Palmar	ND	ND	2.409
	Blanco Dorsal		ND	2.223
	Palmar		ND	3.384
	Dorsal		ND	4.312
Zn	Blanco Palmar	4.344	4.923	1.301
	Blanco Dorsal		4.807	1.569
	Palmar	4.348	4.084	2.447
	Dorsal	4.140	3.444	2.922
Pb	Blanco Palmar	0.996	0.934	0.357
	Blanco Dorsal		0.926	0.254

Tabla 40 Continuación

	Palmar	1.406	1.167	0.372
	Dorsal	1.620	1.995	0.354
Cu	Blanco Palmar	NR	1.021	0.405
	Blanco Dorsal		1.063	0.377
	Palmar	NR	1.380	0.327
	Dorsal	NR	1.411	0.469
Resorcinol	Blanco Palmar	ND	1.155 (55%)	ND
	Blanco Dorsal		1.265 (64%)	ND
	Palmar	ND	0.753 (55%)	ND
	Dorsal	ND	2.771 (73%)	ND
2,3- DNT	Blanco Palmar	ND	0.068 (9%)	0.099 (14%)
	Blanco Dorsal		0.045 (9%)	0.299 (60%)
	Palmar	ND	0.301 (36%)	0.214 (44%)
	Dorsal	ND	0.285 (36%)	0.148 (33%)
2,4 – DNT	Blanco Palmar	ND	0.240 (64%)	0.249 (57%)
	Blanco Dorsal		0.344	0.267
	Palmar	ND	0.232 (64%)	0.353
	Dorsal	ND	0.367	0.328
Metil Ftalato	Blanco Palmar	ND	0.019 (9%)	ND
	Blanco Dorsal		0.145(27%)	ND
	Palmar	ND	0.107 (36%)	ND
	Dorsal	ND	0.302 (82%)	ND
Etil Ftalato	Blanco Palmar	ND	0.352	0.898
	Blanco Dorsal		0.306	0.463
	Palmar	ND	0.281	0.816
	Dorsal	ND	0.249	1.072

ND: no detectado, NR: No realizado

Número entre paréntesis indica frecuencia de depósito

La cantidad de residuos inorgánicos detectados por frotamiento con o sin pre concentración fue muy semejante para la mayoría de los residuos con excepción de magnesio y calcio que se detectaron en mayor cantidad. Esto puede deberse a diferencias en las cantidades presentes entre las personas que efectuaron los distintos ensayos. La preconcentración por evaporación permitió detectar en algunas muestras residuos orgánicos, los que pasaron inadvertidos mediante la técnica normal.

La técnica de muestreo por cinta adhesiva dio resultados muy por debajo de los obtenidos por frotamiento para los residuos inorgánicos, esto se debe a que está técnica proporciona recuperaciones menores a la técnica por frotamiento (Tablas 24, 25) por lo que la ganancia obtenida al concentrar la muestra se pierde debido a la ineficacia de la técnica para obtener los residuos inorgánicos. Sin embargo, se detectaron algunos residuos que no fueron detectados por frotamiento como bario y aluminio que debieron ser detectados por la técnica por frotamiento con preconcentración por evaporación. En el caso de aluminio su presencia se explica como contaminante proveniente de la cinta adhesiva utilizada para realizar el muestreo.

En el caso de los residuos orgánicos la preconcentración permitió la detección de algunos residuos en varias de las muestras analizadas, sin embargo interferencias en los electroferogramas por está técnica impidieron detectar varios de los residuos como resorcinol, centralitas, etc. De los residuos que pudieron ser detectados, los isómeros del dinitrotolueno dieron resultados semejantes por frotamiento y por cinta adhesiva mientras que los resultados obtenidos para los ftalatos no coincidieron entre ambas técnicas, probablemente por diferencias en la recuperación entre ambas técnicas, para este residuo

De lo anterior se puede concluir que la mejor técnica para muestrear los residuos generados por disparar un arma de fuego es la técnica por frotamiento seguida por un proceso de preconcentración.

3.4. Comparación entre la cantidad de residuos depositados por armas de fuego de distinto calibre.

Cuando se habla del análisis de residuos generados por disparar un arma es común comparar la cantidad de residuos depositado por armas de distintos calibres [6], se ha observado que armas con más calibre depositan más residuo, aunque esto depende del tipo y estado del arma. Se compararon los resultados obtenidos con las distintas armas utilizada en este estudio (Tabla 41).

Tabla 41 Comparación de la cantidad de residuos depositado (μg) en distintas zonas de la mano después de dispara armas de distinto calibre. Muestreo por frotamiento.

Arma	Pistola 22 mm (n=1)			Revólver 32 mm (n=3)			Revólver 38 mm (n=10)			
	Zona de la mano	Blanco	Palma	Dorso	Blanco	Palma	Dorso	Blanco	Palma	Dorso
Fe		0.506	4.388	2.622	0.222	0.130	0.384	1.022	1.258	1.226
Ba		ND	ND	1.462	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ca		21.44	87.86	43.85	27.72	75.69	136.32	33.59	64.09	64.09
Mg		ND	39.76	ND	5.378	8.736	7.858	3.258	1.628	
Al		0.928	ND	ND	1.528	ND	ND	ND	ND	ND
Zn		ND	4.524	3.872	12.77	14.61	10.61	4.344	4.348	4.140
Pb		1.682	1.92	2.424	0.484	0.490	0.688	0.996	1.406	1.62
EF		1.088	0.614	1.336	0.62	ND	0.412	ND	ND	ND

ND: no detectado

Se observa gran variabilidad en la cantidad encontrada en los blancos, lo que indica que las personas que realizaron los ensayos no tienen la misma cantidad de residuo en las manos, lo que complica el análisis de los resultados, lo anterior se tomó en cuenta al analizar los datos. Se observa que el disparo con una pistola calibre 22 mm tiende a depositar más residuos en la palma de la mano que dispara, que en el dorso, con la excepción de plomo y se depositó más hierro, bario y zinc que cuando se utilizan otras armas, aunque es necesario en este caso realizar más pruebas para poder realizar una mejor comparación. Esto puede deberse a que la munición de la pistola calibre 22 debe contener estos componentes en mayor cantidad. La pistola calibre 32 mm depositó más residuos de calcio y magnesio pero para la mayoría de residuos depositó menor cantidad que en los demás calibres utilizados. En el caso de plomo se encontró más residuo en la prueba con

calibre 22 mm sin embargo, al realizar la técnica de frotamiento con preconcentración con disparos provenientes de un revólver 38 mm se encontró más residuo.

Lo anterior no coincide con lo reportado pues a un mayor calibre del arma, mayor cantidad de residuos depositado sin embargo, las armas utilizadas para realizar los disparos calibre 22 mm y 32 mm son armas más antiguas que la utilizada para realizar los disparos con calibre 38 mm. El anterior análisis está condicionado además porque se hicieron menos ensayos con los calibres menores.

3.5 Análisis de cartuchos

Se procedió a realizar un mapeo, por medio de plasma acoplado por inducción (PAI) de muestras (n=3) de cartuchos El Aguila percutidos por un revolver 38 mm obtenidas por medio de un hisopo embebido en ácido nítrico al 2%. El mapeo reveló la presencia de todos los residuos buscados por electroforesis capilar, con la excepción de níquel. El análisis anterior se repitió usando el método por electroforesis capilar desarrollado y los resultados de ambas técnicas fue comparado (Tabla 42). Los resultados obtenidos por ambas técnicas coinciden con la excepción de antimonio, el cual no fue detectado por electroforesis capilar, presumiblemente por encontrarse por debajo del límite de detección de esta técnica.

Se ha reportado que los residuos obtenidos de esta manera, corresponden a pólvora sin quemar y, por tanto, comparten su composición [1, 26, 46]. Los resultados muestran una composición diferente tanto de los residuos orgánicos e inorgánicos para los distintos tipos de cartuchos utilizados, en consecuencia la composición de la pólvora utilizada en estos cartuchos es diferente, esto se piensa puede utilizarse para elaborar bases de datos de los distintos tipos de munición presentes en el mercado [1, 11, 46].

Finalmente, se disolvió un cartucho con ácido nítrico concentrado y después de diluir la muestra para dar una solución al 2% de ácido nítrico se repitió el mapeo observándose la presencia de todos los metales buscados con la excepción de níquel. Lo anterior coincide con el análisis por electroforesis capilar donde en la mayoría de las muestras analizadas no fue detectado la presencia de este metal.

Tabla 42 Determinación de residuos metálicos provenientes de cartuchos percutidos por electroforesis capilar y plasma inductivamente acoplado.

Residuo	22 mm El Aguila	32 mm S&W-Fiocchi	38 mm El Aguila	38 mm El Aguila
	EC			PAI
Fe	-	0.37	0.233	✓
Ba	-	-	89.601	✓
Ca	-	14.244	26.527	✓
Mg	10.985	-	8.688	✓
Al	-	-	5.651	✓
Ni	-	-	-	-
Zn	-	3.98	-	✓
Pb	84.188	7.73	25.348	✓
Cu			7.525	✓
Sb	-	-	-	✓
Etil ftalato	-	0.575	-	
Metil Centralita	-	-	9.043	
Etil Centralita	1.026	-	-	

Conclusiones

- ⊕ Se desarrolló un método por electroforesis capilar capaz de detectar once residuos orgánicos y diez residuos inorgánicos provenientes de disparar un arma de fuego, en una sola corrida.
- ⊕ Los límites de detección obtenidos, se encuentran por encima de los valores de referencia de algunos residuos (Ba y Sb), por lo que es necesario aplicar técnicas de preconcentración.
- ⊕ El procedimiento de preconcentración por evaporación, permitió la detección de varios residuos que no habían sido detectados, sin embargo, es necesario optimizar este procedimiento, para obtener un método más rápido, reproducible y confiable
- ⊕ Se considera la técnica de muestreo por frotamiento como la optima para el método de electroforesis capilar desarrollado, siempre y cuando este acompañada de un procedimiento de preconcentración, debido a que proporcionó mejores recuperaciones y electroferogramas más limpios y reproducibles que los obtenidos por la técnica de cinta adhesiva.
- ⊕ Para la interpretación de casos reales, se recomienda realizar un estudio comparativo de las distintas zonas de la mano, tanto de la que efectuó el disparo, como de la que no, y de blancos provenientes de zona de la piel no expuestas a la intemperie, debido a la gran variabilidad en los resultados obtenidos, lo que dificulta establecer valores de referencia para los distintos residuos.
- ⊕ Se encontró una diferencia significativa entre la cantidad de plomo detectada en la zona de maculación, (dorso de la mano que efectúa el disparo), de otras zonas muestreadas, después de disparar un disparo, por lo que este residuo puede ser utilizado como marcador de efectuar un disparo. Otros residuos presentan un comportamiento similar, sin que la diferencia entre las distintas zonas muestreadas

sea estadísticamente significativa; mientras que, otros no están relacionados con disparar un arma bajo las condiciones utilizadas.

- ⊕ La determinación del plomo depositado por disparar un arma de fuego por EC y EAA-ET dio resultados estadísticamente iguales, para las mismas muestras. por lo que la electroforesis capilar es una opción válida para el análisis de estos residuos.
- ⊕ El análisis estadístico conjunto de todos los residuos detectados por electroforesis capilar, permitió clasificar correctamente el 91 % de las muestras provenientes de la zona de maculación, mientras que solamente se detectaron 12 % de falsos positivos. Por tanto, la electroforesis capilar, al aumentar el espectro de sustancias analizadas, facilita la interpretación de los resultados, mediante un análisis discriminante.
- ⊕ Se demostró que el método desarrollado por electroforesis capilar, es capaz de diferenciar la zona de la mano donde se depositan los residuos por disparar un arma de fuego, de otras zonas muestreadas. Por tanto, es una opción viable, a los métodos que son utilizados en la actualidad para realizar este tipo de análisis.

Perspectivas

Dado que el principal problema del método de electroforesis capilar desarrollado, es tener límites de detección por encima de los niveles presentes de varios residuos, es necesario optimizar, el proceso de preconcentración; esto se dificulta debido a las diferencias entre la naturaleza química de los residuos, lo que provoca que algunos residuos se concentren, mientras que otros no.

Debido a lo anterior, una mejor opción sería el análisis de los residuos inorgánicos y orgánicos por separado, aplicando en cada caso el método de preconcentración adecuado a cada tipo de sustancia. Una opción sería la extracción en fase sólida con adsorbentes selectivos para cada tipo de residuo [47], esta extracción puede realizarse en línea lo que disminuirá la manipulación de la muestra, evitaría pérdidas y produciría electroferogramas más limpios. Dentro de estos sistemas se ha propuesto un sistema cruciforme, en el cual se pueden colocar varios capilares en paralelo, con concentradores en línea para distintos tipos de sustancias [48 - 49]. En el caso del estudio de los residuos depositados por disparar un arma de fuego, se necesitarían dos capilares con sus respectivos condensadores, uno para los residuos orgánicos y otro para los inorgánicos, y la separación se haría por separado en cada capilar, pero simultáneamente.

Una vez optimizado el paso de preconcentración de la muestra del método, otros residuos podrían ser detectados, mientras que la diferencia observadas para otros residuos serían más evidentes; todo lo anterior facilitaría la interpretación de los resultados y permitirá establecer criterios más confiables para diferenciar la zona de maculación de otras zonas.

Una vez logrado lo anterior, podrán estudiarse los distintos factores que determinan la determinación de los residuos en casos reales, como son, aquellos que determinan el depósito y persistencia de los residuos así como el efecto de interferencias que puedan estar presentes en muestras reales.

Índice de Tablas

TABLA	TITULO	PÁGINA.
1	Componentes de las Municiones.....	8
2	Fuentes Ambientales de Bario, Antimonio y Plomo.....	11
3	Valores de Referencia de Bario, Plomo y Antimonio.....	12
4	Clasificación de Modos de Electroforesis Capilar (I).....	22
5	Clasificación de Modos de Electroforesis Capilar (II).....	22
6	Clasificación de Modos de Electroforesis Capilar (III).....	23
7	Residuos Orgánicos por disparar un arma de fuego.....	31
8	Propiedades Fisicoquímicas de Residuos Orgánicos.....	32
9	Solubilidad de Residuos Orgánicos.....	33
10	Características de Surfactantes.....	36
11	Propiedades Fisicoquímicas de Residuos Inorgánicos.....	38
12	Separaciones de iones Metálicos por EC.....	42
13	Técnicas para Aumentar la Sensibilidad para EC.....	43
14	Características Químicas de los ácidos Aminocarboxílicos.....	47
15	Constantes de Complejación de ácidos Aminocarboxílicos.....	48
16	Movilidad de Complejos Metálicos.....	57
17	Parámetros de Operación de EAA-ET.....	65
18	Parámetros de la Separación.....	75
19	Sensibilidades Relativas.....	76
20	Amplificación de Campo.....	81
21	Selectividad y Reproducibilidad.....	87
22	Parámetros de la Curva de Calibración.....	89
23	Recuperación de Residuos por Frotamiento.....	92
24	Recuperación de Residuos por Cinta Adhesiva.....	93
25	Efecto de Contaminantes en la Recuperación.....	93
26	Residuos en personas que no accionaron un arma.....	95
27	Resultados con Disparos Revólver 38 mm.....	100
28	Análisis Estadístico. Resultados de plomo, Revólver 38 mm.....	101-102
29	Análisis Estadístico. Resultados de plomo, Revólver 32 mm.....	106-107
30	Residuos Inorgánicos después de Extracción orgánica.....	110
31	Concentración de Residuos Orgánicos después de extracción.....	111
32	Resultados de Plomo con Revólver 38 mm (II).....	115
33	Análisis estadístico. Resultados de plomo, Revólver 38 mm (II).....	115-116
34	Análisis de Varianza Residuos Inorgánicos.....	118
35	Análisis de Varianza Corregido de Residuos Inorgánicos.....	119
36	Análisis de Varianza Residuos Orgánicos.....	120
37	Análisis de Varianza Corregido de Residuos Orgánicos.....	122
38	Resultados con Revólver 38 mm con Cinta Adhesiva.....	123
39	Análisis de Varianza Residuos Inorgánicos por Cinta Adhesiva.....	123
40	Comparación de Resultados por distintas Técnicas de Muestreo.....	125-126
41	Comparación de Resultados obtenidos con Armas de distinto Calibre.	128
42	Análisis de cartuchos por PAI y EC.....	129

Índice de Figuras

FIGURA	TITULO	PAGINA
1	Partes del Iniciador.....	4
2	Residuos de un disparo de arma de fuego.....	5
3	Disparo de un Arma de Fuego.....	6
4	Partes de una Munición y un Proyectoil de Postas.....	7
5	Zonas de Maculación.....	17
6	Componentes de un Equipo de EC.....	19
7	Tipos de Introducción de Muestra en EC.....	20
8	Equilibrio ácido – base grupos silanol.....	25
9	Flujo Electroosmótico.....	25
10	Comparación de flujo electroosmótico con flujo laminar.....	28
11	Micelas.....	35
12	Proceso de Separación de CMEC.....	37
13	Proceso de Apilamiento.....	44
14	Proceso de Amplificación de Campo.....	45
15	Diagramas de Especie M-EDTA.....	48-51
16	Diagramas de Especie M-CDTA.....	51-55
17	Equipo de EC utilizado.....	60
18	Equipo de EAA-ET utilizado.....	61
19	Proceso de Muestras.....	64
20	Curva de calibración de plomo por EAA-ET.....	65
21	Efecto de la concentración de Boratos en la Eficiencia.....	68
22	Efecto de la concentración de Boratos en la Resolución.....	69
23	Efecto de la concentración de SDS en la separación.....	71
24	Efecto de la concentración de CDTA en los Complejos Metálicos.....	72
25	Relación Voltaje/Corriente.....	73
26	Electroferograma de la Mejor Separación Obtenida.....	74
27	Efecto del tiempo de Inyección Hidrodinámica en la Sensibilidad.....	77
28	Efecto del tiempo de Inyección Hidrodinámica en la Resolución.....	78
29	Efecto de la Inyección Electrocinética en la Separación.....	79
30	Apilamiento.....	80
31	Espectros UV de los Residuos en las condiciones de Separación.....	82-86
32	Análisis por EC de un Disparo realizado por un Revólver 32 mm.....	97
33	Análisis por EC de un Disparo realizado por un Revólver 38 mm.....	98
34	Análisis por EC de un Disparo realizado por una Pistola 22 mm.....	98
35	Resultados obtenidos de una Pistola 22 mm.....	99
36	Comparación EC vs. EAA-ET.....	103
37	Calcio encontrado después de un disparo en las zonas de maculación	104
38	Resultados obtenidos de un Revólver 32 mm.....	105
39	Plomo encontrado después de un disparo en las zonas de maculación	107
40	Resorcinol depositado después de disparar un revólver 32 mm.....	109
41	Determinación de Residuos Orgánicos después de una extracción.....	112
42	Centralitas depositada después de disparar un revólver 38 mm.....	114
43	Plomo encontrado después de disparar un revólver 38 mm en las zonas de maculación (II).....	117

44	Hierro encontrado después de disparar en las zonas de maculación....	118
45	Magnesio encontrado después disparar en las zonas de maculación...	119
46	Resorcinol, MF y 23-DNT encontrado después de disparar en las zonas de maculación.....	121
47	Distintos residuos encontrados después de disparar en las zonas de maculación.....	124

Anexo A-1

Unidades y Símbolos

Magnitud	Símbolo	Unidad	Relación con unidades fundamentales
Longitud	l	metro (m)	
Masa	m	kilogramo (kg)	
Volumen	L	Litros (L)	
Temperatura	T	°C	
Tiempo	t	Segundo	s.
Velocidad	v		$m s^{-1}$
Potencia	P	Watt (W)	$m^2 Kg s^{-3}$
Coefficiente de difusión	D		$m^2 s^{-1}$
Carga	q	Coulomb (C)	
Corriente eléctrica	I	Ampere (A)	$C s^{-1}$
Campo eléctrico	E		$m kg s^{-2} C^{-1}$
Potencial eléctrico	V	Volt (V)	$m^2 kg s^{-2} C^{-1}$
Presión		Pa	$m^{-1} kg s^{-2}$
Densidad	δ		$Kg L^{-1}$
Longitud de Onda	λ		m
Absortividad		Á	
Concentración		Molar (M) mg/L	$kg * 10^{-3}$ Peso Molecular ⁻¹ L ⁻¹ $kg * 10^{-6}$ L ⁻¹
Nano- (prefijo)	n-		10^{-9}
Micro- (prefijo)	μ -		10^{-6}
Mili- (prefijo)	m-		10^{-3}
Centi- (prefijo)	c-		10^{-2}
Kilo- (prefijo)	k-		10^3
Cambio en- (prefijo)	Δ		

Anexo A-2 Formulas

Formulas utilizadas para el cálculo de los parámetros de la separación:

Platos teóricos (N): $N = 16(t/w)^2$

Donde t_r corresponde al tiempo de retención y w a la anchura del pico en su base.

Resolución (Rs): $Rs = (t_2 - t_1) / 0.5(w_2 + w_1)$

Donde t_{r2} y t_{r1} , corresponde a los tiempos de retención de los picos 2 y 1, mientras que w_2 y w_1 , hacen referencia a la anchura de los respectivos picos en su base.

Movilidad Electroforética (μ_E): $\mu_E = (l \cdot L / t \cdot v) - (l \cdot L / t_{FEO} \cdot V)$

Donde l es la distancia al detector, L la longitud total del capilar en cm, t el tiempo de retención de la sustancia en particular, t_{FEO} , el tiempo de retención del flujo electroosmótico (ambos en segundos) y V el voltaje aplicado.

Formulas Estadísticas Aplicadas

Media: $\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$

Desviación estándar: $s = \left[\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1} \right]^{1/2}$

Varianza: **varianza = s^2**

Coficiente de variación: **CV = 100(s/media)**

Donde x_i son los valores de las medidas y n el número de medidas.

Ecuación de la curva: **$y = mx + b$**

Coficiente de correlación: $r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{[\sum (x_i - \bar{x})^2][\sum (y_i - \bar{y})^2]}$

Error de la correlación: $Se^2 = \frac{(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}) - \frac{[(\sum xy - \frac{\sum y \sum x}{n})]^2}{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n})}}{n-2}$

Limite de Detección: **LD = $X_b + 3s$; pudiendo ser $LD = b + 3se$**

Donde m es la pendiente de la recta, b la ordenada al origen, x la variable independiente y por último y la independiente.

Bibliografía

- 1.- Meng H.-H., Caddy B. "Gunshot residue analysis. A review" **J. Forensic Sci.** 42:4 (1997), 553-570
- 2.- Thornton J.I. "The Chemistry of Death by gunshot" **Anal. Chim. Acta** 288 (1994) 71-81
- 3.- Romolo F.S., Margot P. "Identification of gunshot residue: A critical review" **Forensic Sci. International** 119 (2001), 195-211
- 4.- Singer L.R., Davis D., Houck M.M. "A survey of gunshot residue analysis methods" **J. Forensic Sci.** 41:2 (1996), 195-198
- 5.- Di Maio V.J.M. "Gunshot Wounds" **Elsevier Science Pub. Co.** (1985)
- 6.- Krishnan S.S. "Detection of gunshot residues on the hands by trace element analysis" **J. Forensic Sci.** 22 (1977), 304-323
- 7.- Garofano L., Capra M., Ferrari F., Bizarro G.P., Di Tullio D., Dell'Olio M., Ghitti A. "Gunshot residues, Further studies on particles of environmental and occupational origin" **Forensic Sci. International** 103 (1999) 1-21
- 8.- Torre C., Mattutino G., Vasino V., Rubino C., "Brake linings: a source of non-gunshot residues particles containing lead, barium and antimony" **J. Forensic Sci.** 47:3 (2002) 494-504
- 9.- Gunaratman L., Kimmo H. "The identification of gunshot residue particles from lead-free Syntox ammunition" **J. Forensic Sci.** 39:2 (1994) 532-536
- 10.- Northrop D.M. "Gunshot Residue analysis by Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis: Assessment for application to Casework. Part 2" **J. Forensic Sci.** 46:3 (2001) 560-572
- 11.- MacCrehan W.A., Smith K.D., Rowe W.F. "Sampling protocols for the detection of smokeless powder residues using capillary electrophoresis" **J. Forensic Sci.** 43(1) (1998) 119-124
- 12.- Twibell J.D., Home J.M., Smalldown K.W., Higgs D.G., Hayes T.S. "Assessment of solvents for the recovery of nitroglycerine from hands using cotton swabs" **J. Forensic Sci.** 27 (1982) 792-800

- 13.- Thompson R.Q., Fetterolf D.D., Miller M.L. Mothershead III R.F. "Aqueous recovery from cotton swabs of organic explosives residue followed by solid phase extraction" *J. Forensic Sci.* 44:4 (1999) 795-804
- 14.- Tiselius A. "A new approach for electrophoretic analysis of colloidal mixtures" *Trans. Faraday Soc.* 33 (1937) 524-531
- 15.- Hjerten S. "Free zone electrophoresis" *Chromatogr. Rev.* 9:2 (1967) 122- 219
- 16.- Weston A., Brown P.R. "HPLC and CE Principles and Practice" **Academic Press San Diego (1997)**
- 17.- Baker D.R. "Capillary Electrophoresis" **Wiley-Interscience, New York (1995)**
- 18.- Heiger D.N. "High Performance Capillary Electrophoresis An Introduction" **Hewlett Packard, France (1997)**
- 19.- Altria K.D. www.ceandcec.com
- 20.- Issaq H.J., Janini G.M., Chan K.C., El Rassi Z. "Approaches for the optimization of experimental parameters in Capillary Zone Electrophoresis" in **Brown P.R., Grushka E.** Eds **Advances in Chromatography 35.** (1995) Chapter 3 **Marcel Dekker**
- 21.- Lide D.R., Milne G.W.A. Eds. "Handbook of Data on Organic Compounds" **CRC Press Boca Raton (1994)**
- 22.- Oehrle S.A. "Analysis of nitramine and nitroaromatic explosives by capillary electrophoresis" *J. of Chromatogr. A.*, 745 (1996) 233- 237
- 23.- Kleiböhmer W., Camman K., Robert J., Mussenbrock E. "Determination of explosive residues in soils by micellar electrokinetic chromatography and high performance liquid chromatography" *J. of Chromatogr.* 638 (1993) 349-356
- 24.- Northrop D.M., Martire D.E., MacCrehan W.A. " Separation and Identification of Organic Gunshot and Explosive Constituents by Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis" *Anal. Chem.* 63 (1991) 1038-1042
- 25.- Luong J.H.T., Guo Y. "Mixed mode Capillary Electrokinetic separation of positional explosive isomers using SDS and negative B- cyclodextrine derivatives" *J. of Chromatogr. A* 811 (1998) 225-232
- 26.- Northrop D.M. "Gunshot Residue analysis by Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis: Assessment for application to Casework. Part 1" *J. Forensic Sci.* 46:3 (2001) 549-559

- 27.- Tagliaro F., Smith F.P., Tedeschi L., Castagna F., Dobosz M., Boschi I., Pascali V. Chapter 10 in "Advanced. Chromatographic. and Electromigration Methods in Bioscience" Ed. Deyl Z., Miksik I., Tagliaro F., Tesarova E. **Elsevier 1998**
- 28.-Thormann W., Lurie I.S., McCord B., Marti U., Cenni B., Malik N. "Advances of capillary electrophoresis in clinical and forensic analysis (1999-2000)" **Electrophoresis 22 (2001) 4216-4243**
- 29.- Liu B.-F., Liu L.-B., Cheng J.-K. "Analysis of inorganic cations as their complexes by capillary electrophoresis" **J. of Chromatogr. A 834 (1999) 277-308**
- 30.- Macka M., Haddad P.R. "Determination of metal ions by capillary electrophoresis" **Electrophoresis 18 (1997) 2482-2501**
- 31.- Timerbaev A.R., Buchberger W "Prospects for detection and sensitivity enhancement of inorganic ions in capillary electrophoresis" **J. of Chromatogr. A 834 (1999) 117-132**
- 32.- Guzman N.A., Majors R.E. "New directions for concentration sensitivity enhancement in CE and microchip technology" **LC-GC North America 19 (2001) 1-10**
- 33.- Nielen M.W.F. "Trace enrichment of environmental samples in capillary electrophoresis" **TRAC 12:9 (1993) 345-356**
- 34.- Albert M., Debusschere L., Demesmay C., Rocca J.L. "Large volume stacking for quantitative analysis of anions in capillary electrophoresis" **J. of chromatogr. A 757 (1997) 281-289**
- 35.- Timerbaev A.R., Semenova O.P., Bonn G.K. " Capillary Zone Electrophoresis of Lanthanoid elements after complexation with Aminopolycarboxylic Acids" **Analyst 119 (1994) 2795-2799.**
- 36.- Timerbaev A.R., Semenova O.P. "Theoretical estimation of capillary zone electrophoresis behaviour of metal complexes using multivariate regression analysis" **J. of Chromatogr. A 690 (1995) 141-148**
- 37- Kotrly S., Sucha L. " Handbook of Chemical Equilibria in Analytical Chemistry" **Ellis Horwood Chichester (1985)**
- 38.- Timerbaev A.R., Semenova O.P., Fritz J.S. "Advanced possibilities on multi-element separation and detection of metal ions by capillary zone electrophoresis using precapillary complexation I. Separation aspects" **J. of Chromatogr. A 756 (1996) 300-306.**

- 39.-Whatley H., Chapman J. "Precision in capillary electrophoresis", **Beckman Coulter Technical information T1860A, E.U.A. (1998).**
- 40.- "The THGA Graphite Furnace: Techniques and Recommended Conditions", **Bodenseewerk Perkin Elmer GmbH (1991).**
- 41.- Revilla A.L., Havel J., Jandik P. "Peak splitting observed during capillary electrophoresis of α and β naphthols in borate buffer" **J. of Chromatogr. A 745 (1996) 225-232**
- 42.- Timerbaev A.R., Semenova O.P., Fritz J.S. "Improved photometric detection of metal ions by capillary zone electrophoresis after precapillary complexation" **J. of Chromatogr. A 811 (1998) 233-239.**
- 43.- Ross G.A. "Instrumental Validation in Capillary Electrophoresis and checkpoints for method validation" **Accredit. Qual. Assur 2:6 (1997) 275-284**
- 44.- Miller J.N., Miller J.C. "Estadística y Quimiometría para Química Analítica" **Pearson Educación Madrid (2002).**
- 45.- Northrop D.M., MacCrehan W.A. "Sample Collection, Preparation and Quantitation in the Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis of Gunshot Residues" **J. Liq. Chrom. 15:6 (1992) 1041-1063**
- 46.- Reardon M.R., MacCrehan W.A., Rowe W.F. "Comparing the Additive composition of Smokeless Gunpowder and Handgun fired Residues" **J. Forensic Sci. 45:6 (2000) 1196-1202**
- 47.- Guzman N.A., Stubbs R.J. "The use of selective adsorbents in CE-MS for analyte preconcentration and microreactions: A powerful three dimensional tool for multiple chemical and biological applications" **Electrophoresis 22 (2001) 3602- 3628**
- 48.- Guzman N.A. "Improved Solid Phase Microextraction device for use in on line Immunoaffinity CE" **Electrophoresis 24 (2003) 3718-3727**
- 49.- Guzman N.A. "Advances in the design of a Proteomic Engine base on a Multi-dimensional Immunoaffinity CE approach" in Guttman A., Paulus A. editors. 16th International Symposium on Microscale Separations and Analysis; 2003, January 17-22.