Revista Colombiana de Medicina Legal y Ciencias Forenses 2013 1(1) 8-12
Disponible en http://www.medicinalegal.gov.co

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DE RESIDUOS DE DISPARO POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE EN FROTIS DE MANOS, EN EL INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES REGIONAL BOGOTÁ.

Validation of gunshot residue analyses method by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry on hand swabs at the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Bogotá's Regional Branch Office.

***María Constanza Moya Jiménez*[1].**
[1]Química. Laboratorio de Evidencia Traza. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Bogotá, Colombia.
Autor para correspondencia:
María Constanza Moya Jiménez: cmoya@medicinalegal.gov.co

Resumen: Se desarrolló la validación del método para la determinación de antimonio, bario y plomo como analitos de interés en el análisis de residuos de disparo tomados de las manos mediante frotis con ácido nítrico. La técnica instrumental utilizada fue espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Los parámetros que se tuvieron en cuenta fueron: especificidad o selectividad, linealidad, precisión entendida como repetibilidad y precisión intermedia, límite de detección, sensibilidad, exactitud.

El método es lineal para el antimonio (^{121}Sb), bario (^{138}Ba) y plomo (^{208}Pb), en el rango de las concentraciones estudiadas (5 µg/l-500 µgl). Los límites de detección para los analitos son 0,174, 0,807 y 0,153 µg/l, respectivamente. Además, el método cumple con los criterios de precisión (CV%<5%) y permite la determinación de niveles de los analitos sin interferencia de señales debidas al algodón de los aplicadores y a sangre, contaminación frecuente en los casos forenses. Para los analitos estudiados se obtuvieron sensibilidades mayores a uno. Utilizando la prueba "t pareada" se determinó que el método validado diferencia entre no disparo y disparo, permitiendo contestar en forma afirmativa la pregunta planteada al inicio de esta investigación: ¿es posible determinar la presencia de antimonio, bario y plomo en frotis de manos, como elemento probatorio en procesos judiciales que involucren armas de fuego, por ICP- MS?

Por todo esto la metodología cumple con los parámetros tenidos en cuenta en esta validación; son por lo tanto confiables los resultados obtenidos en la evaluación de muestras para análisis de residuos de disparo con fines judiciales.

Palabras clave: Residuos de disparo, antimonio, bario, plomo, espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Abstract: A validation method was developed for the determination of antimony, barium and lead as the interest analytes in the analysis of gunshot residues collected from hands by the nitric acid technique. The analytical technique used was inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The analytical parameters evaluated were: specificity or selectivity, linearity, precision, detection limit, sensitivity, accuracy.

The method is lineal in the range of the studied concentrations (5 µg/l - 500 µg/l) for antimony (121Sb), barium (138Ba) and lead (208Pb). The detection limits for the analites are 0.174, 0.807, 0.153 µg/l , respectively. The method also complies with the precision criteria (CV% < 5%) and allows the determination of the analite levels without interference due to signals arising from the cotton in the swabs and from blood, which are common contaminants in forensic casework. For the studied analites sensitivities greater than 1 were obtained. Using the "Paired T" test it was possible to determine that the validated method is able to differentiate between shot and non shot, allowing to answer in a positive way the question asked at the beginning of this investigation: is it possible to determine the presence of antimony, barium and lead in samples collected from the hands by the nitric acid technique, as evidence in judicial investigations involving fireguns, by ICP-MS?

Due to all this, the methodology complies with the parameters taken into account during this validation study; therefore, the results obtained during the evaluation of samples for analysis of gunshot residues collected from hands are reliable.

Keywords: Gunshot residues, antimony, barium, lead, inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS).

Introducción

En Colombia, una de las principales causas de muerte en forma violenta es por arma de fuego, lo que implica que el análisis de residuos de disparo sea rutinario en el laboratorio de Evidencia Traza del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses Regional Bogotá, siendo este laboratorio el único en el Instituto que realiza este tipo de estudio, recibe aproximadamente 1.200 casos anuales.

El objetivo de este trabajo es contar con la validación documentada del método de análisis de

residuos de disparo por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), como parte del aseguramiento de la calidad que garantiza la confiabilidad del producto final que se entrega a la autoridad judicial, es decir, el informe pericial.

La ICP-MS es una técnica de aplicación en el análisis de residuos de disparo por su alta sensibilidad, precisión, bajos límites de detección (Skoog, D. 2001) y que posee límites de detección menores que las técnicas ópticas para la mayoría de los elementos de la tabla periódica. En esta ocurre la atomización e ionización de los elementos por analizar en un plasma generalmente de argón, seguida por la separación de los iones formados por su relación masa/carga y finalmente el recuento del número de iones de cada tipo cuando inciden en un detector (Thomas, R. 2004). Los espectros producidos de esta manera son sencillos y se utilizan para la determinación cualitativa de los elementos presentes en la muestra; para su medida cuantitativa se tienen curvas de calibración en las que se representa el cociente entre el recuento de iones para el analito respecto del recuento para un estándar interno en función de la concentración (Taylor, H. 2001).

Los residuos de disparo son evidencia física traza producto de la descarga de un arma de fuego y están constituidos por partículas tanto inorgánicas como orgánicas. El estudio forense se ha encaminado a la fracción inórganica, específicamente al antimonio, al bario y al plomo. Estos tres elementos se presentan en el fulminante de la munición de la siguiente manera:

- El iniciador: estifnato de plomo, reacciona al contacto con la aguja percutora.
- El oxidante: nitrato de bario, el cual aporta el oxígeno necesario para la reacción.
- El combustible: sulfuro de antimonio.

La cantidad de antimonio, bario y plomo que se deposita en las manos de los disparadores depende de diferentes factores como tipo de arma, munición, condiciones del arma, condiciones ambientales, actividad del disparador, tiempo transcurrido entre disparo y toma de muestras (Schwoeble, A 2000; Smyth, J. 2008).

La detección de los elementos removidos de las manos de los disparadores depende de la calidad de la toma de la muestra, de las circunstancias en que ocurren los hechos y de la técnica analítica empleada.

Materiales y métodos

Instrumentación

Se empleó el ICP-MS Thermo X series II en el Laboratorio de Evidencia Traza del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Regional Bogotá, de acuerdo al Procedimiento Estandarizado de trabajo (PET) "Método de análisis de residuos de disparo por la técnica de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente ICP-MS" código DG-M-PET-15-V01 (Moya, C. 2009).

Condiciones de operación y parámetros de adquisición del ICP-MS

- Flujo del nebulizador: 0,78
- Flujo del plasma: 13,0
- Flujo auxiliar: 0,70
- Potencia del RF (W): 1404

Introducción de la muestra:
- "*Sampling Depth* (mm)": 120
- Velocidad bomba peristáltica (rpm): 30

Cuádruplo:
- Modo de barrido (*scan*): *Peak jump*
- Barridos/réplica: 200
- Réplica/muestra: 3

Preparación de reactivos y estándares

- Ácido nítrico 2% con estándares internos ^{115}In y ^{209}Bi en una concentración de 50 µg/l a partir de estándares de referencia ICP-MS de 1000 µg/ml de indio y bismuto y ácido nítrico R.A.
- Curva de calibración:
  Solución intermedia multielemental de Sb, Ba, Pb de 1.000 µg/l: a partir de estándares de referencia certificados ICP-MS de Sb, Ba y Pb en ácido nítrico 2% de 1.000 µg/ml de concentración.

La curva de calibración se prepara a partir de la solución intermedia multielemental, en seis niveles de concentración (5, 10, 50, 100, 200 y 500 µg/l).

Los parámetros evaluados fueron los siguientes: especificidad o selectividad, linealidad, precisión entendida como repetibilidad y precisión intermedia, límite de detección, sensibilidad, exactitud, con un nivel de confianza del 95%, así:

En la selección de la relación masa/carga de los iones de interés se tomaron los isótopos de mayor abundancia, así: ^{121}Sb, ^{138}Ba y ^{208}Pb.

En la evaluación de la especificidad se analizaron aplicadores de algodón y aplicadores impregnados de sangre en diez réplicas.

Para la precisión y exactitud se analizaron soluciones múltiples de antimonio, bario y plomo en concentraciones de 5, 50, 200 µg/l con estándar interno ^{115}In para ^{121}Sb y ^{138}Ba; ^{209}Bi para ^{208}Pb, en concentración de 50 µg/l, hechas el mismo

día, por el mismo analista, en el mismo equipo, en seis repeticiones para cada concentración; además, durante tres días diferentes con tres réplicas. Igualmente, se corrió blanco de reactivos (ácido nítrico 2% con estándares internos) en diez réplicas para el cálculo de límite de detección y de cuantificación.

Para la linealidad se analizaron seis niveles de concentración, es decir, la curva de calibración, así: 5, 10, 50, 100, 200 y 500 µg/l de Sb, Ba y Pb (en soluciones múltiples), blanco de reactivos (ácido nítrico 2%), con tres réplicas por nivel, realizándose durante tres días diferentes.

La sensibilidad se estableció como la pendiente de la curva de calibración obtenida para cada analito.

En esta investigación se tuvo en cuenta un nivel de confianza del 95%.

Para estimar si existen diferencias significativas entre no disparo y disparo con el método validado mediante este estudio, se elaboró una base de datos con una muestra de 30 personas antes de disparar y después de disparar para munición calibre .38 y de 70 personas para munición 9 mm.

Se utilizó la herramienta estadística denominada "prueba t pareada" (Montgomery, D. 2002), entre antes del disparo y después del disparo, así:

Hipótesis nula:

H_0: $\mu_d = 0$

No existen diferencias significativas en concentraciones de antimonio, bario y plomo entre antes del disparo y después del disparo.

Hipótesis alternativa:

$H_1 : \mu_d \neq 0$

Si existen diferencias significativas entre no disparo y disparo.

La hipótesis nula se rechaza si el valor absoluto de t_0 (calculado) es mayor que $t_{\alpha/2\ n-1,}$ con α 0,025 (tabulado) y se acepta la hipótesis alterna.

La toma de muestras para después del disparo se realizó de acuerdo al Instructivo de toma de muestras (Moya, C.; Rojas, J. 2005).

La hipótesis nula se rechaza si el valor absoluto de t_0 es mayor que $t_{\alpha/2,\ n-1}$, con α 0,025 y se acepta la hipótesis alterna.

Tratamiento de las muestras

La recolección de las muestras se realizó de acuerdo al Instructivo "Toma y manejo de residuos de disparo en manos para análisis por ICP-MS" código DG-M-I-30-V02. El análisis instrumental se efectuó de acuerdo al PET de este análisis.

Resultados y discusión

Para el parámetro de especificidad, los estudios realizados con aplicadores de algodón y con aplicadores impregnados de sangre muestran que la sangre y el algodón no presenta interferencia para el análisis de residuos de disparo, ya que las concentraciones encontradas de los analitos estudiados no corresponden a los niveles determinados como compatibles con residuos de disparo de acuerdo con bases de datos obtenidas previamente (Tabla 1).

		^{121}Sb			^{138}Ba			^{208}Pb		
Concentración (µg/l)		5	50	200	5	50	200	5	50	200
Repetibilidad DER %		1,26	0,72	0,11	0,51	0,44	0,12	0,57	0,81	0.1
Precisión intermedia DER %		5,7	1,34	0,4	4,71	1,58	1,1	3,079	0,645	0.655
Exactitud % ER		0,29	2,67	1,09	11,68	0,69	0,44	3,64	0,1	0.13
Límite detección µg/l		0,174			0,807			0,153		
Límite de cuantificación µg/l		0,58			2,69			0,51		
Sensibilidad analítica (n = 54) CPS/µg/l		14656			50500			95747		
Rango lineal µg/l		5 a 500			5 a 500			5 a 500		
Especificidad copitos algodón µg/l		0,1731 no compatible con RD			0,0469 no compatible con RD			0,0297 no compatible con RD		
Especificidad sangre µg/l		0,0359 no compatible con RD			35,3 no compatible con RD			2,6930 no compatible con RD		
t calculado 9 mm	**Dorso izquierdo**	8,3861			8,2141			9,485		
	Dorso derecho	10,47			8,9475			10,5704		
	Palma izquierda	6,882			9,325			2,15		
	Palma derecha	7,5014			8,67			7,1469		
t calculado .38	**Dorso izquierdo**	6,6331			6,0877			6,7353		
	Dorso derecho	6,8043			7,3613			6,9148		
	Palma izquierda	5,1849			4,1778			6,3492		
	Palma derecha	4,9122			5,95			5,879		

Tabla 1. Resultados de la validación

Al observar los resultados de la repetibilidad y precisión intermedia en la mencionada tabla, se nota cómo las desviaciones estándares relativas (DER) obtenidas experimentalmente para los diferentes analitos –Sb, Ba, y Pb– en los tres niveles de concentración (5, 50 y 200 mg/l) se encuentran en valores por debajo del criterio de aceptación (5%), cumpliendo con el evaluador de este parámetro.

Por lo tanto, se deduce que las variaciones presentadas durante el trabajo experimental no afectan apreciablemente los resultados obtenidos bajo condiciones tales como mismo día, mismo analista, mismo equipo instrumental.

Adicionalmente, se estimó la validez estadística de la precisión intermedia mediante el análisis de varianza de un factor, encontrándose que no hay diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% en las concentraciones evaluadas de los tres analitos durante tres días diferentes, estableciéndose que las variaciones presentadas durante la experimentación no afectan significativamente los resultados bajo la condición de día diferente.

Se detectó que el sistema para el análisis de residuos de disparo es lineal en el rango de concentraciones estudiadas (5µg/l a 5005µg/l), no encontrándose diferencia significativa entre respuestas para una misma concentración, lo cual comprueba que el desvío de la linealidad no fue significativo.

La sensibilidad se obtuvo para los tres analitos a partir de la pendiente de la curva de calibración, con valores superiores a 1 para el ^{121}Sb, ^{138}Ba y ^{208}Pb (Figuras 1 a 3).

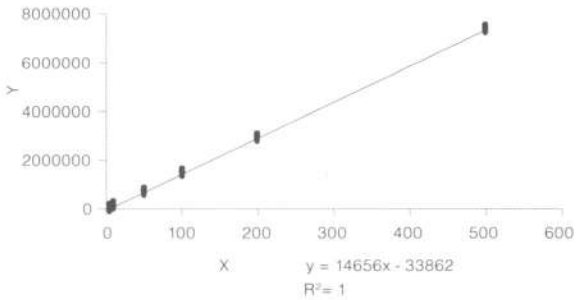

Figura 1. Curva de calibración para el antimonio 121Sb

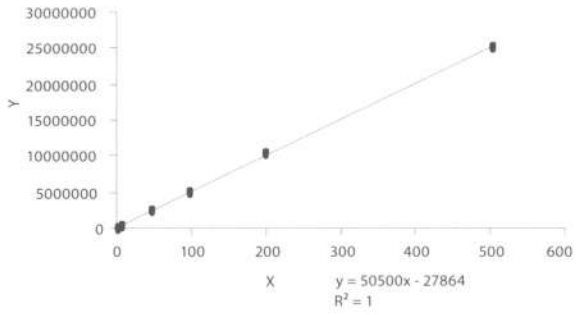

Figura 2. Curva de calibración para el bario 138Ba

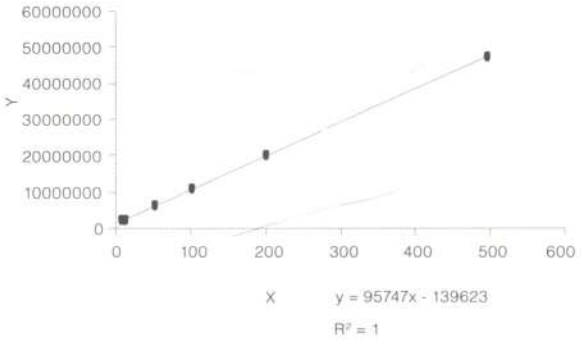

Figura 3. Curva de calibración para el plomo 208Pb

Los límites de detección y cuantificación de los tres analitos estudiados se encuentran en valores por debajo del primer nivel de la curva de calibración, que es 5 µg/l.

Considerándose que el método es semicuantitativo debido a que la muestra no es homogénea en un frotis de manos, se determinó la exactitud como porcentaje de error relativo, obteniéndose valores por debajo del 5%, a excepción del nivel de 5 ppb para el bario, que fue mayor, con las soluciones múltiples en tres días diferentes.

Observando los resultados consignados en la Tabla 1, con relación a la comparación entre antes y después del disparo, se determinó como "t calculado" para las dos municiones (.38 y 9 mm), en los tres elementos analizados, en los dorsos y palmas de las manos es mayor que t tabulado para 29 y 69 grados de libertad (2.00). Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa.

De lo anterior se deduce que sí existen diferencias significativas en las concentraciones de antimonio, bario y plomo en el frotis de manos de personas antes y después del disparo, lo que permite afirmar que el método de análisis de residuos de disparo por ICP-MS validado, sí diferencia entre no disparo y disparo, la metodología cumple con los parámetros estudiados.

Conclusiones

La metodología cumple con los parámetros de validación tenidos en cuenta en este estudio, lo que indica que la técnica ICP-MS es válida en la determinación de antimonio, bario y plomo como analitos de interés en el análisis de residuos de disparo.

El método utilizado en el análisis de residuos de disparo por la técnica ICP-MS sí diferencia entre no disparo y disparo; esta aseveración fue comprobada experimentalmente mediante la herramienta estadística "t pareada"

Bibliografía

1) Montgomery D. Diseño y análisis de experimentos. Segunda edición. México: Limusa-Wiley; 2002.
2) Moya C, Rojas J. Instructivo, toma y manejo de muestras de residuos de disparo en manos para análisis por ICP-MS. Bogotá: Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses – Regional; 2005.
3) Moya C. Procedimento Estándar de Trabajo (PET). Método de análisis de residuos de disparo por la técnica de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente. ICP-MS. Bogotá: Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses; 2009.
4) Schwoeble A, Exlin D. Current Methods in Forensic Gunshot Residues Analysis. Portland: CRC Press; 2000.
5) Skoog D. Principios de análisis instrumental. Quinta edición. Madrid: McGraw-Hill; 2001.
6) Smyth J. Chemical analysis of firearms, ammunition and gunshot residue. New York: International Forensic Science and Investigation Series. CR Press; 2008.
7) Taylor H. Inductively Coupled Plasma Mass spectrometry. Practices and Techniques. California: Academic Press; 2001.
8) Thomas R. Practical Guide to ICP-MS. New York: Marcel Deker Inc.; 2004.

Otra literatura consultada

- Bakowska E. Agilent Technologies. Publication No. 5988-0532 EN; 2001.
- Burgess Christopher. Valid Analytical Methods and Procedures. Cambridge: Published by The Royal Society of Chemistry, PrePress Ltd. pp; 2000: 6-46.
- Bureau of Forensic Services. Physical Evidence Bulletin. Gunshot Residue Collection (GSR). Departament of Justice. 2000.
- Koons R. Analysis of gunshot primer residue collection swabs by inductively coupled plasmamass spectrometry. Journal Forensic Sci. 1998; 43(4):748-754.
- Shapiro, S. & Wilk. Analysis of variance test for normalitation. Biometrika; 52:2009: 591-611. Online version by Dittami Simon.
- Souza J. & Neto; O. Measurement of gunshot residues by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. Further studies with pistols. Forensic Science International. 2007; 172:63-66.