

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 785**

21 Número de solicitud: 201130143

51 Int. Cl.:

G01N 33/22 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

03.02.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.08.2012

Fecha de la concesión:

26.04.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

10.05.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)
PLAZA DE SAN DIEGO, S/N
28801 ALCALÁ DE HENARES (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ DE LA OSSA, M^a Ángeles;
TORRE TOLDÁN, Mercedes y
GARCÍA-RUIZ, Carmen**

74 Agente/Representante:

GUTIÉRREZ DE MESA, José Antonio

54 Título: **Procedimiento para la determinación de las macromoléculas intactas de nitrocelulosa y polímeros de D-glucopiranososa mediante Electroforesis Capilar.**

57 Resumen:

Procedimiento para la determinación de las macromoléculas intactas de nitrocelulosa y polímeros de D-Glucopiranososa mediante electroforesis capilar. El objetivo de la invención es el desarrollo de un procedimiento analítico pionero mediante Electroforesis Capilar con detección por Fluorescencia Inducida por Láser (CE-LIF) que permita determinar la nitrocelulosa intacta, que es una macromolécula heterogénea química y estructuralmente y de elevada masa molar. La invención consiste en la derivatización de la macromolécula con la sal trisódica del ácido 1,3,6-trisulfónico-8-aminopireno (APTS), su posterior separación electroforética utilizando un medio ácido como el tampón formiato a pH 2,0 y su detección LIF directa a una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 520 nm. El procedimiento se ha aplicado con éxito a la determinación de nitrocelulosa contenida en pólvoras sin humo de simple, doble y triple base, nitrocelulosa de bajo contenido en nitrógeno y macromoléculas similares como son la celulosa y el almidón.

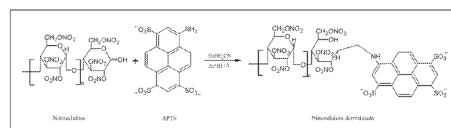


Figura 1

ES 2 386 785 B1

**PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS
MACROMOLÉCULAS INTACTAS DE NITROCELULOSA Y POLÍMEROS DE
D-GLUCOPIRANOSA MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR**

5

DESCRIPCIÓN

El procedimiento analítico propuesto permite la determinación de nitrocelulosa
10 intacta mediante Electroforesis Capilar con detección por Fluorescencia Inducida por
Láser (CE-LIF). Actualmente no existe ningún protocolo analítico para la determinación
de nitrocelulosa intacta, por lo que este procedimiento supone un gran avance ya que
permite determinar, de manera rápida y sencilla, la presencia de nitrocelulosa en
muestras que contengan esta macromolécula como, por ejemplo, las pólvoras
15 homogéneas o de base nitrocelulósica de simple, doble y triple base. Además, este
procedimiento también es válido para la determinación de otros polímeros de D-
glucopiranososa como son la celulosa y el almidón.

SECTOR DE LA TÉCNICA

20

La presente invención tiene su campo de aplicación dentro del área de la
Química y la Tecnología Química y utiliza como técnica la Electroforesis Capilar. En
particular, esta invención se refiere al desarrollo de un método analítico de
determinación de las macromoléculas intactas de nitrocelulosa y polímeros de D-
25 glucopiranososa en muestras de pólvora, colodión, papel y almidón.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La nitrocelulosa es un material blanco, de textura fibrosa y de apariencia similar al
30 algodón, que se fabrica a partir de celulosa. La celulosa es un polisacárido constituido
por un intervalo comprendido entre 100 y 10000 unidades de D-glucopiranososa unidas
por enlaces β (1 \rightarrow 4) [1]. Este polisacárido natural reacciona con ácido nítrico
produciendo un polímero, la nitrocelulosa, también llamada nitrato de celulosa. La

reacción general de formación de la nitrocelulosa a partir de la celulosa es un proceso de esterificación reversible y muy exotérmico esquematizado como: $R-OH + HONO_2 \leftrightarrow R-ONO_2 + H_2O$ [2].

Tanto el precursor, la celulosa, como el producto final, la nitrocelulosa, tendrán una estructura similar, a excepción de los grupos presentes en los carbonos C2, C3 y C6. Estas posiciones, que en la molécula de celulosa están ocupadas por grupos hidroxilo, son las únicas disponibles para la nitración. Debido a que no todos los carbonos presentan la misma probabilidad de reacción con los grupos nitro, existe la posibilidad de obtener nitrocelulosa con diferente grado de nitración. De hecho, el orden de reactividad es $C6 \gg C2 \approx C3$ [2, 3]. Por tanto, la fórmula molecular de la nitrocelulosa es $(C_6H_7O_2(OH)_{3-x}(ONO_2)_x)_n$, donde x indica el número de grupos hidroxilo intercambiados por grupos nitro. La cantidad de grupos hidroxilo sustituidos en una molécula se define como «grado de sustitución» (DS), cuyo cálculo se realiza mediante la ecuación (1) [4]:

15

$$DS = \frac{3,6 \times \text{contenido en nitrógeno} [\%]}{31,13 - \text{contenido en nitrógeno} [\%]} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Este parámetro, que depende del contenido en nitrógeno, representa una de las propiedades más importantes de la nitrocelulosa puesto que su valor afecta directamente a otras propiedades de este polímero, como son la solubilidad y la viscosidad. La solubilidad de la nitrocelulosa es inversamente proporcional al DS y al grado de polimerización (DP, definido como el número de monómeros repetidos a lo largo de la cadena polimérica).

La nitrocelulosa con un bajo contenido en nitrógeno (<12%) se utiliza, entre otras aplicaciones, para fabricar películas fotográficas, tintas y pinturas, mientras que la nitrocelulosa con un alto contenido en nitrógeno (>12%) se caracteriza por presentar naturaleza explosiva y debido a tales características, su principal aplicación se centra en la formación de composiciones explosivas, como son las dinamitas y los propulsores [2, 4, 5]. Las dinamitas son explosivos fuertes utilizados habitualmente con fines civiles. Están constituidas por compuestos de carácter explosivo (nitrate de amonio y nitroglicol), compuestos combustibles (butil-ftalato, harina o serrín y nitrocelulosa) y compuestos inertes (como carbonato de calcio). Los propulsores o pólvoras se utilizan para impulsar los proyectiles a elevadas velocidades y se clasifican según su

composición en: pólvoras negras, homogéneas (también conocidas como pólvoras coloidales o de base nitrocelulósica), compuestas y de alto poder explosivo [2, 6]. De los distintos propulsores existentes, las pólvoras homogéneas y algunas de alto poder explosivo tienen como componente activo (componente energético del propulsor) la nitrocelulosa. Las pólvoras homogéneas se dividen en tres tipos, en función de su número de componentes activos: i) pólvoras de simple base, que contienen principalmente nitrocelulosa; ii) pólvoras de doble base, que están formadas por nitrocelulosa y otra sustancia explosiva como nitroglicerina, dinitroetilenglicol o dinitrotolueno y iii) pólvoras de triple base, que están compuestas por nitrocelulosa y otras dos sustancias explosivas (nitroglicerina o dinitroetilenglicol y nitroguanidina) [6, 7]. Entre las pólvoras de alto poder explosivo se encuentran las pólvoras LOVA (*low-vulnerability-ammunition*), que están formadas principalmente por hexógeno y un derivado de celulosa [2, 8] y las pólvoras HP (*high-performance*) que suelen contener hexógeno, nitrocelulosa y otros explosivos como el nitrato de triaminoguanidina.

Actualmente, el estudio de compuestos explosivos presenta un gran interés en química forense debido, en parte, a los ataques terroristas cometidos contra la población civil y militar. Por ello, hoy en día son necesarios estudios para la caracterización y la determinación de este tipo de compuestos, de manera que se pueda llegar al origen del delito. En el campo de los propulsores, la nitrocelulosa presenta un gran interés puesto que forma parte de la mayoría de éstos.

Aunque existen numerosos estudios sobre compuestos explosivos de naturaleza orgánica, hoy en día, el estudio de la nitrocelulosa continúa siendo un desafío en muchos aspectos. Características de la nitrocelulosa, tales como su elevada masa molar ($\approx 20-250$ kDa [5]), su alta complejidad estructural y su comportamiento químico inusual, dificultan el estudio rutinario de esta macromolécula. Además, este polímero generalmente se encuentra embebido en una matriz compleja y, por tanto, mezclado con otros componentes de diversa naturaleza. La cromatografía líquida, y en particular la cromatografía de exclusión molecular (SEC), ha sido la técnica de separación por excelencia para la determinación y caracterización de nitrocelulosa [9-19]. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados por esta técnica se centran en la determinación de parámetros de caracterización de polímeros, como son la distribución de la masa molar, la viscosidad y el índice de refracción específico. En otros trabajos realizados se han estudiado las propiedades térmicas, mecánicas y morfológicas de este compuesto

mediante técnicas de análisis térmico (calorimetría diferencial de barrido, DSC; análisis termomecánico TMA; análisis mecánico dinámico DMA) [20, 23], técnicas espectroscópicas (espectroscopia infrarroja fotoacústica, FTIR-PAS; espectroscopia infrarroja de micro-reflectancia, FTIR-MR; espectroscopia infrarroja de reflectancia total atenuada escala macro y micro, Macro y Micro- ATR / FTIR) [21, 22] y técnicas de caracterización morfológica (medidas de fuerza, compresión, etc.) [24]. Además, se ha estudiado el proceso de degradación de la nitrocelulosa por técnicas térmicas (DSC; calorimetría diferencial de barrido modulada, MDSC; termogravimetría, TG; análisis térmico diferencial, DTA; calorimetría de aceleración, ARC) espectroscópicas (espectrofotometría, espectroscopia infrarroja, FTIR; espectroscopia FTIR por salto de temperatura, T-Jump-FTIR; espectroscopia FTIR acoplada a espectrometría de masas, FTIR-MS; espectroscopia FTIR por salto de temperatura acoplada a espectrometría de masas con un analizador de tiempo de vuelo, T-Jump/TOF-MS; resonancia magnética nuclear de carbono 13, ^{13}C -NMR) y cromatográficas (cromatografía de gases, GC; cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, GC-MS) [25-46].

En cuanto a la determinación de nitrocelulosa, hasta la fecha sólo se ha realizado por cromatografía líquida de alta eficacia y de intercambio iónico, tras su hidrólisis a nitratos y nitritos [47-49], pero no de forma intacta. Por ello, el objetivo de esta invención es el desarrollo de un procedimiento pionero por CE-LIF que permita determinar la nitrocelulosa intacta.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El procedimiento para la determinación de nitrocelulosa intacta por CE-LIF se basa en una derivatización de la macromolécula con APTS antes de su separación electroforética. Mediante la reacción de derivatización, el agente derivatizante, APTS, se incorpora a la molécula de nitrocelulosa mediante la reacción de aminación reductora reflejada en la **Figura 1**, dotando así a este polímero de tres cargas negativas y de las propiedades fluorescentes propias del agente derivatizante. Estas dos características son indispensables para llevar a cabo la separación por CE y la detección mediante LIF, en un equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ CE System equipado con un detector LIF de Argón-Ión.

Tabla 1. Resumen del procedimiento a seguir para determinar nitrocelulosa intacta por CE-LIF.

CONDICIONES DE DERIVATIZACIÓN	
Cantidad de muestra	0,30-0,50 mg
Reactivos de derivatización	2,0 μL de APTS $1,0 \times 10^{-4}$ mg mL ⁻¹ en ácido acético al 15% (v/v) y 2,0 μL de CBH $1,0$ mol L ⁻¹ en tetrahidrofurano
Temperatura	65 °C
Tiempo de derivatización,	4 h
CONDICIONES DE SEPARACIÓN POR CE-LIF	
Tampón de separación	Formiato 1,0 M a pH 2,0
Capilar	Sílice fundida: 50 μm de diámetro interno, 375 μm de diámetro externo y 50,2 cm de longitud total (40,0 cm de longitud efectiva)
Acondicionamiento (entre inyecciones)	Acido clorhídrico 0,1 M (20 psi, 10 min) Agua mili-Q (20 psi, 2 min) Tampón de separación (20 psi, 4 min)
Inyección de muestra	0,5 psi - 5 s
Temperatura	25 °C
Voltaje	-20 kV
Detección	LIF, $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm

5 CBH, cianoborohidruro de sodio; λ_{ex} , longitud de onda de excitación; λ_{em} , longitud de onda de emisión;

Determinación cualitativa de nitrocelulosa de alto y bajo grado de nitración

10

El procedimiento se aplica a la determinación de nitrocelulosa de alto grado de nitración contenida en pólvoras de simple, doble y triple base, así como en colodiones,

que son patrones comerciales de nitrocelulosa caracterizados porque suelen contener nitrocelulosa con un bajo grado de nitración. Los resultados confirman la presencia de nitrocelulosa en todas las muestras. En la **Figura 2** se muestra el electroforegrama correspondiente al agente derivatizante (blanco analítico) utilizado, la sal trisódica del ácido 1,3,6-trisulfónico-8-aminopireno (APTS) mientras que en las **Figuras 3 y 4** se muestran los perfiles electroforéticos obtenidos para las muestras conteniendo nitrocelulosa correspondientes a pólvoras de simple-, doble- y triple-base y colodiones, respectivamente. Como se observa en la **Figura 2** el agente derivatizante presenta una señal muy intensa entre el cuarto y sexto minuto, sin embargo en las **Figuras 3 y 4** se pone de manifiesto como las señales correspondientes a la molécula de nitrocelulosa aparecen, en todos los casos, aproximadamente a partir del sexto minuto de separación y con un perfil típico de polímero caracterizado por distribuciones gaussianas de picos.

15 *Determinación cualitativa de macromoléculas similares a la nitrocelulosa: celulosa y almidón*

El procedimiento también se aplica a la determinación de celulosa en muestras de papel (folio) (**Figura 5**) y almidón (**Figura 6**). Como para la nitrocelulosa, se observan perfiles de picos típicos de polímero.

20

Ventajas principales del procedimiento

Las ventajas principales del procedimiento inventado son las siguientes:

- 25 - El procedimiento objeto de la invención es pionero para la determinación de nitrocelulosa intacta mediante CE-LIF.
- El procedimiento objeto de la invención es sencillo porque sólo requiere la pulverización de la muestra que contiene nitrocelulosa antes de su derivatización con APTS y su determinación por CE-LIF, utilizando un medio de separación barato y asequible, basado únicamente en un tampón acuoso a pH ácido.
- 30 - El procedimiento objeto de la invención requiere una mínima cantidad de muestra.
- El procedimiento desarrollado permite detectar selectivamente la nitrocelulosa intacta derivatizada sin que interfieran el resto de componentes de la muestra.

- El procedimiento desarrollado permite determinar la presencia de nitrocelulosa en muestras que contienen nitrocelulosa de alto grado de nitración, como son los explosivos (p. ej. las pólvoras de simple-, doble- y triple-base), así como en muestras que contienen nitrocelulosa de bajo grado de nitración, como son los colodiones.
- El procedimiento desarrollado también es aplicable a macromoléculas similares a la nitrocelulosa como es la celulosa y el almidón, hecho que amplía enormemente su campo de aplicación.

10 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Reacción de derivatización de nitrocelulosa con APTS.

Figura 2. Perfil electroforético obtenido para un blanco analítico 2,0 μL de APTS y 2,0 μL de CBH. Condiciones de derivatización y separación por CE-LIF de la Tabla 1.

Figura 3. Perfil electroforético obtenido para muestras que contiene nitrocelulosa con alto grado de nitración correspondientes a 0,30 mg de pólvoras de (a) simple-, (b) doble- y (c) triple-base. Condiciones de derivatización y separación por CE-LIF de la Tabla 1.

Figura 4. Perfil electroforético obtenido para una muestra que contiene nitrocelulosa con bajo grado de nitración correspondiente a 0,50 mg de colodión. Condiciones de derivatización y separación por CE-LIF de la Tabla 1.

Figura 5. Perfil electroforético obtenido para una muestra que contiene celulosa correspondiente a 0,50 mg de papel de folio comercial. Condiciones de derivatización y separación por CE-LIF de la Tabla 1, excepto el tiempo de derivatización, 6 h.

Figura 6. Perfil electroforético obtenido para una muestra de 0,50 mg de almidón diluida 1/100. Condiciones de derivatización y separación por CE-LIF de la Tabla 1.

MODO DE REALIZACIÓN

Preparación de muestras

Se analizan muestras de pólvoras sin humo, que contienen nitrocelulosa con un alto grado de nitración, colodión, que contiene nitrocelulosa de bajo grado de nitración, folio de papel comercial, que contiene celulosa y almidón.

5 La preparación de las muestras depende de su forma física original. Así, las muestras de pólvora, antes de su derivatización, se pulverizan siguiendo distintos procedimientos. Las pólvoras con forma cilíndrica, circular o pulverulentas, se someten, primero, a una molienda en un molino homologado de pólvoras; seguidamente, se pulverizan en un mortero de cerámica y, por último, se congelan, sumergiéndolas en
10 con 5mL de nitrógeno líquido. Esta operación se repite varias veces hasta conseguir un polvo fino lo más homogéneo posible y, finalmente, se secan a temperatura ambiente durante dos días. Las pólvoras en forma de película o incompatibles con la molienda se pulverizan empleando un bisturí.

Las muestras de colodión se presentan en disolución con distintos disolventes
15 orgánicos, por lo que se deposita una parte alícuota de la muestra ($\approx 2-3$ mL) en un vidrio de reloj y se deja evaporar el disolvente durante 24 horas. De esta manera se obtiene un film incoloro o amarillento que se pulveriza en un mortero de cerámica, una vez congelado con 5mL de nitrógeno líquido; se repite la operación tantas veces como sea necesario para conseguir un polvo fino y lo más homogéneo posible.

20 Las muestras de folio se pulverizan con un bisturí, siguiendo el método usado para las pólvoras en forma de película, empleando un bisturí.

El almidón se comercializa en forma de polvo, luego no precisa tratamiento previo a su derivatización y determinación por CE-LIF.

25 *Condiciones de derivatización*

Las condiciones optimizadas para llevar a cabo la reacción de derivatización con APTS requieren partir de una cierta cantidad de muestra (0,30 mg de pólvora o 0,50 mg de colodión, de folio o de almidón) se introducen en un microvial de Beckman Coulter
30 CE junto con 2,0 μL de APTS $1,0 \times 10^{-4}$ mg mL⁻¹ en ácido acético al 15% (v/v) y 2,0 μL de CBH 1,0 M en tetrahidrofurano. Se tapan los viales y se aíslan mediante su envoltura con parafilm y en papel de aluminio para evitar su exposición a la luz. Los viales se introducen en un baño de agua a una temperatura de 65°C durante 4 horas (muestras de

pólvora, colodión y almidón) o 6 horas (muestras de folio) para que tenga lugar la reacción de derivatización. Se prepara un blanco analítico, que contiene, únicamente, el mismo volumen de APTS y CBH indicado previamente, sin incorporar la muestra. Antes de la inyección en el equipo CE-LIF las muestras se dejan enfriar hasta
5 temperatura ambiente, se adicionan 46,0 µL de agua mili-Q y se agitan levemente, excepto las muestras de almidón, que requieren una dilución en proporción 1/100 previa a la inyección.

Condiciones de separación electroforética por CE-LIF

10

Las condiciones electroforéticas para realizar los análisis (por duplicado) de las muestras se indican en la Tabla 1.

APLICACIÓN INDUSTRIAL

15

La determinación de nitrocelulosa de alto grado de nitración, que es aquella que está contenida en muestras de explosivos, como son las pólvoras sin humo, es de enorme interés para los laboratorios forenses, como por ejemplo los laboratorios de química del Servicio de Criminalística de la Guardia Civil y de la Policía Científica del
20 Cuerpo General de Policía, así como para los Institutos Tecnológicos del Ejército, por ejemplo, el Instituto Tecnológico de la Marañosa. La determinación de nitrocelulosa de bajo grado de nitración, como la que está presente en pinturas, barnices, lacas de uñas, cigarrillos, películas fotográficas, etc. es interesante para todas las industrias asociadas a la fabricación o manipulación a estos productos. La determinación de polímeros afines
25 a la nitrocelulosa, como es la celulosa y el almidón, amplía el interés del procedimiento a industrias papeleras y alimentarias principalmente, además de las dedicadas a los adhesivos (gomas de cola de fusión, estampillas, encuadernación, sobres, etiquetas), explosivos (adhesivo para la cabeza de los fósforos), construcción (aglutinante para tabiques, adhesivo para madera laminada), metal (adhesivo de metal poroso,
30 aglutinantes para núcleos de fundición), textiles (acabado de telas, estampado), cosméticos (maquillajes, cremas faciales), productos farmacéuticos (revestimiento de cápsulas, agentes dispersantes), a la minería (separación de minerales por flotación y sedimentación) y a otras aplicaciones, como son películas de plásticos biodegradables,

baterías secas, aglutinante de materias primas en la fabricación de aislantes de asbesto y corcho, agente espesante en la fabricación de tintes y pinturas, aglutinante en la fabricación de crayones de cera, componente en la elaboración de fibra de vidrio, etc.

5

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Nelson D.L.; Cox M.M. *Lehninger Principios de Bioquímica*. Editorial: Omega, Barcelona, **2009**, ISBN: 978-8428214865, Capítulo 7, 235-270.
- [2] Monforte M. *Las Pólvoras y sus Aplicaciones*. Editorial: Unión Española de Explosivos S.A., **1992**, vol. 1, Capítulo 10, 304-360.
- [3] Saunders C.W., Taylor L.T. *J. Energ. Mater.* **1990**, 149-203.
- [4] Nitrocellulose. (2008). Tomado de http://www.dow.com/dowwolff/en/pdfs/NC_Broschure_Jan08.pdf en Julio de **2009**.
- [5] Selwitz C. *Cellulose Nitrate in Conservation*. The Getty Conservation Institute, **1998**, ISBN: 0-89236-098-4.
- [6] Rasines Ladero R.; López López M.; Torre Roldán M.; García Ruiz C. *Anales de Química*, **2009**, 4, 265-270.
- [7] López-López M.; Fernández de la Ossa M.A.; Sáiz Galindo J.; Ferrando J.L.; Vega A.; Torre M.; García-Ruiz C. *Talanta*, **2010**, 81, 1742-1749.
- [8] Ouellet N.; Brochu S.; Lussier L. *Appl. Spectrosc.* **2002**, 56, 125-133.
- [9] Heinzmann G. *Int. Annu. Conf. ICT. 33rd*, **2002**, 58, 1-5.
- [10] Macdonald A.F. *Int. Annu. Conf. ICT. 34th*, **2003**, 126 1-10.
- [11] Deacon P.; Macdonald A.; Gill P.; Mai N.; Bohn M.; Pontius H. *Int. Annu. Conf. ICT. 39th*, **2008**, 68, 1-12.
- [12] Deacon P.; MacDonald A.; Gill P.; Mai N.; Bohn M.A.; Pontius H.; van Hulst M.; de Klerk W.; Baker C. *Int. Annu. Conf. ICT. 40th*, **2009**, 81, 1-14.
- [13] NATO STANAG 4178 (Ed.2) *Test Procedures for Assessing the Quality of Deliveries of Nitrocellulose from one NATO Nation to Another*. Military Agency for Standardization, Editorial: NATO Headquarters, Bruselas, Bélgica, **2009**.
- [14] Deacon P.R.; Garman R.N., Macdonald A.F., Baker C.A. *Int. Annu. Conf. ICT. 37th*, **2006**, 151, 1-7.

- [15] Bellerby J.M.; Deacon P.R.; Gill P. *Int. Annu. Conf. ICT. 37th*, **2006**, 71, 1-11.
- [16] Deacon P.R.; Kennedy G.R.A.; Lewis A.L.; Macdonald A.F. *Symp. Chem. Probl. Connected Stab.Explos. (Proc.)*, 12th **2004**, 195-204.
- [17] Christodoulatos C.; Su T.; Koutsospyros A. *Water Environ. Res.* **2001**, 73, 185-191.
- [18] Cropek D.; Dankowski B. *Sonolysis of nitrocellulose fines*, ERDC/CERL TR-0014 **2000**; Tomado de http://www.cecer.army.mil/TechReports/cropek_sonolysis_NCfines/cropek_sonolysis_NCfines.pdf en Enero de 2010.
- [19] MacMillan D.K.; Majerus C.R.; Laubscher R.D.; Shannon J.P. *Talanta* **2008**, 74, 1026-1031.
- [20] Herder G.; de Klerk W.P.C. J. *Therm. Anal. Calorim.* **2006**, 85, 169-172.
- [21] Schroeder M.A.; Fifer R.A.; Miller M.S.; Pesce-Rodriguez R.A.; McNesby C.J.S.; Singh G. *Combust. Flame* **2001**, 126, 1569-1576.
- [22] Newberry J.; Kaste P.J. *IEEE Trans. Magn.* **2003**, 39, 253-256.
- [23] Ksiazczak A.; Radomski A.; Zielenkiewicz T. J. *Therm. Anal. Calorim.* **2003**, 74, 559-568.
- [24] Sanghavi R.R.; Pillai A.G.S.; Velapure S.P.; Singh A. *J. Energ. Mater.* **2003**, 21, 87-95.
- [25] Pourmortazavi S.M.; Hosseini S.G.; Rahimi-Nasrabadi M.; Hajimirsadeghi S.S.; Momenian H. *J. Hazard. Mater.* **2009**, 162, 1141-1144.
- [26] Sovizi M.R.; Hajimirsadeghi S.S.; Naderizadeh B. *J. Hazard. Mater.* **2009**, 168, 1134-1139.
- [27] Turcotte R.; Acheson B.; Armstrong K.; Kwok Q.S.M.; Jones D.E.G.; Paquet M. *Proc. Int. Pyrotech. Semin. 33rd*. **2006**, 351-361.
- [28] Campbell R.K.; Freedman D.L.; Kim B.J. *Environ. Eng. 1999 Proc. ASCE-CSCE Natl. Conf.* **1999**, 246-253.
- [29] Binke N.; Rong L.; Xianqi C.; Yuan W.; Rongzu H.; Qingsen Y. *J. Therm. Anal. Calorim.* **1999**, 58, 249-256.
- [30] Binke N.; Rong L.; Zhengquan Y.; Yuan W.; Pu Y.; Rongzu H.; Qingsen Y. *J. Therm. Anal. Calorim.* **1999**, 58, 403-411.
- [31] Rong L.; Binke N.; Yuan W.; Zhengquan Y.; Rongzu H. *J. Therm. Anal. Calorim.* **1999**, 58, 369-373.

- [32] Katoh K.; Le L.; Kumasaki M.; Wada Y.; Arai M.; Tamura M. *Thermochim. Acta*. **2005**, *431*, 161-167.
- [33] Katoh K.; Le L.; Kumasaki M.; Wada Y.; Arai M.; *Thermochim. Acta*. **2005**, *431*, 173-176.
- 5 [34] Hiyoshi R.I.; Brill T.B. *Propellants, Explos., Pyrotech.* **2002**, *27*, 23-30.
- [35] Zhou L.; Piekiet N.; Chowdhury S.; Zachariah M.R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 194-202.
- [36] Cropek D.M.; Kemme P.A.; Day J.M. (2001). Pyrolytic Decomposition Studies of AA2, a double-base propellant.
10 http://owwww.cecer.army.mil/techreports/Cropek_Pyrolysis_Decomposition/Cropek_Pyrolysis_decomposition.pdf
- [37] Cropek D.M.; Day J.M.; Kemme P.A. (2001). Incineration by-products of AA2. NC fines, and NG slums.
http://owwww.cecer.army.mil/techreports/cropek_incineration/cropek_incineration.pdf
- 15 [38] Cropek D.M.; Kemme P.A.; Day J.M.; Cochran J. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 4346-4351.
- [39] Freedman D.L.; Cashwell J.M.; Kim B.J. *Waste Manage.* **2002**, *22*, 283-292.
- [40] Auer N.; Veness R.G.; Evans C.S. *Land Contamination & Reclamation*. **1999**, *7* (4), 301-304.
- 20 [41] Auer N.; Hedger J.N.; Evans C.S. *Biodegradation*. **2005**, *16*, 229-236.
- [42] Petrova O.E.; Tarasova N.B.; Davydova M.N. *Anaerobe*. **2002**, *8*, 315-317.
- [43] Tarasova N.B.; Petrova O.E.; Davydova M.N.; Khairutdinov B.I.; Klochkov V.V. *Biochemistry (Moscow)*. **2004**, *69*, 7, 809-812.
- [44] Tarasova N.B.; Petrova O.E.; Faizullin D.A.; Davydova M.N. *Anaerobe*. **2005**, *11*,
25 312-314.
- [45] Vyazovkin S.; Dranca I.; Lang A.J. *Thermochim. Acta*. **2005**, *437*, 75-81.
- [46] Vyazovkin S.; Dranca I.; Lang A.J. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 29-33.
- [47] Christodoulatos C.; Su T.; Koutsospyros A. *Water Environ. Res.* **2001**, *73*, 185-191.
- 30 [48] MacMillan D.K.; Majerus C.R.; Laubscher R.D.; Shannon J.P. *Talanta*, **2008**, *74*, 1026-1031.
- [49] López-López M.; Ramiro Alegre J.M.; García-Ruiz C.; Torre M. (submitted in 2011)

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de determinación de nitrocelulosa intacta **caracterizado** porque permite determinar esta macromolécula mediante Electroforesis Capilar (CE) con
5 detección por fluorescencia inducida por láser (LIF) tras un proceso de derivatización y una separación electroforética en medio ácido.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque requiere un
10 tratamiento de muestra sencillo consistente en la pulverización de la misma antes de su derivatización.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** por realizar la
separación electroforética de la nitrocelulosa intacta en un capilar de sílice fundida no
recubierto, de 50 μm de diámetro interno y 375 μm de diámetro externo con una
15 longitud total de 50,2 cm que debe acondicionarse entre inyecciones con ácido clorhídrico 0,1 M durante 2 min, seguido de agua mili-Q durante 2 min y del tampón de separación durante 4 min, todo ello a una presión de 20 psi.
4. Procedimiento según la reivindicación 3 **caracterizado** por el empleo de un
20 medio de separación acuoso para CE consistente en ácido fórmico 1,0 M ajustado a pH 2,0 con hidróxido sódico 0,1 M.
5. Procedimiento según las reivindicaciones 3 y 4 **caracterizado** por los siguientes
parámetros instrumentales en CE: inyección por presión de 0,5 psi durante 5 s de las
25 muestras; temperatura de 25 °C y voltaje de separación de -20 kV.
6. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la detección se
realiza a una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de
emisión 520 nm de mediante un detector LIF de Argón-Ión.
30
7. Procedimiento según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 **caracterizado** porque
permite la determinación cualitativa de nitrocelulosa intacta contenida en muestras que
contienen nitrocelulosa con un elevado grado de nitración, como son las pólvoras sin

humo, y en muestras que contienen nitrocelulosa con un bajo grado de nitración, como son los colodiones.

8. Procedimiento según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 **caracterizado** porque
5 es aplicable a polímeros de naturaleza similar a la nitrocelulosa como son la celulosa y el almidón.

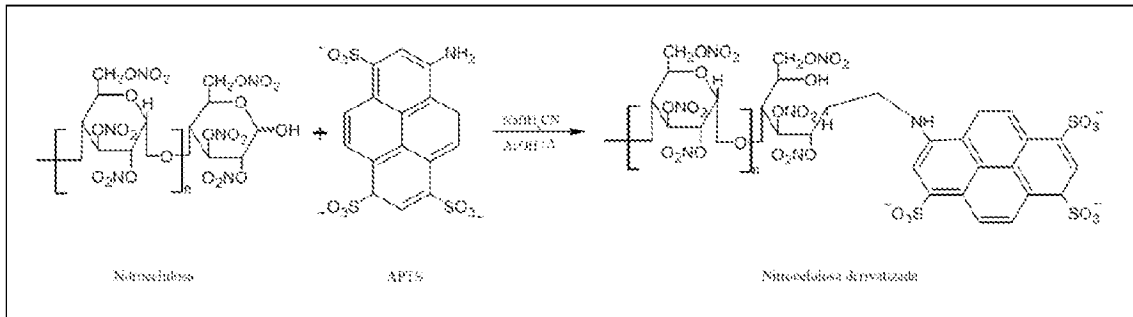


Figura 1

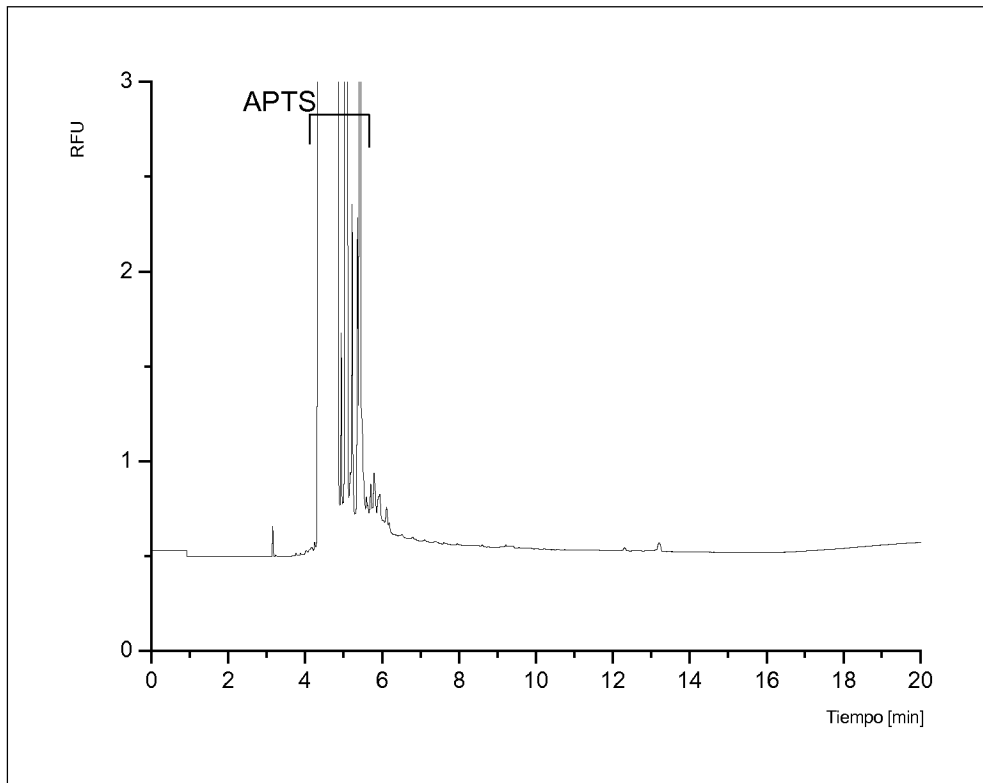


Figura 2

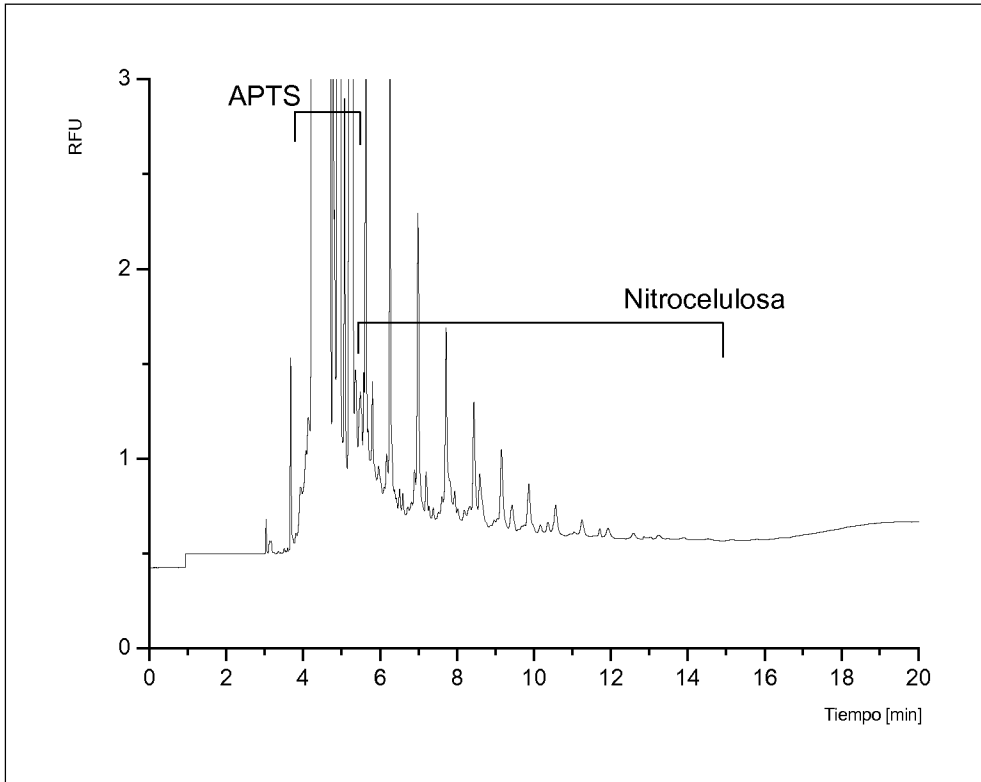


Figura 3 (a)

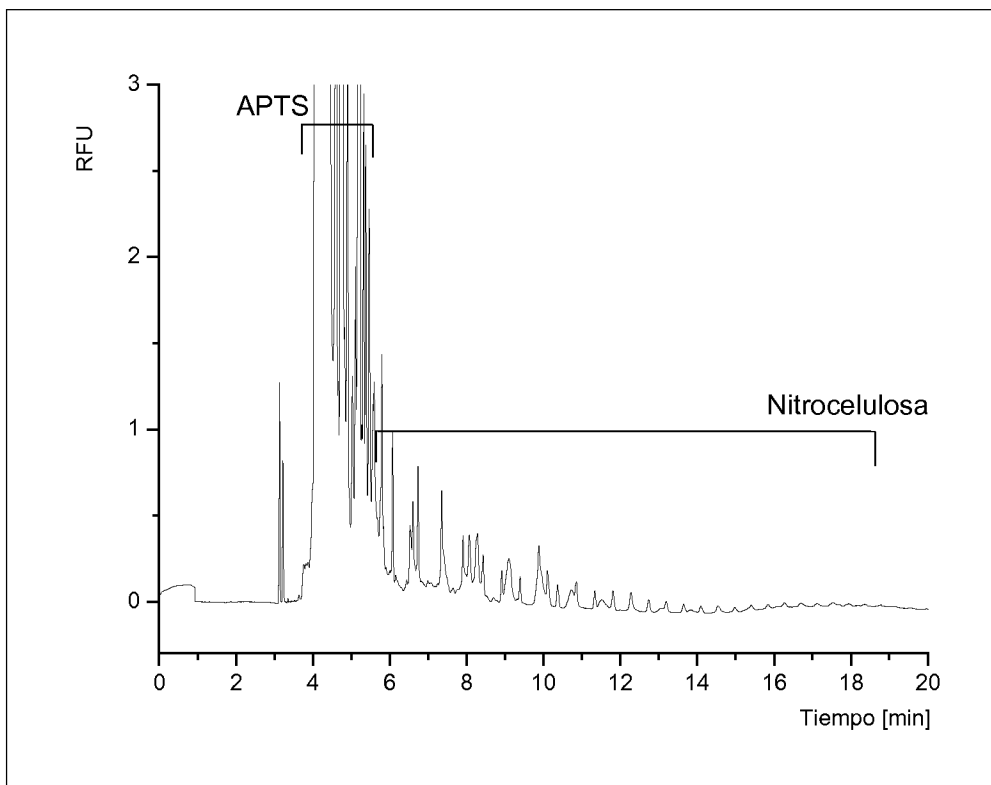


Figura 3 (b)

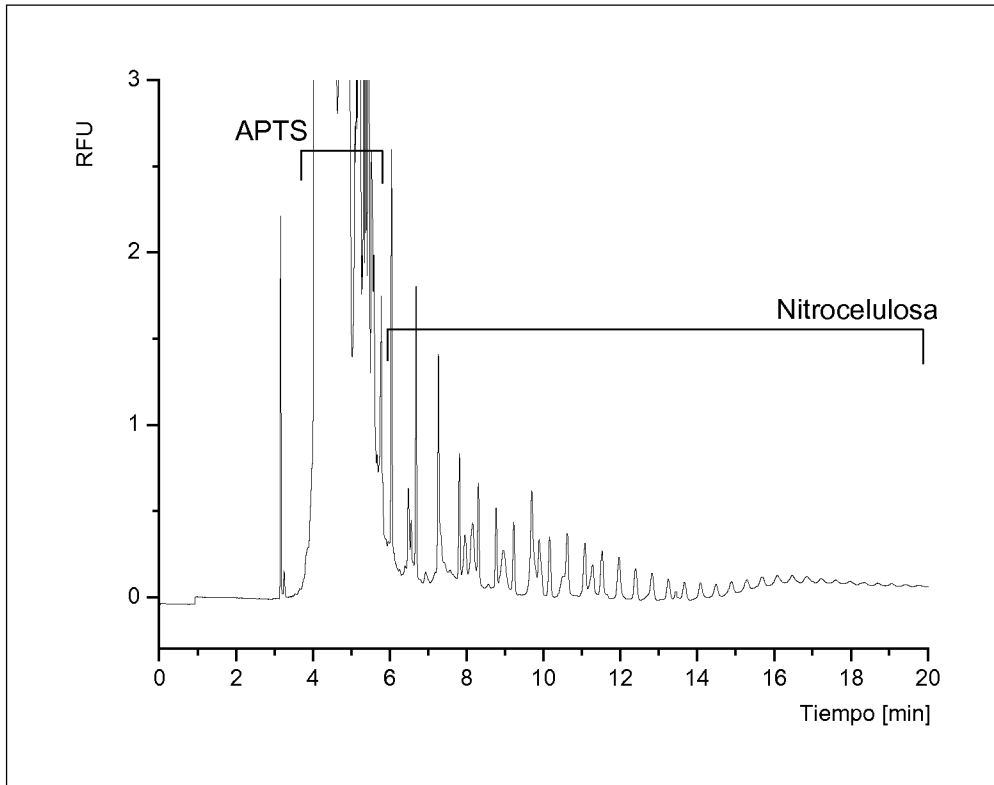


Figura 3 (c)

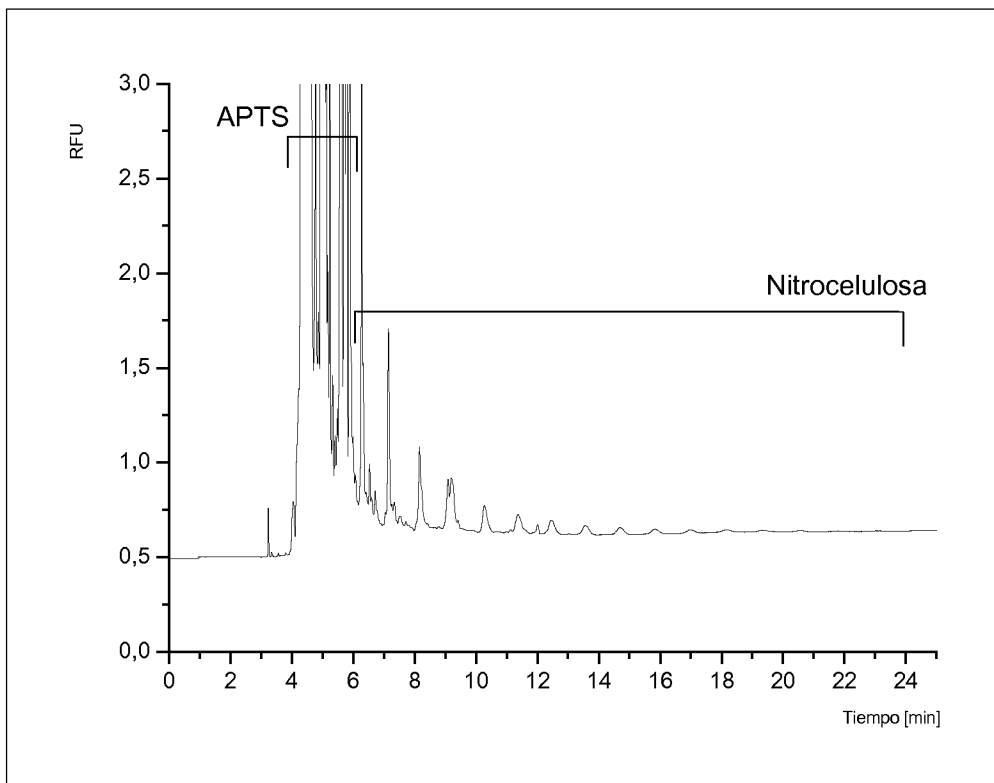


Figura 4

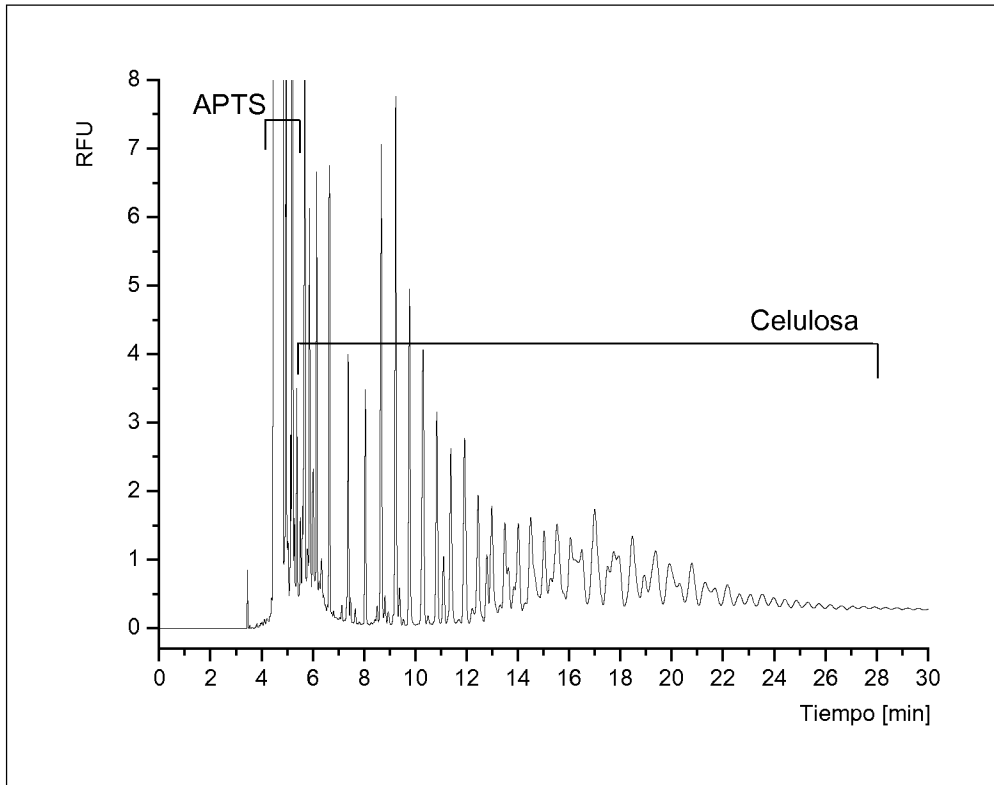


Figura 5

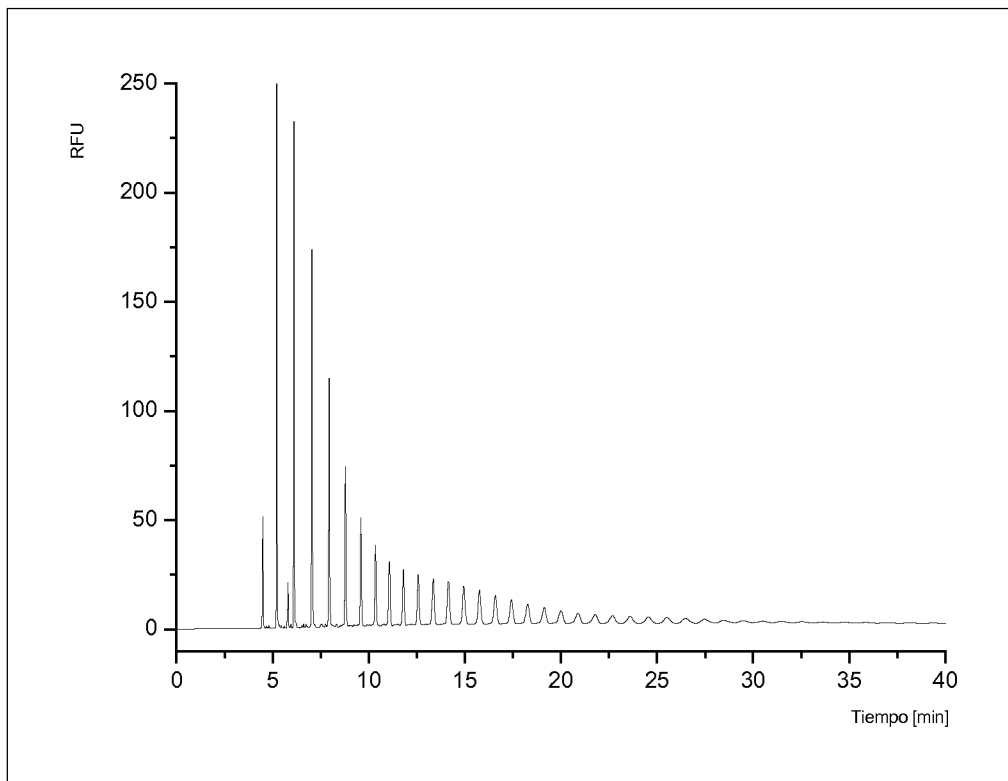


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130143

②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.02.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/22** (2006.01)
G01N27/447 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MACCREHAN W. A., SMITH K. D. y ROWE W. F. "Sampling protocols for the detection of smokeless powder residues using capillary electrophoresis." Journal of Forensic Sciences (1998) Vol. 43, páginas 119-124. Todo el documento.	1-8
A	SINGH S. "Sensor – An effective approach for the detection of explosives." Journal of Hazardous Materials (2007) Vol. 144, páginas 15-28. Resumen, páginas 16, 20 y 21, y tabla 1.	1-8
A	SMITH K. D. et al. "Detection of smokeless powder residue on pipe bombs by micellar electrokinetic capillary electrophoresis." Journal of Forensic Sciences (1999) Vol. 44, páginas 789-794. Todo el documento.	1-8
A	LU Q., COLLINS G. E., SMITH M., WANG J. "Sensitive capillary electrophoresis microchip determination of trinitroaromatic explosives in nonaqueous electrolyte following solid phase extraction." Analytica Chimica Acta (2002) Vol. 469, páginas 253-260. Resumen.	1-8
A	LÓPEZ-LÓPEZ M., FERNANDEZ DE LA OSSA M. A., GALINDO J. S., FERRANDO J. L., VEGA A., TORRE M., y GARCÍA-RUIZ C. "New protocol for the isolation of nitrocellulose from gunpowders: Utility in their identification." Talanta (2010) vol. 81, páginas 1742-1749. Resumen, resultado y discusión, y conclusiones.	1-8
A	BAILEY C. G., WALLENBORG S. R., "Indirect laser-induced fluorescence detection of explosive compounds using capillary electrochromatography and micellar electrokinetic chromatography." Electrophoresis (2000) Vol. 21, páginas 3081-3087. Introducción y columnas de separación y procedimientos.	1-8
A	JOHNS C., et al. "Identification of homemade inorganic explosives by ion chromatographic analysis of post-blast residues." Journal of Chromatography (2008) vol. 1182, páginas 205-214. Página 206.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.01.2012

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, NPL, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.01.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MACCREHAN W. A., SMITH K. D. y ROWE W. F. "Sampling protocols for the detection of smokeless powder residues using capillary electrophoresis." Journal of Forensic Sciences (1998) Vol. 43, páginas 119-124. Todo el documento.	1998
D02	SINGH S. "Sensor – An effective approach for the detection of explosives." Journal of Hazardous Materials (2007) Vol. 144, páginas 15-28. Resumen, páginas 16, 20 y 21, y tabla 1.	2007
D03	SMITH K. D. et al. "Detection of smokeless powder residue on pipe bombs by micellar electrokinetic capillary electrophoresis." Journal of Forensic Sciences (1999) Vol. 44, páginas 789-794. Todo el documento.	1999
D04	LU Q., COLLINS G. E., SMITH M., WANG J. "Sensitive capillary electrophoresis microchip determination of trinitroaromatic explosives in nonaqueous electrolyte following solid phase extraction." Analytica Chimica Acta (2002) Vol. 469, páginas 253-260. Resumen.	2002
D05	LÓPEZ-LÓPEZ M., FERNANDEZ DE LA OSSA M. A., GALINDO J. S., FERRANDO J. L., VEGA A., TORRE M., y GARCÍA-RUIZ C. "New protocol for the isolation of nitrocellulose from gunpowders: Utility in their identification." Talanta (2010) vol. 81, páginas 1742-1749. Resumen, resultado y discusión, y conclusiones.	2010
D06	BAILEY C. G., WALLENBORG S. R., "Indirect laser-induced fluorescence detection of explosive compounds using capillary electrochromatography and micellar electrokinetic chromatography." Electrophoresis (2000) Vol. 21, páginas 3081-3087. Introducción y columnas de separación y procedimientos.	2000
D07	JOHNS C., et al. "Identification of homemade inorganic explosives by ion chromatographic analysis of post-blast residues." Journal of Chromatography (2008) vol. 1182, páginas 205-214. Página 206.	2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un procedimiento para la determinación de nitrocelulosa intacta mediante electroforesis capilar (CE) con detección por fluorescencia inducida por láser (LIF) tras un proceso de derivatización y una separación electroforética en medio ácido (reivindicaciones 1-8).

El documento D01 consiste en una técnica de electroforesis capilar electrocinética micelar para el análisis de residuos de pólvoras sin humo (ver todo el documento).

El documento D02 consiste en una revisión de los sensores que operan en los distintos métodos de detección de explosivos, que van desde los sensores electroquímicos a los inmunosensores (ver resumen, páginas 16, 20 y 21, y tabla 1).

El documento D03 consiste en el análisis forense de los componentes orgánicos de los explosivos mediante electroforesis capilar electrónica micelar (MECE), también conocida como cromatografía micelar electrocinética capilar (MECK). (Ver todo el documento).

El documento D04 consiste en el uso de un microchip de electroforesis capilar para la separación y detección de tres explosivos trinitroaromáticos: 1,2,3,-trinitrotolueno (TNT), 1,3,5-trinitrobenceno (TNB) y 2,4,6-trinitrofenil-N-metilnitramina (tetrilo), en presencia de otros 10 explosivos y derivados de explosivos en un electrolito no acuoso (ver resumen).

El documento D05 consiste en un nuevo método de aislamiento de nitrocelulosa en pólvoras sin humo que consiste en un método de varios pasos de extracción por solvente y posterior análisis mediante HPLC-MS (ver resumen, resultado y discusión, y conclusiones).

El documento D06 consiste en la detección de compuestos explosivos mediante electrocromatografía capilar con detección por fluorescencia inducida por laser (ver introducción y columnas de separación y procedimientos).

El documento D07 divulga la electroforesis capilar y la detección mediante fluorescencia inducida por laser como uno de los métodos analíticos utilizados para el análisis de explosivos orgánicos, siendo la electroforesis capilar uno de los métodos más sensibles y selectivos y capacitado para ser utilizado en formato portátil (ver página 206).

1.-NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).

1.2.-Reivindicaciones 1-8.

Los documentos D01-D07 muestran métodos de electroforesis capilar y detección mediante fluorescencia inducida por laser para la determinación de elementos inorgánicos o elementos orgánicos aromáticos de los explosivos.

La invención reivindicada difiere principalmente de los documentos citados en que ninguno de los documentos citados muestra la determinación de nitrocelulosa intacta.

Así, la invención reivindicada implica un efecto mejorado comparado con el estado de la técnica. Además no se considera obvio que un experto en la materia obtenga la invención a partir de los documentos mencionados anteriormente.

Por lo tanto, los documentos D01-D07 son solo documentos que reflejan el estado de la técnica. En consecuencia la invención es nueva y se considera que implica actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.