

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**Estudo preliminar da detecção de explosivos orgânicos
utilizando a tecnologia *Lab-On-A-Chip***

Lincoln Tassi de Miranda Furtado

RIO DE JANEIRO

2014

**ESTUDO PRELIMINAR DA DETECÇÃO DE EXPLOSIVOS ORGÂNICOS
UTILIZANDO A TECNOLOGIA *LAB-ON-A-CHIP***

Lincoln Tassi de Miranda Furtado

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Químico com Atribuições Tecnológicas.

Orientadores: Prof^ª. Annelise Casellato

Dr. Lucas Blanes

Rio de Janeiro

2014

FURTADO, Lincoln Tassi de Miranda

Estudo preliminar da detecção de explosivos orgânicos utilizando a tecnologia *lab-on-a-chip*/ Lincoln Tassi de Miranda Furtado. - Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2014.

49 f

Trabalho de Conclusão de Curso – UFRJ/ Instituto de Química – IQ, 2014.

Orientadores: Annelise Casellato e Lucas Blanes.

1. Explosivos.
2. Técnicas de separação.
3. Eletroforese capilar.
4. Tecnologia *Lab-On-A-Chip*

I. Casellato, Annelise e Blanes, Lucas

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química

III. Universidade de Tecnologia de Sydney, Faculdade de Ciências

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família por ter cuidado de mim e me apoiado durante todo esse percurso.

Agradeço aos meus amigos fora da faculdade, que mesmo sem ter o conhecimento profundo a solução, forneciam um ombro amigo caso fosse necessário.

Agradeço ao corpo docente do Instituto de Química, que sempre se mostrou solícito e interessado em ajudar, independentemente da situação. Em especial alguns que me acompanharam mais de perto, como Júlio Carlos Afonso, Annelise Casellato, Lola Maria Braga e Carlos Riehl.

Agradeço, do fundo do meu coração, à Professora Viviane Gomes Teixeira, minha orientadora de Iniciação Científica, que me ensinou não só trabalhar dentro de um laboratório, mas também a ser um químico de verdade. Por todas as experiências compartilhadas e pelo carinho demonstrado não só em momentos profissionais, como em momentos decisivos na minha vida pessoal, meu eterno carinho e meu profundo e mais sincero sentimento de gratidão.

Agradeço a minha equipe na Coca Cola, onde realizei meu estágio, que me mostrou um lado da química que não teria a oportunidade de conhecer dentro da faculdade, sempre com muita paciência e devoção.

Agradeço a toda a equipe do Lab-On-A-Chip na Universidade de Tecnologia de Sydney, em especial ao Professor Lucas Blanes e Philip Doble, que me orientaram durante a realização desse trabalho e meu intercâmbio na Austrália.

Agradeço aos companheiros de classe, Marllon Nascimento, Camilla Nascimento, Renata Nascimento, Pedro Borges, Anna Luíza Castro, Mônica Rufino e Vinícius Kartnaller, que sempre que preciso demonstravam atenção através de conselhos e dicas sobre como lidar com a rotina da faculdade.

Resumo

TÍTULO: Estudo preliminar da detecção de explosivos orgânicos utilizando a tecnologia *Lab-On-A-Chip*

ALUNO: Lincoln Tassi de Miranda Furtado

ORIENTADORES: Annelise Casellato , DQI – Instituto de Química – UFRJ

Lucas Blanes, Faculdade de Ciências – UTS.

Desde o atentado terrorista às Torres Gêmeas em Nova York, nos Estados Unidos da América, em 11/09/2011, a necessidade de manter o controle sobre qualquer tipo de arma química aumentou consideravelmente. Nesse âmbito, os explosivos se destacam por estarem presentes em atentados em massa, como carros e homens bomba. Os mais utilizados hoje em dia são o trinitrotuleno (TNT), 2,4,6-trinitrofenil-N-metilnitramina (Tetрил), trinitrobenzeno (TNB) e o m-nitrotolueno (mNT). Dentre as técnicas utilizadas para a separação e identificação de explosivos, destacam-se a cromatografia líquida (CL) e a eletroforese capilar (EC). Já em relação à detecção, técnicas espectroscópicas como a espectrometria de massas (EM) e a detecção na região do ultravioleta-visível (UV-VIS) são as mais exploradas, ambas acopladas a alguma técnica de separação. A EC ganhou popularidade dentre essas técnicas por ser rápida, versátil e portátil. Equipamentos mais recentes que usam a tecnologia *Lab-On-A-Chip* (LOC) permitem a identificação de compostos de natureza biológica através da EC em *microchips*. Trabalhos na literatura mostraram a versatilidade dessa técnica ao detectarem não só substâncias como o ácido desoxirribonucleico (DNA,) ácido ribonucleico (RNA) e proteínas, mas também outras substâncias de interesse forense, como drogas e explosivos. Esse estudo teve como objetivo otimizar a análise de 9 explosivos através do *Bioanalyzer 2100*. Para isso, parâmetros como a composição do tampão e o preparo da amostra foram estudados. Dos 9 explosivos, 8 foram detectados com considerável resolução, apesar de nenhum estudo de identificação dos picos ter sido feito. Isso sugere que a eletroforese capilar quando utilizada com a tecnologia LOC (EC-LOC) tem potencial para ser uma alternativa a técnicas custosas e laboriosas, como o CL-EM, incentivando estudos complementares para a finalização desta metodologia analítica.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química dos explosivos TNT, Tetryl, PETN e RDX	3
Figura 2: Fórmulas estruturais de classes de compostos usados em explosivos	6
Figura 3: Representação esquemática da técnica EC (Bonato et al., 2005)	10
Figura 4: Comparação entre o aspecto do fluxo pressurizado e fluxo eletrosmótico (Bonato et al., 2005)	11
Figura 5: <i>Chip</i> utilizado com o Bioanalyzer 2100. Aspecto e esquematização do <i>chip</i> de vidro (Lloyd et al., 2011).....	13
Figura 6: Esquematização do <i>chip</i>	17
Figura 7: Estrutura química dos nove explosivos utilizados	21
Figura 8: Esquematização da injeção. A) Lavagem da separação de canais. B) Arraste da amostra para o ponto de detecção. C) Interseção entre amostra e T2. D) Captura da amostra para detecção.	23
Figura 9: Eletroferograma da Injeção 2, contendo apenas o T2 na posição A1 do <i>chip</i> , representando a linha de base	24
Figura 10: Eletroferograma da Injeção 1, contendo TNB, TNT, Tetryl e 3,4-DNT na posição A1 do <i>chip</i>	24
Figura 11: Eletroferograma da Injeção 2, contendo TNT, Tetryl, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT na posição A2 do <i>chip</i>	25
Figura 12: Eletroferograma da Injeção 3, contendo TNT, Tetryl, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT na posição A1 do <i>chip</i>	26
Figura 13: Eletroferograma da Injeção 4, contendo TNT, Tetryl, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT a 25 ppm na posição A1 do <i>chip</i> ; Concentração de Borato de sódio 10 mM	27
Figura 14: Eletroferograma da Injeção 4, contendo TNT, Tetryl, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT a 50 ppm na posição A2 do <i>chip</i> ; Concentração de Borato de sódio 10 mM	27
Figura 15: Eletroferograma da Injeção 4, contendo TNT, Tetryl, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT a 100 ppm na posição A3 do <i>chip</i> ; Concentração de Borato de sódio 10 mM	28
Figura 16: Eletroferograma da Injeção 5, contendo TNT, Tetryl, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT na posição A1 do <i>chip</i> ; Concentração de pigmento: 2%.....	29

<p>Figura 17: Eletroferograma da Injeção 6, contendo TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT na posição A1 do <i>chip</i>; Adição de HEC 1,0 % </p>	30
<p>Figura 18: Eletroferograma da Injeção 7, contendo TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT na posição A1 do <i>chip</i>; Adição de HEC 0,1 % </p>	30
<p>Figura 198: Eletroferograma da Injeção 8, contendo TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT na posição A1 do <i>chip</i>; Amostras diluídas em água.....</p>	31
<p>Figura 20: Eletroferograma da Injeção 9, contendo TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT na posição A1 de um <i>chip</i> que passou pelo processo de limpeza.....</p>	32

Lista de Abreviaturas

2,4-DNT	2,4-Dinitrotolueno
2amin-DNT	2-Amin-4,6-dinitrotolueno
3,4-DNT	3,4-Dinitrotolueno
4amin-DNT	4-Amin-4,6-dinitrotolueno
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNT	Dinitrotolueno
EC	Eletroforese Capilar
EC-LOC	Eletroforese Capilar com a Tecnologia Lab-On-A-Chip
EGDN	Etileno glicol dinitrato
EM	Espectrometria de Massas
GFP	Green Fluorescent Protein
HEC	Hexietilcelulose
LED	Light Emitting Diode
LIF	Laser-induced fluorescence
LOC	Lab-On-A-Chip
mDNB	1,3-Dinitrobenzeno
MEKC	Cromatografia eletrocínica micelar
mNT	1,3-Nitrotolueno
NG	Nitroglicerina
PETN	Tetranitrato de pentaeritrina
RDX	Ciclotrimetilenotrinitramina

RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tetril	2,4,6-Trinitrofenil-N-metilnitramina
TNB	Trinitrobenzeno
TNT	Trinitrotolueno
UV-VIS	Espectroscopia Ultravioleta-Visível

Sumário

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Abreviaturas.....	vii
Introdução.....	1
Objetivos.....	15
Objetivo Geral	15
Objetivos Específicos	15
Materiais e Métodos	16
Reagentes.....	16
Instrumentação.....	16
Preparo do Tampão.....	16
Preparo das Amostras	17
Preparo do chip.....	17
Injeção	18
Otimização do Método	18
Limpeza do chip	20
Resultados e Discussão.....	21
Conclusões.....	33
Perspectivas Futuras	34
Referências	35

Introdução

Desde o final do século XX, o uso de explosivos em ações terroristas vem se intensificando, colocando essa classe de substâncias sob os olhares da sociedade moderna por questões de segurança. A mídia global noticia com frequência ataques em massa feitos aleatoriamente através do uso de veículos-bomba, em que os explosivos são a ferramenta fundamental para que a morte de milhares de civis tenha ocorrido ao longo dos últimos anos. (FAINBERG, 1992)

Infelizmente, é impossível prever de onde e quando os ataques vem/serão feitos, o que torna qualquer sociedade vulnerável a eles. A fim de combater essa ameaça, por exemplo, a Europa, alvo de alguns ataques, possui a Organização pela Segurança e Cooperação (OSCE, *Organization for Security and Co-operation in Europe*), que tem como medidas básicas promover quadros jurídicos internacionais, intensificar o treinamento de medidas anti-terroristas, aumentar a vigilância e segurança de documentos de viagem, como passaportes e vistos, promover políticas públicas com parceiros que defendam a mesma causa, combater o uso da Internet como ferramenta de promoção do terrorismo, além de proteger suas infraestruturas que provêm energia, como nuclear e refinarias, por serem consideradas alvos vulneráveis que podem causar sérios danos se atacadas. (FAINBERG, 1992, Police, 2005)

Já a Polícia Federal da Austrália se diz comprometida em reforçar suas relações com regiões vizinhas a fim de combater o terrorismo por meio de leis internacionais, através de treinamento e capacitação na busca de novas maneiras de fazer esse combate. Outra organização preocupada com esse assunto é o FBI (*The Federal Bureau of Investigation*), nos Estados Unidos, que enfatiza a importância da cautela em lojas de varejo que comercializam explosivos, sendo que todo comportamento suspeito de um consumidor deve ser reportado às autoridades, evitando a preparação caseira de artefatos explosivos. De fato, todas essas medidas se difundem em regiões onde o terrorismo é considerado uma ameaça iminente. (Investigation, Police, 2005)

No Brasil, um país fora do centro das atenções de organização terroristas, como a AlQaeda ou Estado Islâmico, a preocupação é outra. Apesar dos explosivos serem considerados produtos controlados, de acordo com o Decreto DEC 3.665/2000 (DECRETO DO EXECUTIVO) 20/11/2000 (EXECUTIVO, 2000), não há o devido controle efetivo por parte do Exército e Polícias Civas sobre a fabricação, venda e armazenamento dos mesmos. Assim, vem sendo detectado o aumento de casos de explosões de caixas eletrônicos e agências bancárias por todo o Brasil, sendo os principais alvos cidades do interior, como no Nordeste.

Mesmo sem o intuito de ferir civis, esse tipo de atentado ao patrimônio gera terror e insegurança na população. A Polícia Federal faz sua parte através de investigações de quadrilhas que possuem esse comportamento, mas os acontecimentos são recorrentes. (Mello, Sul, 2014)

Dentre os explosivos conhecidos, o mais antigo é a pólvora negra. Desenvolvida na China, a pólvora negra é uma mistura de nitrato de potássio, enxofre e carvão, e o intuito da sua produção era produzir fogos de artifício, sinalizadores e armas de fogo. Depois passou a ser utilizada com fins militares (foguetes, bombas e explosivos, todos lançados de catapultas) e mais tarde em armas. Saindo da China para o Japão, Europa e Mongólia, em 1249, a pólvora negra teve sua formulação descrita pelo Frei Inglês Roger Bacon. Sete séculos depois, em 1831, o inglês William Bickford desenvolveu um estopim de segurança, tornando os dispositivos a base de pólvora negra mais práticos e seguros. (Mello, 2014)

Participaram também o suíço Christian Friedrich Schonbein e o italiano Ascanio Sobrero, que, em 1848 descobriu a nitroglicerina, causando uma revolução nessa área, já que esse composto possui poder de explosão muitas vezes maior do que o da pólvora negra. Em 1863, o sueco Alfred Nobel, o mesmo responsável pelo prêmio Nobel, estabilizou o poder detonante da nitroglicerina, patenteando o que seria a dinamite, um explosivo com o mesmo poder de explosão mas seguro o suficiente para ser comercializado. No século XX, explosivos mais modernos foram desenvolvidos, como o TNT, muito utilizado na Primeira Guerra Mundial e também como estopim da reação de explosão da bomba atômica de plutônio. Hoje em dia é usado para demolir construções ou por empresas de mineração. Outros foram introduzidos na Segunda Guerra Mundial, como a ciclotrimetilenotrinitramina (RDX, em inglês, *Research Department X*), tetranitrato de pentaeritrina (PETN) e o Tetril. A Figura 1 mostra a estrutura dos explosivos mencionados. (SENASP, Bellis, 2014)

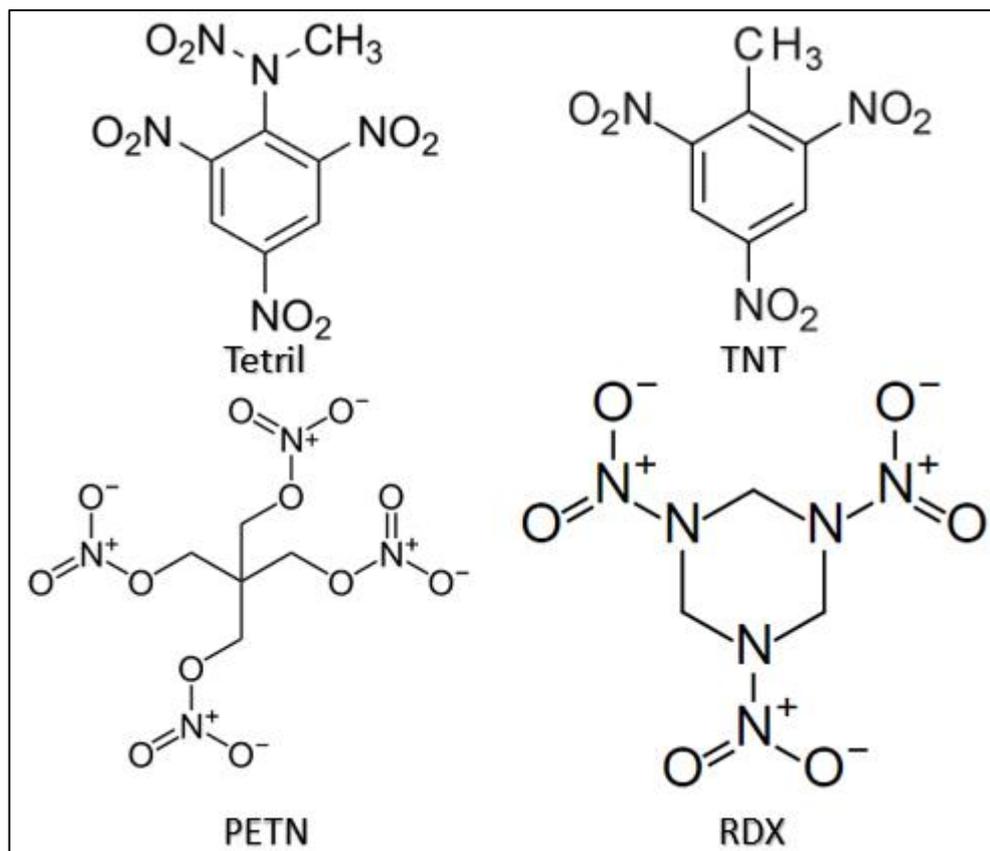


Figura 1: Estrutura química dos explosivos TNT, Tetril, PETN e RDX

Uma definição geral para uma substância explosiva diz que ela é um sólido ou líquido (ou até mesmo uma mistura) capaz, através de uma reação química, produzir gás em temperatura, pressão e velocidade suficientes para causar danos aos seus arredores (Organization, 2014). Outros conceitos relacionados aos explosivos de relevante compreensão são:

- Explosão: arrebentamento ou expansão resultante de uma grande pressão, causado pela transformação de um explosivo por detonação, deflagração ou outra liberação de pressão como a contida em um vaso de pressão. (Chaffee-Cipich et al., 2013, Cesar, 2014)
- Detonação: fenômeno no qual uma onda de choque de alta energia percorre o corpo de um explosivo causando a sua transformação em produtos mais estáveis, liberando grande quantidade de calor. (Cesar, 2014, Chaffee-Cipich et al., 2013)
- Deflagração: auto-combustão de um corpo, em qualquer estado físico, que contém em sua composição combustível e comburente intimamente misturados em proporção adequada. (Cesar, 2014, Chaffee-Cipich et al., 2013)

- Combustão: reação química rápida de um oxidante, como o oxigênio, com materiais combustíveis, gerando luz e calor, através da produção de gás carbônico e/ou monóxido de carbono e água. (Cesar, 2014, Chaffee-Cipich et al., 2013)

Devido ao grande número de explosivos diferentes disponíveis atualmente, algumas classificações são propostas. Uma delas é feita de acordo com o tipo de perigo que o explosivo pode gerar, como exposto na Tabela 1. (Bellis, 2014)

Tabela 1: Classificação de substâncias explosivas quanto ao nível de perigo gerado

Classe	Descrição
1.1	Substâncias e artigos que geram explosão em massa (aquela que afeta quase que toda a região de alcance instantaneamente);
1.2	Substâncias e artigos que possuem projeção discreta se comparada a uma explosão em massa.
1.3	Substâncias e artigos que envolvam fogo e mínima explosão ou mínima projeção (ou ambas), mas não explosão em massa, podendo ser: (i) combustão que gera aumento de calor por radiação; ou (ii) queimas consecutivas, produzindo mínima explosão ou mínima projeção (ou ambas);
1.4	Substâncias e artigos que não apresentam nenhum perigo significativo: apresentam apenas pequeno risco caso haja ignição. Os efeitos são limitados ao recipiente que o contém e a projeção de fragmentos é mínima. Um incêndio exterior oriundo dessa substância ou artigo não deve provocar explosão instantânea de todo o conteúdo;
1.5	Substâncias e artigos que são muito insensíveis a explosões;
1.6	Substâncias e artigos que são extremamente insensíveis a explosões: contém apenas detonadores insensíveis a explosões e demonstram negligenciável probabilidade de causar algum acidente devido a acidental ignição ou acidental propagação.

Outras classificações usuais, mas não oficiais, classificam os explosivos de acordo com CESAR (2014):

- Aplicação prática
 - Altos Explosivos
 - Primários: provocam a transformação de outros explosivos através da detonação. Exige, inicialmente, ignição ou choque. São materiais muito sensíveis, que explodem sob a ação do fogo ou pelo impacto de um golpe. Usados geralmente em espoletas, detonadores e espoletas de percussão. Usualmente são sais inorgânicos, como nitrato de potássio.
 - Secundários: destinados à produção de trabalho para a destruição pela ação da força dos gases produzidos. Exigem detonação de um outro explosivo, detonável por chama ou choque. São materiais insensíveis ao choque mecânico e à chama, mas explodem com grande violência quando ativados. Usualmente materiais orgânicos, como fulminato de sódio.
 - Baixos Explosivos: Produzem um efeito balístico. Sua transformação é a deflagração e o impulso inicial é a chama. Velocidade de transformação regular, interessante para balística. Simplesmente queimam ou deflagram. Liberam grandes volumes de gás de combustão. Podem ser orgânicos ou inorgânicos.
- Combustão
 - Completa: sua queima gera CO_2 e H_2O e, em alguns casos, O_2 .
 - Incompleta: Sua queima também gera CO como subproduto.
- Composição Química (de acordo com suas funções)
 - Nitrocompostos;
 - Ésteres nítricos;
 - Nitroaminas;
 - Derivados dos ácidos clórico e perclórico;
 - Azidas;
 - Sais como cloratos, percloratos e nitratos;
 - Compostos capazes de produzir explosão (fulminatos, acetiletos, compostos ricos em N_2 [tetrazeno], peróxidos, ozonídeos, etc.).

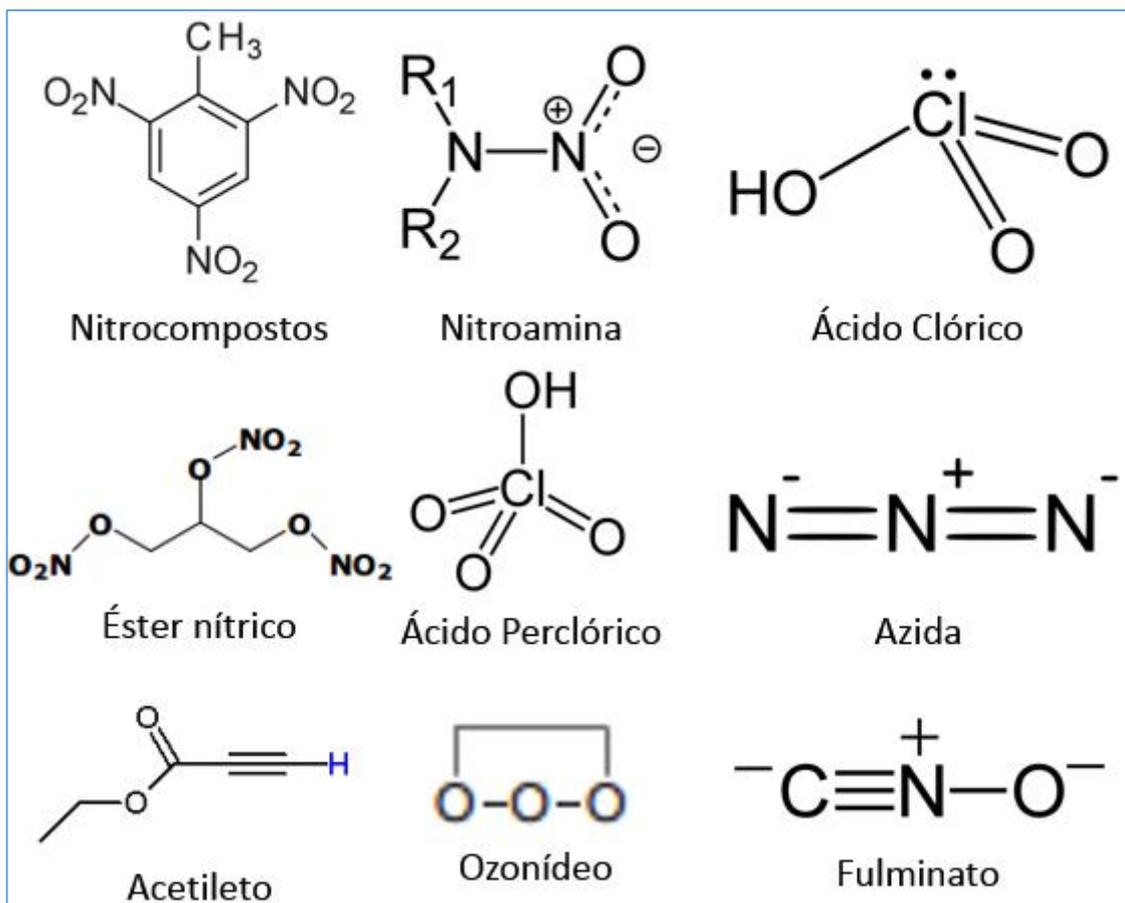


Figura 2: Fórmulas estruturais de classes de compostos usados em explosivos

PLETS (Plets, 1953) propôs a teoria dos explosóforos, grupamentos estruturais que conferem capacidade de explosão. Esses grupos foram classificados em 8 classes, a saber:

- $-\text{NO}_2$ e $-\text{ONO}_2$ em substâncias orgânicas e inorgânicas;
- $-\text{N}=\text{N}-$ e $-\text{N}=\text{N}=\text{N}-$ em azidas orgânicas e inorgânicas;
- $-\text{NX}_3$ (X= halogênio);
- $-\text{N}=\text{C}-$ em fulminatos;
- $-\text{OCIO}_2$ e $-\text{OCIO}_3$ em cloratos e percloratos orgânicos ou inorgânicos;
- $-\text{O}-\text{O}-$ e $-\text{O}-\text{O}-\text{O}-$ em peróxidos e ozonídeos orgânicos e inorgânicos;
- $-\text{C}\equiv\text{C}-$ no acetileno e em acetiletos metálicos;
- M-C em alguns compostos orgânicos contendo metal ligado a carbono.

O princípio de toda explosão, independente de sua magnitude, é o mesmo. Para que ela ocorra, é necessário a presença de três elementos: combustível, oxidante e meios de ignição, que seriam as substâncias explosivas. Todo material explosivo queima muito rápido, liberando grandes quantidade de gás a determinada temperatura, pressão e velocidade num curto espaço

de tempo. Todos esse gás concentrado se expande rapida indefinidamente, ocupando a área ao seu redor devido a pressão que o confinava. Isso é capaz de gerar destruição nos entornos da área em que a explosão ocorreu. (Documentary, 2014)

Após a explosão, a área ao redor da mesma estará contaminada e necessitará de posterior remediação, uma vez que o conteúdo residual pode ser tóxico tanto para o ser humano, quanto para a vegetação (se houver). Para fazer isso de forma rápida, eficiente e segura, a caracterização precisa dos resíduos da explosão é necessária. (Organization, 2014, Documentary, 2014)

É importante ressaltar a diferença entre explosivo e a substância química responsável pela explosão. Analogamente a um fármaco sólido, em que existe o principal componente do remédio (o princípio ativo) cercado de outros componentes como a cápsula gel, ou a goma de fixação, um explosivo possui uma substância de alto poder detonante responsável pela explosão envolto em um material que contém outros componentes, como o pó de "flash" (pó de alumínio ou magnésio unido a um oxidante, como o perclorato de potássio), mistura ANFO (nitrato de amônio e óleo combustível) e elementos de pirotecnia, como os usados em fogos de artifício. Esse tipo de material deixa considerável quantidade de resíduos inorgânicos durante a deflagração. (Cesar, 2014, Organization, 2014, Bellis, 2014)

A habilidade na hora de remover os resíduos deixados nas superfícies dos arredores é vital para a posterior detecção dos componentes do explosivo. Traços de explosivos aderem facilmente às mãos e aos equipamentos dos investigadores e subseqüentemente são transferidos para roupas, veículos e outras superfícies. A determinação dos cátions presentes, como amônio, monometilamônio e potássio, e de ânions, como cloreto, nitrato e perclorato é de extrema importância para a identificação da natureza dos explosivos. (Cesar, 2014)

Explosivos são conhecidos como substâncias de difícil análise. Alguns dos fatores são a alta pressão de vapor, fazendo com que elas se volatilizem rapidamente; composição externa, que diminui ainda mais essa pressão de vapor e ainda cobre os materiais explosivos, bloqueando o escape desses vapores; baixa estabilidade térmica, levando-os a degradação na maioria das técnicas atuais, como cromatografia gasosa (CG); e presença de interferentes que geram resultados falso-positivos. (Moore, 2004)

Diversas técnicas foram utilizadas até hoje para a identificação de explosivos. Desde os anos 70 a cromatografia iônica vem sendo utilizada para detectar ânions, como nitrito, nitrato, sulfato, sulfito, tiocianato, e cátions, como potássio, sódio e amônio, em cenas de crime onde houve uma explosão. Esse método se baseia no uso de duas colunas com trocadores iônico fortes, seguidos de uma membrana que neutraliza o poder iônico do eluente, permitindo a detecção apenas dos íons. Entretanto, o trabalho de encontrar uma combinação de fase móvel e estacionária que atendesse grande parte dos explosivos era árduo, e as análises não chegavam a ser eficientes para a identificação do explosivo. (McCord et al., 1994)

Em CG, alguns explosivos como nitroglicerina (NG), etileno glicol dinitrato (EGDN), dinitrotolueno (DNT), TNT, PETN, e RDX foram detectados em misturas em que seus níveis eram muito baixos utilizando-se métodos de extração em fase sólida, pré concentração e extração em fluido supercrítico. Apesar dos explosivos terem sido detectados, o volume de injeção de amostra utilizado era muito grande. (Cascio et al., 2004)

Já em CL, uma técnica bastante abrangente, muito tem sido feito em relação aos explosivos, principalmente com o objetivo de reduzir esse volume de injeção, produzindo métodos mais rápidos. (Cascio et al., 2004)

Com o passar dos anos, a tecnologia dos detectores e qualidade das resinas usadas como fase estacionária foram aprimoradas, facilitando a análise, aumentando sua eficiência. Mesmo assim, tal técnica ainda precisa de uma técnica de confirmação, já que a difração de raio-x não era sensível o bastante para identificar os mesmos compostos encontrados nas técnicas cromatográficas. Para que a confirmação fosse feita, cientistas usavam outra configuração de sistema cromatográfico, como por exemplo outra coluna ou outra fase móvel. (McCord et al., 1994)

Métodos utilizando a absorção na região do infravermelho foram desenvolvidos a fim de se identificar e quantificar explosivos através de bandas de absorção de grupos como NO_2 . Porém, espectros de infravermelho de moléculas grandes não são de fácil compreensão, além dos explosivos se decomporem ao longo dessa análise, originando outros compostos que interferem na análise (Moore, 2004).

A espectroscopia por Raman também foi utilizada com excitações na região de 1064 nm, a fim de minimizar complicações por fluorescência, mas mais uma vez o aquecimento da amostra foi detectado como problema, apesar de alguns dispositivos terem sido utilizados em

campo devido às suas portabilidades. Essa técnica só seria eficaz se, juntamente a ela, métodos de ressonância ou melhoria de superfície fossem utilizados, dificultando a interpretação dos resultados e a tornando mais cara. (Moore, 2004, Badjagbo and Sauv , 2012, FAINBERG, 1992)

Mesmo com esses avanços, essas técnicas ainda possuem baixos limites de detec o, análises longas, baixa seletividade e pouca portabilidade, e por isso outras duas técnicas vêm se destacando na detec o de explosivos: a EM e a EC.

A primeira se destaca basicamente pela sua seletividade de análise devido ao método de ioniza o. Uma variedade de métodos já foi utilizada, como a ioniza o por impacto de elétrons, *electrospray*, ioniza o química a pressão reduzida e atmosférica, fotoioniza o, entre outros. Estudos mostraram que uma técnica de separa o, como as cromatográficas, em associa o com um espectr metro de massas acoplado a um sistema de ioniza o por ESI ou APCI são muito eficazes na detec o de traos de explosivos em água, por exemplo. Entretanto, nem todas as espécies são detectadas facilmente, necessitando um estudo mais aprofundado de acordo com o alvo da análise. (Moore, 2004, McCord et al., 1994, Cesar, 2014)

Com a chegada da EC, a análise de cátions e ânions ficou mais fácil devido ao mecanismo de separa o aplicado. Essa técnica usa diferença de condutividade para identificar os íons presentes, deixando a técnica muito mais abrangente, diferente da cromatografia iônica, que depende de uma complexa intera o entre o explosivo e a fase estacionária. A partir da , as duas técnicas passaram a ser usadas como complementares nesses casos (Hargadon, 1992).

A EC ganhou força nos últimos 20 anos por se apresentar como uma técnica alternativa   CL para a análise de explosivos, graas a sua eficiência, agilidade, versatilidade e minimiza o de recursos, como amostra e solventes. Devido a essas propriedades, a EC teve investimentos para se tornar uma técnica portátil, podendo ser realizada em campo, onde se encontram os resíduos de um explosivo após sua explosão. (Lloyd et al., 2011, Sarazin et al., 2010)

Essa técnica   baseada na velocidade de migra o de diferentes espécies químicas carregadas sob a influência de um campo elétrico de corrente contínua, podendo ser usada na detec o de diversos tipos de compostos, como íons inorgânicos, compostos biológicos (amino cios, vitaminas) e drogas. A velocidade de migra o, mencionada anteriormente,  

proporcional à carga iônica do analito e inversamente proporcional aos fatores de retardamento por atrito. (Pumera and Wang, 2002, Skoog, 2009)

As injeções são feitas na presença de solução tampão através da aplicação de uma forte diferença de potencial por meio de um par de eletrodos localizados em cada extremidade do sistema, como mostra a Figura 3.

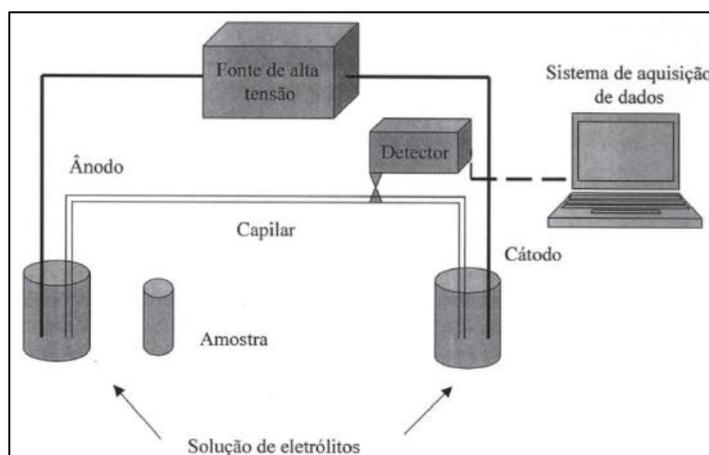


Figura 3: Representação esquemática da técnica EC (Bonato et al., 2005)

A EC é considerada rápida, menos trabalhosa, com maior resolução, menor consumo de amostra e solvente, e mais automatizável quando comparada à eletroforese em gel, técnica de mesmo princípio. Outra vantagem é o fato da detecção ao final da análise poder ser quantitativa de forma eficiente, o que não ocorre na em gel. (Skoog, 2009)

Junto com os analitos, o tampão também se desloca em direção ao catodo de acordo com a diferença de potencial aplicada, gerando o que é chamado de fluxo eletrosmótico. Isso só ocorre devido à presença de uma dupla camada elétrica na interface capilar/solução. A parede interna do capilar é composta basicamente por sílica, carregada negativamente uma vez que os grupos silanóis (Si-OH) estão ionizados. Os cátions do tampão, que estão solvatados, são empurrados de acordo com a diferença de potencial aplicada, se movendo e, conseqüentemente, arrastando o solvente junto com eles, de forma diferente quando comparado ao fluxo pressurizado, como mostra a Figura 4 (Skoog, 2009, Bonato et al., 2005).



Figura 4: Comparação entre o aspecto do fluxo pressurizado e fluxo eletrosmótico (Bonato et al., 2005)

Existem basicamente dois tipos de injeções na EC: a eletrocinética, e a por pressão. Na primeira, o eletrodo é introduzido no recipiente contendo a amostra, e a diferença de potencial é aplicada, introduzindo a amostra no capilar através da migração iônica e do fluxo eletrosmótico; Na segunda, ocorre a aplicação de uma diferença de pressão, que direciona a solução que contém a amostra para dentro do capilar como um todo. (Skoog, 2009)

A fim de tornar a EC mais abrangente, TERABE (Terabe et al., 1985) propôs a cromatografia eletrocinética micelar (em inglês, *Micellar electrokinetic chromatography*, MEKC), permitindo que espécies neutras, como explosivos nitroaromáticos e outras espécies nitradas, fossem separadas tão bem quanto as espécies carregadas. A diferença básica entre a EC e a MEKC é a presença das micelas, formadas por moléculas que possuem uma cauda formada por hidrocarbonetos de cadeia longa, e um grupo polar na outra extremidade. Em solução aquosa, ao atingirem a concentração micelar crítica, formam agregados iônicos capazes de agregar à sua estrutura espécies não carregadas presentes na amostra. O destaque é dado ao surfactante dodecil sulfato de sódio, mais conhecido como SDS. (Pumera, 2006)

Uma técnica que foi beneficiada por esse avanço foi a EC em *microchip*, conhecida como EC-LOC. A expressão *Lab-On-A-Chip* pode ser atribuída a qualquer dispositivo que integre uma ou mais funções de análise num único *chip* de tamanhos variados (mm^2 ou cm^2), funções que são comumente exercidas em laboratórios por equipamentos diferentes. São considerados sistemas microeletromecânicos, capazes de realizar análises com quantidades mínimas de volume, da ordem de pL. (Manz et al., 1990)

LOCs são oriundas principalmente da necessidade de se obter resultados mais confiáveis em relação à sensibilidade e a resultados falsos positivos obtidos devido à presença de interferentes. Além disso, a crescente necessidade de desenvolver dispositivos portáteis para a determinação de substâncias específicas, como DNA, anfetaminas e explosivos, impulsionou o desenvolvimento dessa técnica juntamente a EC (Manz et al., 1990, Lloyd et al., 2011).

Hoje em dia, o *LOC* é considerado uma técnica portátil, com geração mínima de resíduos e pequena quantidade de amostra necessária, além de possuir curto tempo de análise, fácil integração com outras técnicas, automatizável, segura e de baixo custo. (Lloyd et al., 2011, Verpoorte, 2002, Pawell et al., 2013). Entretanto, apesar de trazer consigo todas essas vantagens, é uma técnica nova que precisa ser aprimorada. Além disso, é suscetível a efeitos físico-químicos, como capilaridade e dureza de superfícies. (Collins et al., 2006, Vlčková et al., 2006)

O sistema do *Bioanalyzer 2100*, com o objetivo de promover a separação eletroforética de DNA, RNA e proteínas, é um dispositivo compacto, portátil, robusto (mantém o equipamento funcionando entre 5 e 40 °C), provendo resultados com alta qualidade digital. Seus princípios básicos são a eletroforese e o citometria de fluxo. O primeiro deles acabou ganhando força não só na detecção das espécies mencionadas, como também na de explosivos e anfetaminas (Lloyd et al., 2011, Nitsche, 2002, Yetisen AK, 2011, Collins et al., 2006, Brena et al., 2006).

Outra vantagem explorada do *Bioanalyzer 2100* é sua capacidade de medir a fluorescência de compostos marcados previamente, devido ao seu sistema de detecção *LED-LIF/LIF*, em que *LED* significa *Light Emitting Diode* (em português, Diodo Emissor de Luz), e *LIF* significa *Laser-induced fluorescence* (em português, Laser de indução por fluorescência). (Preckel et al., 2002). Esse sistema de detecção foi projetado pois o alvo principal do equipamento eram células e seus componentes que pudessem possuir fluorescência após serem marcados, como o éster de acetoximetilo, ou até mesmo a *GFP* (*green fluorescent protein*, em português, proteína verde fluorescente), fluorescente quando estimulada por radiação. (Nitsche, 2002)

O tipo de pigmento utilizado depende não só do tipo de célula envolvida, como também dos componentes de detecção do sistema. Esse sistema é constituído por um diodo de *LED* azul, com janela de detecção entre 510 e 540 nm, enquanto o diodo de laser vermelho possui janela entre 590 e 650 nm. Moléculas do pigmento, inicialmente misturadas à solução tampão, se misturam a solução contendo a amostra através dos canalículos do *microchip*, tornando-se passíveis de detecção através do sistema de fluorescência do *Bioanalyzer 2100*. (Nitsche, 2002, Collins et al., 2006)

Os *microchips* utilizados no *Bioanalyzer* 2100 são idênticos ao apresentado na Figura 4. Fabricados a partir de vidro *Lime Soda* (mesmo nome em português, compostos por óxidos de sílica, sódio, cálcio, magnésio, alumínio e potássio), seus canalículos, com profundidade de 10 μm , espessura de 50 μm e separação entre canais de 15 μm , podem conectar até 12 amostras com as soluções da análise, contendo o tampão e o pigmento. (Lloyd et al., 2011)

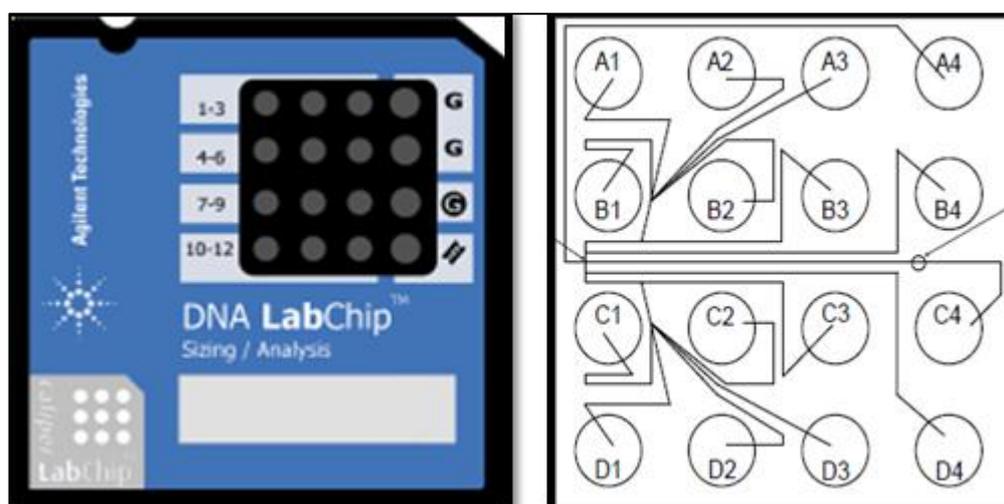


Figura 5: *Chip* utilizado com o *Bioanalyzer* 2100. Aspecto e esquematização do *chip* de vidro (Lloyd et al., 2011)

Muitos fatores podem interferir na análise do *Bioanalyzer* 2100, causando alargamento dos picos e reduzindo a eficiência da separação. Por exemplo, o comprimento da região de injeção, a largura do detector, difusão longitudinal (como ocorre na CL), a interação do analito com a parede do capilar, efeito Joule e dispersão eletromigratória. Algumas vantagens da EC-LOC provém da geometria de seus canalículos, que possibilita a dissipação eficiente do calor, gerado pela passagem da corrente elétrica, conhecida como Efeito Joule. Esse aumento de temperatura gera um gradiente de temperatura na solução tampão que, conseqüentemente, influencia parâmetros da solução como condutividade, viscosidade e sua difusão pelo capilar. Esse aumento pode ser expressivo a ponto da alta resistência elétrica não resistir, gerando o alargamento das bandas. (Knox and McCormack, 1994, Zhu et al., 2012, 2006)

O fluxo eletrosmótico também pode influir na análise, já que possui um perfil radial constante de velocidade, não contribuindo para o alargamento das bandas, muito comum em CL, em que o fluxo é pressurizado e seu perfil é parabólico (vide Figura 4, pg 11). O tampão é outro fator influente nesse aspecto, uma vez que dependendo do seu valor de absorvância no comprimento de onda selecionado para a análise, pode interferir na detecção do analito alvo. (Zhu et al., 2012)

Caso isso ocorra, é interessante o uso de aditivos, que atuem basicamente em quatro situações: alterando a mobilidade do soluto ou o fluxo eletroosmótico; diminuindo o efeito de matriz; e reduzindo a interação com a parede do capilar. Caso esse aditivo seja um surfactante, como o SDS, sua concentração influencia a eficiência da análise, pois ela pode gerar sobrecarga térmica. (Tavares, 1997, Knox and McCormack, 1994)

É visando essas possíveis interferências que esse trabalho se dedica a otimizar o método de análise de explosivos através de um sistema EC-LOC, como o *Bioanalyzer 2100*.

Objetivos

Objetivo Geral

Utilizar a técnica EC em *microchip* para detectar e identificar explosivos.

Objetivos Específicos

- Detectar os explosivos através de injeções contendo padrões diversos;
- Variar parâmetros de análise, tais como composição do tampão (pigmento da análise, componentes e suas concentrações) e concentração da amostra, a fim de otimizar a resolução dos sinais no eletroferograma;
- Desenvolver uma metodologia de reutilização do *chip*.

Materiais e Métodos

Reagentes

Soluções padrão de TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-Dinitrotolueno (2,4-DNT), m-Dinitrobenzeno (m-DNB), 3,4-Dinitrotolueno (3,4-DNT), 2-amin-4,6-dinitrotolueno (2amin-DNT) e 4-amin-4,6-dinitrotolueno (4amin-DNT) foram usadas como amostras testes, todas com concentração de 1.0 mg/mL em acetonitrila. O tampão foi constituído por borato de sódio (Borato de sódio, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), SDS e solução pigmento (*Kit* para Análise de DNA). Hidroxietil celulose (HEC) também foi utilizada como um aditivo do tampão em alguns testes. A água utilizada para a preparação do tampão foi ultrapura, gerada por um sistema de purificação de água Sartorius (18.2 m Ω).

Instrumentação

Todos os experimentos foram realizados usando o sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer*TM e seu software *Agilent 2100 Expert*, localizado no laboratório de Química Forense da Universidade de Tecnologia de Sydney, Austrália. A detecção foi feita por uma luz de *led* que detecta a fluorescência vermelha das substâncias analisadas (590 – 650 nm). O *chip* utilizado foi o DNA 500, também adquirido da *Agilent Technologies*.

Preparo do Tampão

O preparo do tampão foi feito em duas etapas. A primeira delas envolveu o preparo de uma solução T1, contendo Borato de sódio (concentração variável de acordo com o experimento – vide Tabela 2) e SDS 50 mM. Para isso, o SDS foi solubilizado totalmente com a menor quantidade possível de água ultrapura. Em seguida, adicionou-se o sal e água ultrapura com quantidade suficiente para atingir as concentrações desejadas de Borato de sódio e SDS. Em seguida, essa solução foi filtrada com uma membrana de 0,2 μm , permaneceu em banho ultrassônico por 5 min e teve seu pH verificado após essas etapas, finalizando o preparo de T1.

A fim de se preparar T2, a solução que de fato foi transferida para o *chip*, transferiu-se para um *ependorf* a solução de pigmento, e o volume foi completado com a solução T1 a fim de se obter a concentração desejada de pigmento (vide Tabela 2). Foi nesse estágio de preparo que também, por duas vezes, foi adicionada a solução de HEC.

Preparo das Amostras

Todas as amostras analisadas foram padrões comerciais de explosivos em acetonitrila. As amostras foram diluídas em água, em solução de Borato de sódio, e em solução de Borato de sódio contendo SDS.

Outro parâmetro que foi avaliado foi a concentração das amostras, sempre dentro da faixa de 10 a 100 ppm.

Preparo do chip

Introduziram-se 9 uL de T2 na posição C4 do chip com o auxílio de uma micropipeta de precisão. O *chip* foi acoplado ao dispositivo de suporte do *kit*, que continha uma seringa capaz de difundir a solução tampão ao longo do *chip*. Essa seringa, então, foi pressionada sobre o *chip* e travada, mantendo a pressão por 45 segundos. Após esse intervalo, a seringa foi destravada até que seu êmbolo voltasse a posição inicial (antes de pressioná-lo).

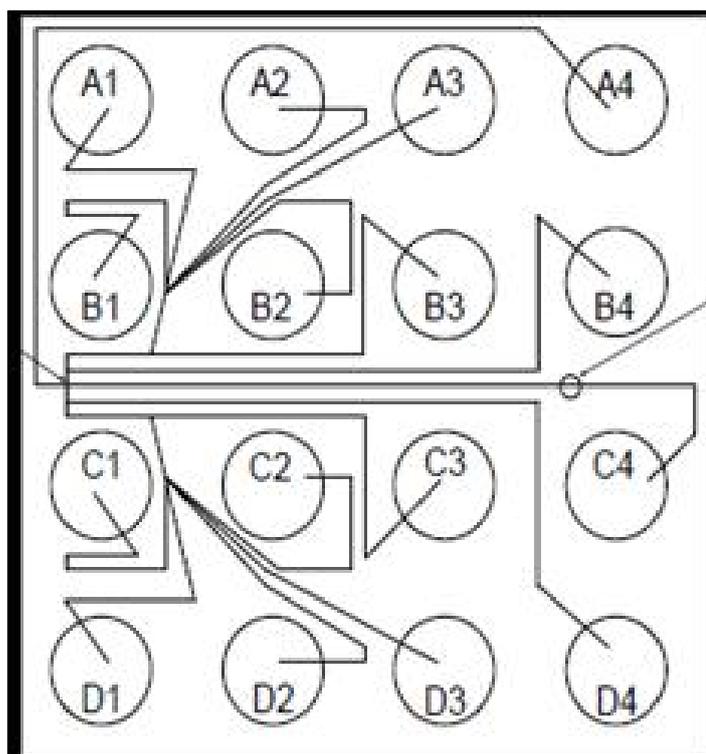


Figura 6: Esquemática do chip

Para finalizar o preparo do *chip*, 9 uL de solução tampão T2 foram adicionados em todas as posições da coluna 4, e 9 uL das amostras foram adicionadas nas posições de 1 a 12. Caso não houvesse 12 amostras para serem injetadas, as outras posições eram preenchidas com 9 uL de solução T1.

Injeção

Ao preparar o equipamento para realizar a injeção, o eletrodo do equipamento foi seco com um lenço de papel suavemente. Em seguida, o *chip* foi acoplado à sua respectiva posição no *Bioanalyzer 2100*. Fechou-se o compartimento e deu-se início à injeção através do *software* do equipamento. Ao final de cada injeção foi possível extrair eletroferogramas para posterior análise através do mesmo *software*.

Ao remover o *chip* do equipamento, o mesmo foi lavado, assim como o equipamento. Para esse segundo procedimento, um outro *chip*, específico para a lavagem, foi preenchido com MilliQ e acoplado à posição do *chip* no equipamento. Após 30 s, o *chip* foi removido e os eletrodos foram secos com um outro lenço de papel e o equipamento estava pronto para a próxima injeção.

Otimização do Método

O tampão e as amostras usadas tiveram parâmetros variados ao longo dos experimentos realizados para a otimização do método. O tampão teve sua composição e concentração variados, enquanto as amostras tiveram diferentes solventes de diluição e diferentes concentrações. Outro fator analisado foi o reaproveitamento do *chip*.

A Tabela 2 lista como todos os parâmetros foram variados ao longo da otimização.

Tabela 2: Parâmetros estudados durante a otimização do método

Injeção	Composição do tampão			Parâmetros				Instrumento
	Composição	pH	Pigmento DNA (%)	Número de explosivos	Diluição da amostra	Concentração dos explosivos (ppm)	Condição do Chip	
1	50 mM BorNa + 50 mM SDS	9,2	1.5	4	em T1	10	Novo	
2		9,2	1.5	9	em T1	10	Novo	
3		9,2	1.5	9	em solução de BorNa	10	Novo	
4	10 mM BorNa + 50 mM SDS	9,2	1.5	9	em T1	100 / 50 / 25	Novo	
5		9,2	2.0	9	em T1	50	Novo	
6	10 mM BorNa + 50 mM SDS + 1% HEC	9,2	2.0	9	em T1	50	Novo	
7	10 mM BorNa + 50 mM SDS + 0.1% HEC	9,2	2.0	9	em T1	50	Novo	
8	10 mM BorNa + 50 mM SDS	9,2	2.0	9	em água	50	Novo	
9	Idem Injeção 5							Usado

*A sigla BorNa é referente ao borato de sódio, usada apenas nessa tabela.

Limpeza do chip

Buscando minimizar o custo de análise através do reaproveitamento do *chip*, a eficácia do mesmo foi avaliada após a aplicação de uma metodologia de limpeza. Esse procedimento foi feito imediatamente após a análise. O *chip* foi removido do *Bioanalyzer 2100* e rinsado abundantemente com água da torneira, e em seguida com água MiliQ. Todos os experimentos foram realizados em Sydney, Austrália, aonde a água da torneira é considerada potável.

De forma cautelosa, todas as posições do *chip* foram secas com ar comprimido. A fim de avaliar a eficiência da secagem, o *chip* foi colocado contra a luz e em frente a uma superfície escura, o que auxiliou na observação dos canalículos do *chip*. Se esses canalículos ainda aparecessem por completo, o *chip* poderia seguir para a próxima etapa de limpeza; caso contrário, era descartado.

Após esse primeiro procedimento, todas as posições do *chip* foram preenchidas com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M com o auxílio de uma pipeta de precisão. Elas eram preenchidas até o topo, exceto a posição C4. Nessa posição, era acoplado um sistema de vácuo, que lá permanecia por 15 min. Após esse intervalo, o *chip* foi lavado novamente com água da torneira e água MiliQ.

Em seguida, foi novamente acoplado à posição C4 do *chip* um sistema de vácuo, enquanto as demais posições do *chip* foram preenchidas com água MilliQ. Após permanecer sob vácuo durante 15 min, o *chip* foi lavado com água da torneira, seco com ar comprimido e pode ser utilizado para a realização dos testes de sua eficiência.

Resultados e Discussão

A análise de nove explosivos (TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT) por EC foi avaliada através do Bioanalyzer 2100. As primeiras condições estudadas são idênticas às discutidas por PHIL (Pesenti et al., 2014).

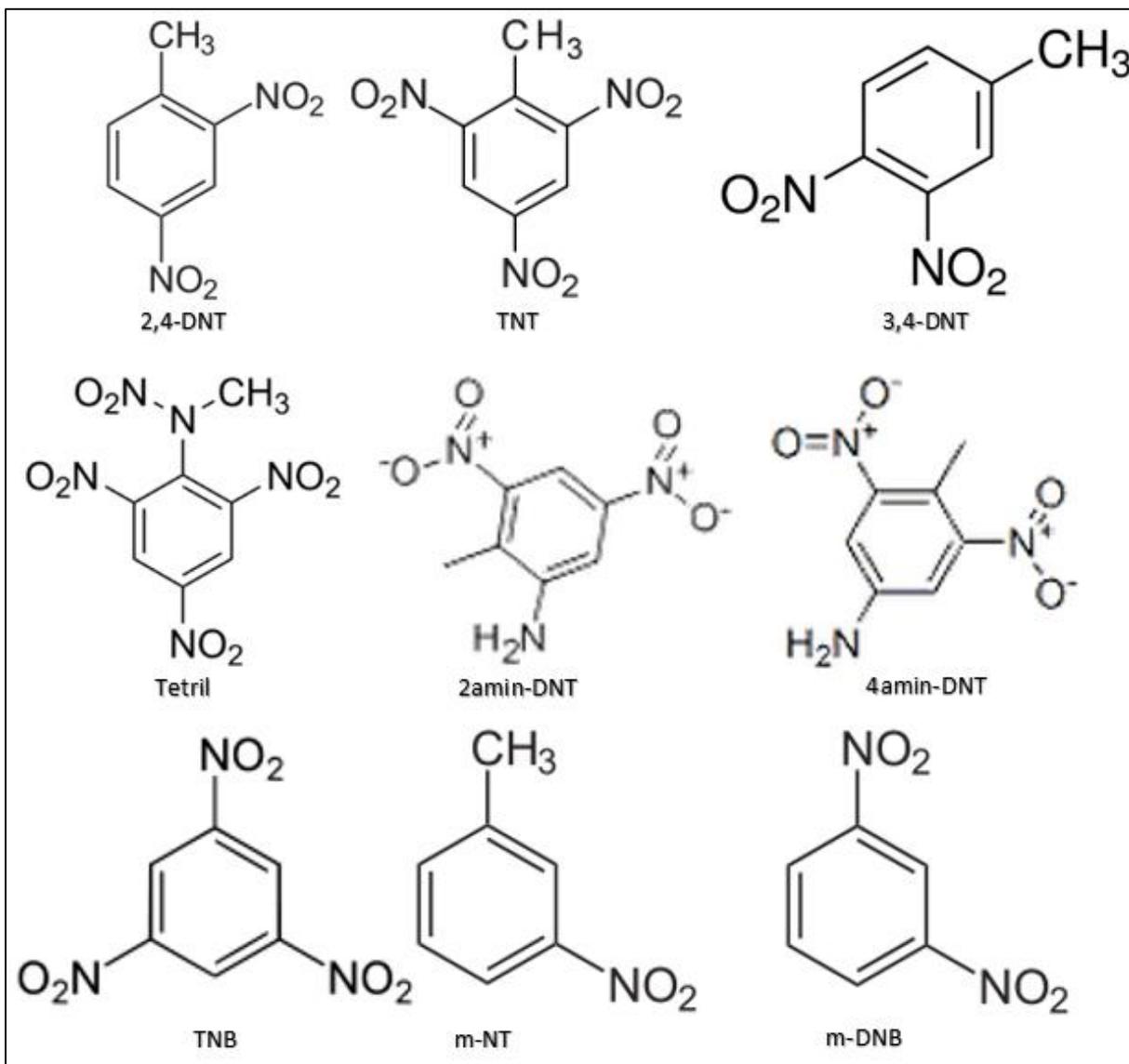


Figura 7: Estrutura química dos nove explosivos utilizados

No que se refere ao tampão, diversas condições foram testadas durante os experimentos realizados, variando-se a concentração de componentes como o Borato de sódio e o pigmento. A concentração de SDS foi mantida em 50 mM em todos os experimentos, e a diluição durante o preparo do tampão era sempre feita em água. Se necessário, o pH do tampão era corrigido com solução saturada de ácido bórico recém preparada, a fim de atingir pH 9,2.

O Borato de sódio é comumente utilizado como eletrólito em tampões de aplicação em EC. Como a mobilidade eletroforética do soluto depende intimamente do pH do eletrólito, a mobilidade efetiva depende do controle desse pH, que pode ser feito através da escolha de uma solução tampão adequada, influenciando a separação dos solutos. Já o SDS, por ser um surfactante, forma agregados iônicos com suas extremidades carregadas negativamente em contato com o soluto que passa pelo canalículo do *chip*. Dessa forma, o tampão também é arrastado para o eletrodo negativo, mas como uma velocidade reduzida, devido à presença da cauda apolar do SDS. Ao interagir com os analitos alvo, esses se distribuem entre a fase aquosa e a fase micelar do tampão, auxiliando a separação dos mesmos.

O tampão possui sua própria condutividade, já que sua fluorescência é detectada devido à presença do pigmento. Quando um explosivo passa pelo ponto de detecção, a condutividade da mistura diminui, originando o pico. Esse método é chamado de detecção indireta.

Para essa primeira injeção, tanto as posições C4 e A1 do chip foram preenchidas com a solução T2. A posição C4 é posição de dispersão do tampão, como pode ser visto na Figura 5. Todas as outras posições do chip são direcionadas para a C4, e são detectadas no meio do caminho. Ao início da injeção, uma diferença de potencial é aplicada entre as posições A4 e C4, fazendo com que a solução T2 corra nessa direção. Em seguida, outra diferença de potencial é aplicada, mas dessa vez entre as posições A1 (A2, A3, uma por vez) e C4, direcionando a amostra para C4 também. Ao atingirem o ponto de interseção (marcado em vermelho na Figura 7-B, pg 23), parte da amostra é arrastada em direção à posição C4, sendo detectada no meio do caminho (próximo à região marcada em azul na Figura 7-B, pg 23), produzindo o eletroferograma.

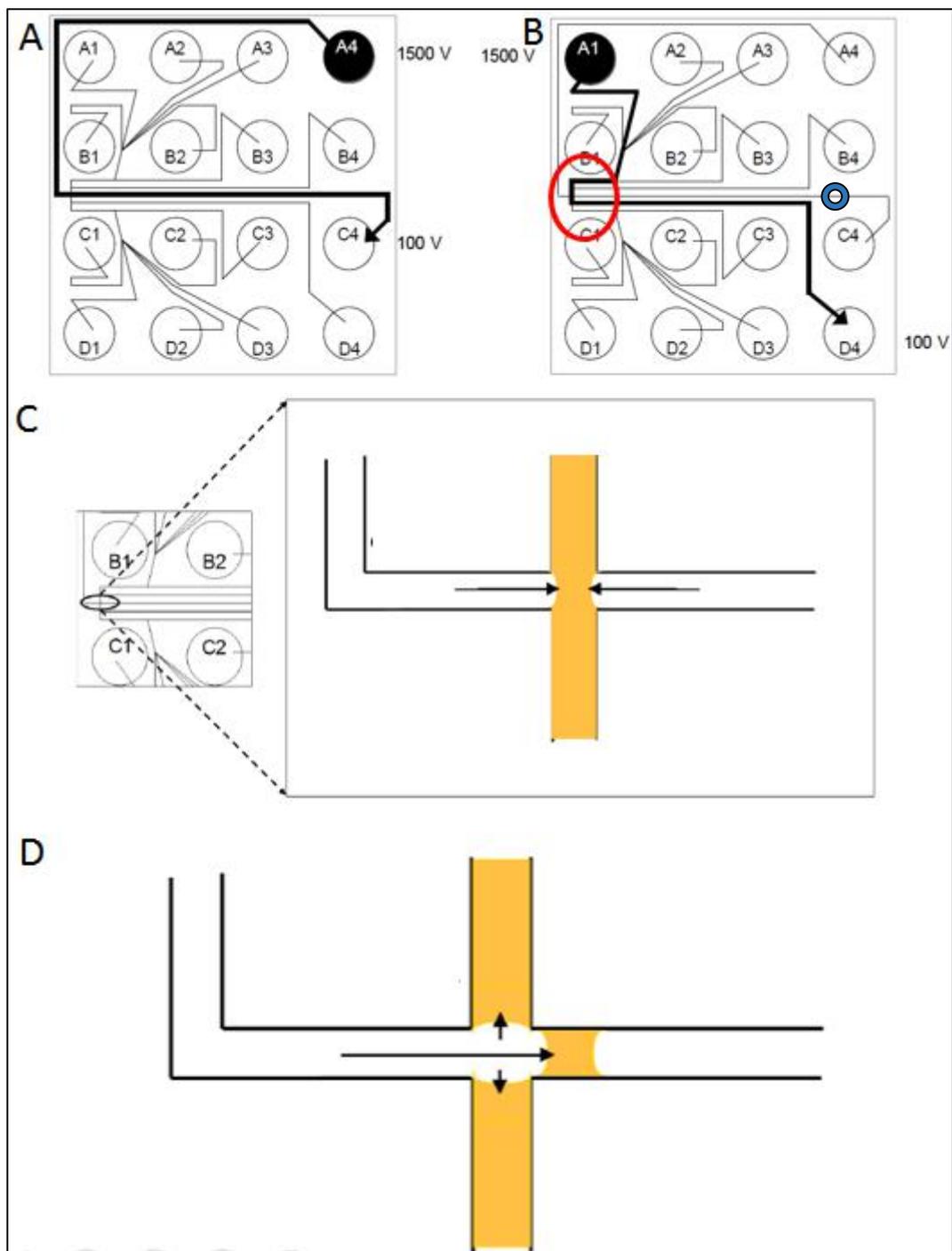


Figura 8: Esquematização da injeção. A) Lavagem da separação de canais. B) Arraste da amostra para o ponto de detecção. C) Interseção entre amostra e T2. D) Captura da amostra para detecção.

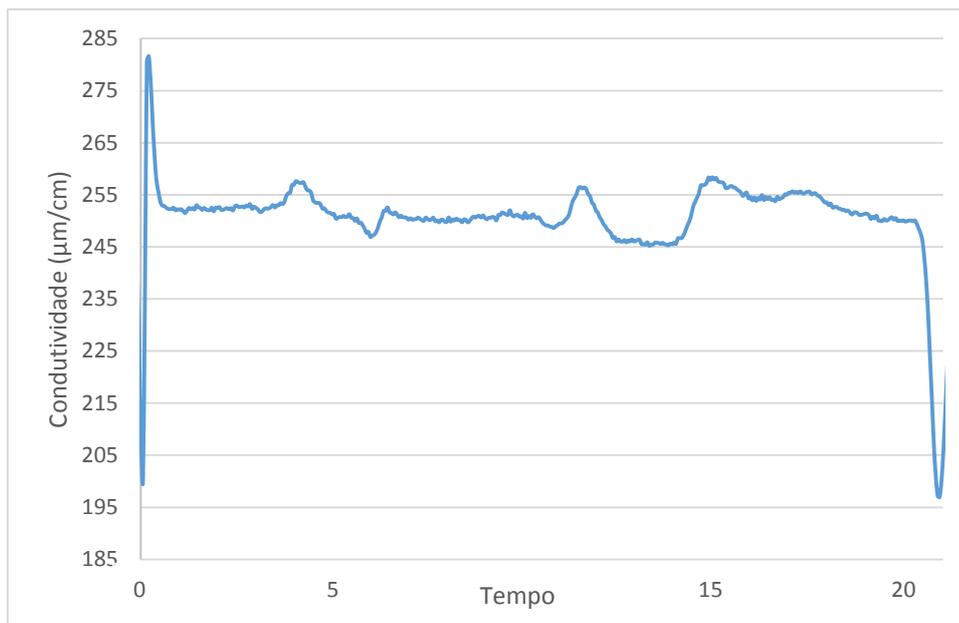


Figura 9: Eletroferograma da Injeção 2, contendo apenas o T2 na posição A1 do *chip*, representando a linha de base

Como pode ser visto na Figura 8, a linha de base foi detectada sem interferências relevantes e pouco ruído. Em uma análise inicial, uma mistura contendo quatro explosivos foram injetados na primeira injeção (TNB, TNT, Tetril e 3,4-DNT) como forma de teste preliminar. As condições de preparo do tampão e da amostra para todas as injeções estão listadas na Tabela 2. A composição do tampão usado foi uma solução de 50 mM de Borato de sódio e 50 mM de SDS. O pH era 9,2 (assim como para todas as outras injeções) e a concentração do pigmento era de 1,5 %. A diluição da amostra foi feita em T1 afim de se atingir concentração dos explosivos igual a 10 ppm. O *chip* utilizado nessa injeção era novo.

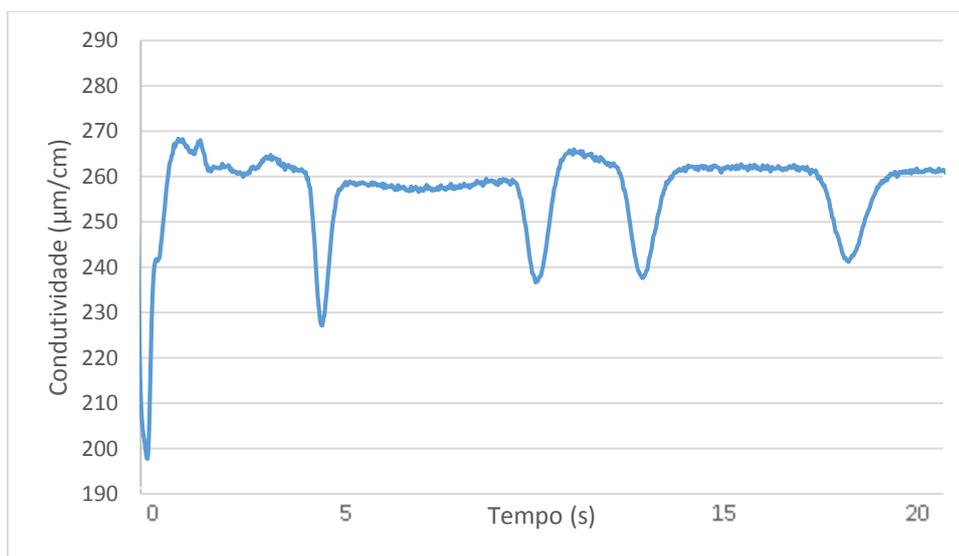


Figura 10: Eletroferograma da Injeção 1, contendo TNB, TNT, Tetril e 3,4-DNT na posição A1 do *chip*

Para esses compostos, o espectro apresentou quatro picos bem resolvidos que representam a diferença de condutividade entre o tampão puro (linha de base) e na presença de cada explosivo ao ser detectado. Nenhuma análise de identificação dos picos foi feita durante esse trabalho.

Após a realização do teste com a mistura de 4 explosivos, a segunda injeção foi feita com uma amostra contendo 9 explosivos, sendo TNT, Tetryl, TNB, m-NT, 2,4-NT, m-NT, 3,4-NT, 2-amin-4,6-NT e 4-amin-4,6-NT adicionados no ponto de detecção A2 do *chip*. O ponto de detecção A1 continha apenas o tampão. A Figura 10 apresenta o eletroferograma obtido da injeção contendo 9 explosivos.

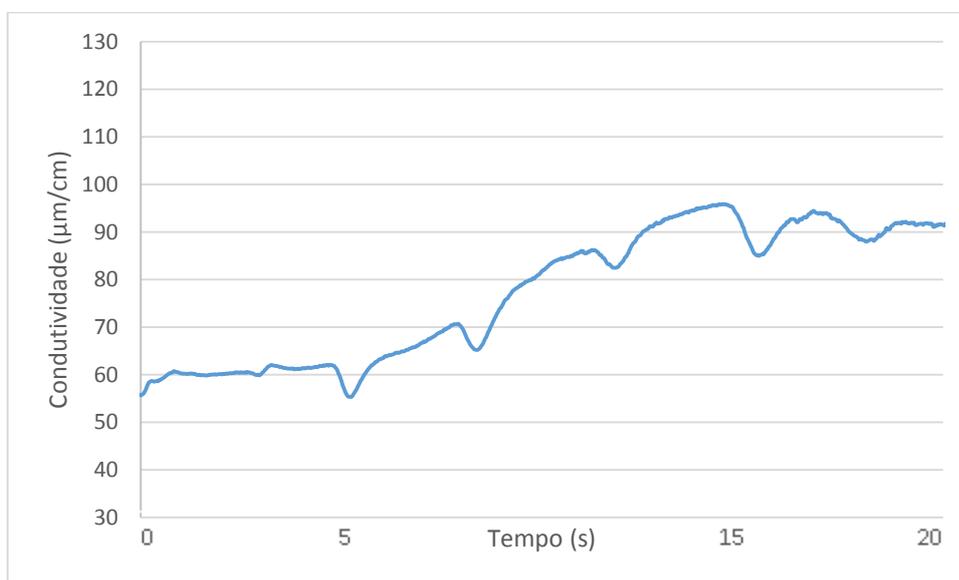


Figura 11: Eletroferograma da Injeção 2, contendo TNT, Tetryl, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT na posição A2 do *chip*

A presença dos 9 explosivos fez com que a linha de base se tornasse irregular, e os picos não puderam ser identificados claramente. Isso sugere que os parâmetros estabelecidos nessa injeção (composição de T2, pH, concentração do pigmento, concentração dos explosivos e diluição dos mesmos) não foram eficientes para separar os 9 compostos, ao contrário do observado na análise dos outros quatro anteriormente.

A fim de buscar melhor resolução para os nove picos, tentou-se ao invés de diluir o as amostras na solução tampão, diluir apenas em solução de Borato de sódio, para diminuir o efeito Joule na amostra. Esse efeito é resultado da passagem da corrente elétrica através da solução tampão quando uma voltagem é aplicada a mesma. O campo elétrico gerado aquece a solução

a ponto de criar gradientes de temperatura no tampão, alterando o fluxo eletroforético ao longo da seção capilar, difundindo a separação das moléculas (Zhu et al., 2012, 2007).

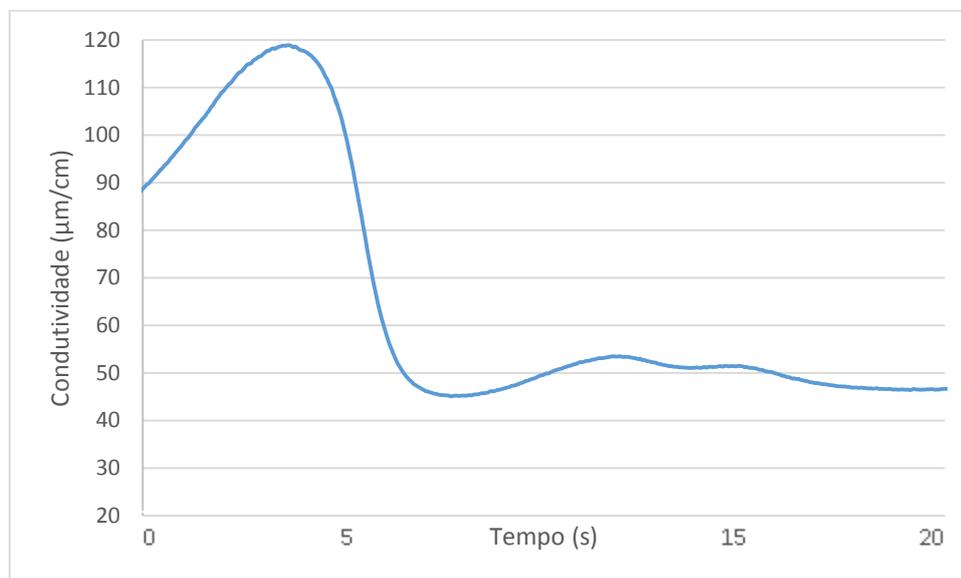


Figura 12: Eletroferograma da Injeção 3, contendo TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT na posição A1 do chip

A Injeção 3 (Figura 11), que possui suas amostras diluídas em tampão, revela um considerável decréscimo de toda a condutividade da amostra, tornando impossível o reconhecimento de qualquer pico. Dessa forma, a diluição das amostras tende a ser mais apropriada em solução de Borato de sódio com SDS do que em apenas Borato de sódio. A fim de confirmar essa premissa, a Injeção 4 foi feita em três diferentes concentrações de amostra: 25, 50 e 100 ppm. Outra mudança nessa injeção foi a concentração da solução de Borato de sódio no tampão (10 mM ao invés de 50 mM).

É interessante observar a presença de um pico para cima na Injeção 3 (Figura 11), o que não era esperado. Como mostrado na Figura 10 (pg. 24), os picos referentes aos explosivos são devidos a uma detecção indireta, ou seja, há um decréscimo de condutividade da solução que contém o pigmento quando o explosivo está presente. A presença de um pico positivo sugere que outra espécie em solução foi detectada também, ou até mesmo interagiu com o pigmento em solução, como por exemplo o íon sódio ou o íon borato. Outra sugestão é a má formação da dupla camada elétrica pelo SDS e pelo capilar, mesmo que pontual, interferindo no fluxo eletrosmótico do tampão, gerando os picos através da detecção dos mesmos íons já citados. Ainda existe a possibilidade de variação de corrente, mas como esse problema é aleatório, e os picos persistem em análises posteriores, é possível que esse não seja o motivo.

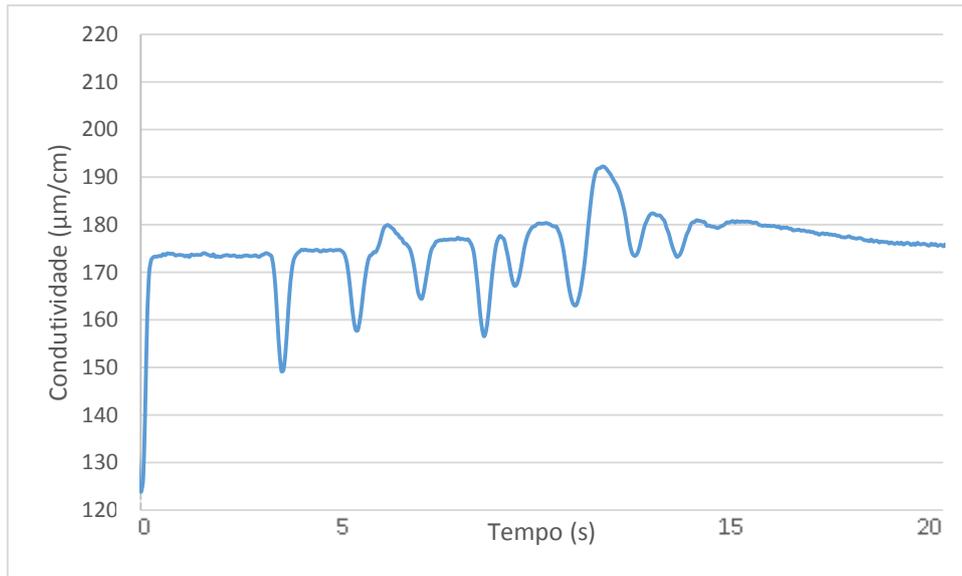


Figura 13: Eletroferograma da Injeção 4, contendo TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT a 25 ppm na posição A1 do *chip*; Concentração de Borato de sódio 10 mM

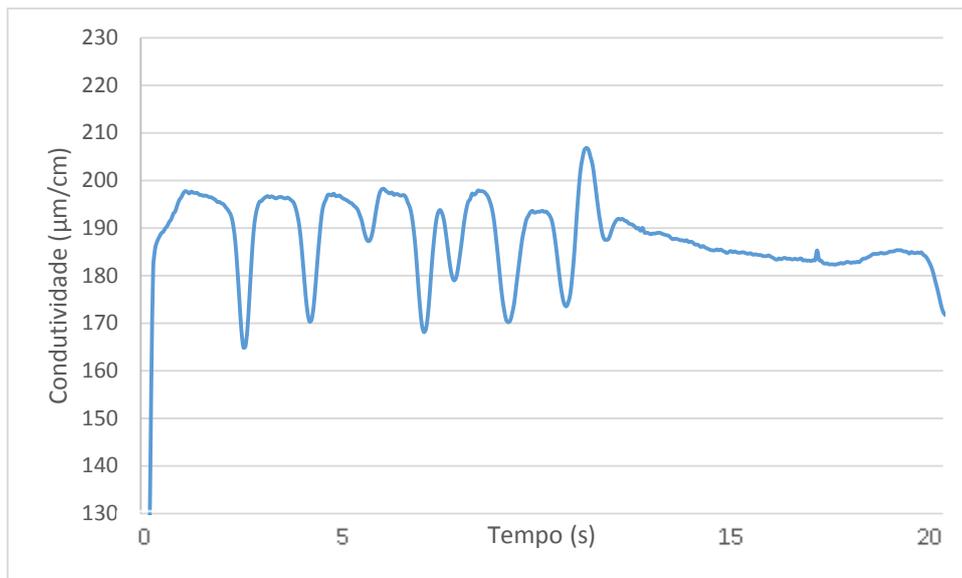


Figura 14: Eletroferograma da Injeção 4, contendo TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT a 50 ppm na posição A2 do *chip*; Concentração de Borato de sódio 10 mM

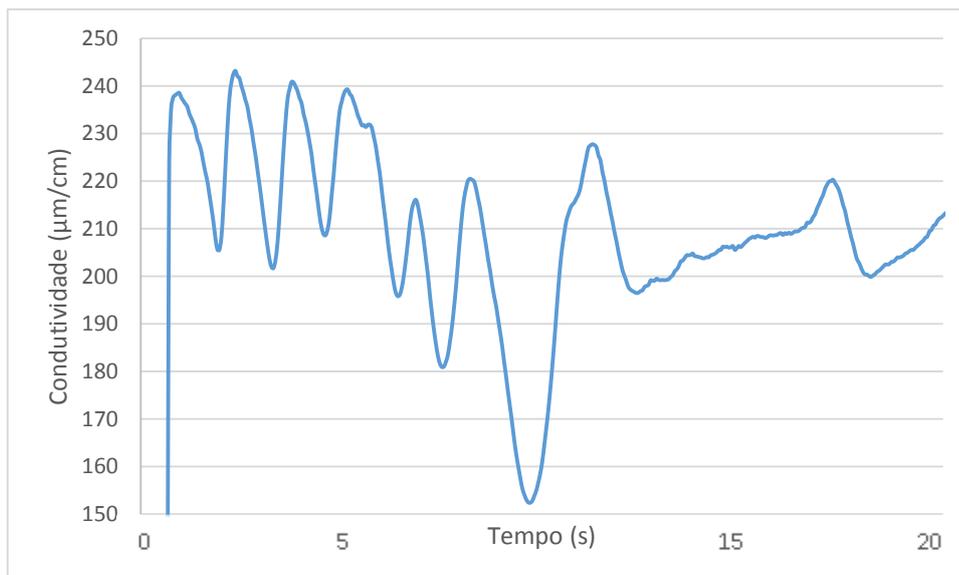


Figura 15: Eletroferograma da Injeção 4, contendo TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT a 100 ppm na posição A3 do *chip*; Concentração de Borato de sódio 10 mM

A alteração da concentração de Borato de sódio no tampão T2 é novamente uma maneira de diminuir o efeito Joule, aumentando a resolução dos picos. Todos as três concentrações apresentaram entre 6 e 8 picos, sendo a resolução dos eletroferogramas de concentração 50 e 25 ppm relativamente melhores quando comparados às amostras de concentração igual a 100 ppm, em que a resolução dos picos foi comprometida. Optou-se por dar prosseguimento aos experimentos com amostras em concentração igual a 50 ppm, pois essa concentração seria mais suscetível a alterações no método durante os experimentos.

Apesar dos avanços em relação a resolução dos picos, ambos eletroferogramas possuem apenas 8 picos, enquanto a amostra contém 9 explosivos. Além disso, a linha de base não está reta o suficiente para ser considerada uma boa linha base. Provavelmente o sinal oriundo da amostra (fluorescência do pigmento) não é estável durante todas as análises. Sendo assim, a Injeção 5 teve a concentração do pigmento DNA elevada para 2 %, ao invés de 1,5%.

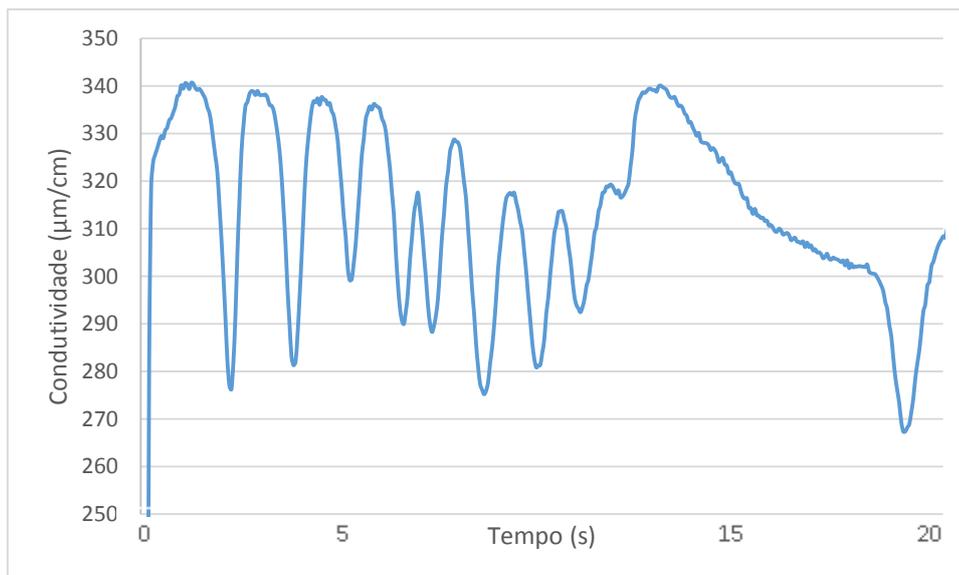


Figura 16: Eletroferograma da Injeção 5, contendo TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT na posição A1 do chip; Concentração de pigmento: 2%

Essa injeção apresenta uma linha de base tão estável quanto a Injeção 4 (Ponto de detecção A2, pg. 27), porém é possível observar claramente 8 picos e um nono pico coeluinto com o oitavo, com quase nenhuma resolução, sendo impossível identificá-lo como um composto da mistura. É possível também evidenciar a coeluição dos picos 4 e 5. Vê-se então que o aumento da concentração do pigmento de DNA no tampão T2 facilitou a visualização dos picos uma vez que suas fluorescências foram intensificadas, possibilitando que o equipamento conseguisse discernir melhor um pico do outro, logo, aumentando a resolução dos mesmos.

Entretanto, na Figura 15 é possível observar que os primeiros picos estão numa região em que a linha de base é mais estável que a em que estão os últimos. Para tentar corrigir isso, o uso de um aditivo como a hidroxietilcelulose (HEC) no tampão foi avaliada. É sabido que esse tipo de composto é capaz de formar uma cobertura em volta do lado interno do capilar, diminuindo o fluxo eletrosmótico, aumentando a seletividade da corrida e a estabilidade da linha base, uma vez que o capilar estaria mais protegido contra substâncias que provocariam instabilidade no sinal da linha de base. As Injeções 6 e 7 (pg. 30) repetiram a composição da Injeção 5, adicionando-se 1,0 % e 0,1 % de HEC, respectivamente.

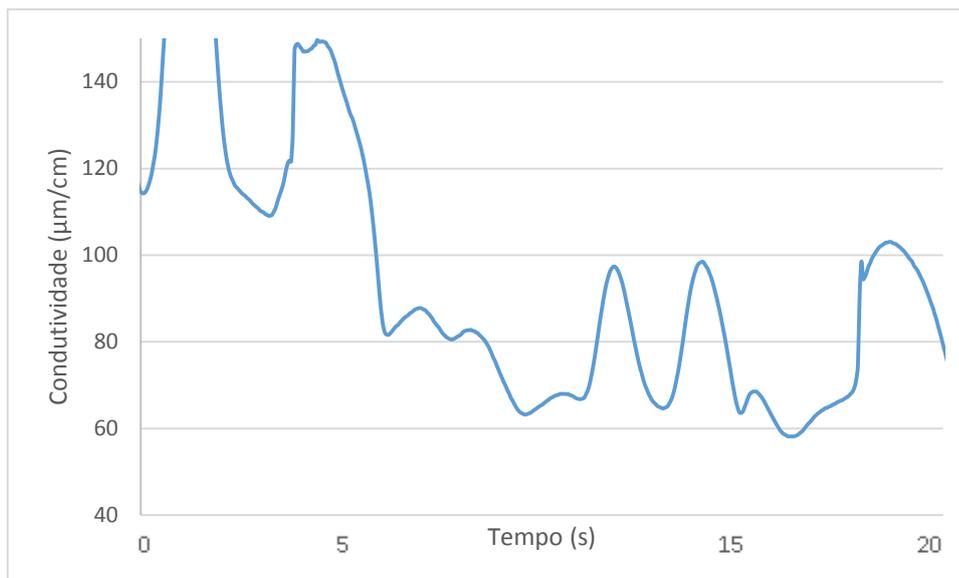


Figura 17: Eletroferograma da Injeção 6, contendo TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT na posição A1 do *chip*; Adição de HEC 1,0 %

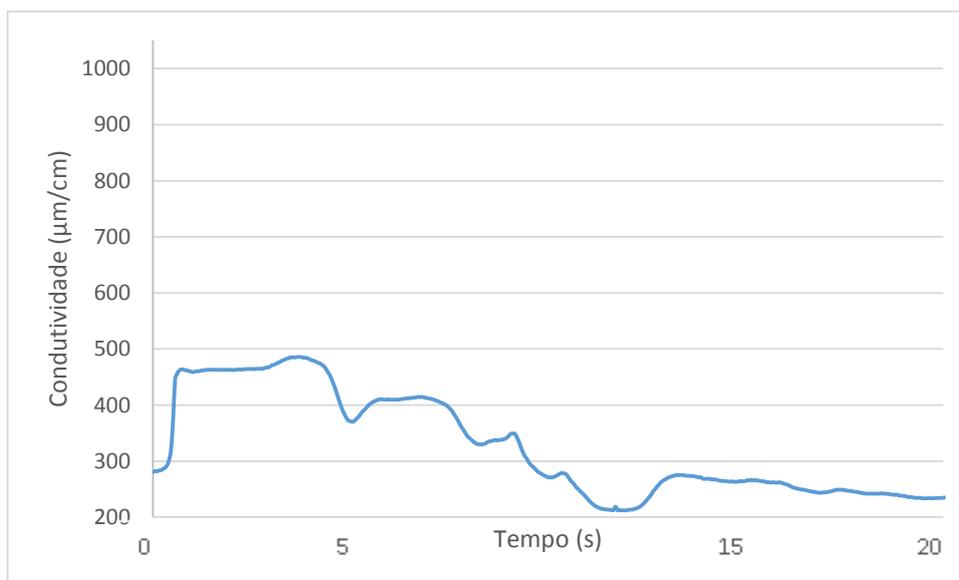


Figura 18: Eletroferograma da Injeção 7, contendo TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT na posição A1 do *chip*; Adição de HEC 0,1 %

A adição da HEC se mostrou ineficaz em aprimorar a resolução. Os problemas anteriores em relação à linha base persistiram e, além disso, a resolução dos picos deixou de existir, e nenhum deles foi detectado. Acredita-se que a HEC, por ser uma molécula de tamanho elevado (720 kDa) seja eficaz apenas para a EC convencional, e não para a mesma em *microchip*, onde o capilar possui seu tamanho bastante reduzido.

Com os seguintes parâmetros da Injeção 5 definidos como os mais adequados até agora, repetiu-se essa injeção mas dessa vez fazendo a diluição da amostra em água, visando uma possível economia de Borato de sódio e SDS. A Figura 18 corresponde ao eletroferograma da Injeção 8.

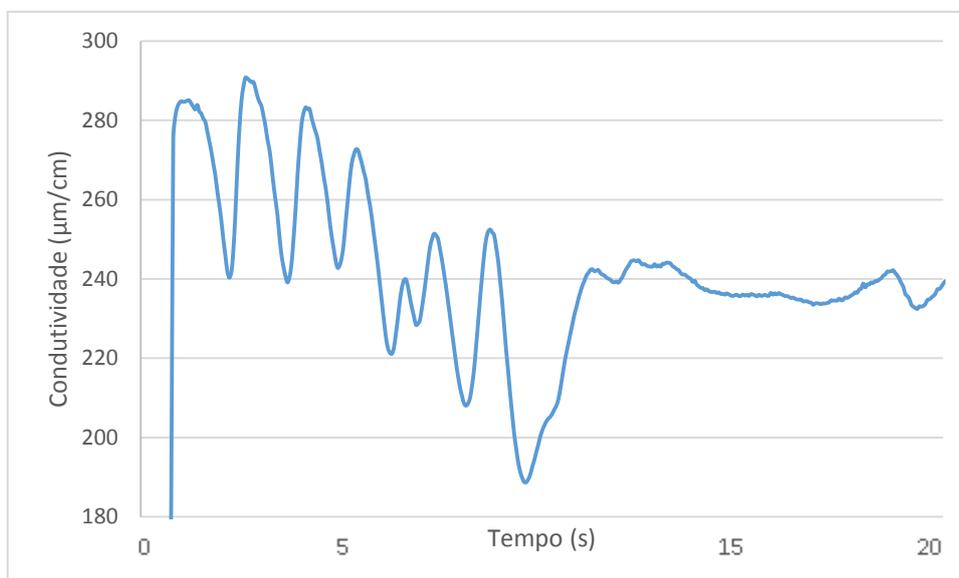


Figura 19: Eletroferograma da Injeção 8, contendo TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT na posição A1 do *chip*; Amostras diluídas em água

O eletroferograma resultante apresenta menos picos do que o esperado, mal resolvidos, além de uma linha de base irregular. Portanto, a água não se mostrou um bom solvente para essa análise.

Por último, foi desenvolvida uma metodologia para que o *chip* usado em uma análise fosse reutilizado. A reutilização do *chip* traria benefícios econômicos, práticos e ecológicos. A metodologia é responsável por eliminar qualquer resíduo que tenha permanecido nos canalículos após a última análise, utilizando solução de NaOH como meio de limpeza principal. Dessa forma, as paredes do *chip* estariam prontas para receber uma nova solução contendo SDS e formando a dupla camada elétrica sem maiores problemas. A Figura 20 (pg. 32) é apenas um exemplo de eletroferograma obtido após uma análise em um *chip* que passou pela metodologia de reaproveitamento. Vários testes foram realizados e o eletroferograma abaixo foi o melhor resultado obtido.

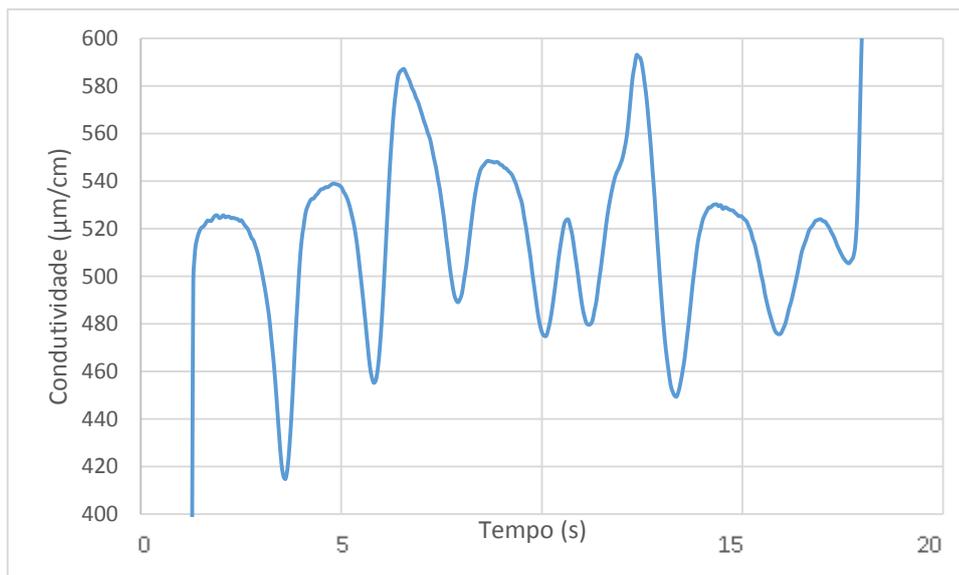


Figura 20: Eletroferograma da Injeção 9, contendo TNT, Tetril, TNB, m-NT, 2,4-DNT, m-DNB, 3,4-DNT, 2amin-DNT e 4amin-DNT na posição A1 de um *chip* que passou pelo processo de limpeza.

Pode-se observar que é possível identificar 8 picos nesse eletroferograma, que possui um comportamento parecido com o obtido na Injeção 5, como por exemplo os picos 4 e 5 coeluídos. Porém, a linha de base é instável e cada pico possui uma condutividade mínima diferente. Além disso, o comportamento da condutividade da amostra após a região de presença dos picos possui condutividades suspeitas, até mesmo na forma de picos, o que pode indicar impurezas da análise anterior ou mesmo deixadas durante a lavagem do *chip*.

Conclusões

O *Agilent 2100 Bioanalyzer* demonstrou potencial para ser usado como instrumento na detecção de explosivos de forma rápida (< 20 s). Oito dos nove explosivos estudados foram detectados, apesar deles não terem sido identificados.

Através da variação de parâmetros como composição de tampão e concentração da amostra foi possível identificar uma condição de análise mais próxima da ideal para os nove explosivos, a Injeção 5. Nessa injeção, feita em um *chip* novo, a concentração de borato de sódio era 10 mM, SDS 50 mM, pigmento 2% , pH 9,2 enquanto as das amostras, que foram diluídas em T1, eram 50 ppm.

O método de reutilização do chip se mostrou relativamente eficaz, uma vez que apesar de boa resolução dos picos, a linha base se apresentou instável.

Perspectivas Futuras

Os estudos preliminares mostraram que é necessário averiguar melhor as condições de análise a fim de se obter uma resolução adequada para a identificação de cada um dos nove picos obtidos através dos nove explosivos estudados. Com o que se têm até o momento, a identificação individual através de injeções para comparação entre os tempos de retenção ficaria comprometida. Além do mais, é preciso padronizar o método instrumental e a extração dos dados para que esses tempos de retenção possam ser comparados de forma adequada, possibilitando também a quantificação desses explosivos.

Outro aprimoramento a ser feito é o desenvolvimento de *kits* e dispositivos portáteis para a análise via EC-LOC em campo, acelerando o processo de identificação dos explosivos devido às suas curtas janelas de detecção. Além disso, a EC-LOC apresenta vantagens relevantes sobre técnicas com o mesmo intuito, como redução do uso de consumíveis, automação, tempo de análise e custo.

Referências

- BADJAGBO, K. & SAUVÉ, S. 2012. Mass Spectrometry for Trace Analysis of Explosives in Water. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42, 257-271.
- BELLIS, M. 2014. The History of Explosives - Explosives are materials capable of a instantaneous release of gas or heat. Available: <http://inventors.about.com/od/estartinventions/a/explosives.htm> [Accessed 10/11].
- BONATO, P. S., JABOR, V. A. P. & GAITANI, C. M. D. 2005. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. *Química Nova*, 28, 683-691.
- BRENA, R. M., AUER, H., KORNACKER, K., HACKANSON, B., RAVAL, A., BYRD, J. C. & PLASS, C. 2006. Accurate quantification of DNA methylation using combined bisulfite restriction analysis coupled with the Agilent 2100 Bioanalyzer platform. *Nucleic Acids Res*, 34, e17.
- CASCIO, O., TRETTENE, M., BORTOLOTTI, F., MILANA, G. & TAGLIARO, F. 2004. Analysis of organic components of smokeless gunpowders: High-performance liquid chromatography vs. micellar electrokinetic capillary chromatography. *ELECTROPHORESIS*, 25, 1543-1547.
- CESAR, P. 2014. Explosivos e Propelentes. Portal de Estudos em Química (PEQ).
- CHAFFEE-CIPICH, M. N., STURTEVANT, B. D. & BEAUDOIN, S. P. 2013. Adhesion of Explosives. *Analytical Chemistry*, 85, 5358-5366.
- COLLINS, G. E., HAES, A., LU, Q. & GIORDANO, B. Lab on a *Chip* Sensor Platform for Explosives and CBW Toxin Detection. *Measurement Systems for Homeland Security, Contraband Detection and Personal Safety, Proceedings of the 2006 IEEE International Workshop on*, 18-19 Oct. 2006 2006. 2-4.
- DOCUMENTARY, W. 2014. Explosions Documentary on the Science and History of Explosives and Explosions.
- EXECUTIVO 2000. DÁ NOVA REDAÇÃO AO REGULAMENTO PARA A FISCALIZAÇÃO DE PRODUTOS CONTROLADOS (R-105). In: MD, M. D. D.-. (ed.).
- FAINBERG, A. 1992. Explosives Detection for Aviation Security. *Science*, 255, 1531-1537.

HARGADON, K. A. 1992. Electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 610, B327-B359.

INVESTIGATION, F. B. O. Retail Security Awareness [Online]. Available: <http://www.fbi.gov/about-us/investigate/terrorism/wmd/wmd-security-awareness-videos/transcript-retail-security-awareness> [Accessed 10th Nivember 2014].

KNOX, J. H. & MCCORMACK, K. A. 1994. Volume expansion and loss of sample due to initial self-heating in capillary electroseparation (CES) systems. *Chromatographia*, 38, 279-282.

LLOYD, A., BLANES, L., BEAVIS, A., ROUX, C. & DOBLE, P. 2011. A rapid method for the in-field analysis of amphetamines employing the Agilent Bioanalyzer. *Analytical Methods*, 3, 1535-1539.

MANZ, A., GRABER, N. & WIDMER, H. M. 1990. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1, 244-248.

MCCORD, B. R., HARGADON, K. A., HALL, K. E. & BURMEISTER, S. G. 1994. Forensic analysis of explosives using ion chromatographic methods. *Analytica Chimica Acta*, 288, 43-56.

MELLO, A. Ousadia: Cresce o uso de dinamite em assaltos a bancos [Online]. ASCOBOM. Available: <http://www.ascobom.org.br/?p=27603>.

MOORE, D. S. 2004. Instrumentation for trace detection of high explosives. *Review of Scientific Instruments*, 75, 2499-2512.

NITSCHKE, R. 2002. Cell fluorescence assays on the Agilent 2100 bioanalyzer – general use. In: TECHNOLOGIES, A. (ed.) *Application*. Germany: Agilent Technologies.

ORGANIZATION, I. L. 2014. Chpater 15 - Explosives. ILO - International Labour Organization.

PAWELL, R. S., INGLIS, D. W., BARBER, T. J. & TAYLOR, R. A. 2013. Erratum: “Manufacturing and wetting low-cost microfluidic cell separation devices” [*Biomicrofluidics* 7, 056501 (2013)]. *Biomicrofluidics*, 7, -.

- PESENTI, A., TAUDTE, R. V., MCCORD, B., DOBLE, P., ROUX, C. & BLANES, L. 2014. Coupling Paper-Based Microfluidics and Lab on a *Chip* Technologies for Confirmatory Analysis of Trinitro Aromatic Explosives. *Analytical Chemistry*, 86, 4707-4714.
- PLETS 1953. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 5, 173.
- POLICE, A. F. 2005. Enhancing AFP Counter Terrorism International and National Roles [Online]. Canberra, Australia: Australian Federal Police. Available: <http://www.afp.gov.au/en/media-centre/speeches/2005/safeguarding-australia-summit-2005> [Accessed 10th November 2014].
- PRECKEL, T., LUEDKE, G., CHAN, S. D. H., WANG, B. N., DUBROW, R. & BUHLMANN, C. 2002. Detection of Cellular Parameters Using a Microfluidic *Chip*-Based System. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 7, 85-89.
- PUMERA, M. 2006. Analysis of explosives via *microchip* electrophoresis and conventional capillary electrophoresis: A review. *ELECTROPHORESIS*, 27, 244-256.
- PUMERA, M. & WANG, J. 2002. Contactless Conductivity Detector for Microchip Capillary Electrophoresis: Fast Measurements of Explosives and Explosive Residues. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 7, 47-49.
- SARAZIN, C., DELAUNAY, N., VARENNE, A., COSTANZA, C., EUDES, V. & GAREIL, P. 2010. Capillary and Microchip Electrophoretic Analyses of Explosives and their Residues. *Separation & Purification Reviews*, 39, 63-94.
- SENASP História dos explosivos e efeitos das explosões. *INSIGHT - Instituto de Integração Homem-Trabalho*.
- SKOOG, D. A. 2009. Eletroforese Capilar, Eletrocromatografia e Fracionamento por Campo e Fluxo. In: BOOKMAN (ed.) *Princípios de Análise Instrumental*. 6 ed. Porto Alegre.
- SUL, C. S. D. P. F. N. R. G. D. 2014. PF desarticula grupo responsável por ataques a bancos com uso de explosivo [Online]. Porto Alegre: Polícia Federal do Brasil. Available: <http://www.dpf.gov.br/agencia/noticias/2014/08/pf-desarticula-grupo-responsavel-por-ataques-a-bancos-com-uso-de-explosivo>.
- TAVARES, M. F. M. 1997. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. *Química Nova*, 20, 493-511.

- TERABE, S., OTSUKA, K. & ANDO, T. 1985. Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary. *Analytical Chemistry*, 57, 834-841.
- VERPOORTE, E. 2002. Microfluidic chips for clinical and forensic analysis. *Electrophoresis*, 23, 677-712.
- VLČKOVÁ, M., STETTLER, A. R. & SCHWARZ, M. A. 2006. Microchip Affinity Capillary Electrophoresis: Applications and Recent Advances. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29, 1047-1076.
- YETISEN AK, J. L., COOPER JR, QIN Y, PALANIVELU R, ZOHAR Y 2011. A microsystem-based assay for studying pollen tube guidance in plant reproduction. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 21.
- ZHU, J., SRIDHARAN, S., HU, G. & XUAN, X. 2012. Joule heating effects on electrokinetic focusing and trapping of particles in constriction microchannels. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 22, 075011.