

NUEVAS SOLUCIONES PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS NRBQEN CONTENEDORES (COSMIC)

Zamora Pérez, Daoíz^{‡*}, Piñero González, María Ysabel[‡], Pérez Velasco, Sergio[‡], Delgado Ballesteros, Rafael[‡] y Amo-González, Mario[‡]

[‡] SEADM S.L., Parque tecnológico de Boecillo.

Correo electrónico: daoiz.zamora@seadm.com

Resumen:

SEADM, empresa española desarrolladora de instrumentación analítica en el campo de la seguridad, está inmersa en un proyecto de investigación denominado COSMIC, con el objeto de desarrollar tecnología para la detección de amenazas NRBQe en contenedores marítimos. Los desarrollos cubren diversas tecnologías:

1) **Tecnología GC-DMA-F-DMA.** La combinación de cromatografía de gases multicapilar con espectrometría diferencial de movilidad en tándem con fragmentación intermedia (GC-DMA-F-DMA), proporciona límites de detección de pocos picogramos (<30 pg) en muestras atmosféricas. Pese a estas notables prestaciones, dicha tecnología es asequible, al no requerir de alto vacío a diferencia de la espectrometría de masas. Esto permite una solución con prestaciones revolucionarias a muy bajo coste. El sistema será sometido a ensayos reales en el puerto de Valencia.

2) **Tecnología DMA-MS/MS.** La tecnología basada en DMA (análisis diferencial de movilidad)-MS/MS (espectrometría de masas de triple cuadrupolo), que ha logrado la detección de 0.01 ppq de RDX con tasas de falsas alarmas menores al 1%, se ha aplicado a la detección de agentes químicos (gas sarín y gas mostaza) usando simulantes no tóxicos que serán probados en el Puerto de Rotterdam en 2020. Esta tecnología se utilizará asimismo para la identificación de bacterias, a través del análisis de compuestos característicos de su metabolismo. Ello permitirá la detección de amenazas bacteriológicas a través de sus patrones de olor; el proyecto se ensayará con bacterias reales patógenas en colaboración con el CSIC.

3) **Detección de virus mediante técnicas de movilidad iónica.** Un nuevo sistema de identificación de virus en muestras biológicas se está desarrollando en colaboración con la Universidad de Yale, basado en un equipo de movilidad iónica. Los ensayos iniciales se llevarán a cabo con virus de Hepatitis B sin genoma, que se extrapolarán a virus reales con diámetros nanométricos de hasta 200 nm.

El conjunto de soluciones está en una fase intermedia de desarrollo, con resultados extraordinarios que serán ensayados en contenedores reales a lo largo de 2020.

Palabras clave: Detección, Amenaza, NRBQe, Contenedor, IMS, Movilidad Iónica, Espectrometría de Masas.

1. Introducción

Los materiales CBRNE (Químicos, Biológicos, Radiológicos, Nucleares y Explosivos) utilizados por los terroristas, son una amenaza real y creciente dentro de la Unión Europea y a nivel global. Existe un gran desafío en lo relativo a la inspección eficiente de contenedores para este grupo de amenazas, ya que actualmente no hay una solución para hacer frente al problema. A modo de ejemplo, cabe destacar el caso de estudio de amenazas CBRN de la CE publicado por CSES (2011) [1], el cual indica las principales amenazas CBRNE que podrían utilizarse para atacar a personas o infraestructuras.

1.1. Estado del arte

La UE tiene varios tipos de puntos de cruce fronterizo, los cuales se pueden agrupar en tres tipos principales: fronteras marítimas, aéreas y terrestres, con métodos de inspección totalmente distintos. El proyecto COSMIC se dirige al escenario del análisis de contenedores de carga en fronteras marítimas, donde actualmente se utiliza un enfoque basado en la selección de objetivos para su inspección, en función de la información disponible (país de origen, tipo de carga, historial, etc.). Estas inspecciones están centradas básicamente en mercancías de contrabando como el tabaco, drogas u objetos ilegales, pero existe una importante brecha de seguridad respecto a los materiales CBRNE.

El actual flujo de inspección es por tanto muy limitado en términos de sus capacidades de detección de amenazas CBRNE, así como en los tiempos de inspección. Por ejemplo, en el puerto de Rotterdam (Holanda), el más grande de la UE, tan solo un 0,6% de los contenedores manejados durante el año 2017 pudieron ser escaneados por rayos X. De los 50.000 contenedores analizados, unos 1.500 se enviaron para inspección física. En aproximadamente 500 de los contenedores se identificó una anomalía de algún tipo tras la inspección física (la cual requiere unas 4 horas de 2 agentes). Estos datos alertan de la necesidad de un sistema de análisis eficiente y fiable.

1.2. Descripción del proyecto

El proyecto COSMIC incluye el diseño, desarrollo e implementación de un sistema de detección basado en tres etapas (primaria, secundaria e inspección manual) utilizando un nuevo conjunto de dispositivos de detección innovadores en cada una de las tres etapas. La función de la primera etapa (primaria) es realizar una inspección rápida CBRNE, combinada con otras comprobaciones de seguridad. Solo los contenedores sospechosos pasarán a la detección secundaria, donde se hará un análisis más detallado para confirmar la sospecha mediante el uso de un nuevo conjunto de detectores para agentes químicos, biológicos y explosivos con distintas tecnologías, con el fin de mejorar la eficiencia del sistema. Tanto las inspecciones primarias como las secundarias se realizarán en contenedores cerrados. La tercera etapa (inspección manual) se realizará, ya con el contenedor abierto, en aquellos contenedores sospechosos durante la inspección secundaria. COSMIC utilizará nuevos dispositivos de detección con capacidad para proporcionar resultados rápidos en campo, sin necesidad de enviarlo a un laboratorio externo y tener que esperar durante varias horas/días a su análisis.

El consorcio del proyecto COSMIC está formado por tres empresas comerciales (ATOS, Lingacom y SEADM), tres institutos de investigación (CSIC, Technion y Ben-Gurion University) y usuarios finales como la Guardia Civil, la Administración de Aduanas Holandesas y la Policía Nacional Israelí.

1.3. *Objetivos del proyecto*

El objetivo general del proyecto COSMIC es el de cerrar la brecha de seguridad principal de las aduanas en materiales CBRNE, facilitando la inspección rápida de gran cantidad de contenedores y vehículos en puertos marítimos y en el cruce de fronteras, utilizando para ello un enfoque basado en tres etapas. Como objetivos específicos de cada una de las distintas amenazas CBRNE, desarrollados por SEADM en el proyecto COSMIC, cabría destacar:

- 1) Desarrollo de nuevos sensores para la **detección de explosivos** basados en Análisis de Vapor (extracción de aire de los contenedores), utilizando Tecnología GC-DMA-F-DMA para la etapa primaria, y Tecnología DMA-MS/MS para la etapa secundaria.
- 2) Desarrollo de un nuevo sensor para la **detección de agentes químicos y biológicos** en la etapa secundaria, basado en Análisis de Vapor, con Tecnología DMA-MS.
- 3) Desarrollo de un nuevo sensor para la **detección de virus**, basado en Tecnología ES-CR-DMA.

2. **Desarrollo**

El desarrollo del proyecto COSMIC, implica, además del desarrollo analítico del detector, llevar a cabo un trabajo experimental donde se están utilizando diversos reactivos químicos, estándares e instrumentación analítica, los cuales se detallan a continuación.

2.1. *Reactivos y estándares*

Uno de los objetivos del proyecto es el estudio de los agentes de guerra química (en inglés, CWA) gas mostaza y somán, para lo cual se emplearon estándares de alta pureza analítica (>99%) correspondientes a compuestos simulantes: 2-cloroetil etil sulfuro (2-CEES) y malonato de dietilo (DEM) respectivamente [2,3]. En la etapa final del proyecto se utilizarán muestras reales para su posterior estudio y análisis.

2.2. *Instrumentación analítica*

A continuación, se detallarán las diferentes Tecnologías empleadas para cada uno de los tipos de amenazas a detectar por los sensores desarrollados por SEADM dentro del proyecto COSMIC.

2.2.1. *Tecnología GC-DMA-F-DMA*

La tecnología GC-DMA-F-DMA, utilizada en la detección primaria de explosivos, combina la separación de volátiles a través de una columna multicapilar, con el análisis diferencial de movilidad en tándem.

La muestra se recoge a través de un muestreador que fuerza a pasar 600 L de aire del contenedor a través de un filtro con un adsorbente químico donde parte de los vapores son capturados. Posteriormente el filtro se traslada al analizador y se introduce en el desorber térmico, donde los vapores previamente retenidos son liberados en una corriente de nitrógeno. Tras ello los vapores son retenidos en una trampa fría. A continuación, la trampa fría se desorbe a gran velocidad y los vapores se inyectan en la columna capilar. En función de la distinta interacción con la fase estacionaria, cada vapor tiene un tiempo de retención en la columna distinto, produciéndose, por tanto, una separación en el tiempo de los vapores analizados. A la salida de la columna, los vapores son ionizados en una fuente de electrospray secundario (D-LFSESI [4]) e introducidos en el primer DMA [5] (DMA1) que sólo deja pasar la banda estrecha de movilidad de interés. Los iones seleccionados entran en el

fragmentador térmico, donde son sometidos a elevadas temperaturas a presión atmosférica y se dividen en varios fragmentos. Los fragmentos entran en el segundo DMA (DMA2), que solo permite pasar la banda estrecha de movilidad del fragmento de interés. Los iones seleccionados por el DMA2 se envían finalmente a un electrómetro [6] de muy bajo ruido desarrollado por SEADM para su cuantificación.

2.2.2. Tecnología DMA-MS/MS

Tanto para la detección de los simulantes de CWA (2-CEES y DEM), como para la decompuestos orgánicos volátiles (VOCs) del metabolismo bacteriano, se utilizó un DMA plano modelo P5 [7] (Figura 1) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (AB Sciex API 5000 [8]).

El DMA permite realizar un primer filtrado de iones a presión atmosférica en régimen lineal de movilidad. Este analizador tiene la particularidad de combinar un flujo laminar de gas de arrastre con un campo eléctrico perpendicular entre dos electrodos paralelos, de manera que los iones que penetran a través de la ranura del electrodo superior se abren en forma de abanico a medida que viajan hacia el electrodo inferior, originando que sólo un estrecho rango de movilidades sea muestreado a través de una segunda ranura ubicada en el electrodo inferior. Por su parte, el espectrómetro de masas aporta una segunda discriminación de los iones en función de su relación masa/carga (m/z) tanto del ión molecular (modo Q1), como de los fragmentos derivados de éste (MS/MS), siendo la primera configuración el modo utilizado para el análisis de VOCs, donde se obtiene una huella espectral completa de la muestra, mientras que la configuración MS/MS permitió definir un método analítico con una elevada selectividad y especificidad para la caracterización de los dos simulantes de CWA seleccionados.

En el caso de los análisis de VOC, se ha diseñado un nuevo sistema de emisión de vapores, para extraer los vapores de una determinada cepa de bacterias con el fin de analizar sus componentes volátiles en el DMA-MS (Figura 2a). El sistema de emisión de vapores (Figura 2b) consta de tres partes: una zona inferior de generación de vapores, una zona superior de acumulación de estos vapores, y una zona intermedia entre ambas. En la parte inferior será en la cual se introduzca la placa Petri con las bacterias. Esta zona deberá estar a 37 °C, temperatura a la cual las bacterias emitirán los vapores que queremos analizar. Dichos vapores ascenderán a la zona superior, que tendrá un volumen de 0.5 litros y se encontrará a una temperatura de hasta 200 °C, para evitar que los vapores se adhieran a las paredes. Entre estas dos partes es necesario mantener una gran diferencia de temperatura, y para ello se ubicará una zona intermedia entre ambas consistente en un aislante térmico para evitar que la zona inferior se caliente a una temperatura más alta de lo debido y pueda dañar el cultivo de bacterias. Para ello se utilizará un aislante PEEK.

2.2.3. Detección de virus mediante técnicas de movilidad iónica ES-CR-DMA (inspección manual de virus)

El proceso que se utilizará para la detección de virus mediante técnicas de movilidad iónica es el siguiente. En una primera etapa se electrosprayan (ES)[9] las partículas virales disueltas, en una segunda etapa se reduce la carga de los iones (CR) y por último se separan las partículas por tamaños mediante el uso de un analizador diferencial de movilidad (DMA) específicamente diseñado para este campo, el cual permite cubrir un rango de tamaños entre los 30 y 200 nm. Esta técnica ofrece un análisis de tamaños bastante flexible para pequeñas partículas en una disolución.

En la primera etapa (ES) se confiere carga a las partículas virales. Al tratarse de partículas de gran tamaño (entre los 30nm. en el caso del virus de la Hepatitis B(HBV), hasta los 110nm. en el caso del coronavirus de la Gastroenteritis Trasmisible (TGEV))acaban obteniendo múltiples cargas, lo que daría una medida errónea del tamaño si se las considerara de carga unitaria, y no se puede saber el número de cargas que tienen. Esto resalta la necesidad de la segunda etapa (CR) en la que se reduce la carga de las partículas hasta obtener partículas de carga unitaria, de modo que sean perfectamente clasificables en tamaño por la última etapa (DMA).

El objetivo del desarrollo de este instrumento es asegurar la detección de partículas virales, que estuvieran en ese rango de tamaños, en muestras reales.

3. Listas, figuras y tablas

CWA activo	Simulante del CWA	m/z (M+1)	MS/MS	Pérdidas en MS/MS
Gas mostaza	2-CEES	125	75	$\cdot\text{CH}_2\text{Cl}$
Somán	DEM	161	133, 115	$\text{C}_2\text{H}_4, (\text{C}_2\text{H}_4, \text{H}_2\text{O})$

Tabla 1.Caracterización de los métodos de detección para simulantes de agentes de guerra química.

VOCs	Da	m/z (M+1)	MS/MS	Pérdidas en MS/MS
2-Heptenal	112.17	113	95	H_2O
2-Etil-1-hexanol	130.23	131	113, 85	$\text{H}_2\text{O}, (\text{C}_2\text{H}_4, \text{H}_2\text{O})$
3-Metil-1-butanol	88.15	89	57	$\text{CH}_2, \text{H}_2\text{O}$

Tabla 2.Caracterización de los métodos de detección para VOCs del metabolismo bacteriano.

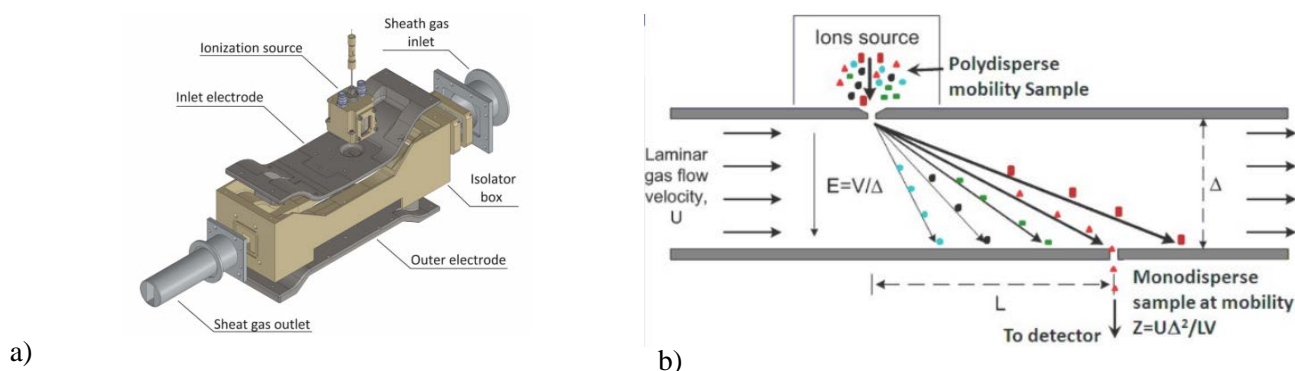


Figura 1.Esquema de un DMA (a) y principio de funcionamiento (b)

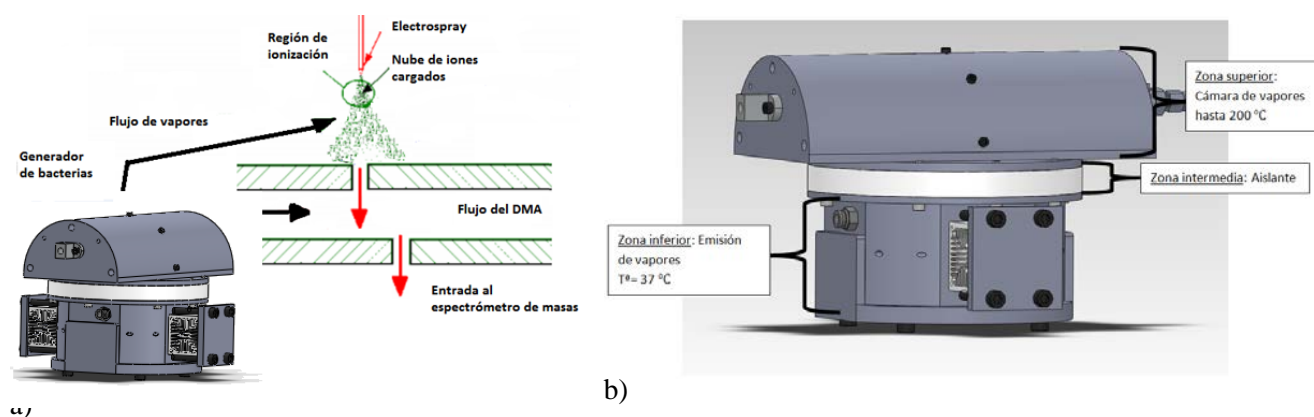


Figura 2. Esquema del sistema de emisión de vapores conectado a un DMA-MS (a) y Partes del sistema de emisión de vapores (b)

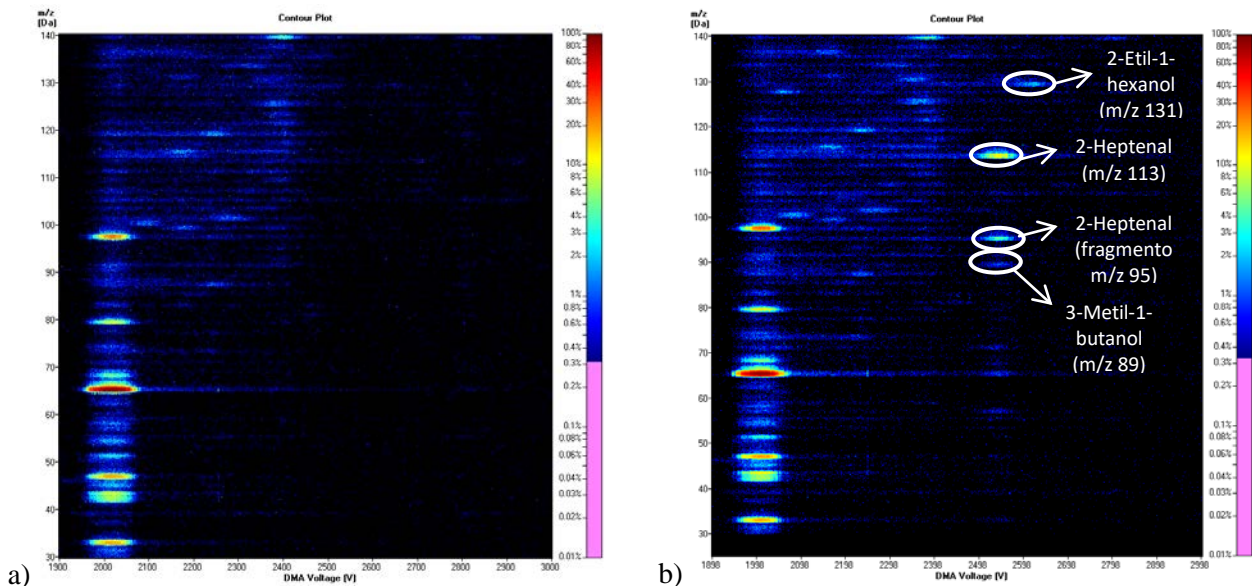


Figura 3. Mapas topográficos de un blanco (a) y una mezcla de VOCs (b) característicos del metabolismo bacteriano.

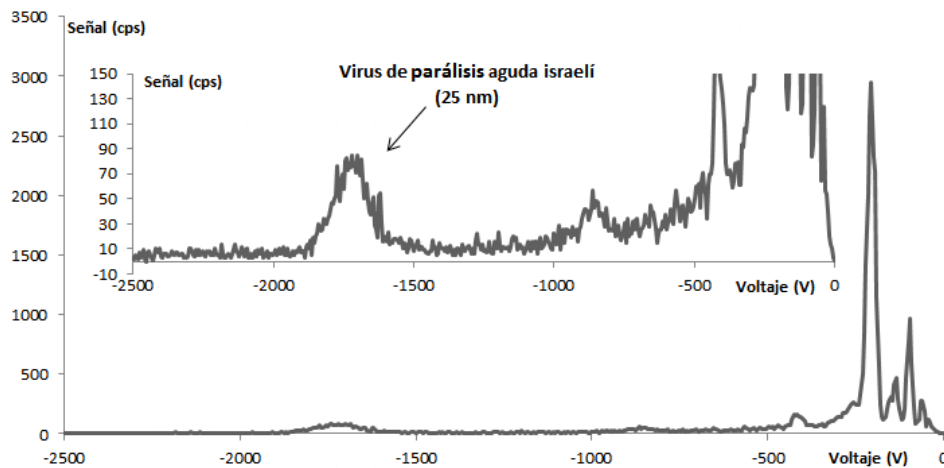


Figura 4. Espectro de muestra con virus de parálisis aguda israelí de abeja

4. Resultados y discusión

4.1. Detección de explosivos con tecnología GC-DMA-F-DMA

En el marco del proyecto EffeXfase II (2018-2019), financiado por el programa FASS del reino Unido, con el objetivo de desarrollar la técnica DMA-F-DMA para la detección de explosivos, se han realizado pruebas para evaluar el fondo del instrumento al analizar muestras de 500 litros de aire. Los resultados han sido los siguientes: 2.5 pgde TNT (5 ppq), 6.3 pgde PETN (9 ppq), 9.4 pg de NG (19 ppq), 23 pgde EGDN (67 ppq) y 33 pgde RDX (67 ppq).

Además se han realizado pruebas con muestras explosivos comerciales (varios gramos) ocultos en palés de carga, para evaluar la capacidad de detección del analizador GC-DMA-F-DMA en colaboración de INTA. Los palés estaban formados por 27 cajas de 40x40 cm, situándose el explosivo (50 g) en la caja central. El muestreo se realizaba introduciendo el tubo de aspiración por la parte superior del palé, a través de una pequeña apertura sobre el film con el que el palé estaba recubierto. La detección fue directa para los explosivos EGDN, NG y TNT, e indirecta para la PETN, que fue detectada a través de trazas contaminantes de otros explosivos. El RDX no se detectó,

ni directamente ni a través de trazas de otros explosivos (las muestras de RDX fueron compradas específicamente para estas pruebas, siendo almacenadas lejos del resto de explosivos).

4.2. Detección de simulantes de agentes químicos

Para la caracterización del método analítico que permitió la detección de los simulantes de CWA(2-CEES y DEM), se realizó un primer análisis que consistió en combinar un barrido amplio del DMA (entre 1.700 y 3.200 V) con el modo *full scan* (Q1) del MS, para valorar la presencia del analito de interés tanto en polaridad positiva como negativa. Los resultados obtenidos indican que las moléculas estudiadas se ionizan más eficientemente bajo el modo de polaridad positivo, hecho que coincide con estudios anteriores [2,3]. Posteriormente se realizó la fragmentación del ion correspondiente a cada simulante y se estudiaron, tanto el patrón obtenido, como la estructura química de las moléculas que se pierden en la fragmentación. Finalmente, con esta información se procedió a completar la caracterización del método MRM (MS/MS) para cada compuesto (Tabla 1).

4.3. Análisis de VOCs provenientes del metabolismo bacteriano

El sistema de emisión de vapores, junto con la tecnología DMA-MS/MS (Figura 2a), también ha permitido la caracterización de VOCs asociados al catabolismo bacteriano. De manera preliminar, en este trabajo, se han realizado dos tipos de estudio, un estudio dirigido donde se ha detectado la presencia de diversos biomarcadores que están asociados con la presencia de las especies *Escherichiacoli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* [10], como son el 2-heptenal, 2-etil-1-hexanol y 3-metil-1-butanol. Para cada uno de los analitos mencionados, se definió un método MS/MS como se indica en la Tabla 2. Por otro lado, se ha realizado un estudio no dirigido donde se compara el mapa topográfico (que contiene toda la huella espectral) obtenida para un blanco y para una mezcla de VOCs característicos del metabolismo bacteriano (Figura 3). El barrido de voltaje en el DMA se realizó entre 1.900 y 3.000 V y el rango de m/z monitorizadas estuvo entre 30-140 Da, considerando la masa molecular de los compuestos de interés. De esta manera, el método propuesto podrá ser utilizado para el análisis de toda la huella espectral correspondiente a cultivos de las bacterias mencionadas anteriormente. Los datos obtenidos bajo este tipo de configuración serán tratados quimiométricamente, empleando análisis multivariante, específicamente análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante ortogonal parcial de mínimos cuadrados (OPLS-DA), lo que permitirá determinar la probabilidad de que alguno de los microorganismos estudiados se encuentre en un contenedor en concentraciones que puedan representar una amenaza biológica.

4.4. Validación del sistema ES-CR-DMA para la detección de virus.

El sistema ES-CR-DMA fue montado y probado en las instalaciones de la Universidad de Yale (New Haven, Connecticut). Para el análisis se utilizó una muestra que contenía el virus de parálisis aguda israelí de abeja, de tamaño 25 nm, proporcionando un espectro claro de detección de esta partícula que se puede observar en la Figura 4. El resto de señal, presente a bajos voltajes, se asocia a estados de carga doble, triple, etc. y a partículas de menor tamaño presentes en la muestra, ya que esta no es una muestra pura del virus sino que se ha obtenido a partir de abejas reales.

También se puede observar cómo, en la zona de detección de partículas virales, no existe fondo o contaminación de otras partículas, lo que de momento parece anunciar una baja probabilidad de falsos positivos en la detección.

5. Conclusiones

La tecnología GC-DMA-F-DMA ha demostrado niveles de pocos picogramos en análisis atmosféricos. Además, ha demostrado la capacidad de detección de vapores de explosivo ocultos en palés de carga, detectando de manera satisfactoria cuatro de los 5 explosivos estudiados en condiciones reales.

En lo relativo al análisis de explosivos, agentes químicos y VOCs bacterianos, la tecnología DMA-MS/MS representa una novedosa plataforma analítica (en especial en el caso de agentes químicos y bacterianos), que permite en pocos segundos la detección de compuestos simulantes de agentes de guerra química, así como también el estudio de biomarcadores genéricos o específicos que pudieran indicar la presencia de bacterias en contenedores.

En cuanto a la detección de virus, la aproximación ES-CR-DMA proporciona una solución barata y rápida que arroja una primera identificación de la presencia o ausencia de virus en muestras biológicas, permitiendo abaratar los procesos de control.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Universidad de Yale por el asesoramiento científico y tecnológico de esta investigación, al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por su colaboración en los ensayos realizados con bacterias y virus y al Programa Horizonte 2020 por la financiación del Proyecto COSMIC.

Referencias

1. Centre for Strategy & Evaluation Services. CBRN Case Study [Internet]. [cited 2019 Jul 31]. Available from: https://ec.europa.eu/home-affairs/sites/homeaffairs/files/e-library/documents/policies/security/pdf/cbrn_case_study_cses_en.pdf
2. Smith J, Noll R, Cooks G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**;25:1437-1444.
3. Cordell R, Willis K, Wyche K, Blake R, Ellis A, Monks P. *Anal. Chem.* **2007**;79(21):8359-8366.
4. SEADM. LFSESI [Internet]. [cited 2019 Jul 31]. Available from: <https://www.seadm.com/products/vapour-analysisdetection/low-flow-secondary-electrospray-ionizer/>
5. SEADM. Differential Mobility Analyzer [Internet]. [cited 2019 Jul 31]. Available from: <https://www.seadm.com/products/nano-particle-and-molecule-classifiers/ultra-high-resolution-differential-mobility-analyzer/>
6. SEADM. Electrometer Lynx E12 [Internet]. [cited 2019 Jul 31]. Available from: <https://www.seadm.com/products/technological-modules/electrometer/>
7. SEADM. Planar DMA [Internet]. [cited 2019 Jul 31]. Available from: <https://www.seadm.com/products/technological-modules/separation/planar-dma-cell/>
8. AB SCIEX. API 5000 LC/MS/MS System [Internet]. [cited 2019 Jul 31]. Available from: <https://sciex.com/Documents/Downloads/Literature/5000-site-planning-guide-en.pdf>
9. Fernandez de la Mora J, Barrios-Collado C. *Aerosol Sci Technol.* **2017**;51(6):778-86.
10. Ratiu I, Bocos-Bintintan V, Patrut A, Moll H, Turner M, Paul Thomas C. *Anal. Chim. Acta* **2017**;982:209-217.