UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Síntese, Aplicação e Avaliação da Toxicidade Aguda de Complexo Orgânico à Base de Európio Proposto como Marcador Fotoluminescente para a Identificação de Resíduos de Tiro

Caline Airão Destefani

Dissertação de Mestrado em Química

Vitória
2014

Caline Airão Destefani

Síntese, Aplicação e Avaliação da Toxicidade Aguda de Complexo Orgânico à Base de Európio Proposto como Marcador Fotoluminescente para a Identificação de Resíduos de Tiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Química, na área de Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Romão

VITÓRIA
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Destefani, Caline Airão, 1983-

D476s Síntese, aplicação e avaliação da toxicidade aguda de complexo orgânico à base de európio proposto como marcador fotoluminescente para a Identificação de resíduos de tiro / Caline Airão Destefani. - 2014.

109 f.: il.

Orientador: Wanderson Romão.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Fotoluminescência. 2. Compostos de európio. 3. Espectrometria de massa. 4. Testes de toxicidade. 5. Marcador óptico. I. Romão, Wanderson. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas. III. Título.

CDU: 54

Síntese, Aplicação e Avaliação da Toxicidade Aguda de Complexo Orgânico à Base de Európio Proposto como Marcador Fotoluminescente para a Identificação de Resíduos de Tiro

Caline Airão Destefani

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Aprovada em 29/08/2014 por:

Prof. Dr. Wanderson Romão
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Profa. Dra. Ingrid Tavora Weber
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Sandro José Greco
Universidade Federal do Espírito Santo

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Agosto de 2014

Dedico este trabalho a toda minha família que sempre esteve ao meu lado me apoiando e que sempre foi meu alicerce.

AGRADECIMENTOS

A Deus, detentor de todas as verdades.

Aos meus pais, minhas irmãs e irmão por todo amor e incentivo incondicionais.

Ao meu professor e orientador Prof. Dr. Wanderson Romão, pela oportunidade, incentivo e aprendizagem durante todo o trabalho.

Ao Leonardo, por toda ajuda e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Petroleômica: Gabriela, Lindamara, Lilian, Heloísa, Mayara, Letícia, Helber, Vitor Nunes, Jandira, Larissa, Flávia e Natwire, pela ajuda constante.

À Polícia Civil do Espírito Santo, que através do Acordo de Cooperação Técnica n° 23068.011398/2012-72, celebrado com a Universidade Federal do Espírito Santo, tornou possível a realização do estudo.

Aos Peritos Criminais do Laboratório de Química e da Seção de Balística, em especial à Bianca, Tânia, Raíssa e Fabiano, pelo incentivo e colaboração nas etapas do trabalho.

Ao Prof. Dr. Elias Meira da Silva e seu aluno Clebson de Jesus Macrino, por fornecerem o composto estudado.

Ao Prof. Dr. Sandro José Greco e seu aluno João Francisco Allochio Filho, pela colaboração na etapa de síntese.

À Profa. Dra Denise Coutinho Endringer, pela colaboração e orientação na realização do teste de toxicidade.

Ao Laboratório de Experimentação Animal para Análise Farmacológica da Universidade Vila Velha, pela cooperação na realização do teste de toxicidade.

Ao LabPetro/UFES, em especial ao professor Dr. Eustáquio Vinícius Ribeiro de Castro, pela oportunidade de execução deste trabalho.

Ao professor Prof. Dr. Sandro José Greco e à Profa. Dra Ingrid Tavora Weber, por comporem a banca de avaliação desta dissertação.

E a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução (%) dos homicídios por AF no Brasil (1980 – 2010) - Adaptada.....19
Figura 2. Número de homicídios no Espírito Santo de acordo com os meios utilizados (Jan. – Dez. 2011 / Jan. – Nov. 2012) - Adaptada.....20
Figura 3. Proporção (%) de homicídios consumados nos municípios da Grande Vitória de acordo com o tipo de arma utilizada nos anos de 2011, 2012 e 2013 e no primeiro semestre de 2014. Dados cedidos pela DHPP/PCES - Adaptada.....21
Figura 4. Esquema de um cartucho de arma de fogo e seus elementos essenciais - Adaptada.....23
Figura 5. Estrutura química da: **(a)** nitrocelulose e **(b)** nitroglicerina.....25
Figura 6. Reação química para identificação dos íons Pb^{2+} - Adaptada.....27
Figura 7. Reação química para identificação dos íons Ba^{2+} - Adaptada.....27
Figura 8. Diagrama de níveis de energia mostrando a origem da luminescência do íon Eu^{3+} através da excitação indireta - Adaptada.....32
Figura 9. Imagens dos marcadores quando expostos à radiação UV: **(a)** *R-Marker* e *G-Marker* emitindo na região do vermelho e verde, respectivamente; **(b)** *R-Marker* em revólver de calibre .38 após disparo; **(c)** *G-Marker* em pistola de calibre .40 após disparo; **(d)** *G-Marker* sobre a superfície do alvo; (e) *R-Marker* na mão do atirador (resíduos de *R-Marker* são indicados pelas setas amarelas); **(f)** resíduos sem chumbo contendo *R-* e *G-Markers*.....33
Figura 10. Espectros de emissão dos marcadores fotoluminescentes antes e após os disparos **(a)** *R-Marker* = [Eu(DPA)(HDPA)] e **(b)** *G-Marker* = [Tb(DPA)(HDPA)]..34
Figura 11. (a) Espectros de emissão dos *UC Markers*, originados a partir de um máximo de excitação em 325 nm; **(b)** GSR em pistola de calibre .40, após disparo com munição convencional não marcada (branco); **(c)** *UC Marker-1* em pistola de calibre .40 após disparo; **(d)** e **(e)** resíduos sem chumbo contendo *UC Markers*. **(d)**: não irradiados com luz UV e **(e)**: sob luz UV - Adaptada.....35
Figura 12. Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas - Adaptada.....37
Figura 13. Ilustração esquemática de uma fonte de ionização por *Eletrospray* - Adaptada.....38

Figura 14. Esquema do funcionamento de uma cela de ICR. **(a)** Diagrama do movimento ciclotrônico de íons e **(b)** a cela de ICR. A rotação dos íons ocorre perpendicularmente ao campo magnético B - Adaptada.....40
Figura 15. (a) Esquema de um espectrômetro de massas FT-ICR MS; **(b)** Diagrama de Energia em função da trajetória do caminho percorrido pelo íon - Adaptada.....41
Figura 16. Fórmula estrutural do ácido pícrico.....45
Figura 17. Estruturas de ressonância do ânion picrato.....45
Figura 18. Estrutura da (a) caprolactama e **(b)** *n*-metil-ε-caprolactama.....46
Figura 19. Estrutura de ressonância da caprolactama - Adaptada.....46
Figura 20. Síntese dos complexos de európio a partir de três etapas: **(a)** Etapa I) síntese do carbonato básico de európio (III) hidratado; **(b)** Etapa II) síntese do picrato de európio (III) hidratado; e **(c)** Etapa III) síntese do complexo de picrato de európio (III) com a *n*-metil-ε-caprolactama - Adaptada.....50
Figura 21. Imagens dos complexos **(a, c, e)** $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ e **(b, d, f)** $[Eu(PIC)_3.xH_2O]$ sem irradiação de luz UV, e sob luz UV a 254 e 365 nm.....54
Figura 22. Imagens do complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ **(a)** sem irradiação de luz UV; **(b)** sob luz UV em 395 nm; e **(c)** seu espectro de emissão a 77 K sob excitação a 430 nm. Notar que o complexo emitiu fotoluminescência de cor vermelha quando exposto a luz UV.....55
Figura 23. Espectros FTIR de **(a)** $[EuCO_3(OH).xH_2O]$, **(b)** $[Eu(PIC)_3.xH_2O]$, **(c)** $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$, **(d)** PIC e **(e)** NMK.....57
Figura 24. Curvas TGA e DTG para os complexos **(a)** $[EuCO_3(OH).xH_2O]$, **(b)** $[Eu(PIC)_3.xH_2O]$ e **(c)** $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$.....59
Figura 25. ESI(-)-FT-ICR MS de $[Eu(PIC)_3.xH_2O]$.....60
Figura 26. ESI(+)-FT-ICR MS de $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$.....61
Figura 27. Série isotopóloga experimental e calculada dos íons **(a)** $[Eu(PIC)_2(NMK)_4]^+$ e **(b)** $[Eu(PIC)_2(NMK)_3]^+$. A série isotopóloga do marcador é bastante característica devido principalmente à presença de Eu, e se aproxima do padrão teórico calculado pelo *software* Analyst.....63
Figura 28. ESI(+)MS/MS para íons de *m/z* **(a)** 990, **(b)** 863 e **(c)** 649.....64
Figura 29. Esquema da fórmula estrutural proposta para o complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$.....65
Figura 30. Esquema de **(a)** preparo dos cartuchos de calibre .38 e .40 convencionais marcados com diferentes massas de $Eu(PIC)_3(NMK)_3$, **(b)** produção de GSR após

disparos com revólver .38 e pistola .40 a uma distância constante de 50 cm entre o atirador e o alvo, e **(c)** detecção do GSR sob irradiação UV em 395 nm e coleta através de *swab* umedecido com uma solução de EDTA 2% (w/v).....71
Figura 31. Imagens da detecção visual do GSR, sob irradiação de luz UV, após disparos com cartuchos contendo 2, 5, 10, 25 e 50 mg do marcador: alvo e chão (ambos cobertos por pano de cor preta), cartucho deflagrado, e sobre o atirador. O marcador é indicado no atirador por setas pretas.....73
Figura 32. Imagens da detecção do GSR nas regiões do cano e da câmara do tambor de revólveres quando efetuados disparos com cartuchos contendo 2, 5, 10, 25 e 50 mg.....74
Figura 33. Imagens da detecção visual do GSR, sob irradiação de luz UV, após disparos com cartuchos .40 contendo 25 e 50 mg do marcador: alvos, cartuchos deflagrados, chão (ambiente) e sobre o atirador. O marcador é indicado no atirador por setas pretas.....76
Figura 34. Imagens da detecção do marcador nas regiões do cano e da culatra de pistolas .40 quando efetuados disparos com cartuchos contendo 25 e 50 mg.....77
Figura 35. Detecção visual das propriedades ópticas do marcador **(a)** 2 horas e **(b)** 12 meses após a deflagração do cartucho.....78
Figura 36. Coleta do GSR marcado utilizando a lanterna UV e *swab* embebido em EDTA 2% (figura à esquerda) e a fotoluminescência do marcador no *swab* (figura à direita).....79
Figura 37. ESI(-)-FT-ICR MS de GSR detectado nas regiões do **(a)** alvo, **(b)** mão do atirador e **(c)** arma de fogo após disparo com cartucho contendo 50 mg do marcador.....80
Figura 38. Comparação da série isotopóloga do **(a)** íon $[Eu(EDTA) - 4H]^-$ de m/z 441 e dos átomos **(b)** Ba, **(c)** Pb, **(d)** Eu e **(e)** Sb.....81
Figura 39. ESI(-)-FT ICR MS de GSRs coletados da mão direita dos atiradores após disparos com cartuchos marcados com **(a)** 2, **(b)** 5, e **(c)** 50 mg de $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$.....82
Figura 40. Esquema do protocolo 423 (OEDC, 2011) com dose de partida de 50 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal.....93
Figura 41. Esquema cronológico dos procedimentos executados em cada dose.....94
Figura 42. Fluxograma das etapas do teste de toxicidade e a determinação da DL_{50}.....96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomes, símbolos e propriedades dos lantanídeos - Adaptada.....30

Tabela 2. Fórmulas moleculares, valores de massa experimentais e teóricos, e erros de massa dos complexos de európio e de cálcio identificados por ESI(±)-FT-ICR MS.....62

Tabela 3. Evolução do peso corporal dos animais tratados com as doses de 50 $mg.kg^{-1}$, 300 $mg.kg^{-1}$ e 2000 $mg.kg^{-1}$. Valores representados por média ± erro padrão da média.....97

Tabela 4. Resultados da determinação da Toxicidade Aguda do composto fotoluminescente.....98

Tabela 5. Resultados das análises bioquímicas após 14 dias da dose aguda do complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$. Valores representados por média ± erro padrão da média.....99

Tabela 6. Valores de DL_{50} oral para camundongos.....100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF - Armas de Fogo

ANOVA - *Analysis of Variance* (Análise de Variância)

API - *Atmospheric Pressure Ionization* (Ionização a Pressão Atmosférica)

ALT - Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Aminotransferase

CBC - Companhia Brasileira de Cartuchos

CID - *Collision-Induced Dissociation* (Dissociação Induzida por Colisão)

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CRM - *Charged Residue Model* (Modelo de Carga Residual)

DHPP - Divisão de Homicídios e Proteção à Pessoa

DL_{50} - Dose Letal Média

DMCL - Dispositivos Moleculares Conversores de Luz

DTA - *Differential Thermal Analysis* (Análise Térmica Diferencial)

EDTA - *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)

EDX - *Energy Dispersive X-ray* (Detector de Energia Dispersiva de Raio-X)

ENASP - Estratégia Nacional de Justiça e Segurança Pública

ESI - *Eletrospray Ionization* (Ionização por *Electrospray*)

ESI-FT-ICR MS - *Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas com Ionização por *Eletrospray* e Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier)

FA - Fosfatase Alcalina

FT-ICR - *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (*Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier)

FTIR - *Fourier Transform Infrared* (Infravermelho com Transformada de Fourier)

GEAC - Gerência de Estatística e Análise Criminal

GGT - Gamaglutamil transferase

GHS - *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos)

GSR - *GunShot Residues* (Resíduos de Disparo de Arma de Fogo)

H_2PDA - ácido 2,6-piridinodicarboxílico

IARC - *International Agency for Research on Câncer*

ICP OES - *Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy* (Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado)

ICR - *Ion Cyclotron Resonance (*Ressonância Ciclotrônica de Íons)

IEM - *Ion Evaporation Model* (Modelo de Evaporação do Íon)

Ln - Lantanídeo

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

LnOFs - *Lanthanide-Organic Frameworks*

MS - *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)

MS/MS - Espectrometria de Massa em *Tandem*

NaTFA - *Sodium Trifluoroacetate* (trifluoroacetato de sódio)

NH_4OH - Hidróxido de Amônio

NIOSH - *National Institute for Occupational Safety and Heath*

NMK - *n*-metil-2-aza-cicloheptanona

OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

PCES - Polícia Civil do Estado do Espírito Santo

pH - Potencial Hidrogeniônico

PIC - Ácido Pícrico

pKa - Constante de Acidez

RF - Radiofrequência

S&W - *Smith & Wesson*

SESP - Secretaria de Estado da Segurança Pública e Defesa Social do Estado do Espírito Santo

SPL - *Special*

SRM - *Selected Reaction Monitoring* (Monitoramento de Reação Selecionada)

TCLM - Transferência de Carga do Ligante para o Metal

TGA - *Thermogravimetric Analysis* (Análise Termogravimétrica)

TNT - Tecido Não Tecido

UV - UltraVioleta

Z_{ef} - Carga Nuclear Efetiva

LISTA DE SÍMBOLOS

η - Eficiência Quântica

S_0 - Estado Fundamental Singleto

S_1 - Estado Singleto Excitado

ʎ - Lambda

m - Massa

Ω_λ - Parâmetros de Intensidades Fenomenológicos

% - Porcentagem

wt % - Porcentagem em Massa

m/z - Razão Massa/Carga

T_1 - Tripleto

τ - Tempo de Vida

V - Volume

RESUMO

Um complexo de alta fotoluminescência é proposto como marcador óptico para a identificação de resíduos de tiro (GSR). O marcador é o complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$, de fórmula molecular $Eu(C_6H_2N_3O_7)_3.(C_7H_{13}NO)_3$, que apresenta o íon Eu^{3+} e os ligantes ácido pícrico (PIC) e *n*-metil-ε-caprolactama (NMK). Foi realizada a caracterização quimicamente através de espectroscopia de emissão, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), termogravimetria e análise térmica diferencial (TG/DTA), e espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* e ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (ESI-FT-ICR MS), e, em seguida, foram adicionadas diferentes massas do complexo a munições convencionais (de 2 a 50 mg por cartucho). Após os tiros, o GSR marcado foi visualmente e quimicamente detectado por irradiação UV (λ = 395 nm) e ESI-FT-ICR MS, respectivamente. Os resultados mostraram uma fotoluminescência eficiente e duradoura, sendo facilmente visível sobre a superfície do alvo, no ambiente, no cartucho deflagrado, na arma de fogo, e sobre as mãos e braços do atirador quando utilizada massa a partir de 25 mg do marcador em cartuchos .38 e 50 mg em cartuchos .40. Sua toxicidade aguda também foi avaliada empregando-se o Protocolo 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) e apresentou DL_{50} de 1000 $mg.kg^{-1}$, sendo classificado como de categoria 4 na escala do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), considerado, portanto, de média toxicidade. O composto mostrou ser menos tóxico do que os componentes inorgânicos de munições convencionais (em especial o Pb), justificando o seu emprego como marcador de GSR.

Palavras-chave: Complexos de európio. Fotoluminescência. Marcador óptico. GSR. Espectrometria de massa. Toxicidade aguda.

ABSTRACT

A complex of high photoluminescence is proposed as optical marker for the gunshot residues (GSR) indentification. The marker is the complex $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$, of molecular formula $Eu(C_6H_2N_3O_7)_3.(C_7H_{13}NO)_3$, which has the Eu^{3+} ion and the ligands picric acid (PIC) and *n*-methyl caprolactam (NMK). It was performed to chemical characterization by emission spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric and differential thermal analysis (TG/DTA), and electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (ESI-FT-ICR MS), and, then, were added to conventional munitions different masses of complex (from 2 to 50 mg by cartridge). After the shots, the marked GSR was visually and chemically detected by UV irradiation (λ = 395 nm) and ESI-FT-ICR MS, respectively. The results showed an efficient and lasting photoluminescence, being easily visible on the surface of the target, in the environment, in the cartridge triggered, on the firearm, and on the hands and arms of the shooter when used mass from 25 mg marker in .38 cartridges and 50 mg in .40 cartridges. Its acute toxicity was also evaluated using the Protocol 423 of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) and presented LD_{50} of 1000 $mg.kg^{-1}$, being classified as a category 4 on the scale of the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), therefore considered of medium toxicity. The compound was shown to be less toxic than the inorganic components of conventional ammunition (especially Pb), justifying its use as GSR marker.

Keywords: Europium complexes. Photoluminescence. Optical marker. GSR. Mass spectrometry. Acute toxicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL..... 19
1.1. Balística Forense..... 22
1.1.1. Armas de fogo e seus Cartuchos..... 23
1.1.2. Mecanismo de disparo e formação de resíduos de tiro..... 26
1.1.3. Análise de resíduos de tiro..... 26
1.1.4. Munições Ambientais ou *Clean Range*..... 28
1.2. Lantanídeos e suas aplicações..... 28
1.3. Espectrometria de Massas (MS)..... 36
1.3.1. Ionização por *Electrospray* (ESI)..... 37
1.3.2. Ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR-MS)..... 38
1.3.3. Espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS)..... 42
2. OBJETIVOS..... 43
2.1. Objetivo Geral..... 43
2.2. Objetivos Específicos..... 43
3. CAPÍTULO 1: Síntese e caracterização química dos complexos $[Eu(PIC)_3.xH_2O]$ e $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$..... 45
3.1. INTRODUÇÃO..... 45
3.1.1 Ácido Pícrico..... 45
3.1.2. Lactamas..... 46
3.2. OBJETIVOS..... 47
3.2.1. Geral..... 47
3.2.2. Específicos..... 47
3.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... 48
3.3.1. Materiais e Reagentes..... 48
3.3.2. Complexos de európio..... 48
3.3.3. Síntese de complexos de európio..... 48
3.3.4. Caracterização..... 50
3.3.4.1. Espectro de Emissão..... 50
3.3.4.2. FTIR..... 51
3.3.4.3. TGA / DTA..... 51

3.3.4.4. ESI(±)-FT-ICR MS..... 51
3.3.4.5. ESI (±) FT-ICR MS/MS..... 52
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 53
3.4.1. Espectro de Emissão..... 53
3.4.2. FTIR..... 56
3.4.3. TGA / DTA..... 57
3.4.4. ESI(±)-FT-ICR MS..... 60
3.4.5. ESI (±) FT-ICR MS/MS…….. 63
3.4.6. Determinação da fórmula estrutural do complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$.... 64
3.5. CONCLUSÃO..... 66
4. CAPÍTULO 2: Detecção visual e química do marcador no GSR..... 67
4.1. INTRODUÇÃO..... 67
4.2. OBJETIVOS..... 68
4.2.1. Geral..... 68
4.2.2. Específicos..... 68
4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... 69
4.3.1. Materiais e Reagentes..... 69
4.3.2. Preparo das munições convencionais marcadas..... 69
4.3.3. Realização dos disparos..... 69
4.3.4. Análise visual de GSR..... 70
4.3.5. Coleta e preparo das amostras..... 70
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 72
4.4.1. Análise visual de GSR..... 72
4.4.2. ESI(+)-FT-ICR MS..... 79
4.5. CONCLUSÃO..... 83
5. CAPÍTULO 3: Avaliação da toxicidade aguda do marcador fotoluminescente..... 84
5.1. INTRODUÇÃO..... 84
5.1.1. Teste de Toxicidade Aguda (Protocolo 423 – OECD, 2011)..... 85
5.1.2. Ensaios bioquímicos de marcadores de função hepática e renal..... 85
5.1.3. Toxicidade dos metais: Pb, Ba e Sb..... 88
5.2. OBJETIVOS..... 91
5.2.1. Geral..... 91

5.2.2. Específicos..... 91
5.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... 92
5.3.1. Materiais e Reagentes..... 92
5.3.2. Animais experimentais..... 92
5.3.3. Protocolo experimental..... 92
5.3.4. Análises bioquímicas..... 95
5.3.5. Análise estatística..... 95
5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 96
5.5. CONCLUSÃO..... 101
6. CONCLUSÃO GERAL..... 102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 104

1. INTRODUÇÃO GERAL

A realidade do crime de homicídio no contexto mundial mostra que as armas de fogo (AF) são os principais instrumentos utilizados para sua execução. No Brasil observou-se um aumento significativo desta realidade entre os anos de 1992 e 2010, quando inicialmente a taxa girava em torno de 70% e chegou a representar quase a totalidade das mortes causadas por AF (94,6%), **Figura 1** [1]**.**

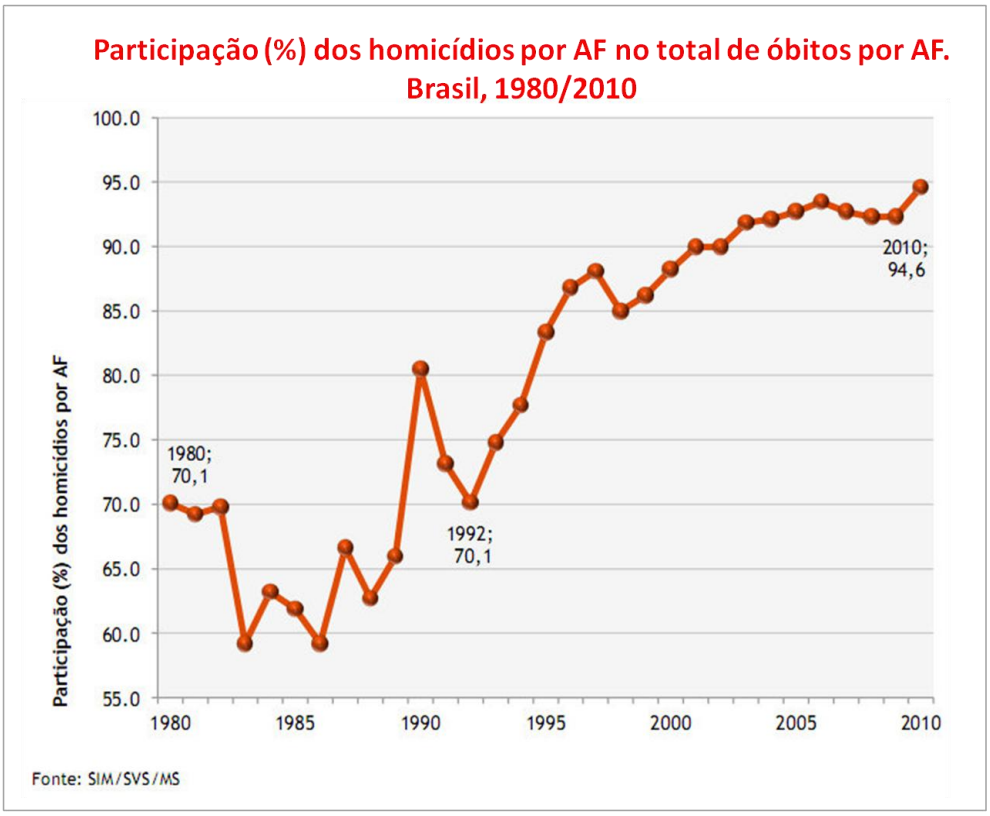
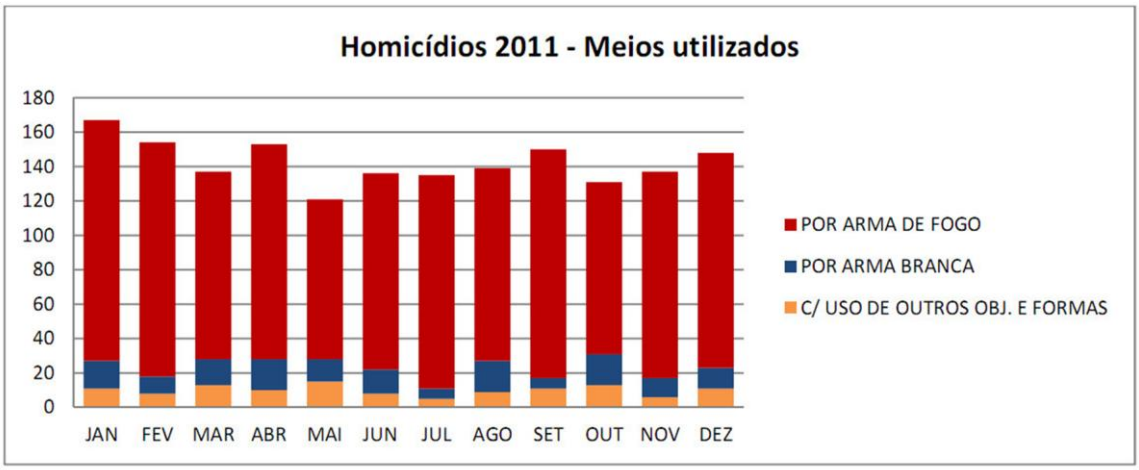


Figura 1. Evolução (%) dos homicídios por AF no Brasil (1980 – 2010) - Adaptada [1].

O Estado do Espírito Santo vem contribuindo para o agravamento desse cenário, ocupando em 2010 a segunda posição nas estatísticas de taxa de óbito por AF [1] e em 2012 a segunda posição no *ranking* de homicídio juvenil (jovens de 15 a 29 anos de idade), setor da sociedade mais afetado pela mortalidade por AF [2].

Na **Figura 2,** cedida pela GEAC/SESP, apresenta-se a distribuição do número de homicídios no Espírito Santo em função dos meios utilizados. Novamente, as armas de fogo se mostraram presentes em mais de 80% dos casos de homicídio ocorridos no período de janeiro de 2011 a novembro de 2012 (informação pessoal)*.



Fonte: Dados primários: software E-COPs (CIODES/SESP). Dados Consolidados : GEAC/SESP.

Figura 2. Número de homicídios no Espírito Santo de acordo com os meios utilizados (Jan. – Dez. 2011 / Jan. – Nov. 2012) - Adaptada*.

Nos municípios da Grande Vitória a estatística foi ainda maior, atingindo valores próximos a 90 % nos anos de 2011, 2012, 2013 e no primeiro semestre de 2014, conforme dados cedidos pela DHPP/PCES e apresentados na **Figura 3** (informação pessoal)**.

_____

* Gerência de Estatística e Análise Criminal da Secretaria de Estado da Segurança Pública e Defesa Social do Estado do Espírito Santo (GEAC/SESP). **Pesquisa de homicídios por meios utilizados 2011-2012**. Mensagem recebida por calinead@hotmail.com em 23 nov. 2012.

** Divisão de Homicídios e Proteção à Pessoa da Polícia Civil do Espírito Santo (DHPP/PCES). **Dados de Armas de Fogo 2011 – 2014.** Mensagem recebida por caline.destefani@pc.es.gov.br em 18 jul. de 2014.

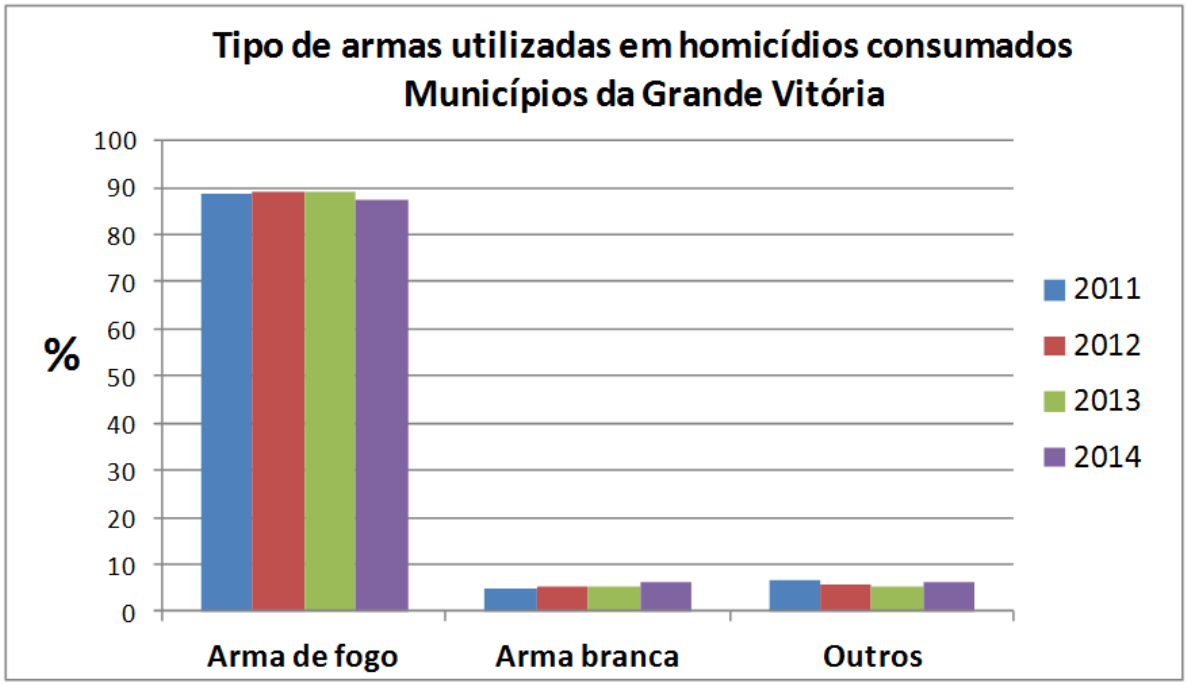


Figura 3. Proporção (%) de homicídios consumados nos municípios da Grande Vitória de acordo com o tipo de arma utilizada nos anos de 2011, 2012 e 2013 e no primeiro semestre de 2014. Dados cedidos pela DHPP/PCES - Adaptada**.

Os principais fatores apontados para explicar os altos níveis de mortalidade por armas de fogo são sua elevada disponibilidade e as facilidades existentes para sua aquisição, aliadas à decisão de utilizar AF para resolver qualquer tipo de conflito interpessoal, na maior parte dos casos banais e circunstanciais. Outro fator de grande relevância são os elevados níveis de impunidade vigentes no país, que atuam como estímulo para a resolução de conflitos pela via violenta, diante da escassa probabilidade de punição [1]**.**

Em 2012 foi lançado pela Estratégia Nacional de Justiça e Segurança Pública (ENASP) o *Relatório Meta 2: A Impunidade como Alvo*, que mostra um diagnóstico da investigação de homicídios no Brasil. O estudo mostrou que o índice de elucidação desse tipo de crime é baixíssimo no país. Do levantamento realizado em todos os Estados e Distrito Federal, que chegou ao total de 134.944 inquéritos classificados nos parâmetros da Meta 2, ou seja, instaurados até 31 de dezembro de 2007 e que ainda não estavam finalizados, a maior concentração ocorreu na Região

Sudeste, com 76.780 inquéritos, ou 56,9% do total. Na outra ponta, a Região Norte apresentou um estoque inicial de 5.400 inquéritos, ou 4% do total [3].

Esses dados mostram a grande necessidade de ações para o combate e a elucidação dos crimes de homicídio. Dessa forma, a Balística Forense assume um papel de grande relevância social, atuando como instrumento legal para a elucidação da dinâmica e da autoria de crimes que envolvam o uso de armas de fogo [4].

1.1. Balística Forense

A Balística Forense conceitua-se como um ramo da Criminalística que estuda as armas de fogo, sua munição e os efeitos dos tiros por elas produzidos, sempre que tiverem relacionadas direta ou indiretamente com infrações penais, visando esclarecer e provar de maneira técnica a sua ocorrência [5].

Ao se estudar um projétil disparado por uma arma de fogo, divide-se o seu movimento em três partes distintas, que constituem as divisões da Balística Forense: balística interna, balística externa e balística dos efeitos. Na balística interna ou balística interior, estuda-se o que ocorre desde o momento do disparo até o instante em que o projétil abandona a arma. É a parte da balística relativa à estrutura, aos mecanismos, ao funcionamento das armas de fogo e à técnica do tiro, bem como os efeitos de detonação da espoleta e deflagração da pólvora dos cartuchos. Dentro da balística externa ou balística exterior é estudada a trajetória do projétil, desde sua saída pela boca do cano da arma até a sua parada final, analisando as condições do movimento, velocidade inicial do projetil, sua forma, massa e superfície, a resistência do ar, a ação da gravidade e os seus movimentos intrínsecos. Por fim, a balística dos efeitos, balística terminal ou balística do ferimento estuda o movimento do projétil desde o primeiro impacto até a dissipação total de sua energia cinética, ou seja, até o seu repouso final [5]. Entre as três áreas definidas, serão abordadas neste projeto a balística interna e a balística de efeitos, uma vez que serão avaliados os resíduos gerados por disparos de arma de fogo e sua dispersão no ambiente, a fim de se determinar a autoria de um tiro.

1.1.1. Armas de fogo e seus Cartuchos

As armas de fogo constituem um dos principais objetos de estudo dentro da Balística Forense e são conceituadas como artefatos de dimensões e formas diversas utilizadas para arremessar projetis através da força expansiva dos gases resultantes da combustão da pólvora. São consideradas máquinas térmicas, obedecendo aos princípios da termoquímica e da termodinâmica [4].

Uma arma de fogo tem como elementos essenciais o aparelho arremessador ou a arma propriamente dita, a carga de projeção (pólvora), e o projétil, sendo que os dois últimos integram, geralmente, o cartucho (**Figura 4**). O cartucho é definido como a unidade de munição das armas de fogo de retrocarga, sendo constituído genericamente pelo estojo, espoleta contendo a mistura iniciadora, pólvora ou carga de projeção, e projetil [5,6].

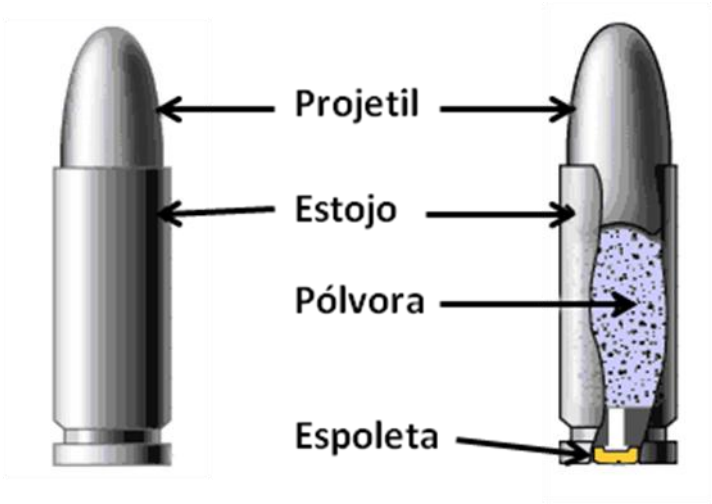


Figura 4. Esquema de um cartucho de arma de fogo e seus elementos essenciais - Adaptada [5].

O estojo constitui o componente externo e inerte do cartucho, possibilitando que todos os componentes necessários ao disparo fiquem unidos em uma peça e contribuindo para a sua padronização como unidade de munição. Sua forma e dimensão determinam as da câmara da arma em que for utilizada, e consequentemente o calibre da mesma. A maioria dos estojos são constituídos de latão 70:30 (70% de cobre e 30% de zinco), dada a facilidade de ser trabalhado, ou seja, pelas características de se expandir, não permitir o escape de gases pelas paredes da câmara e de recuperar em parte a forma original após cessar a pressão,

facilitando a extração e permitindo a recarga de munição. Há também estojos confeccionados em cobre e em alumínio [5].

A espoleta é um pequeno recipiente metálico, em forma de cápsula, que contém a mistura iniciadora (carga de inflamação) e encontra-se montada no alojamento localizado no centro do culote do estojo. Sua função é iniciar a queima da pólvora contida no estojo e, assim, gerar a expulsão do projétil através do cano da arma [4,5].

A composição da mistura iniciadora utilizada na munição varia com o fabricante. A mistura iniciadora empregada pela Companhia Brasileira de Cartuchos (CBC) tem como principais componentes o estifinato de chumbo (composto explosivo), nitrato de bário (oxidante), trissulfeto de antimônio (combustível), tetrazeno (sensibilizante) e alumínio atomizado (gera maior vivacidade à chama) [5,6].

Os produtos resultantes da queima da mistura iniciadora são basicamente os óxidos de carbono, água e óxidos metálicos, tais como óxido de chumbo, de bário e de antimônio. Dessa forma, os elementos chumbo (Pb), bário (Ba), e antimônio (Sb), estão presentes nos resíduos produzidos por disparo de armas de fogo (*GunShot Residues* - GSR) e configuram como os principais marcadores químicos de GSR [7]. Eventualmente poderão ser encontrados óxidos de outros metais, quando a mistura iniciadora apresentar composição diferente da atualmente utilizada na espoleta dos cartuchos da marca CBC [5].

A pólvora ou carga de projeção é um combustível sólido e granular, que se inflama com grande rapidez ($\cong$ 400 m s^{-1}), produzindo grande volume de gases e elevando a temperatura. Ela tem como função expelir o projétil através da pressão gerada pelos gases no interior do cartucho. Sua deflagração não necessita de oxigênio do exterior, pois seus próprios componentes possuem o oxigênio necessário [5].

Basicamente, existem dois tipos de pólvora: **i)** a pólvora preta, com fumaça, e **ii)** a pólvora química, sem fumaça.

No primeiro caso, a pólvora é classificada como mais antiga e é raramente utilizada nos dias atuais. Ela é composta de $\cong$ 75% de salitre (sais de nitrato de sódio ou nitrato de potássio), 13% de carvão vegetal e 12% de enxofre. O salitre atua como comburente, fornecendo o oxigênio, já o carvão e o enxofre atuam como combustíveis [5]. Durante sua queima é produzida grande quantidade de gases, como

o nitrogênio e dióxido de carbono, e de resíduos sólidos e fumaça, conforme **Equação 1** [4].

$$S_{(s)} + 3\ C_{(s)} + 2\ KNO_{3(s)} \rightarrow 3\ CO_{2(g)} + N_{2(g)} + K_2S_{(s)} \qquad \textbf{Eq. 1}\ [4]$$

A pólvora química ou pólvora sem fumaça surgiu como um substituto moderno da pólvora negra, pois produz pouca fumaça e menos resíduos, proporcionando maior pressão em pequenas quantidades. Ela apresenta alguns aditivos com funções específicas que contribuem diretamente para a vida útil da munição, sendo eles: nitrocelulose (oxidante); nitroglicerina, ftalato de dimetila ou butila, glicerina (plastificante); difenilamina, 2- ou 4-nitrofenilamina, *n*-nitrosodifenilamina, dinitrotolueno, *n*-metil-*p*-nitroanilina, metil ou etil centralina, resorcinol (estabilizantes); sulfato de potássio, nitrato de potássio e grafite (aditivos orgânicos) [4-6].

Existem dois tipos de pólvora química:

- Pólvora de base simples: possui ingrediente ativo à base de nitrocelulose, que produz menos calor na queima, favorecendo para a durabilidade da arma (**Figura 5a**) [4,5].
- Pólvora de base dupla: possui dois ingredientes ativos, a nitrocelulose e a nitroglicerina, apresentando maior conteúdo energético e maior resistência á umidade (**Figura 5a-b**) [4,5].

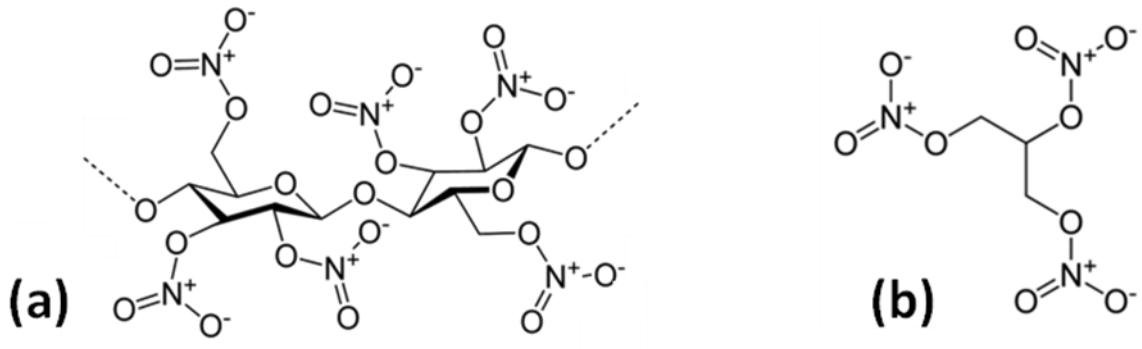


Figura 5. Estrutura química da: **(a)** nitrocelulose e **(b)** nitroglicerina [4].

Por último, o projetil é a parte do cartucho que será expelida através do cano, sob a ação dos gases resultantes da queima da pólvora. Além das pressões

elevadas, a temperatura interna do cano da arma pode atingir valores em torno de 2500°C, contribuindo para o lançamento do projetil [4]. Podem ser divididos em três grupos: projetis de liga de chumbo, projetis encamisados e projetis de cobre (99,95% de Cu) [5].

1.1.2. Mecanismo de disparo e formação de resíduos de tiro

Para que um disparo de arma de fogo ocorra, é necessário o acionamento do mecanismo de disparo, geralmente através da força mecânica pelo pressionamento do gatilho, fazendo com que a ponta do percutor deforme a espoleta. O choque mecânico detona a mistura iniciadora, produzindo chamas de alto poder calorífico que passam por orifícios existentes no fundo do alojamento da espoleta e dão início à combustão dos grãos de pólvora. A combustão da pólvora gera, em frações de segundo, um grande volume de gases, cuja pressão impele o projétil através do cano da arma, que é a única saída possível. No momento da detonação, em meio à condições especificas de alta temperatura e pressão, os componentes metálicos são volatilizados e rapidamente condensados em seguida, dando origem a partículas esféricas e esferóides muito pequenas (0,1μm a 5μm), formando o GSR. Portanto, no momento do tiro são expelidos da arma, além do projétil, diversos resíduos sólidos e produtos gasosos oriundos da combustão da pólvora e da detonação da mistura iniciadora contida na espoleta, que podem atingir as mãos, os braços e roupas do atirador ficando ali aderidos, além de se espalharem no local do disparo [4-6].

1.1.3. Análise de resíduos de tiro

A identificação de resíduos inorgânicos do tiro, principalmente Pb, Ba e Sb, extraídos das mãos de supostos atiradores tem sido a forma mais empregada dentro da Balística Forense para determinar se uma pessoa produziu um tiro, manuseou uma arma de fogo ou esteve próxima de quem produziu o disparo [6,8].

Esses resíduos podem ser detectados através do exame químico por via úmida utilizando o reagente rodizonato de sódio (reação de *Feigl-Suter*) ou por técnicas instrumentais, onde a única técnica padronizada até o momento é a

MEV/EDX (Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio-X) [4-10].

O exame químico por via úmida utilizando o rodizonato de sódio é empregado para constatar a presença de Pb e Ba provenientes de disparo de arma de fogo. Na presença de íons Pb^{2+} observa-se o aparecimento de manchas de cor rosa (**Figura 6**) e na presença de íons Ba^{2+} ocorre o desenvolvimento de manchas de cor laranja (**Figura 7**). Este teste é considerado rápido e de baixo custo, porém apresenta baixa sensibilidade. Dessa forma, um resultado negativo não significa que não há GSR. Além disso, um resultado positivo pode não ser oriundo de um disparo de arma de fogo, haja vista a grande utilização de Pb e Ba em outras atividades [4,5,7,11].

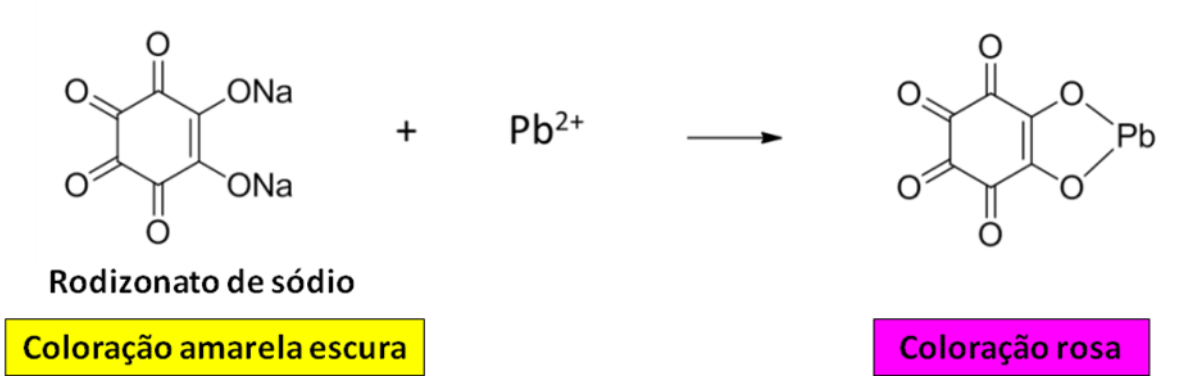


Figura 6. Reação química para identificação dos íons Pb^{2+} - Adaptada [4].

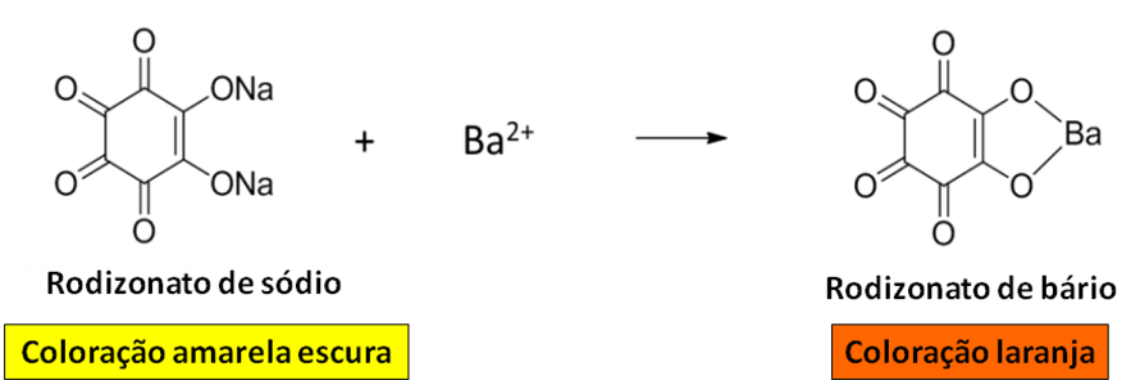


Figura 7. Reação química para identificação dos íons Ba^{2+} - Adaptada [4].

A identificação segura e inequívoca de uma partícula de GSR é dependente de suas características morfológicas e químicas. Conforme já mencionado, nas condições extremas de pressão e temperatura durante um disparo são formadas

partículas esféricas e esferóides, cuja composição se dá pela combinação dos três elementos químicos Pb/Ba/Sb, presentes na mistura iniciadora da maioria das munições. Esse fenômeno é apenas constatado de maneira inequívoca quando o MEV/EDX é empregado como método analítico, o que é fundamental na distinção entre resíduos de tiro e resíduos de origem ocupacional ou ambiental [4,5,12,13].

1.1.4. Munições Ambientais ou *Clean Range*

Investigações com instrutores de tiro revelaram um alto nível de Pb encontrado no sangue, 60 μg/100 g de sangue, limite máximo permitido pela NIOSH (*National Institute for Occupational Safety and Heath*) [14]. Em função da crescente preocupação com a saúde de policiais e atiradores, constantemente expostos a uma atmosfera rica em metais tóxicos (principalmente Pb), foram desenvolvidas munições isentas de metais pesados, denominadas de *clean range ammunition* ou munições ambientais. Em julho de 1998, a Companhia Brasileira de Cartuchos (CBC) lançou essas munições no mercado internacional, que passaram a apresentar como mistura iniciadora: diazol, nitrato de estrôncio, pólvora, e tetrazeno; e tendo como produtos de reação o monóxido de carbono, o dióxido de carbono, o vapor d'água, o nitrogênio e o óxido de estrôncio. Em meados de 2002, a mistura iniciadora destas munições passou a ser composta por diazol, tetrazeno, nitrocelulose, nitrato de potássio e alumínio [4-6]. Além desses cartuchos não apresentarem metais pesados na composição da espoleta, os projetis são totalmente encamisados para evitar a evaporação de Pb oriundo de seu núcleo. Dessa forma, os elementos Pb, Ba e Sb não estão presentes nos resíduos de tiro, o que impossibilita a caracterização dos GSR inorgânicos através de métodos por via úmida ou técnicas modernas como MEV/EDX [15], e faz necessário o desenvolvimento de novos marcadores químicos.

1.2. Lantanídeos e suas aplicações

Os elementos do bloco *f* (do lantânio ao lutécio) são conhecidos como lantanídeos ou lantanóides (Ln) e se caracterizam pelo preenchimento gradativo do antepenúltimo nível energético, 4*f* [16]. O escândio (Sc) e o ítrio (Y) também são bastante semelhantes quimicamente aos Ln, e por isso sua química é

frequentemente tratada junto com a série dos lantanídeos [17]. Segundo recomendações da IUPAC, usa-se o termo “lantanídeos” para designar os elementos do La ao Lu e “terras raras” quando aos lantanídeos são incluídos o Sc e o Y [18]. Porém, a expressão “terras raras” não é adequada para designar estes elementos. Eles receberam o termo “terras” porque foram inicialmente conhecidos em forma de óxidos. Além disso, a expressão “raras” não está de acordo pois muitos dos lantanídeos não são particularmente raros na natureza [18].

A principal fonte mineral para os primeiros lantanóides é a monazite, $(Ln,Th,)PO_4$, que contém uma mistura de lantanóides e tório. Outro mineral fosfato, o xenotímio (de composição similar), é a principal fonte dos lantanóides mais pesados. Em geral, a separação dos íons Ln^{3+} é feita em larga escala por extração líquido-líquido em múltiplas etapas, na qual os íons distribuem-se entre fase aquosa e uma fase orgânica contendo agentes complexantes. Utiliza-se a cromatografia de troca iônica para separar os íons lantanóides quando se deseja uma pureza elevada [19].

Todos os lantanóides são metais eletropositivos com uma notável uniformidade nas propriedades químicas em virtude de suas configurações eletrônicas. A diferença significativa entre esses metais se dá frequentemente em seus tamanhos [19]. Ao longo da série é observado um decréscimo do raio atômico à medida que elétrons são adicionados à subcamada 4*f*. Esse efeito é chamado de “contração dos lantanídeos”, cujo aumento da carga nuclear efetiva (Z_{ef}) é acompanhado do aumento do número atômico devido à blindagem fraca de cada um do elétrons *f* sobre os demais elétrons desta subcamada [17].

A soma das três primeiras energias de ionização dos lantanídeos são em geral valores baixos, e por isso os elementos no estado de oxidação (+III) têm caráter iônico e o íon predominante é o Ln^{3+} [17]. Os íons Ln^{2+} e Ln^{4+}, que também ocorrem, são sempre menos estáveis que o Ln^{3+}.

Os compostos de lantanídeos possuem uma grande variedade de aplicações, muitas delas dependentes das propriedades ópticas associadas às suas transições eletrônicas *f-f*. Quando excitados eletronicamente pela absorção de radiação, retornam rapidamente ao estado fundamental e emitem radiação eletromagnética, na região do ultravioleta, visível ou do infravermelho, através do processo conhecido como luminescência. No caso dos lantanídeos, a excitação ocorre pela absorção de luz (fóton) e, portanto, sua emissão é denominada fotoluminescência. Por exemplo, os óxidos de európio e ortovanadato de európio são usados para dar a cor vermelha

às telas de tubos de raios catódicos; já o Neodímio (Nd^{3+}), o Samário (Sm^{3+}) e o Hólmio (Ho^{3+}) são usados nos *lasers* de estado sólido [19]. Dentre os íons lantanídeos que apresentam forte luminescência, um dos mais estudados é o Európio (Eu^{3+}), que emite na região do visível (coloração vermelha) e cujos isótopos estáveis são o ^{151}Eu (47,82%) e ^{153}Eu (52,18%).

Na **Tabela 1** estão apresentados os nomes, símbolos e algumas propriedades dos lantanóides, como configuração eletrônica dos elementos e os íons lantanídicos trivalentes [19].

Tabela 1. Nomes, símbolos e propriedades dos lantanídeos - Adaptada [16,19].

Nome	Ln	Ln^0 (estado fundamental)	Ln^{3+} (íon tripositivo)
Lantânio	La	$[Xe]5d^1\ 6s^2$	$4f^0$
Cério	Ce	$[Xe]4f^1\ 5d^1\ 6s^2$	$4f^1$
Praseodímio	Pr	$[Xe]4f^3\ 6s^2$	$4f^2$
Neodímio	Nd	$[Xe]4f^4\ 6s^2$	$4f^3$
Promécio	Pm	$[Xe]4f^5\ 6s^2$	$4f^4$
Samário	Sm	$[Xe]4f^6\ 6s^2$	$4f^5$
Európio	Eu	$[Xe]4f^7\ 6s^2$	$4f^6$
Gadolínio	Gd	$[Xe]4f^7\ 5d^1\ 6s^2$	$4f^7$
Térbio	Tb	$[Xe]4f^9\ 6s^2$	$4f^8$
Disprósio	Dy	$[Xe]4f^{10}\ 6s^2$	$4f^9$
Hólmio	Ho	$[Xe]4f^{11}\ 6s^2$	$4f^{10}$
Érbio	Er	$[Xe]4f^{12}\ 6s^2$	$4f^{11}$
Túlio	Tm	$[Xe]4f^{13}\ 6s^2$	$4f^{12}$
Itérbio	Yb	$[Xe]4f^{14}\ 6s^2$	$4f^{13}$
Lutécio	Lu	$[Xe]4f^{14}\ 5d^1\ 6s^2$	$4f^{14}$

Os lantanídeos são classificados de acordo com os conceitos de Pearson como ácidos duros e, por isso, coordenam-se preferencialmente com bases duras, especialmente àquelas contendo oxigênio e nitrogênio como átomos doadores [18].

Complexos com número de coordenação inferior a seis são raros, sendo os mais comuns com número de coordenação 7, 8 e 9, resultando numa grande variedade estereoquímica [16]. Quando esses complexos apresentam elevado rendimento quântico são considerados promissores Dispositivos Moleculares Conversores de Luz (DMCL) [20, 21].

A excitação direta do íon lantanídeo é pouco eficiente na geração de luminescência, já que não possui absortividade molar alta devido à blindagem dos orbitais 4*f* pelos orbitais mais externos $6s^2 5p^6$. Porém, quando se utiliza um ligante que absorve luz ultravioleta e transfere a energia para o íon lantanídeo, ocorre um aumento de sua eficiência de excitação, oriunda de transições intraconfiguracionais da camada *4f*, que resulta em emissão observada geralmente na região do visível, e característica do íon metálico [22]. Portanto, ocorre uma transferência de energia intramolecular do ligante ao íon metálico central, fenômeno conhecido como "efeito antena" [20]. Diz-se que esta absorção é uma banda de transferência de carga do ligante para o metal (TCLM), já que a absorção de luz leva à excitação de um elétron de um orbital localizado essencialmente sobre o ligante para um orbital localizado essencialmente sobre o metal [17].

A excitação indireta de um íon lantanídeo envolve, inicialmente, a excitação de um elétron do ligante para um dos níveis vibracionais de um estado eletrônico excitado, para formar um estado excitado singleto localizado no ligante, como mostrado na **Figura 8**, para um complexo de Eu^{3+}. Este estado singleto relaxa rapidamente para o nível vibracional de menor energia do estado excitado e pode sofrer cruzamento entre sistemas, para um estado tripleto de menor energia, do qual pode ocorrer transferência de energia para um dos orbitais localizados sobre o íon Ln^{3+}. Observa-se luminescência se a relaxação deste estado excitado para um estado de menor energia, ou para o estado fundamental, for acompanhada de emissão de radiação [17].

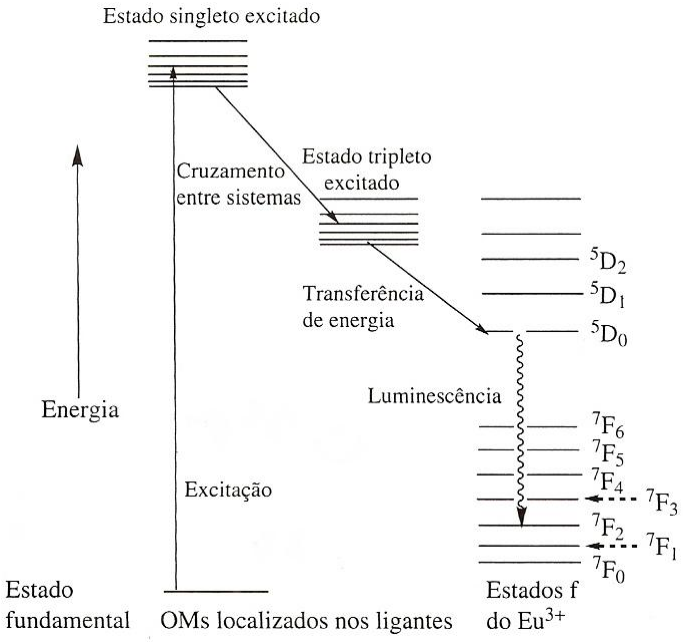


Figura 8. Diagrama de níveis de energia mostrando a origem da luminescência do íon Eu^{3+} através da excitação indireta - Adaptada [17].

Dessa forma, em função de suas características químicas e ópticas, complexos de lantanídeos estão sendo aplicados na área de Balística Forense. Em 2009 a professora WEBER e sua equipe [23] desenvolveram dois marcadores fotoluminescentes que permitiram a detecção visual do GSR quando eram adicionados a cartuchos em proporções superiores à 5 wt %. Em outras palavras, apenas 1 g do marcador era suficiente para marcar 100 cartuchos de calibre .38 ou 62 cartuchos de calibre .40. Foram estudados dois LnOFs, o *R-Marker* = [Eu(DPA)(HDPA)] e o *G-Marker* = [Tb(DPA)(HDPA)], onde H_2PDA corresponde ao ligante ácido 2,6-piridinodicarboxílico. As propriedades ópticas dos compostos foram avaliadas antes e após a realização de disparos com munições contendo os marcadores. Na **Figura 9a** é mostrada a forte emissão de *R- Marker* e *G-Marker* quando expostos à radiação UV, nas cores vermelho e verde, respectivamente. Suas propriedades ópticas permaneceram inalteradas após os tiros e o GSR marcado foi visualmente identificado nas armas de fogo utilizadas nos disparos (**Figuras 9b-c**), sobre a superfície do alvo (**Figura 9d**), na mão do atirador (**Figura 9e**) e nos resíduos sem chumbo contendo *R-* e *G-Markers* (**Figura 9f**) [23].

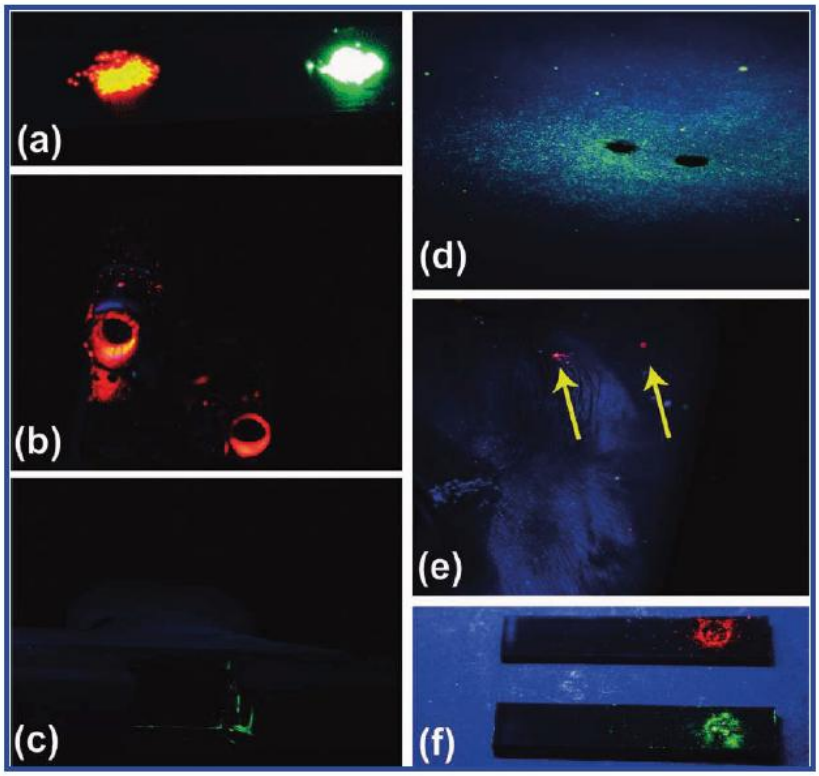


Figura 9. Imagens dos marcadores quando expostos à radiação UV: **(a)** *R-Marker* e *G-Marker* emitindo na região do vermelho e verde, respectivamente; **(b)** *R-Marker* em revólver de calibre .38 após disparo; **(c)** *G-Marker* em pistola de calibre .40 após disparo; **(d)** *G-Marker* sobre a superfície do alvo; **(e)** *R-Marker* na mão do atirador (resíduos de *R-Marker* são indicados pelas setas amarelas); **(f)** resíduos sem chumbo contendo *R-* e *G-Markers* [23].

Nas **Figuras 10a-b** são mostrados os espectros de emissão dos marcadores antes e após os disparos, originados a partir de um máximo de excitação entre 291 e 294 nm, onde são observadas as típicas emissões de cor vermelha e verde associadas às transições Eu^{3+} $^5D_0 \rightarrow {}^7F_j$ e Tb^{3+} $^5D_4 \rightarrow {}^7F_j$, respectivamente [23].

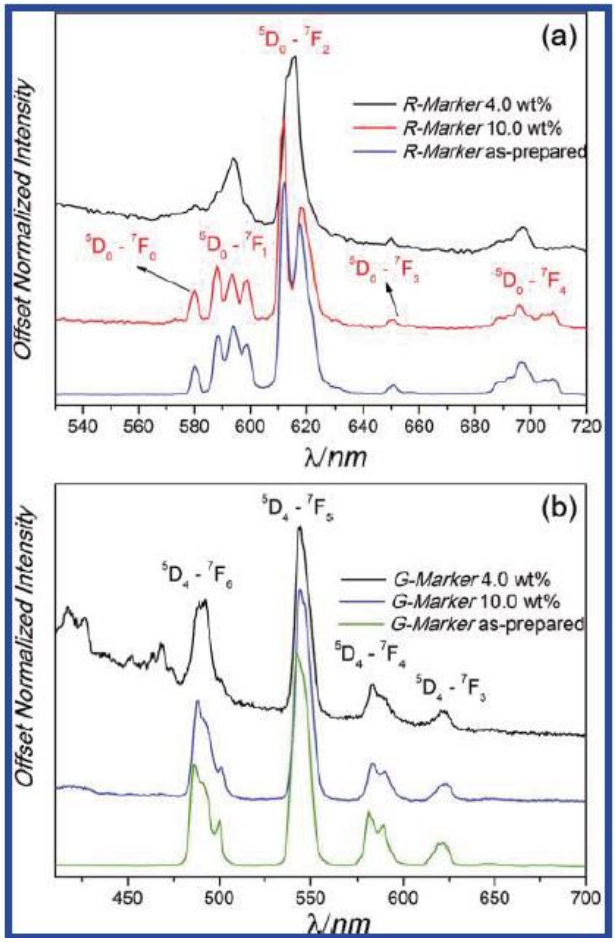


Figura 10. Espectros de emissão dos marcadores fotoluminescentes antes e após os disparos **(a)** *R-Marker* = [Eu(DPA)(HDPA)] e **(b)** *G-Marker* = [Tb(DPA)(HDPA)] [23].

Nessa mesma vertente, em 2012 WEBER *et al.* [24] estudou cinco LnOFs designados como *UC Marker-1* a *UC Marker-5*, que apresentavam simultaneamente Yb^{3+} e Tb^{3+} na sua estrutura, [$(Tb_{1-x}Yb_x)$(DPA)(HDPA)], sendo que *x* variava em uma proporção de 0,05 mol a 0,5 mol (**Figura 11a-e**). Os marcadores mostraram uma intensa emissão na cor verde associada à transição Tb^{3+} $^5D_4 \rightarrow {}^7F_j$ (**Figura 11a**) e, novamente, complexos a base de íons Tb^{3+} mostraram-se eficazes em aplicações na área de Balística Forense, como mostrado nas **Figuras 11c** e **11e** [24].

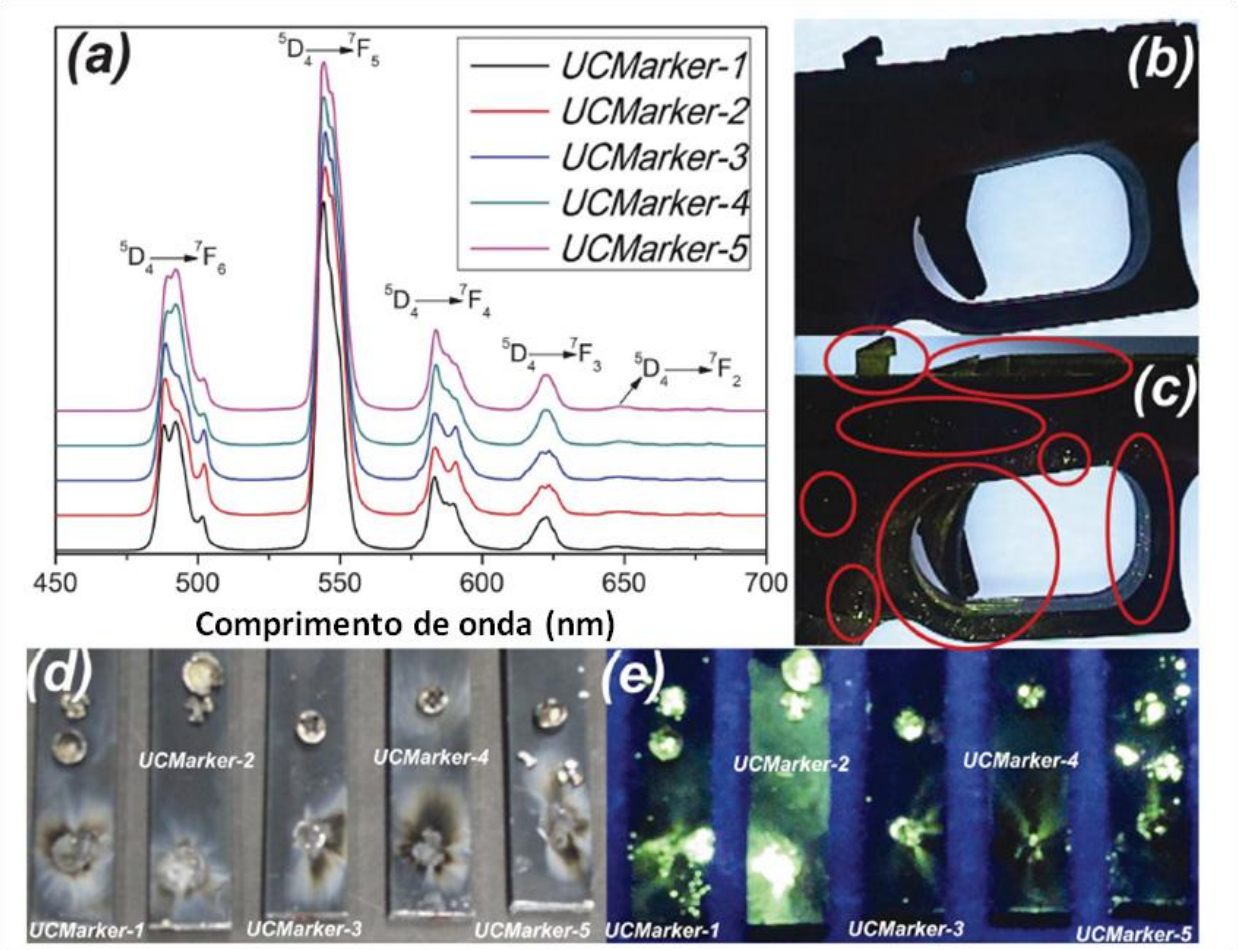


Figura 11. (a) Espectros de emissão dos *UC Markers*, originados a partir de um máximo de excitação em 325 nm; **(b)** GSR em pistola de calibre .40, após disparo com munição convencional não marcada (branco); **(c)** *UC Marker-1* em pistola de calibre .40 após disparo; **(d)** e **(e)** resíduos sem chumbo contendo *UC Markers*. **(d)**: não irradiados com luz UV e **(e)**: sob luz UV - Adaptada [24].

Portanto, as principais vantagens e inovações do uso de complexos de lantanídeos como marcadores luminescentes de munições na área de Balística Forense são: **i)** apresentam composição definida e atípica, diferentemente, dos compostos comumente encontrados no meio ambiente e em tarefas ocupacionais; **ii)** demonstram baixa toxicidade em comparação a metais pesados como o Pb; **iii)** podem ser detectados usando apenas uma lâmpada na região do ultravioleta; **iv)** configuram um método de baixo custo por análise; e **v)** na forma de complexos, apresentam estabilidade térmica e inércia química, contribuindo para uma luminescência eficiente e duradoura (permanecendo por meses) [23,24,25].

1.3. Espectrometria de Massas (MS)

A MS tornou-se uma técnica poderosa e multidisciplinar no campo analítico e bioanalítico. Seu sucesso é resultado, principalmente, de sua capacidade em detectar, contar e caracterizar átomos e moléculas dos mais variados tipos, composições e tamanhos [26]. Entre as suas vantagens se destacam a alta sensibilidade, seletividade e velocidade de análise. Recentemente, a MS também se tornou mais generalista a respeito dos tipos de moléculas e misturas que por ela podem ser analisadas, sendo capaz de discriminar não apenas moléculas relativamente pequenas, mas também todos os tipos de biomoléculas, sais orgânicos e inorgânicos, complexos organometálicos, entidades supramolecular e espécies biológicas como vírus e bactérias [27].

A MS é uma técnica que consiste na ionização das moléculas de interesse através de um sistema de ionização ou fonte de íons, e na posterior separação dos íons formados com base em suas diferentes razões massa/carga (*m/z*). O valor de *m/z* representa a unidade adimensional formada pela divisão da massa de um íon (em unidade de massa atômica unificada) pelo seu número de carga (independente do sinal) [28]. Tal relação é utilizada como base para se obter informações relativas a massa molar e características estruturais de uma amostra. Portanto, MS não analisa átomos neutros ou moléculas neutras e sim, espécies iônicas. A carga positiva ou negativa é necessária para que ocorra a interação do íon com campos magnéticos e elétricos utilizados pelos analisadores de massas. As diferentes magnitudes de resposta para os íons de diferentes massas constituem a base para a separação no analisador de massas. Além de discriminar íons, a MS é capaz de detalhar a quantidade de íons gerados em uma determinada relação *m/*z, determinar o perfil isotópico que é único para cada substância, inferir sobre a composição elementar de uma substância a partir da exatidão em massas, elucidar a estrutura molecular e quantificar [26]. Os diferentes tipos de fonte de ionização e analisadores de massas são o que determinam a aplicabilidade da MS [29].

Em geral a análise de um composto compreende cinco etapas: **i)** a introdução da amostra, **ii)** a ionização das moléculas, **iii)** a passagem por um analisador de massas que separa os íons formados de acordo com a razão *m/z*, **iv)** o detector que "conta" os íons e transforma o sinal em corrente elétrica e **v)** o processador que converte a magnitude do sinal elétrico em função da razão *m/z* em dados,

proporcionando um espectro de massas correspondente, conforme mostrado no diagrama esquemático da **Figura 12** [30]**.**

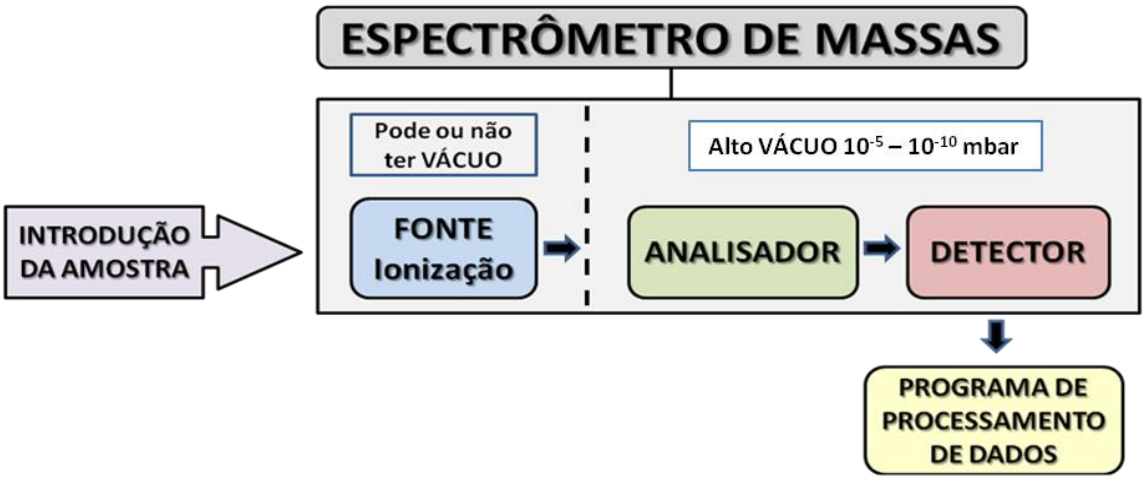


Figura 12. Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas - Adaptada [30].

1.3.1. Ionização por *Electrospray* (ESI)

ESI é uma técnica de ionização a pressão atmosférica (API) que analisa, além de compostos voláteis e termicamente estáveis, uma grande variedade de compostos não-voláteis e termicamente lábeis, incluindo complexos organometálicos. Ela permite que moléculas de baixa ou alta massa molar, alta polaridade e complexidade estrutural sejam facilmente ionizadas e analisadas por MS. Nesta técnica, as espécies do analito são ionizadas em solução e transferidas para fase gasosa como entidades isoladas, geralmente na forma de moléculas protonadas ou cátions (modo positivo), ou ainda moléculas desprotonadas ou ânions (modo negativo) [31]. A **Figura 13** ilustra um esquema típico de uma fonte de ESI.

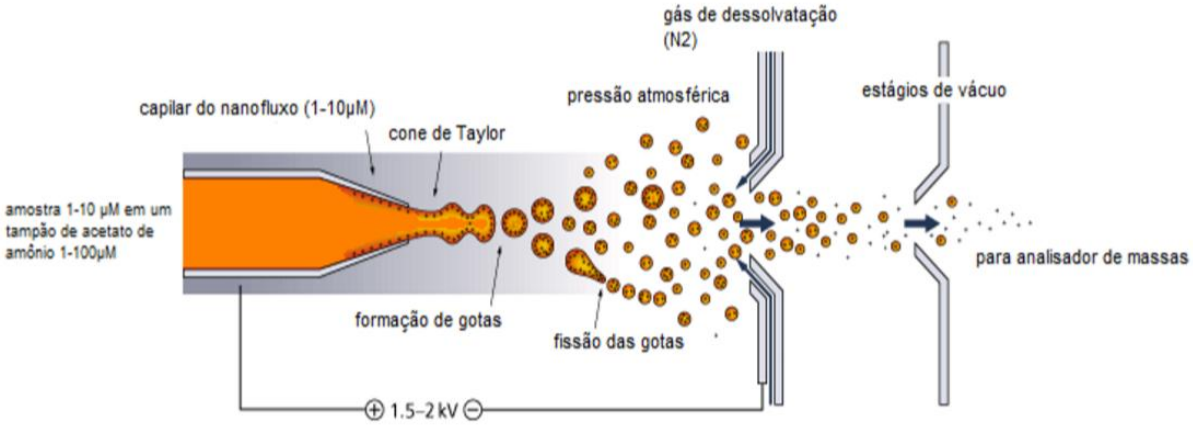


Figura 13. Ilustração esquemática de uma fonte de ionização por *Eletrospray* - Adaptada [31].

A ionização por ESI é produzida aplicando um campo elétrico forte, sob pressão atmosférica, no líquido que passa pelo capilar em um fluxo contínuo baixo (1-10 $\mu L.min^{-1}$). O campo elétrico é resultante da diferença de potencial aplicada (1-4 kv) entre o capilar e o contra eletrodo separado por 0,3 – 2 cm. Este campo induz o acúmulo de cargas na superfície do líquido ao final do capilar, resultando na formação de um cone, chamado de cone de Taylor, onde gotas altamente carregadas são formadas. Um gás injetado coaxialmente permite a dispersão dessas gotas e a formação do *spray* em um espaço limitado. As gotas atravessam uma corrente de gás quente (gás de dessolvatação), sendo o mais comum o nitrogênio, ou passam por um capilar aquecido para remover as últimas moléculas de solvente [32]. O solvente evapora e o volume das gotas é reduzido, o que provoca um aumento na repulsão entre os íons de mesma carga [33]. Como resultado formam-se gotas contendo apenas um íon (modelo CRM – *Charged Residue Model*) ou os íons evaporam (são “ejetados”) para fase gasosa (modelo IEM – *Ion Evaporation Model*).

1.3.2. Ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS)

O analisador de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR ou simplesmente FT-MS) é considerado, até o momento, o tipo mais complexo de analisadores de massas. FT-ICR MS rotineiramente fornece um poder de ultra-alta resolução de massa, $m/\Delta m_{50\%}$>100.000, e exatidão de massa superior a 1 ppm. Estas altas especificações significam que FT-ICR é ideal para analisar

misturas de complexos [34,35]. Além disso, torna-se possível atribuir fórmulas moleculares ($C_cH_hN_nO_oS_s$) de forma inequívoca através da medição de massa de íons de carga única como $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$ ou $[M - H]^-$, onde M corresponde a molécula neutra.

O princípio físico do movimento ciclotrônico de íons descreve que partículas carregadas, na presença de um forte campo magnético, assumem um movimento circular com uma frequência que é proporcional à sua razão m/z (**Figura 14a**). O movimento ciclotrônico é devido ao deslocamento de um íon presente em um campo magnético uniforme ***B***, no qual estará sujeito a uma força dada pela **Equação 2**,

$$F = qv \times B \qquad \textbf{Eq. 2}$$

onde *q* e *v* são a carga do íon e a velocidade, respectivamente. O campo magnético faz com que os íons tenham uma trajetória circular com raio *r*, ou seja, um movimento ciclotrônico. Na **Equação 3** a relação inversa entre o raio da trajetória circular de um íon e o campo magnético, indica que campos magnéticos altos criam trajetórias iônicas com raios pequenos.

$$R = mv/qB \qquad \textbf{Eq. 3}$$

Nesta equação *m* e *r* correspondem a massa e o raio da trajetória do íon, respectivamente. Já na **Equação 4**, celebrada como a equação ciclotrônica, a frequência ciclotrônica é denotada por ω_c, e descrita como:

$$\omega_c = qB/m \qquad \textbf{Eq. 4}$$

Portanto, a ultra-alta resolução é devido à quantidade de voltas que um determinado íon percorre ao ser excitado na presença de um campo magnético. Além disso, das **Equações 3** e **4** pode se concluir que quanto maior o campo magnético, menor será o raio ciclotrônico de um íon e maior será sua frequência ciclotrônica, e, por consequência, maior será o poder de resolução [36].

Os íons gerados pela fonte de ionização são aprisionados na cela de ICR, também designada como *penning trap* (*trap* na presença de um campo magnético), onde cada íon começa a se movimentar em uma determinada posição pela ação do

campo magnético uniforme. Contudo, o sinal do ICR é detectável apenas se os íons apresentarem um movimento sincronizado (em fase). Com intuito de obter essa sincronia, aplica-se um campo elétrico (RF) espacialmente uniforme com a mesma frequência ciclotrônica, tornando o movimento dos íons detectáveis. O sinal de ICR (domínio de tempo) é resultante, portanto, da corrente oriunda da detecção de uma imagem oscilante de uma carga ao se aproximar de dois eletrodos condutores opostos paralelamente. O espectro em domínio de frequência é obtido pela transformada de Fourier em um sinal de ICR digitalizado no domínio de tempo. Em seguida, após uma simples conversão matemática, este é transformado em domínio de massas ou espectro de massas (**Figura 14b**) [37].

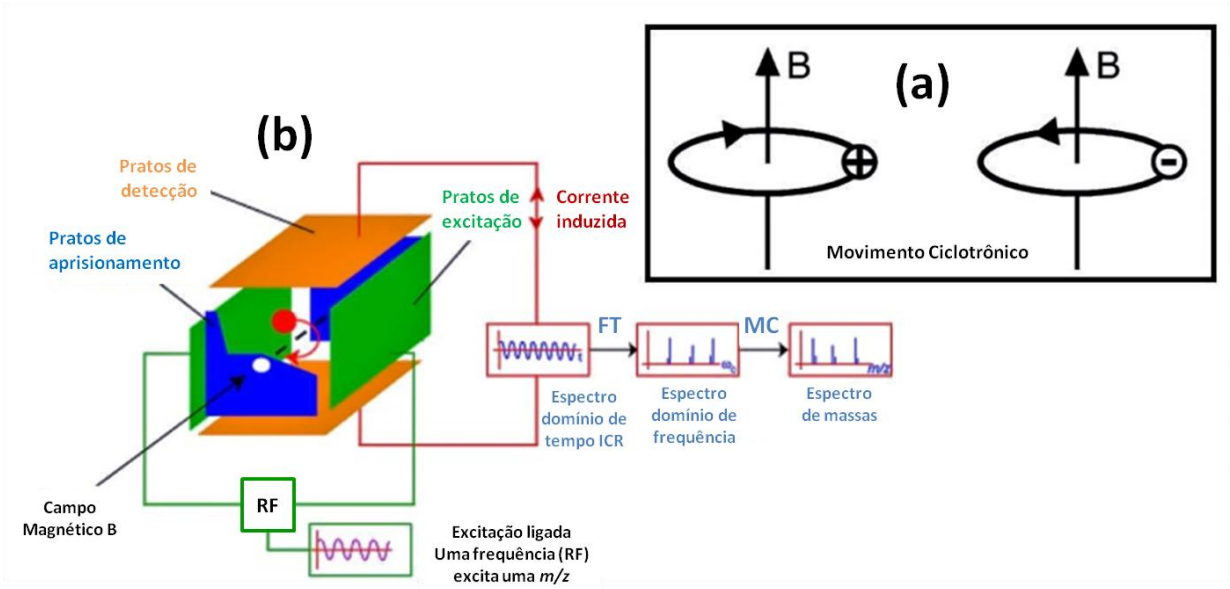


Figura 14. Esquema do funcionamento de uma cela de ICR. **(a)** Diagrama do movimento ciclotrônico de íons e **(b)** a cela de ICR. A rotação dos íons ocorre perpendicularmente ao campo magnético B - Adaptada [36].

A **Figura 15a** ilustra a trajetória dos íons dentro de um espectrômetro de massas FT-ICR MS comercial. Após o processo de ionização, os íons são focalizados e atraídos para dentro do analisador a partir de lentes que funcionam como uma espécie de cone de *Taylor*, responsáveis pela atração e transição do íon a partir de um sistema a pressão atmosférica para uma pressão reduzida (≅ 10 -6 mbar). Caso exista algum fenômeno de supressão iônico, o mesmo pode ser reduzido usando um mecanismo de fragmentação induzida na fonte de ionização. O

processo ocorre quando uma voltagem é aplicada em uma das lentes focalizadoras (aqui nomeadas de *skimmer*), perturbando, assim, a trajetória de espécies majoritárias. Consequentemente, ocorre uma diminuição da população de íons na cela de ICR e da energia do sistema, **Figura 15b**. Em seguida, os íons atravessam o analisador quadrupolar (que atua unicamente como filtro de massas) e um hexapolo (cela de colisão). Quando os íons chegam ao hexapolo a *beam valve* é fechada e eles são acumulados. Portanto, o tempo de acumulação dos íons pode ser controlado e, consequentemente, a população de íons na cela de ICR. O hexapolo também funciona como cela de colisão e experimentos de MS^2 podem ser realizados. Por fim, o íon alcança a cela de ICR, e a quantidade de íons deve ser mantida em um valor ótimo usualmente menor que 10^7 (para celas de 1 cm de diâmetro). Isso assegura que as interações espaciais de cargas sejam minimizadas, permitindo ao analisador ICR medir *m/z* com um altíssimo valor de resolução e exatidão [38].

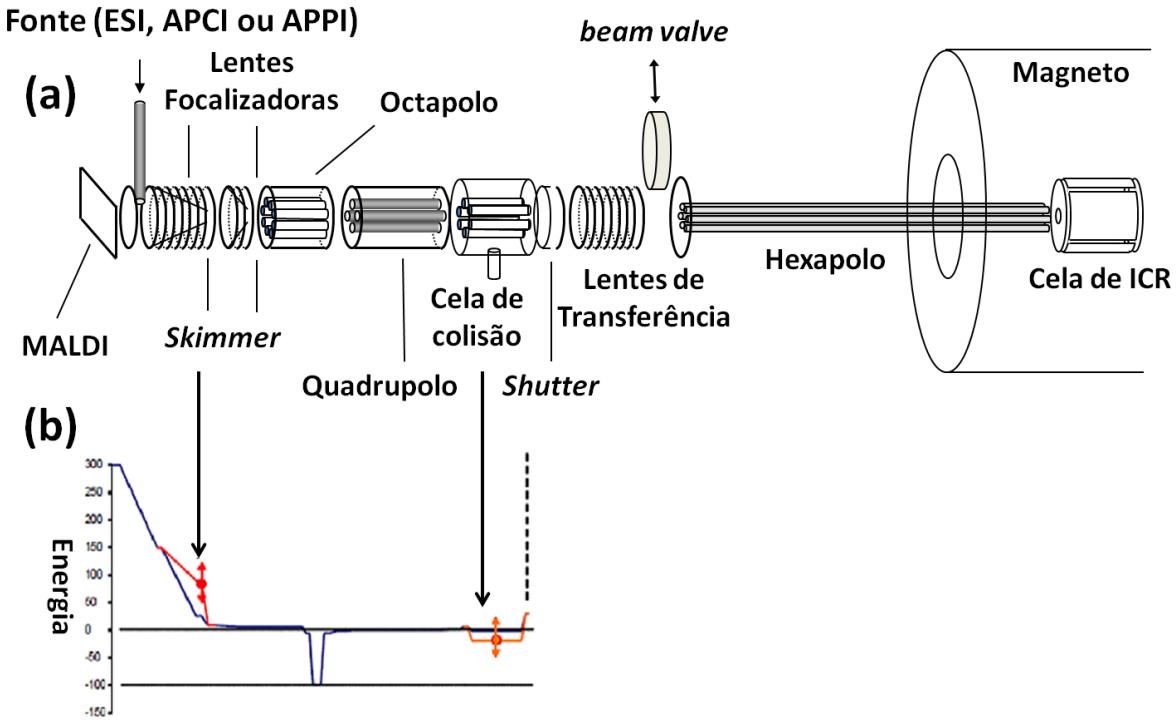


Figura 15. (a) Esquema de um espectrômetro de massas FT-ICR MS; **(b)** diagrama de Energia em função da trajetória do caminho percorrido pelo íon - Adaptada [38].

1.3.3. Espectrometria de Massas em *tandem* (MS/MS)

Os sistemas empregando a espectrometria de massas sequencial possibilitam a obtenção de informações estruturais de íons selecionados, empregando experimentos de dissociação induzida por colisão (CID). O processo envolve a ionização de uma amostra, com recuperação seletiva de um íon característico do composto que está sendo estudado, e a obtenção de espectro diagnóstico dos íons filhos produzidos por aquele íon. Em misturas complexas, esses íons filhos fornecem evidência inequívoca da presença de um composto conhecido. No caso de compostos novos ou desconhecidos, esses íons filhos permitem a obtenção de muitas informações estruturais. A técnica mais utilizada em MS/MS é o Monitoramento de Reação Selecionada (SRM). Ela monitora a corrente iônica associada ao *m/z* de uma transição de um íon precursor a um fragmento específico durante uma dissociação induzida por colisão. Empregando esta metodologia, compostos que apresentem estrutura química diferentes vão produzir espectros de fragmentação diferentes, possibilitando a diferenciação e caracterização estrutural do íon selecionado [28].

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade do uso de complexo fotoluminescente como marcador de munição para identificação de resíduos de disparo de arma de fogo.

2.2. Objetivos Específicos

<u>CAPÍTULO 1</u>: Síntese e caracterização química dos complexos [Eu(PIC)$_3$.*x*H$_2$O] e [Eu(PIC)$_3$(NMK)$_3$].

- Reproduzir a síntese dos complexos.
- Avaliar suas propriedades ópticas e determinar o(s) complexo(s) com características adequadas para ser(em) testado(s) como marcador(es) óptico(s) de munição.
- Caracterizar quimicamente os complexos através das técnicas: FTIR, TG/DTA, e ESI-FT-ICR MS.
- Estabelecer a estrutura química do(s) complexo(s).

<u>CAPÍTULO 2</u>: Detecção visual e química do marcador no GSR

- Avaliar qualitativamente a presença do marcador fotoluminescente após disparos, no atirador, no ambiente do disparo, na arma e no cartucho deflagrado, variando a massa adicionada ao cartucho, pela detecção visual através de lâmpadas UV (395 nm) e por ESI-FT-ICR MS.
- Avaliar as propriedades ópticas do marcador no GSR.
- Estipular a massa ideal de marcador a ser adicionada à munições de calibre .38 e .40.

CAPÍTULO 3: Avaliação da toxicidade aguda do marcador fotoluminescente

- Estimar o valor de DL_{50} para o marcador, empregando-se o protocolo 423 preconizado pela OECD (2001).

- Classificar a toxicidade aguda por via oral do marcador, de acordo com a escala de toxicidade da GHS.

- Comparar os dados de toxicidade do marcador com os efeitos tóxicos dos metais pesados presentes nos resíduos de tiro gerados por munições convencionais.

3. CAPÍTULO 1: Síntese e caracterização química dos complexos $[Eu(PIC)_3.xH_2O]$ e $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$.

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. Ácido Pícrico

O ácido pícrico, também chamado 2,4,6-trinitrofenol, é um fenol que contém três grupos nitros ($-NO_2$) nos carbonos 2, 4 e 6 do anel aromático e possui fórmula molecular $C_6H_3N_3O_7$ (**Figura 16**). Ele é um ácido forte (pKa = 0,25), cuja acidez é diminuída quando substituintes doadores de elétrons entram nas posições 3 ou 5 do anel de sua estrutura. O ácido pícrico funde a 122°C e os compostos derivados do seu ácido são indistintamente chamados de picratos [39,40].

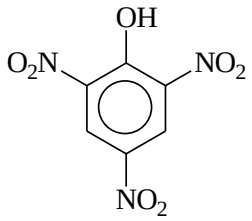


Figura 16. Fórmula estrutural do ácido pícrico.

Estudos revelaram que íons picratos em compostos onde ligantes orgânicos e íons metálicos estão envolvidos, podem estar ligados a essas espécies através do átomo de oxigênio do grupo fenólico; através dos átomos de oxigênio do grupo para-nitro; ou de forma bidentada através do átomo de oxigênio fenólico e de um dos átomos de oxigênio do grupo orto-nitro [39]. Duas formas diferentes de coordenação do íon picrato são mostradas na **Figura 17** [39,40].

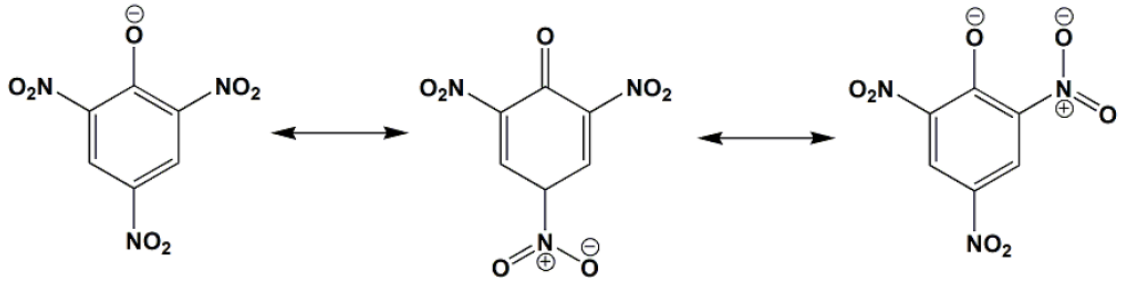


Figura 17. Estruturas de ressonância do ânion picrato [39].

3.1.2. Lactamas

As lactamas são amidas cíclicas, também chamadas de 2-azacicloalcanonas, cujo termo “aza” é usado para designar o átomo de nitrogênio. A caprolactama, **Figura 18a**, é uma amida cíclica de sete membros, também chamada de 2-azacicloheptanona, que possui fórmula molecular $C_6H_{11}NO$ [39,40]. Na **Figura 18b** é representada a *n*-metil-ε-caprolactama ou *n*-metil-2-aza-cicloheptanona, que apresenta um grupamento metila substituído no nitrogênio e possui fórmula molécula $C_7H_{13}NO$.

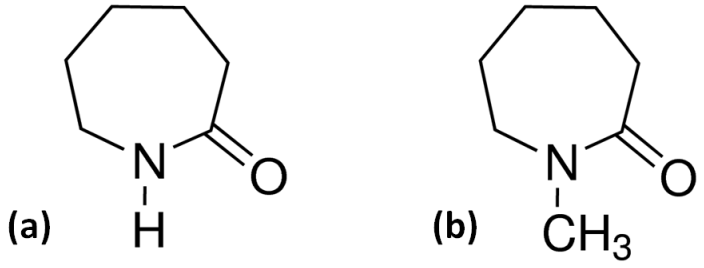


Figura 18. Estrutura da **(a)** caprolactama e **(b)** *n*-metil-ε-caprolactama.

Nos compostos de coordenação observa-se que o oxigênio carbonílico da amida é o principal ponto de ligação e que este apresenta propriedades doadoras mais intensas. Esse comportamento é atribuído à deslocalização do par de elétrons não ligante do nitrogênio para um orbital molecular π, envolvendo o O e o C, conforme **Figura 19** [39].

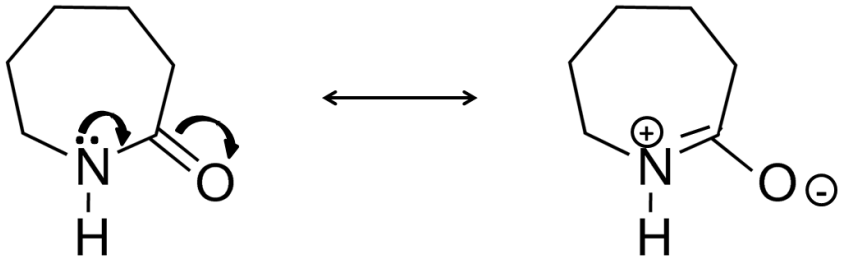


Figura 19. Estruturas de ressonância da caprolactama - Adaptada [39].

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Geral

Síntese e caracterização química dos complexos $[Eu(PIC)_3.xH_2O]$ e $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$.

3.2.2. Específicos

- Reproduzir a síntese dos complexos.
- Avaliar suas propriedades ópticas e determinar o(s) complexo(s) com características adequadas para ser(em) testado(s) como marcador(es) óptico(s) de munição.
- Caracterizar quimicamente os complexos através das técnicas: FTIR, TG/DTA, e ESI-FT-ICR MS.
- Estabelecer a estrutura química do(s) complexo(s).

3.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1. Materiais e Reagentes

Acetonitrila, etanol, éter etílico, ácido clorídrico, e ureia (grau analítico com uma pureza superior a 99.5 %) foram fornecidos por Vetec Química Fina Ltda, Brasil. Hidróxido de amônio, trifluoroacetato de sódio, arginina, e ácido fórmico foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemicals, USA, e usados para as análises por ESI(±)-FT-ICR MS. Óxido de európio, ácido pícrico e *n*-metil-ε-caprolactama (Sigma-Aldrich Chemicals, USA) e água ultrapura (18.2 MΩ cm, preparada por sistema de osmose reversa, Purelab Mk2 Ultra, UK) foram utilizados para preparação dos complexos de európio. Todos os reagentes foram utilizados sem purificação.

3.3.2. Complexos de Európio

Foram estudados dois complexos de európio: o picrato de európio (III) hidratado [$Eu(PIC)_3.xH_2O$]; e, o complexo de picrato de európio (III) com a *n*-metil-ε-caprolactama [$Eu(PIC)_3(NMK)_3$]. Os compostos foram sintetizados na Universidade Federal do Espírito Santo pelo mestre em Química Clebson Macrino, orientado pelo prof. Dr. Elias Meira da Silva [39]. Posteriormente, a síntese foi reproduzida na UFES pelo mestre em Química João Francisco Allochio Filho, no Laboratório de Síntese Orgânica & Medicinal coordenado pelo prof. Dr. Sandro José Greco.

3.3.3. Síntese dos complexos de európio

Conforme ilustra a **Figura 20a-c**, a síntese dos complexos de európio foi realizada em três etapas: **I)** síntese do carbonato básico de európio (III) hidratado [$EuCO_3(OH).xH_2O$]; **II)** síntese do picrato de európio (III) hidratado [$Eu(PIC)_3.xH_2O$]; e, **III)** síntese do complexo de picrato de európio (III) com a *n*-metil-ε-caprolactama [$Eu(PIC)_3(NMK)_3$].

Primeiramente, na etapa I, procedeu-se à abertura do óxido de európio. Preparou-se uma suspensão aquosa de óxido de európio (0,1 mmol mL^{-1}) e posteriormente, ácido clorídrico foi adicionado lentamente, controlando o pH entre 1 e 3, até a completa dissolução do óxido (perda da turvação). A solução foi então

aquecida em chapa de aquecimento até a temperatura de 100°C, e em seguida ureia foi adicionada lentamente, com controle de pH, até atingir valor final igual a 7. Um precipitado branco foi produzido e o sistema permaneceu sob agitação contínua durante um período de 2 h. O precipitado foi filtrado e lavado diversas vezes com água destilada, para a eliminação de íons Cl^-, e secou à temperatura ambiente. A massa do carbonato básico de európio foi pesada e a reação apresentou rendimento de 90 % (**Figura 20a**) [39].

Posteriormente procedeu-se à síntese do picrato de európio (III) hidratado (etapa II). Preparou-se uma suspensão aquosa de carbonato básico de európio (III) hidratado (0,1 mmol mL^{-1}) e, sob agitação constante, adicionou-se lentamente o PIC durante 30 minutos. Posteriormente, o excesso de água foi removido em um evaporador rotativo e a solução permaneceu em repouso à temperatura ambiente durante um período de 24 h para formar, após cristalização e filtração a vácuo, um precipitado amarelo. O sólido foi lavado com água fria para formar o complexo $[Eu(PIC)_3.H_2O]$ e a reação apresentou um rendimento de 88% (**Figura 20b**) [39].

Finalmente, na etapa III, foi realizada a síntese do complexo de picrato de európio (III) com a *n*-metil-ε-caprolactama. O picrato de európio hidratado foi solubilizado em etanol (0,2 mmol mL^{-1}) e em seguida, sob agitação, foi adicionado NMK 3 mmol gota a gota (relação molar 1:3 sal – ligante). Um precipitado amarelo foi imediatamente formado, e após filtração, foi purificado através de lavagens com água fria e éter etílico. No final do processo, foi obtido um pó de coloração amarela e a reação apresentou um rendimento de 85% (**Figura 20c**). A fluorescência foi evidenciada pela emissão de coloração amarela e vermelha a 254 e 369 nm, respectivamente [39].

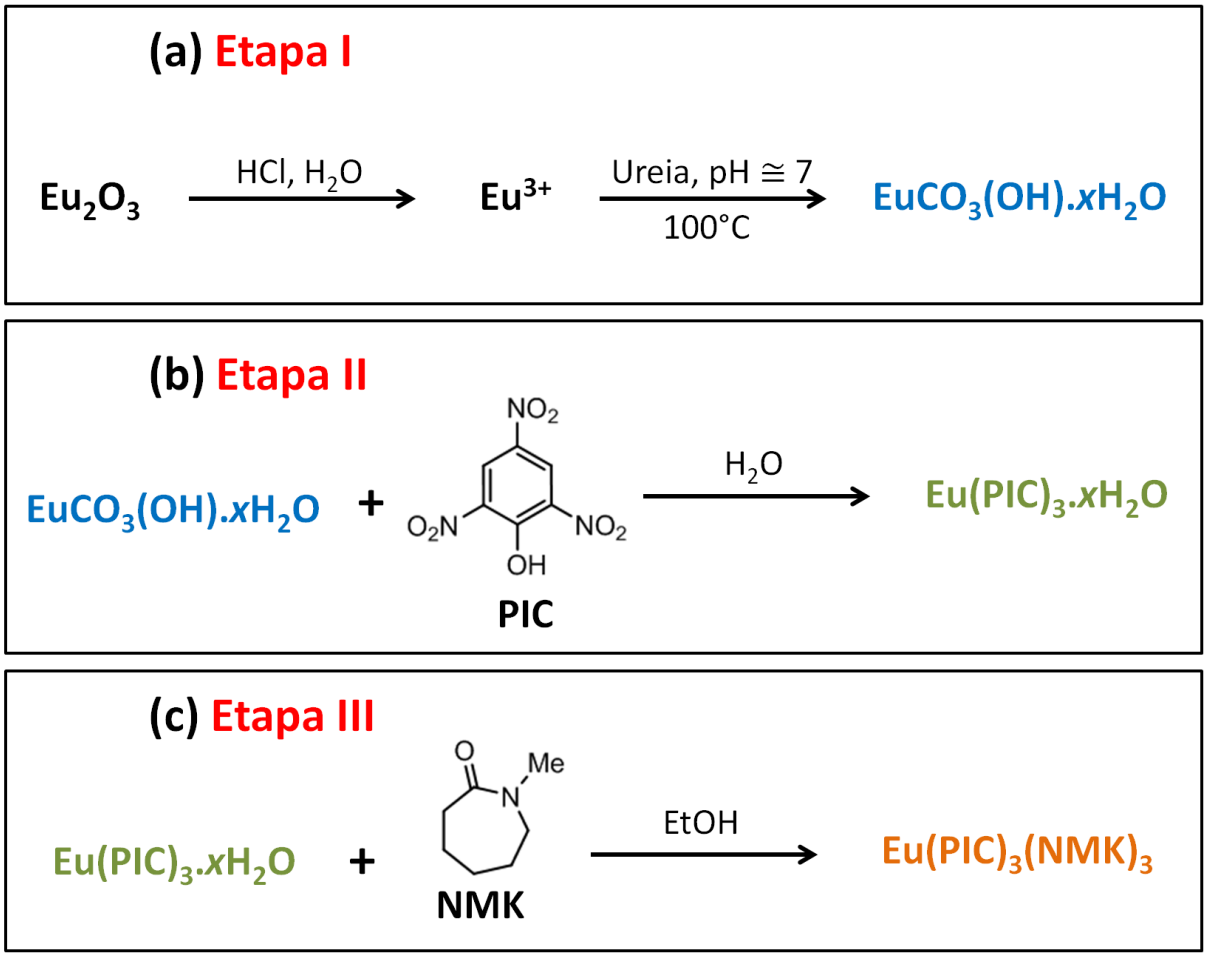


Figura 20. Síntese dos complexos de európio a partir de três etapas: **(a)** Etapa I) síntese do carbonato básico de európio (III) hidratado; **(b)** Etapa II) síntese do picrato de európio (III) hidratado; e **(c)** Etapa III) síntese do complexo de picrato de európio (III) com a *n*-metil-ε-caprolactama - Adaptada [39].

3.3.4. Caracterização

3.3.4.1. Espectro de Emissão

A emissão dos complexos foi testada utilizando lâmpadas UV de comprimento de onda igual a 254, 365 e 395 nm. O espectro de emissão foi obtido na faixa de 500-750 nm, a 77 K, com excitação a 430 nm utilizando um espectrofluorímetro Jobin-Yvon ModelFluorolog FL3-22 equipado com uma lâmpada contínua de Xênon de 450 W como fonte de excitação.

3.3.4.2. FTIR

Um ABB BOMEN IR (modelo FTLA2000-102), juntamente com o acessório de reflectância total atenuada (ATR) tipo MIRacle, foi utilizado para os estudos de FTIR. Complexos de európio foram inseridos sob uma única placa de cristal de cristal de reflexão e um total de 16 varreduras foram realizadas e os espectros de ATR-FTIR foram registrados de 4000 a 630 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1}. O ruído de fundo foi realizado sob o ar, sendo novamente adquirido antes de cada amostra analisada. Os espectros de FTIR-ATR foram adquiridos usando o *software* GRAMS/AI (Thermo Galactic).

3.3.4.3. TGA / DTA

Termogravimetria e análise térmica diferencial (TG / DTA) foram realizadas em um TA Instrument SDT Q600, operando de 25 a 1000 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} sob uma atmosfera de ar sintético e fluxo de ar de 50 mL min^{-1}. Uma massa de 2-10 mg foi utilizada para todos os experimentos.

3.3.4.4. ESI(±)-FT-ICR MS

Os complexos de európio foram preparados em solução de acetonitrila/água (1:1 v/v %) que continha 0,1 % m/v de NH_4OH por ESI no modo negativo, ESI(-), e 0,1 % m/v de ácido fórmico por ESI no modo positivo, ESI(+). A solução foi diretamente infundido a uma taxa de fluxo de 5 µL min^{-1} para a fonte de ESI. O espectrômetro de massa (modelo 9.4T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) foi configurado para operar em uma faixa de massa de *m/z* 200-2000. As condições da fonte de ESI foram as seguintes: uma pressão do gás nebulizador de 3 bar, uma voltagem capilar de 3-4.1 kV, e uma temperatura de transferência capilar de 250 °C. Os íons são acumulados na célula de colisão hexapolar com o tempo de 0.01-0.02 s seguido por transporte para a célula do analisador (ICR) através do sistema de guia de íons multipolar (outro hexapolo). O tempo de vôo no hexapolo foi de 0.7 ms. Espectros de ESI-FT-ICR foram adquiridos pela acumulação de 64 varreduras de sinais. Todos os espectros de massas foram calibrados externamente utilizando NaTFA (*m/z* de 200 a 2000). Um poder de resolução, $m/\Delta m_{50\%} \cong 480.000$,

no qual $\Delta m_{50\%}$ é a largura do pico a meia-altura, de $m/z \cong 400$, e uma exatidão de massas < 1 ppm foram observados. A exatidão de massa é determinada a partir de erro de massa definido como erro = (m/z_{medido} - $m/z_{teórico}$) / $m/z_{teórico}$) x 10^6). Os espectros de massa foram adquiridos e processados usando o *software* Data Analysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os dados de MS foram processados, e as composições elementares dos compostos foram determinadas medindo os valores de *m/z*.

3.3.4.5. ESI (±) FT-ICR MS/MS

Experimentos de MS^2 foram realizados em um analisador quadrupolo acoplado a espectrômetro de massa FT-ICR, Q-FT-ICR MS (modelo 9.4T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os espectros de ESI(+)-MS/MS foram adquiridos utilizando: i) taxa de fluxo da infusão de 5 µL min^{-1}, ii) voltagem de capilar de 3.5-4.1 kV; iii) temperatura de nebulização de 250 °C, iv) argônio como gás de colisão; v) tempo de acumulação de íons de 1 s; vi) janela de isolamento de 1.0 (unidade *m/z*); vii) e 25-45% da energia de colisão. Os espectros foram adquiridos por acumulação de 32 varreduras e processados usando o *software Data Analysis* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Espectro de Emissão

As propriedades ópticas dos complexos de európio foram testadas e apenas $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ apresentou emissão de fotoluminescência. Nas **Figuras 21a-f** é mostrado o efeito visual dos compostos $[Eu(PIC)_3.xH_2O]$ e $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ sem irradiação de luz UV **(a-b)** e quando submetidos a luz UV a 254 **(c-d)** e 365 nm **(e-f)**. Foram observadas emissões na região do amarelo **(c)** e do vermelho **(e)** para $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$, ao passo que nenhuma emissão foi observada para o complexo $[Eu(PIC)_3.xH_2O]$ **(d,f)**. É descrito na literatura, que compostos contendo os íons lantanídeos apresentam suas propriedades luminescentes afetadas por moléculas de água coordenadas, as quais diminuem a intensidade de emissão devido a ressonância entre os seus estados vibracionais e os estados emissores do íon metálico, tornando possível o favorecimento de processos não-radiativos, via mecanismo de acoplamento vibrônico com o oscilador O-H [39].

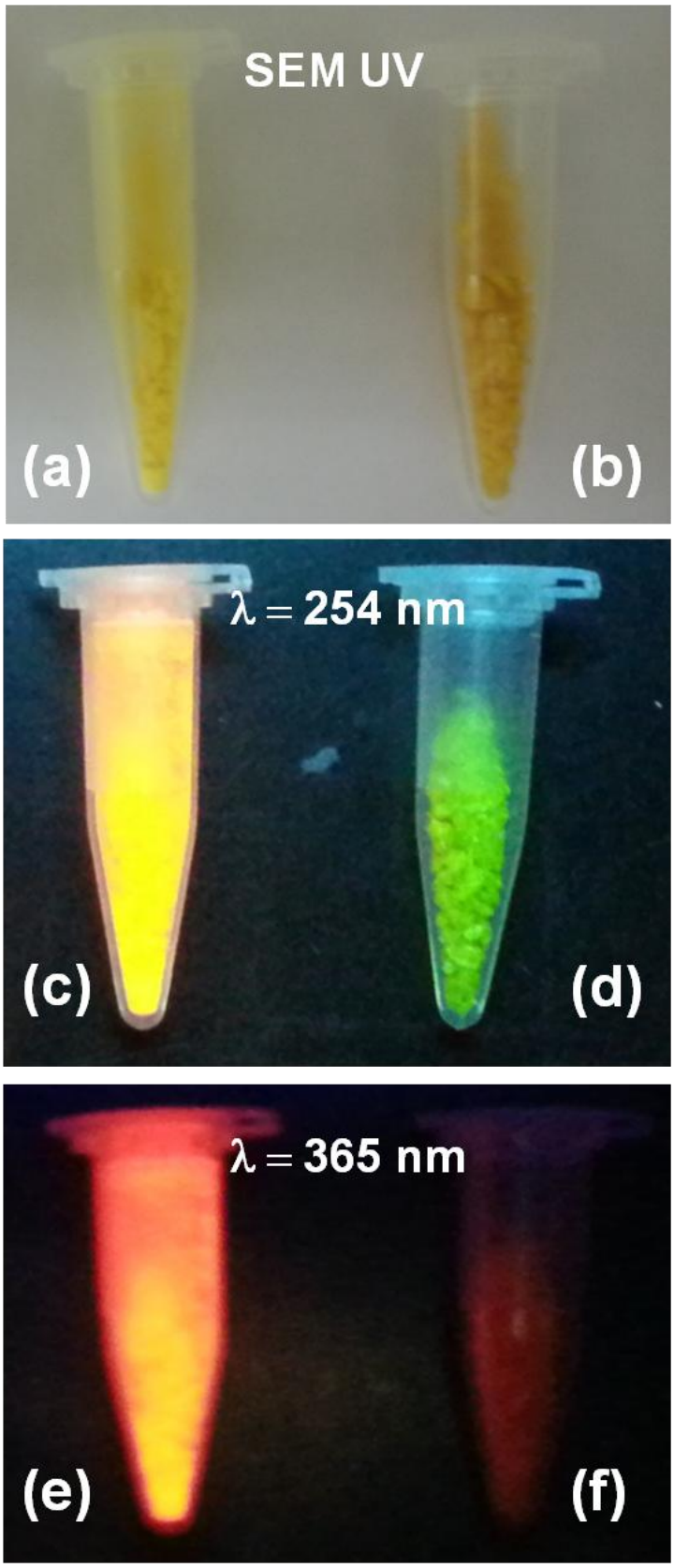


Figura 21. Imagens dos complexos **(a, c, e)** $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ e **(b, d, f)** $[Eu(PIC)_3.xH_2O]$ sem irradiação de luz UV, e sob luz UV a 254 e 365 nm.

Na **Figura 22b** é mostrado o efeito visual do composto $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ sob irradiação UV a 395 nm. Novamente foi observada intensa emissão vermelha, coloração característica do lantanídeo európio. O espectro de emissão de $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$, adquirido a 77 K pela excitação respectiva a máxima absorção de 430 nm, confirmou a emissão da coloração vermelha característica do Eu^{3+}, devido às transições do estado excitado $^5D_0$ para os estados ^7F_J (J = 0, 1, 2, 3 e 4) (**Figura 22c**) [20]. Portanto, apenas o complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ apresentou as características ópticas desejadas para ser aplicado como marcador de GSR.

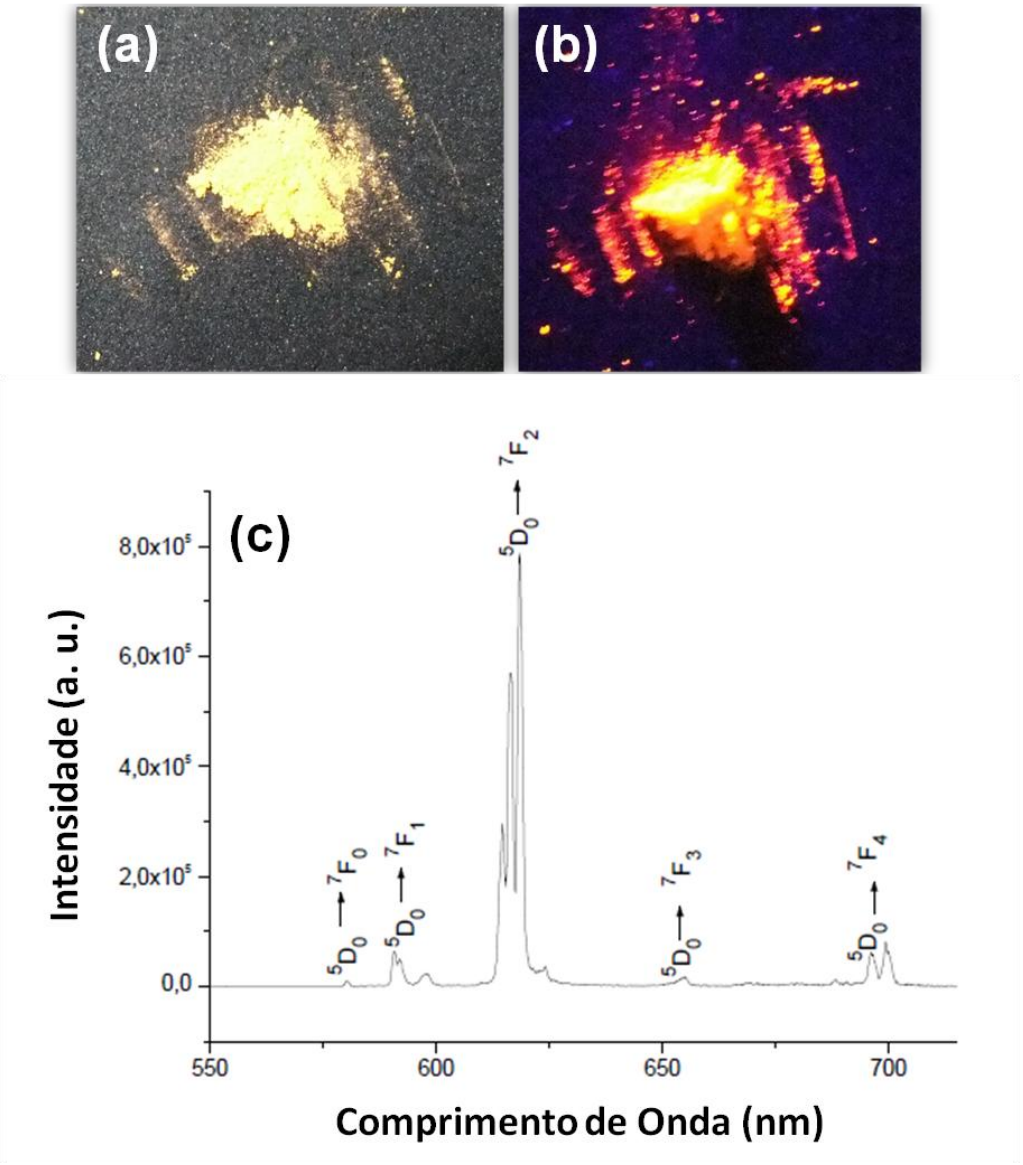


Figura 22. Imagens do complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ **(a)** sem irradiação de luz UV; **(b)** sob luz UV em 395 nm; e **(c)** seu espectro de emissão a 77 K sob excitação a 430 nm. Notar que o complexo emitiu fotoluminescência de cor vermelha quando exposto a luz UV.

3.4.2. FTIR

Na **Figura 23a-e** são apresentados os espectros ATR-FTIR dos complexos **(a)** [$EuCO_3(OH).xH_2O$], **(b)** [$Eu(PIC)_3.xH_2O$], **(c)** [$Eu(PIC)_3(NMK)_3$], e os espectros dos ligantes **(d)** PIC e **(e)** NMK.

Para o carbonato básico de európio **(a)**, a formação dos íons carbonato (CO_2^-) foi demonstrada pelas bandas em 1479, 1376, 1098 e 846 cm^{-1} [41-43]. Já a formação do complexo [$Eu(PIC)_3.xH_2O$] **(b)** foi identificada pelas frequências de estiramento assimétrica ($\nu_{ass}NO_2$ = 1525 e 1575) e simétrica (ν_sNO_2 = 1330 e 1364) características do íon picrato **(d)**, evidenciando a coordenação deste íon ao centro metálico lantanídico [44]. O mesmo padrão de bandas foi encontrado para [$Eu(PIC)_3(NMK)_3$]. Finalmente, a presença do ligante NMK no picrato de európio **(c)** foi confirmada pela deformação axial do grupamento carbonila (νC=O) da lactama **(e)**, correspondente à banda de frequência igual a 1650 cm^{-1} [28].

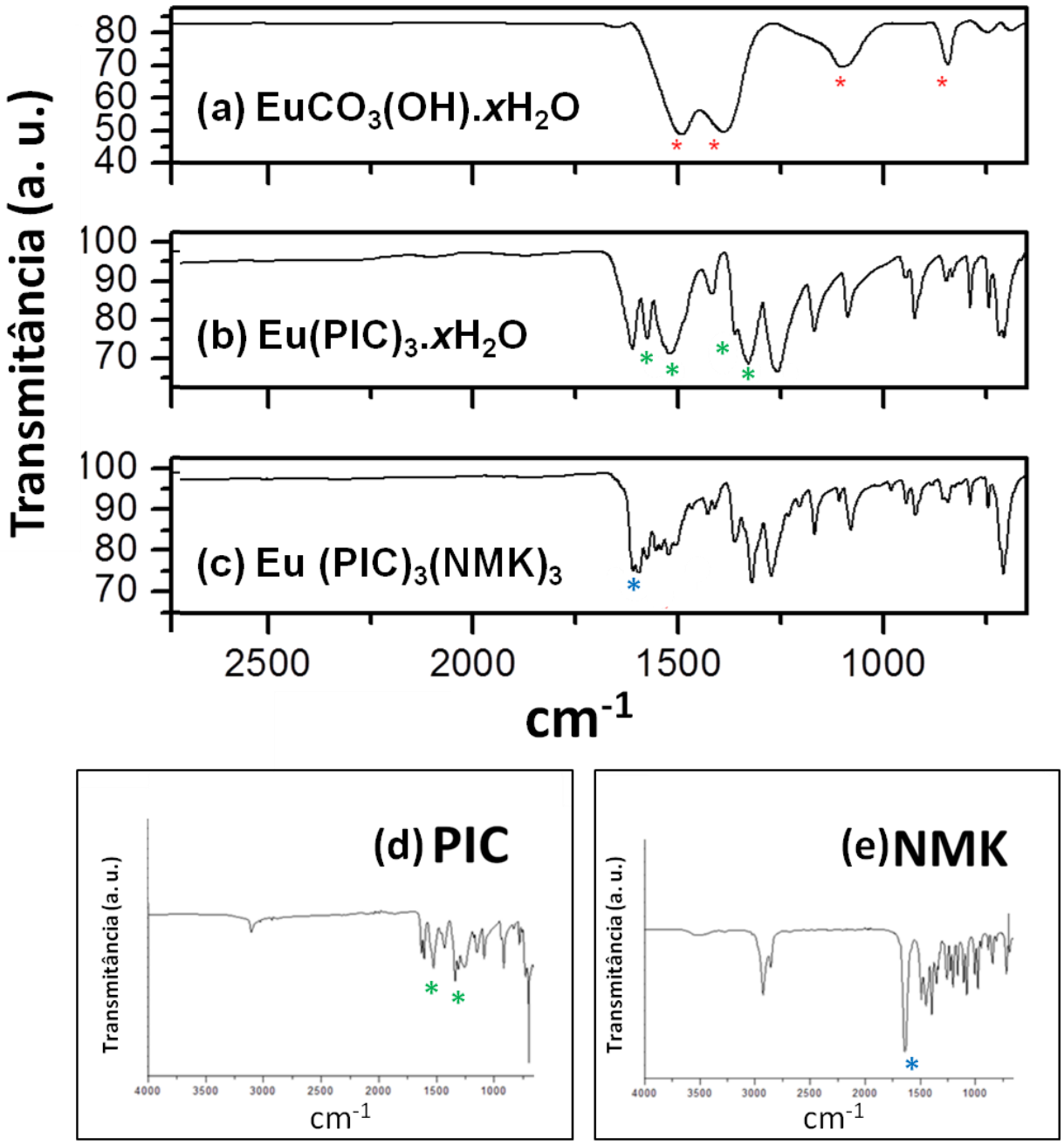


Figura 23. Espectros FTIR de **(a)** [$EuCO_3(OH).xH_2O$], **(b)** [$Eu(PIC)_3.xH_2O$], **(c)** [$Eu(PIC)_3(NMK)_3$], **(d)** PIC e **(e)** NMK.

3.4.3. TGA / DTA

As curvas TGA e DTG dos compostos foram registradas no intervalo de temperatura de 25 para 1000 °C (**Figura 24a-c**). Para o carbonato de európio hidratado **(24a)**, entre 30 e 200 °C ocorreu perda de água do complexo, formando carbonato anidro. A decomposição do carbonato de európio começou em cerca de 400 °C, com formação de $Eu_2O_3.CO_2$ a 550 °C. O último foi decomposto a um estágio intermediário em cerca de 570 °C, sendo formado Eu_2O_3 em torno de 900°C [41-43].

Para o $[Eu(PIC)_3.xH_2O]$, dois eventos de perda de massa foram registrados conforme **Figura 24b**. Semelhante à **Figura 24a**, o primeiro evento no intervalo de 30 a 200 °C (≅ 10 wt.%) correspondente à perda de moléculas de água. Nakagawa et. al. [45] mostrou resultados semelhantes na preparação de alguns picratos lantanóides, onde uma perda de peso de 10 wt. % também foi observada quando o composto é seco ao ar. O segundo evento a 313 °C é devido à decomposição do picrato, equivalente à perda de 86,34% de massa.

Na Figura **Figura 24c** estão apresentadas variações registradas nas curvas TGA/DTA do complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$, onde foram observados quatro eventos de perda de massa. O primeiro (168 °C) e o segundo (308 °C) eventos equivalem à perda de ligantes NMK (≅ 37 wt. %). O terceiro evento corresponde à perda das moléculas de PIC, que ocorreu à 336° C. Finalmente, à 423° C, observou-se a formação de óxido de európio.

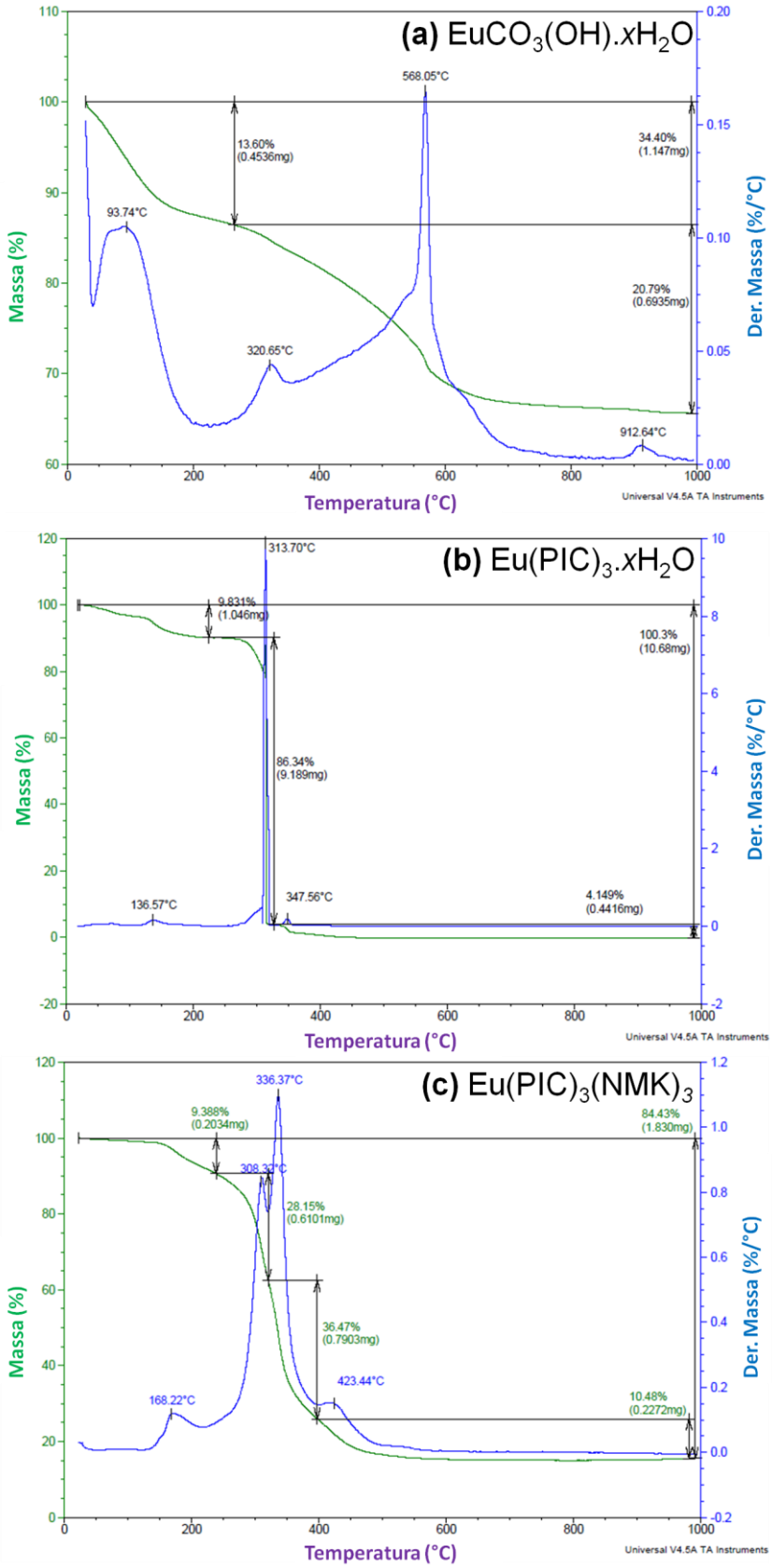


Figura 24. Curvas TGA e DTG para os complexos **(a)** [$EuCO_3(OH).xH_2O$], **(b)** [$Eu(PIC)_3.xH_2O$] e **(c)** [$Eu(PIC)_3(NMK)_3$].

3.4.4. ESI(±)-FT-ICR MS

Na **Figura 25** é apresentado o espectro de ESI(-)FT-ICR MS para a solução de [Eu(PIC)$_3$.xH$_2$O]. O complexo foi detectado como o ânion [Eu(PIC)$_4$ - 4H]$^-$, correspondente ao sinal de *m/z* 1064.8815 **(2)**, no qual Eu^{3+} está coordenado de forma bidentada a cada um dos quatro ânions picrato, [PIC - H]$^-$.

O ânion picrato também foi detectado em sua forma livre [PIC - H]$^-$, correspondente ao íon de *m/z* 227.9899 **(1)**.

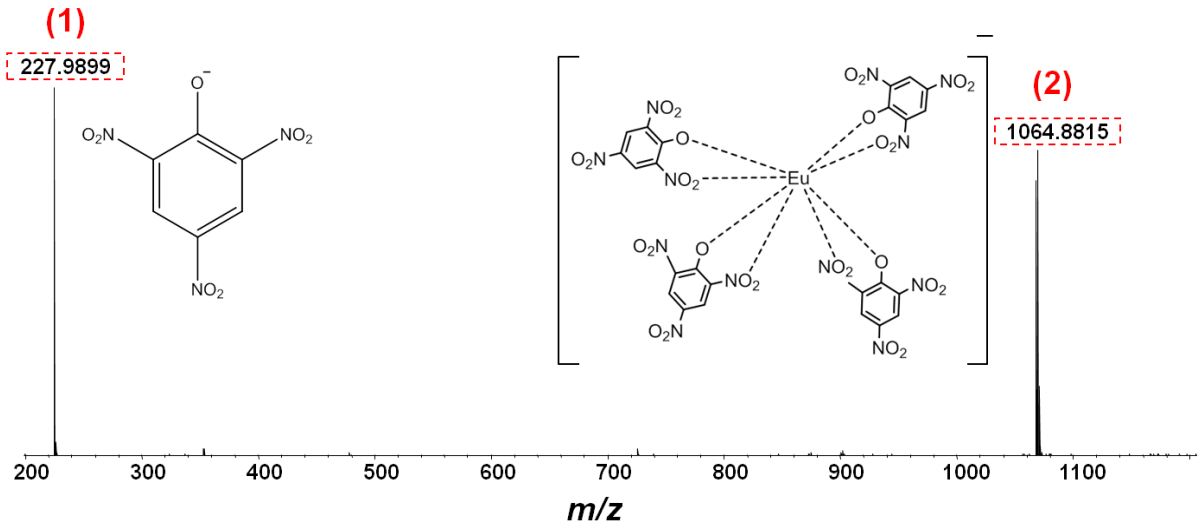


Figura 25. ESI(-)-FT-ICR MS de [Eu(PIC)$_3$.xH$_2$O].

Na **Figura 26** é apresentado o espectro de ESI(+)-FT-ICR MS para [Eu(PIC)$_3$(NMK)$_3$]. Os íons diagnóstico [Eu(PIC)$_2$(NMK)$_2$ - 2H]$^+$ de *m/z* 863.0986 **(6)**, [Eu(PIC)$_2$(NMK)$_3$ - 2H]$^+$ de *m/z* 990.1985 **(7)**, e [Eu(PIC)$_2$(NMK)$_4$ - 2H]$^+$ de *m/z* 1117.2983 **(8)** identificam o complexo [Eu(PIC)$_3$(NMK)$_3$]. Foram detectados também os íons [Ca(PIC)(NMK)$_2$ - H]$^+$ de *m/z* 522.1508 **(3)**, [Ca(PIC)(NMK)$_3$ - H]$^+$ de *m/z* 649.2504 **(4)**, e [Ca(PIC)(NMK)$_4$ - H]$^+$ de *m/z* 776.3502 **(5)**, constatando a presença do metal contaminante cálcio.

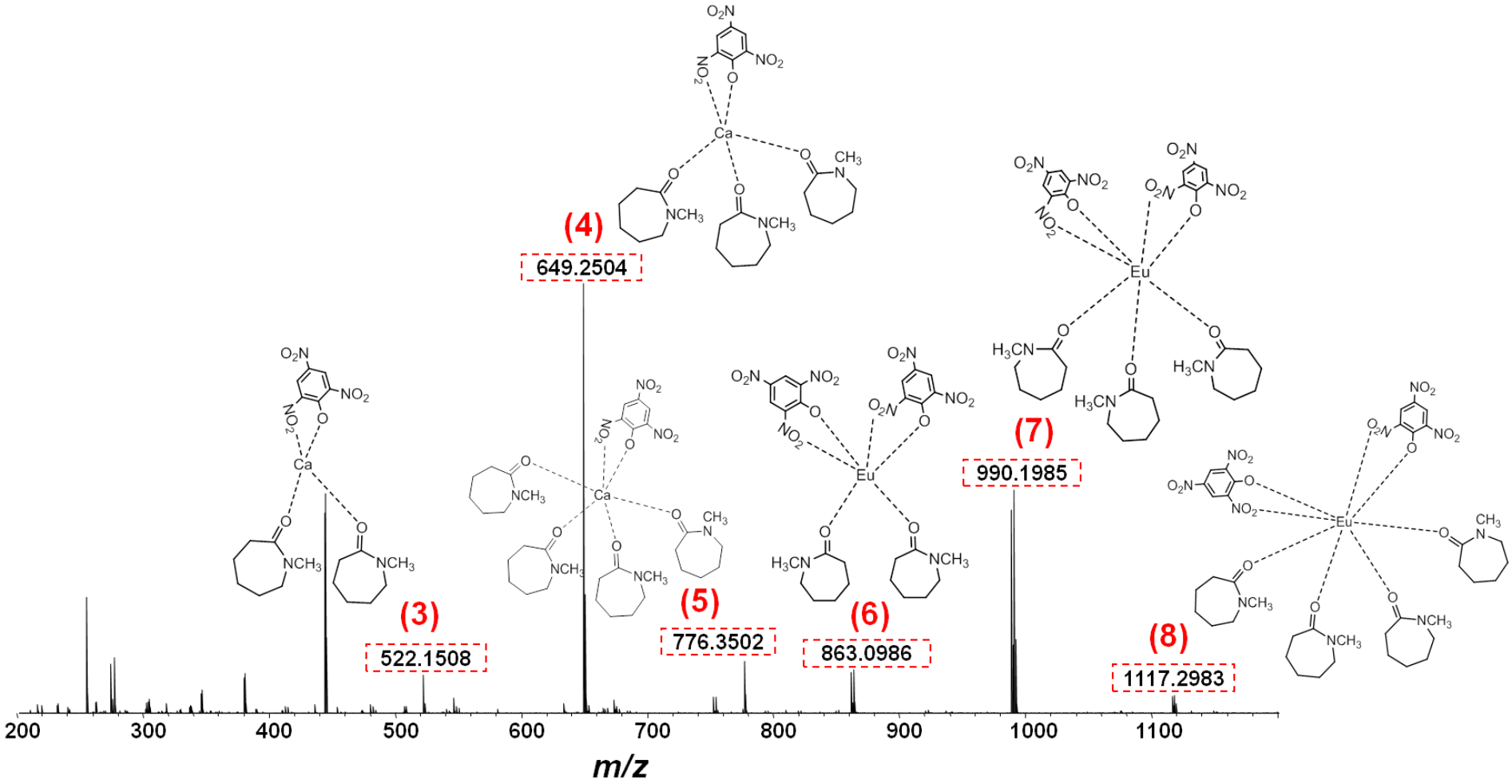


Figura 26. ESI(+)-FT-ICR MS de $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$.

As fórmulas moleculares, os valores de *m/z* experimentais e teóricos, e o erro de massa para os íons de *m/z* 228 **(1)**, 1064 **(2)**, 522 **(3)**, 649 **(4)**, 776 **(5)**, 863 **(6)**, 990 **(7)**, e 1117 **(8)** são apresentados na **Tabela 2**. Em todos os casos, os valores experimentais de *m/z* estão de acordo com os valores calculados, obtidos na maioria dos casos com desvios de massa inferiores a 1 ppm, demonstrando a alta exatidão da técnica. Por exemplo, o sinal **(8)** apresentou *m/z* experimental de 1117.2983 e foi identificado como sendo $[Eu(PIC)_2(NMK)_4 - 2H]^+$ de *m/z* teórico 117.2985, demonstrando um erro de massa igual a -0.18 ppm. Já nos sinais **(3)** e **(5)**, foi possível identificar as estruturas de seus íons com exatidão de massa até à quarta casa decimal (522.1598 e 776.3502, respectivamente).

Tabela 2. Fórmulas moleculares, valores de massa experimentais e teóricos, e erros de massa dos complexos de európio e de cálcio identificados por ESI(±)-FT-ICR MS.

Sinal	Íon	Fórmula molecular	$m/z_{experimental}$	$m/z_{teórico}$	Erro (ppm)
1	$[PIC - H]^-$	$C_6H_2N_3O_7^-$	227.9899	227.9898	0.44
2	$[Eu(PIC)_4 - 4H]^-$	$[Eu.C_{24}H_8N_{12}O_{28}]^-$	1064.8815	1064.8792	2.16
3	$[Ca(PIC)(NMK)_2 - H]^+$	$[Ca.C_{20}H_{28}N_5O_9]^+$	522.1508	522.1508	0
4	$[Ca(PIC)(NMK)_3 - H]^+$	$[Ca.C_{27}H_{41}N_6O_{10}]^+$	649.2504	649.2505	-0.15
5	$[Ca(PIC)(NMK)_4 - H]^+$	$[Ca.C_{34}H_{54}N_7O_{11}]^+$	776.3502	776.3502	0
6	$[Eu(PIC)_2(NMK)_2 - 2H]^+$	$[Eu.C_{26}H_{30}N_8O_{16}]^+$	863.0986	863.0989	-0.35
7	$[Eu(PIC)_2(NMK)_3 - 2H]^+$	$[Eu.C_{33}H_{43}N_9O_{17}]^+$	990.1985	990.1987	-0.20
8	$[Eu(PIC)_2(NMK)_4 - 2H]^+$	$[Eu.C_{40}H_{56}N_{10}O_{18}]^+$	1117.2983	1117.2985	-0.18

A presença de um átomo de Eu nos complexos também contribuiu para a identificação dos sinais, visto que o metal gera um padrão isotópico característico para os compostos. Conforme **Figura 27a-b**, a série isotopóloga experimental dos íons de *m/z* 1117.2983 **(a)** e 990.1985 **(b)** é bem próxima do padrão teórico calculado pelo *software Data Analyst*. Esta relação corrobora com as estruturas apresentadas na **Figura 26**.

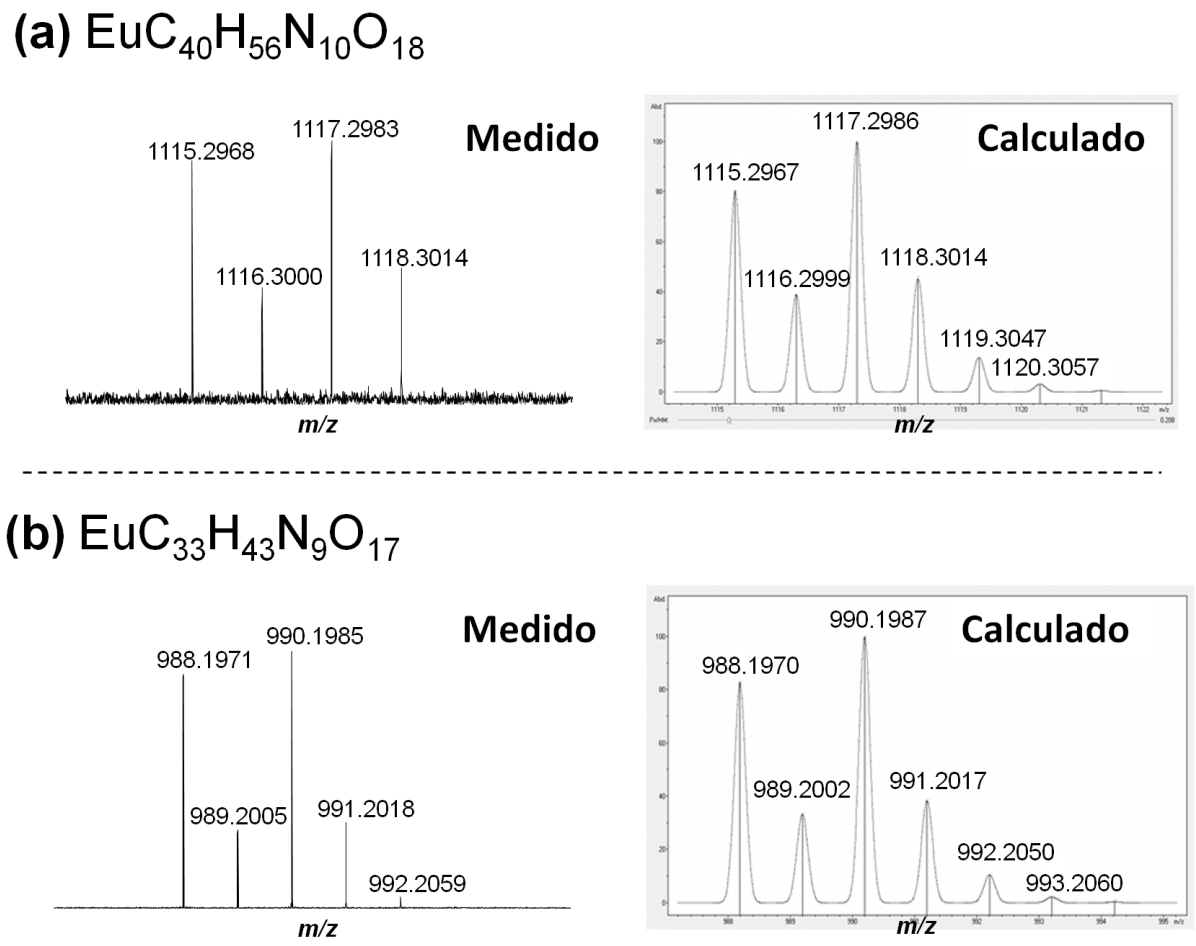


Figura 27. Série isotopóloga experimental e calculada dos íons **(a)** $[Eu(PIC)_2(NMK)_4]^+$ e **(b)** $[Eu(PIC)_2(NMK)_3]^+$. A série isotopóloga do marcador é bastante característica devido, principalmente, à presença de Eu, e se aproxima do padrão teórico calculado pelo *software* Analyst.

3.4.5. ESI (±) FT-ICR MS/MS

Para confirmar as estruturas e a conectividade dos complexos de európio, os espectros ESI(+)-MS/MS foram adquiridos para os íons $[Eu(PIC)_2(NMK)_3 - 2H]^+$, $[Eu(PIC)_2(NMK)_2 - 2H]^+$ e $[Ca(PIC)(NMK)_3 - H]^+$ de *m/z* 990, 863 e 649 (**Figuras 28a-c**), respectivamente. A partir de experimentos de CID foi identificada a perda neutra de 127 Da, característica de uma molécula de NMK ($C_7H_{12}N_1O_1$), para os íons: 990 → 863 **(a)**, 863 → 736 **(b)** e 649 → 522 **(c)**. Portanto, foi possível confirmar existência de NMK na estrutura dos complexos.

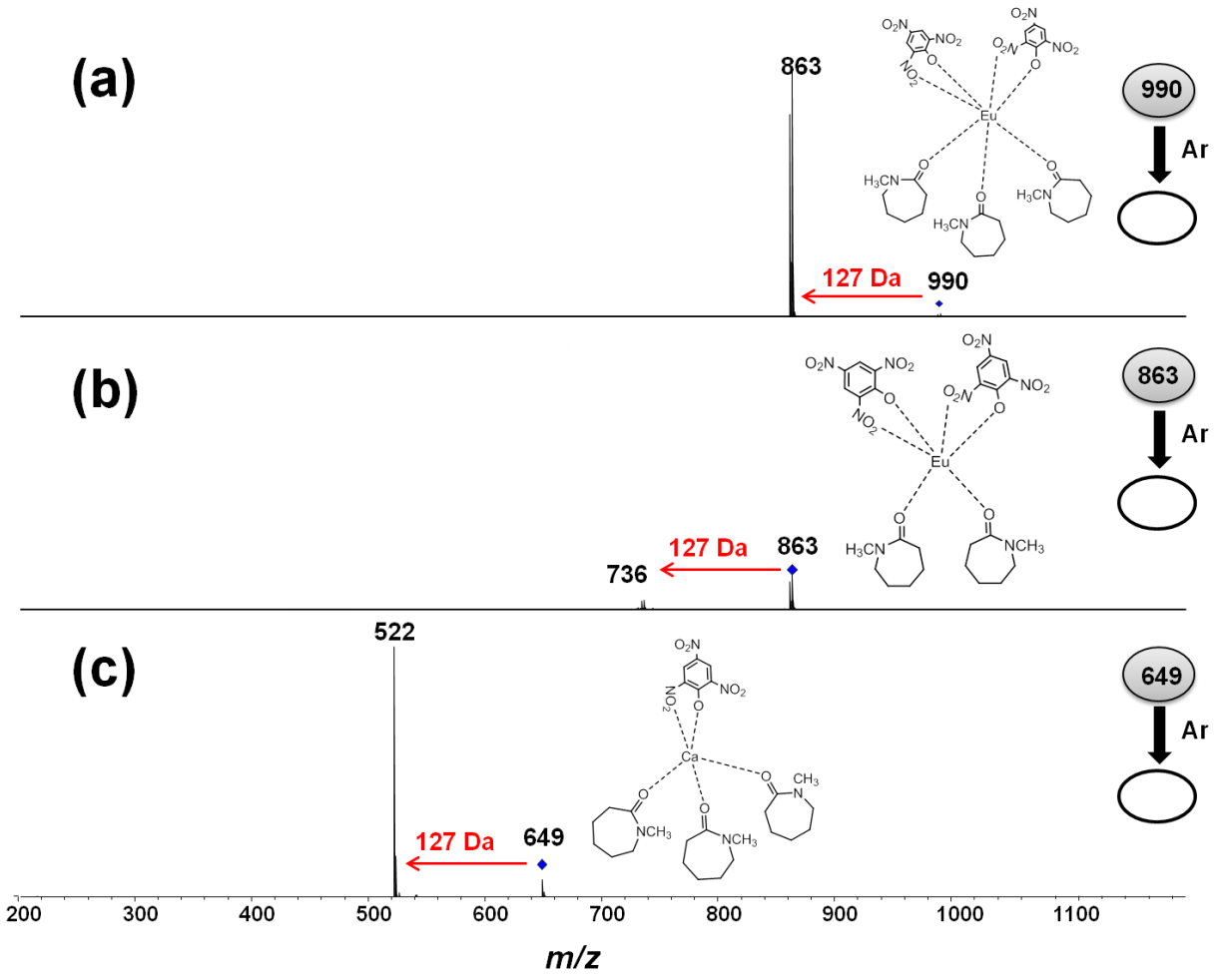


Figura 28. ESI(+)MS/MS para íons de *m/z* **(a)** 990, **(b)** 863 e **(c)** 649.

3.4.6. Determinação da fórmula estrutural do complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$.

De acordo com as informações obtidas através dos espectros vibracionais na região do IV e dos espectros de ESI(±)-FT-ICR MS do complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$, o íon Eu (III) apresenta número de coordenação igual a nove, estando coordenado a três *n*-metil-ε-caprolactamas por meio dos oxigênios carbonílicos, e a três picratos bidentados, cada um coordenado de forma quelante por meio do oxigênio fenólico e de um oxigênio de um grupo o-nitro. A estrutura proposta para o complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ foi confirmada por MACRINO [39] através de difratometria de raios-X pelo método do monocristal e é representada na **Figura 29**.

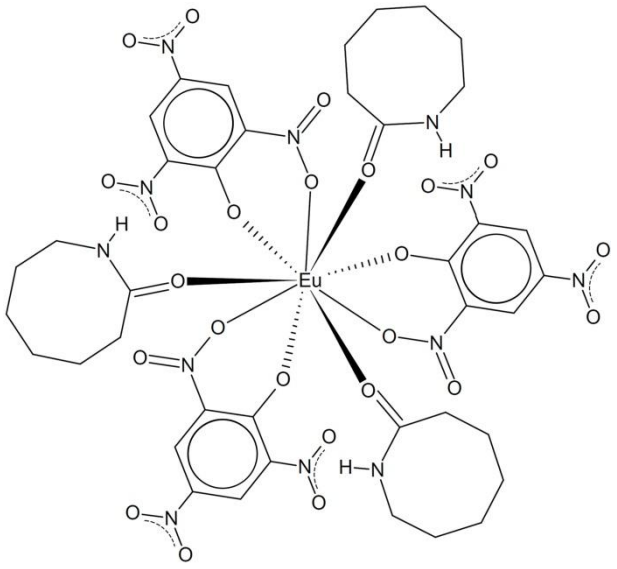


Figura 29. Esquema da fórmula estrutural proposta para o complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ [39].

3.5. CONCLUSÃO

As propriedades ópticas dos complexos de európio sintetizados foram testadas e apenas $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ apresentou as características desejadas para ser aplicado como marcador de GSR. Seu espectro de emissão mostrou forte emissão na região do vermelho, cor característica do íon Eu^{3+}. Portanto, o marcador óptico escolhido foi o complexo lantanídico $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$, formado a partir do íon Eu^{3+} coordenado a três ácidos pícricos (PIC) e a três moléculas de *n*-metil-ε-caprolactama (NMK). Através das análises por ATR-FTIR, TGA/DTA e ESI-FT-ICR MS foi possível propor uma estrutura para o complexo, que foi confirmada por medida de difração de raios-X. De acordo com as análises, o íon Eu (III) apresenta número de coordenação igual a nove, estando coordenado a três NMK através do oxigênio de sua carbonila e a três picratos bidentados, cada um coordenado de forma quelante por meio do oxigênio fenólico e de um oxigênio de um grupo o-nitro.

4. CAPÍTULO 2: Detecção visual e química do marcador no GSR

4.1. INTRODUÇÃO

A utilização de marcadores químicos de munições que emitem luz quando fotoexcitados vem sendo estudada no Brasil [23,24,25]. A técnica apresenta diversas vantagens em relação às metodologias até então padronizadas e empregadas na análise de GSR e da trajetória de tiro. A munição marcada possibilita não somente a identificação do atirador, como também auxilia na avaliação da cena do crime a na determinação da dinâmica dos fatos de forma imediata e com maior eficácia e precisão. Como os resíduos ficam depositados no atirador, na vítima e no ambiente onde ocorreu o disparo, as propriedades ópticas do marcador possibilitam a visualização precisa do vestígio no local do crime utilizando equipamentos portáteis e baratos que emitem luz ultravioleta. Dessa forma, é possível inferir sobre a posição do atirador em relação ao alvo no momento do disparo, os alvos transfixados na trajetória do tiro e o trajeto do projétil no alvo, contribuindo para determinar o tipo de crime ocorrido, se homicídio, suicídio ou execução. O método também permite a análise química laboratorial do GSR, propiciando resultados seguros e confiáveis a respeito do vestígio e constituindo excepcional ferramenta pericial a ser aplicada na elucidação de crimes que envolvam o uso de armas de fogo. Outra vantagem é que a marcação pode ser adicionada às munições destinadas aos diversos órgãos de segurança pública dos Estados em diferentes variações químicas e cores, permitindo assim o rastreamento de sua origem.

4.2. OBJETIVOS

4.2.1. Geral

Detecção visual e química do marcador no GSR.

4.2.2. Específicos

- Avaliar qualitativamente a presença do marcador fotoluminescente após disparos, no atirador, no ambiente do disparo, na arma e no cartucho deflagrado, variando a massa adicionada ao cartucho, pela detecção visual através de lâmpadas UV (395 nm) e por ESI-FT-ICR MS.

- Avaliar as propriedades ópticas do marcador no GSR.

- Estipular a massa ideal de marcador a ser adicionada à munições de calibre .38 e .40.

4.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1. Materiais e Reagentes

O marcador adicionado às munições foi o complexo fotoluminescente $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$, que tem como ligantes o ácido pícrico (PIC) e a *n*-metil-ε-caprolactama (NMK), de fórmula molecular $Eu(C_6H_2N_3O_7)_3.(C_7H_{13}NO)_3$. Conforme apresentado no CAPÌTILO 1, apenas $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ apresentou as características ópticas desejadas para ser testado como marcador de GSR.

Para a realização dos disparos foram utilizados cartuchos convencionais de calibre .38 SPL e .40 S&W, ambos da marca CBC, e armas de fogo do tipo revólver, de calibre .38, e do tipo pistola, de calibre .40, ambas da marca Taurus.

Ácido etilenodiamino tetra-acético (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado como agente complexante em *swabs* umedecidos. Nas análises por ESI(±)-FT-ICR MS foram usados acetonitrila, hidróxido de amônio, trifluoroacetato de sódio, arginina, e ácido fórmico obtidos da Sigma-Aldrich Chemicals, USA, e água ultrapura (18.2 MΩ cm, preparada por sistema de osmose reversa, Purelab Mk2 Ultra, UK). Todos os reagentes foram utilizados sem purificação.

4.3.2. Preparo das munições convencionais marcadas

A fim de avaliar a quantidade ideal de marcador a ser utilizada em munições de arma de fogo, cinco massas foram testadas em duplicata: 2, 5, 10, 25 e 50 mg. Cartuchos convencionais de calibre .38 foram desmontados, o marcador $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ foi adicionado à pólvora e, posteriormente, os projetis foram recolocados. Por razões de segurança, procedimentos de homogeneização não foram realizados. Foram preparadas, também, munições convencionais de calibre .40 com as massas de 25 e 50 mg do marcador. O esquema de preparação das munições marcadas é apresentado na **Figura 30a**.

4.3.3. Realização dos disparos

As sessões de disparos foram realizadas por voluntários na sala de tiro da Seção de Balística da Polícia Civil do Espírito Santo, Brasil. Os cartuchos foram

disparados a uma distância aproximada de 50 cm do alvo, em estande de tiro fechado (**Figura 30b**). A superfície do alvo e o chão do local foram forrados com tecido preto (TNT) para facilitar a detecção visual e eliminar a possibilidade de contaminação cruzada do GSR marcado. Em cada experimento foi utilizada uma arma diferente, sendo realizada a limpeza prévia.

4.3.4. Análise visual de GSR

Após cada disparo, foi realizada a análise visual do GSR utilizando lâmpadas com irradiação UV (λ = 395 nm). Foram analisados os braços e as mãos do atirador, o alvo, o ambiente, a arma de fogo e o cartucho deflagrado. As imagens foram registradas utilizando uma câmera profissional Nikon modelo D 3000 VR.

4.3.5. Coleta e preparo das amostras

Para as análises por ESI-FT-ICR MS, o GSR foi coletado por meio de esfregaço utilizando *swabs* embebidos com uma solução de EDTA 2% (w/v) e armazenados em tubos de polipropileno de 15 mL (**Figura 30c**). A cada tubo foi adicionado 10 mL de água e, em seguida, as amostras foram submetidas a um banho ultrassônico (Unique, Modelo UltraCleaner 1450, Brasil) por 20 min e 25 KHz e aquecidas em banho de água por 1 h a 100 °C. Posteriormente, 10 µl do extrato contendo o GSR marcado foi diluído numa mistura de acetonitrila/água (1:1, v/v %), produzindo um volume final de 1 mL. A solução resultante foi analisada por ESI(-)-FT-ICR MS conforme condições relatadas no *Procedimento Experimental* do CAPÍTULO 1.

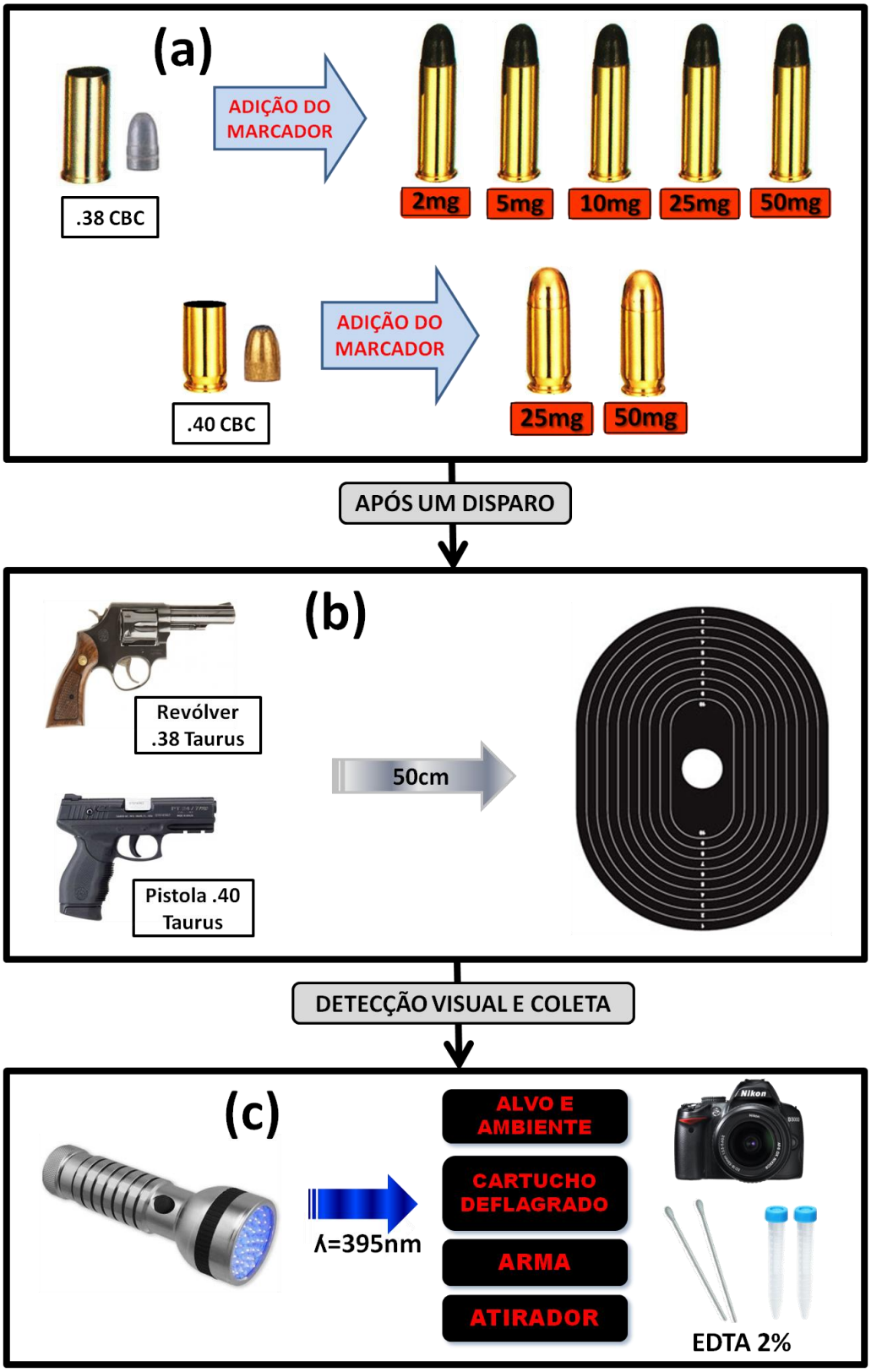


Figura 30. Esquema de **(a)** preparo dos cartuchos de calibre .38 e .40 convencionais marcados com diferentes massas de $Eu(PIC)_3(NMK)_3$, **(b)** produção de GSR após disparos com revólver .38 e pistola .40 a uma distância constante de 50 cm entre o atirador e o alvo, e **(c)** detecção do GSR sob irradiação UV em 395 nm e coleta através de *swab* umedecido com uma solução de EDTA 2% (w/v).

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. Análise visual de GSR

A adição de diferentes massas do complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ à pólvora das munições não interferiu na eficiência dos disparos. A composição do marcador pode ter, inclusive, contribuído para a deflagração da munição, haja vista as propriedades explosivas de um dos seus componentes, o PIC, e a capacidade deste formar compostos metálicos explosivos altamente inflamáveis [46].

A curva de TGA/DTA para $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ estudada no CAPÍTULO 1 deste trabalho mostrou que a decomposição do complexo ocorreu após aquecimento até 400° C. Apesar da temperatura interna do cano da arma poder atingir 2500°C durante um disparo, valor bem acima da temperatura relatada para a decomposição do complexo, a presença da fotoluminescência no GSR revelou que pode não haver decomposição total do marcador após os tiros. A **Figura 31** apresenta imagens do GSR sob irradiação de luz UV, após disparos com cartuchos .38 contendo 2, 5, 10, 25 e 50 mg do marcador $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$, na superfície do alvo, no ambiente, no estojo deflagrado, na arma de fogo e no atirador. Os resultados positivos foram obtidos nas regiões da superfície do alvo e no estojo deflagrado para todas as massas de marcador (2-50 mg), enquanto que no ambiente (chão), foi necessária massa ≥ 10 mg. A detecção no atirador e nas armas de fogo (**Figura 32**) foi apenas visualizada quando utilizadas as massas de 25 e 50 mg. Em todos os casos, a diminuição da quantidade do marcador afetou a capacidade de detecção visual do GSR.

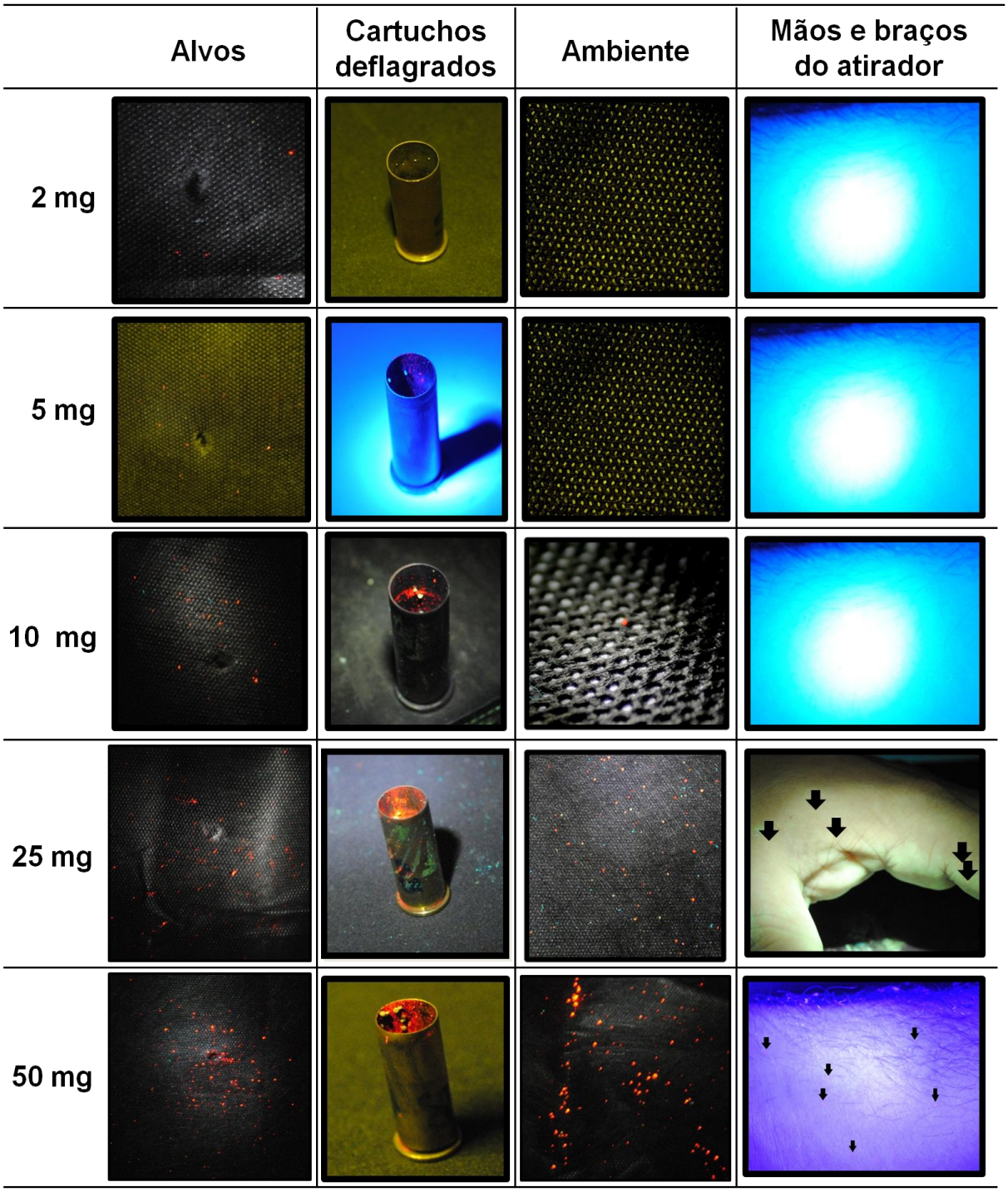


Figura 31. Imagens da detecção visual do GSR, sob irradiação de luz UV, após disparos com cartuchos contendo 2, 5, 10, 25 e 50 mg do marcador: alvo e chão (ambos cobertos por TNT de cor preta), cartucho deflagrado, e sobre o atirador. O marcador é indicado no atirador por setas pretas.

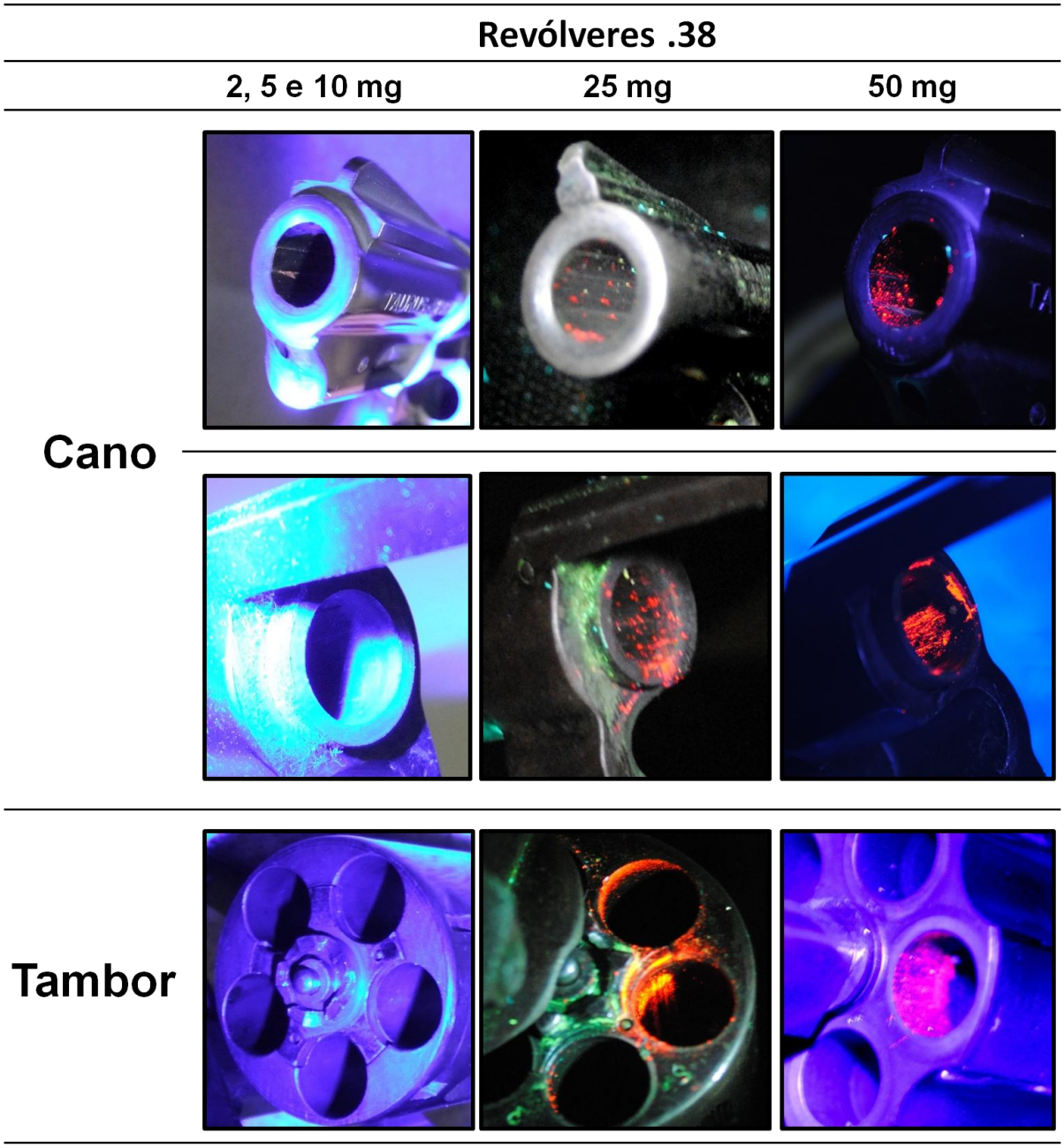


Figura 32. Imagens da detecção do GSR nas regiões do cano e da câmara do tambor de revólveres após efetuados disparos com cartuchos contendo 2, 5, 10, 25 e 50 mg.

Os tiros com munições de calibre .40 marcadas mostraram menor eficiência para o marcador. Após disparo com cartucho .40 marcado com 50 mg, obteve-se resultado positivo para todas as regiões analisadas. Já no disparo com cartucho .40 contendo 25 mg, não foi detectada a presença de fotoluminescente no atirador. Observou-se também menor emissão no GSR originado por cartuchos .40, quando comparado com o GSR dos cartuchos .38 marcados com as mesmas massas (25 e

50 mg). O melhor desempenho do marcador em cartuchos de calibre .38 ocorre devido os revólveres serem armas mais abertas na região da câmara do tambor (parte em que se insere o cartucho), liberando assim, uma maior quantidade de GSR [5]. Além disso, a velocidade final alcançada pelo projétil do revólver .38 é menor (229 m/s) do que a de pistola .40 (300 m/s) [47], o que causa dispersão mais lenta dos resíduos gerados durante o disparo, atingindo em maior proporção as mãos do atirador e o ambiente. Nas **Figuras 33 e 34** é apresentado o resultado visual dos disparos com os cartuchos .40 contendo 25 e 50 mg.

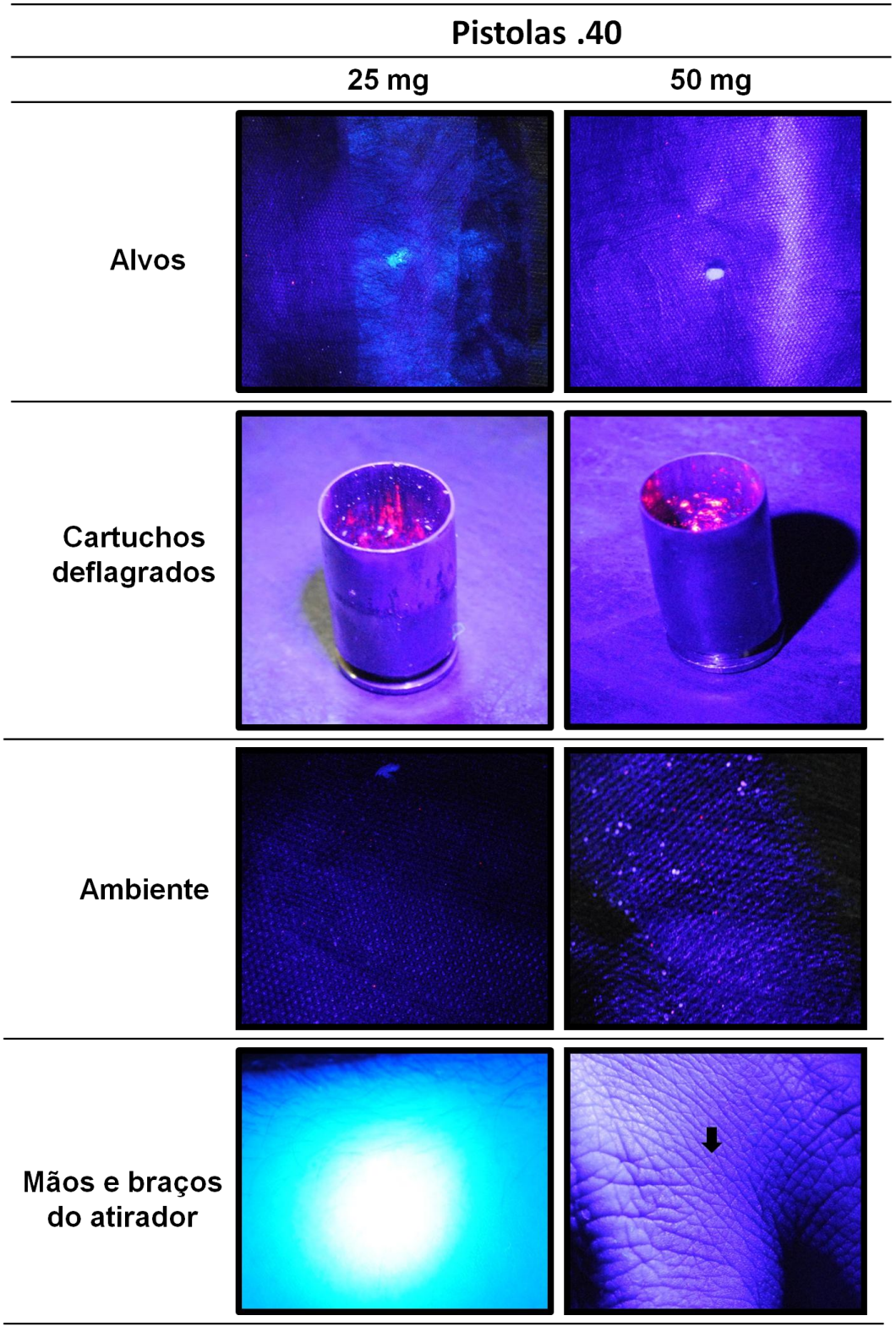


Figura 33. Imagens da detecção visual do GSR, sob irradiação de luz UV, após disparos com cartuchos .40 contendo 25 e 50 mg do marcador: alvos, cartuchos deflagrados, chão (ambiente) e sobre o atirador. O marcador é indicado no atirador por seta preta.

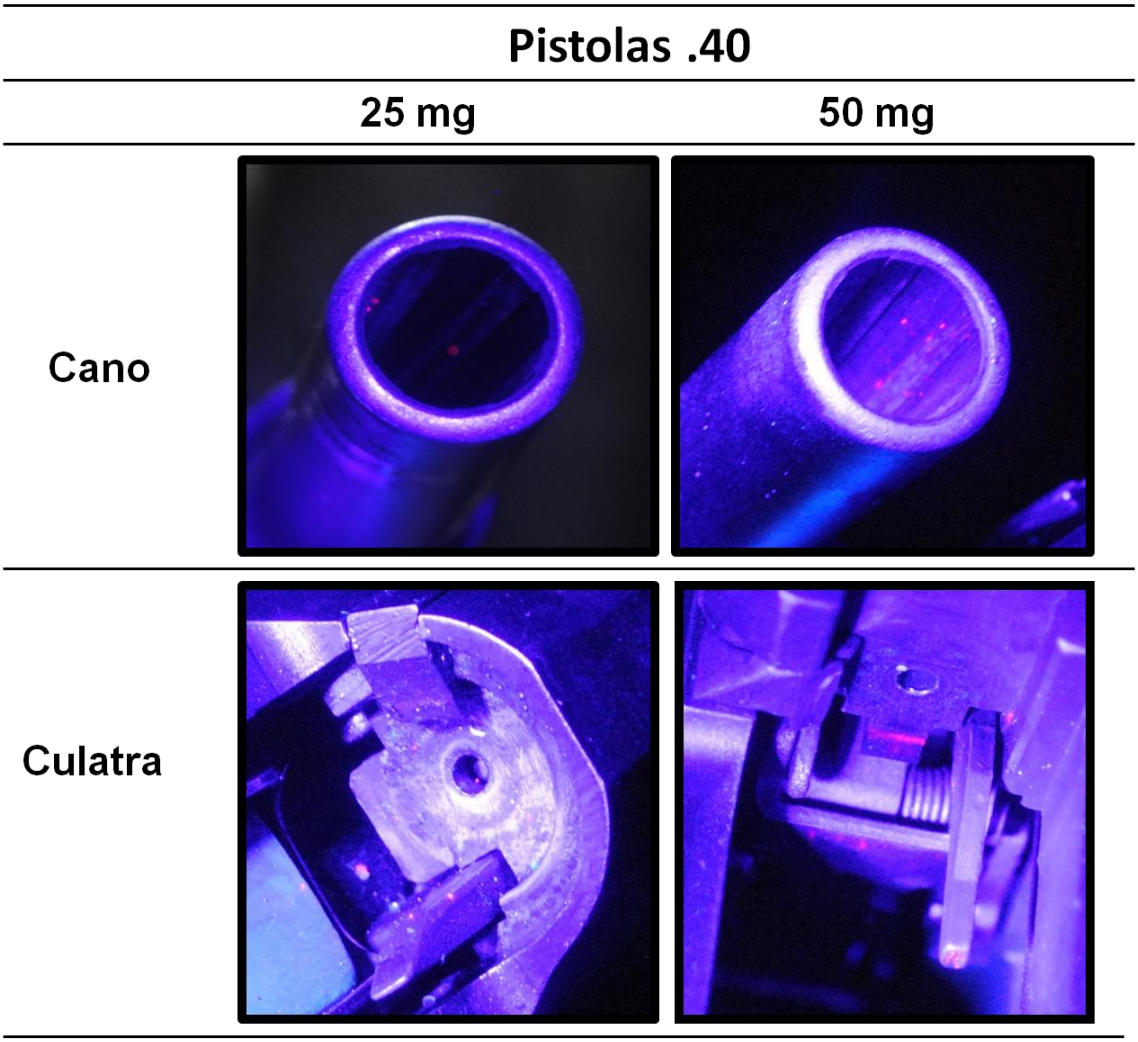


Figura 34. Imagens da detecção do marcador nas regiões do cano e da culatra de pistolas .40 quando efetuados disparos com cartuchos contendo 25 e 50 mg.

Portanto, para munições de calibre .38 a marcação com $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ foi eficiente quando utilizadas massas a partir de 25 mg por cartucho, enquanto que para munições de calibre .40 o melhor resultado foi observado com 50 mg. O custo final do processo foi avaliado para as duas marcações e os cálculos mostraram valor aproximado de US$ 80.00 por grama de marcador sintetizado em condições laboratoriais. Dessa forma, foi estimado o valor de US$ 2,00 por cartucho de calibre .38, no qual um grama do marcador é suficiente para marcar cerca de 40 cartuchos, e o valor de US$ 4,00 por cartucho de calibre .40, no qual um grama do marcador é suficiente para marcar cerca de 20 cartuchos.

As propriedades ópticas do material desenvolvido foram monitoradas em função do tempo, permanecendo inalterada a luminescência por mais de doze

meses após a realização do disparo, mesmo quando armazenada em ambiente úmido (**Figura 35**).

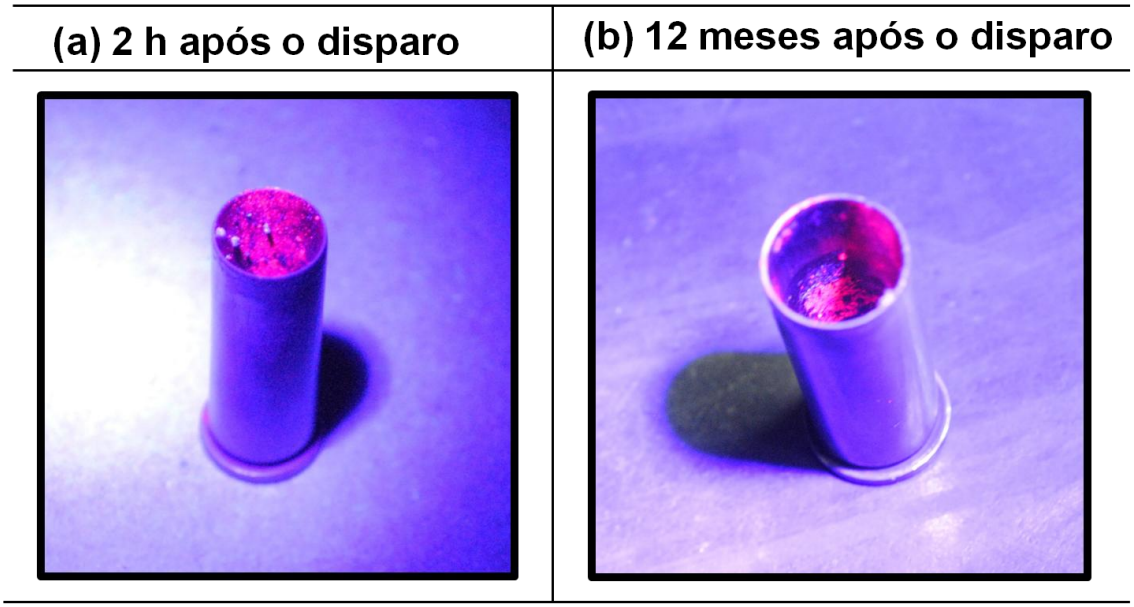


Figura 35. Detecção visual das propriedades ópticas do marcador **(a)** 2 horas e **(b)** 12 meses após a deflagração do cartucho.

Foi observado, ainda, que a luminescência emitida facilitou a extração do GSR marcado, já que tornou imediata e precisa a visualização das melhores áreas de coleta, o que não ocorre com o GSR convencional sem marcação. Além disso, a fotoluminescência foi detectada nos *swabs* após a coleta (**Figura 36**), favorecendo a constatação do vestígio mesmo após sua extração do local do disparo e confirmando a estabilidade do marcador. Portanto, os testes mostraram a eficácia e simplicidade do método, comprovando a resistência do complexo às altas temperaturas, sua inércia química e fotoluminescência elevada e duradoura.

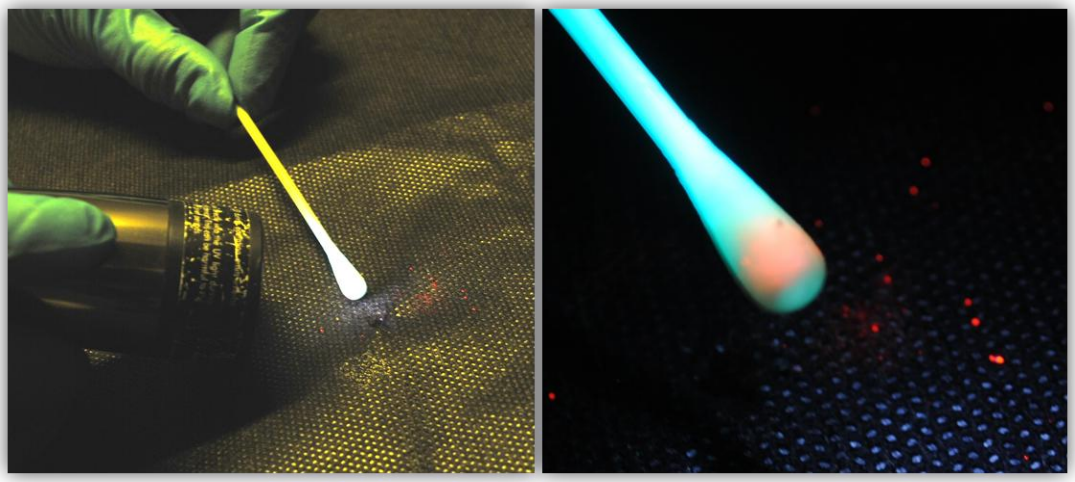


Figura 36. Coleta do GSR marcado utilizando a lanterna UV e *swab* embebido em EDTA 2% (à esquerda) e a fotoluminescência do marcador no *swab* (à direita).

4.4.2. ESI(-)-FT-ICR MS

O GSR de munições convencionais marcadas foi identificado por espectrometria de massa de ultra-alta resolução, ESI(-)-FT-ICR MS, conforme **Figura 37a-c**. Analisando os espectros de massa do GSR coletado de diferentes regiões (alvo **(a)**, mão do atirador **(b)** e arma de fogo **(c)**) após disparo com cartucho contendo 50 mg do marcador, em todos os casos o íon de *m/z* 440 foi identificado. Ele corresponde ao complexo [Eu(EDTA)] detectado na forma desprotonada, o íon diagnóstico $[Eu(EDTA) - 4H]^-$, de fórmula molecular $[Eu.C_{10}H_{12}N_2O_8]^+$. Foi observado erro de massa inferior a 1 ppm (-0.45 ppm) quando comparado o valor de *m/z* experimental (440.9810) e calculado (440.9812) para o íon $[Eu(EDTA) - 4H]^-$ detectado no alvo **(a)**, corroborando para a estrutura apresentada.

Complexos contendo ligantes quelantes apresentam constantes de estabilidade maiores do que complexos análogos que não contêm ligantes quelantes. Isso se deve ao efeito quelato, visto que quando uma das pontas de um ligante quelante se dissocia, o ligante ainda permanece ligado ao íon metálico por outros grupos doadores, de modo que a probabilidade da ponte dissociada se reconectar ao íon metálico é maior do que a probabilidade do ligante quelato ser deslocado por um segundo íon [17]. EDTA e íons de Eu^{3+} podem formar complexos com número de coordenação seis, cujo centro metálico é coordenado por quatro átomos de oxigênio dos carboxilatos e dois átomos de nitrogênio, todos oriundos da

molécula de EDTA [48]. O complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ possui número de coordenação igual a nove, apresentando três NMK coordenadas por meio de oxigênios carbonílicos e três PIC bidentados, cada um coordenado de forma quelante por meio do oxigênio fenólico e de um oxigênio de um grupo o-nitro [39]. Dessa forma, o complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ apresenta três ligantes bidentados, enquanto o EDTA se liga ao európio através de seis átomos doadores, sendo considerado um ligante polidentado. Essa diferença garante maior estabilidade ao complexo [Eu(EDTA)], justificando a provável dissociação do íon Eu do marcador $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ e a formação do complexo com o EDTA.

Também foi possível identificar no GSR do alvo **(37a)** e da arma de fogo **(37c)** a presença do ânion picrato em sua forma livre $[PIC - H]^-$, correspondente ao íon de *m/z* 227.

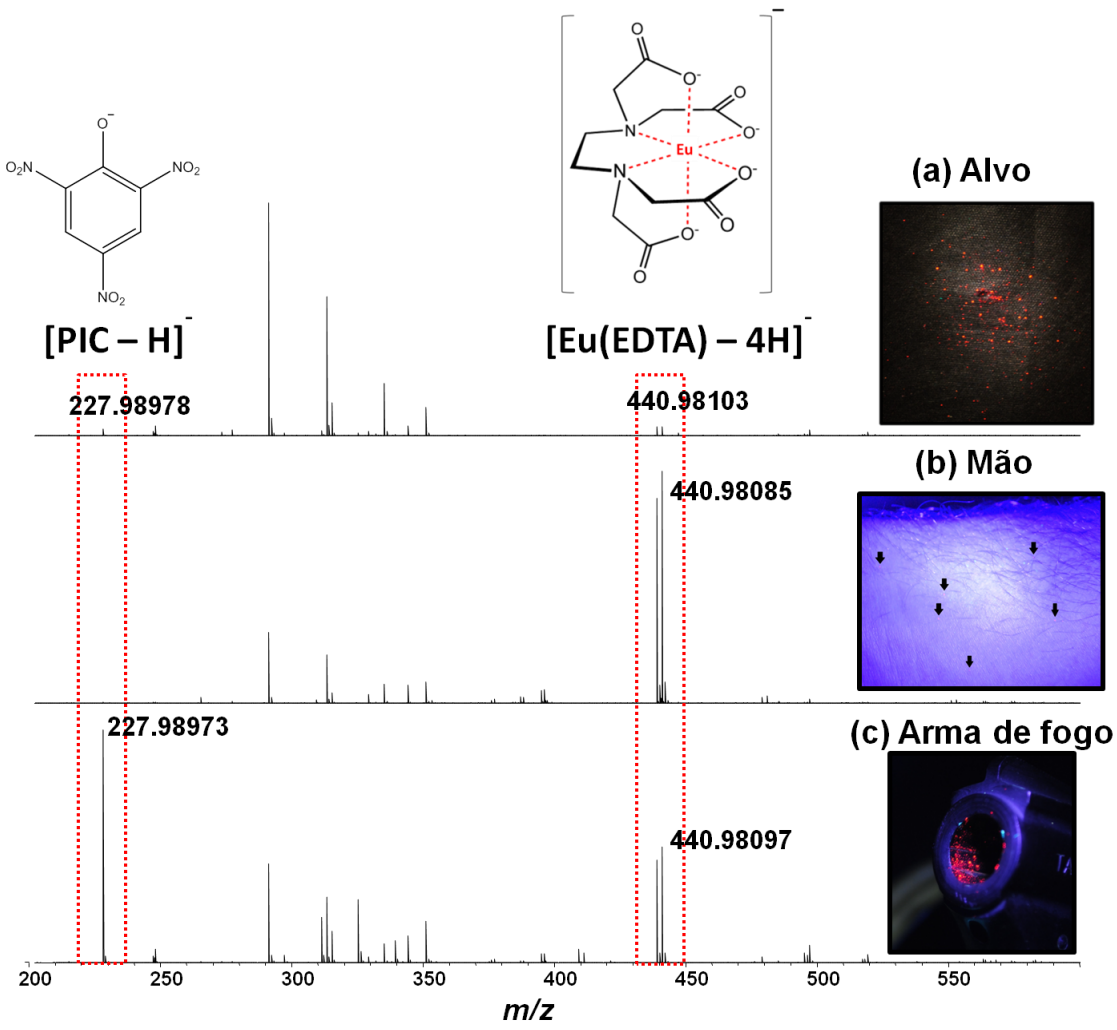


Figura 37. ESI(-)-FT-ICR MS de GSR detectado nas regiões do **(a)** alvo, **(b)** mão do atirador e **(c)** arma de fogo após disparo com cartucho contendo 50 mg do marcador.

Além disso, a série isotopóloga do íon [Eu(EDTA) - 4H]$^-$ corrobora com a presença do metal Eu, eliminando assim, a hipótese de Pb, Ba e Sb estarem na sua composição química (típicos marcadores presentes em GSR convencional), **Figura 38a-e**.

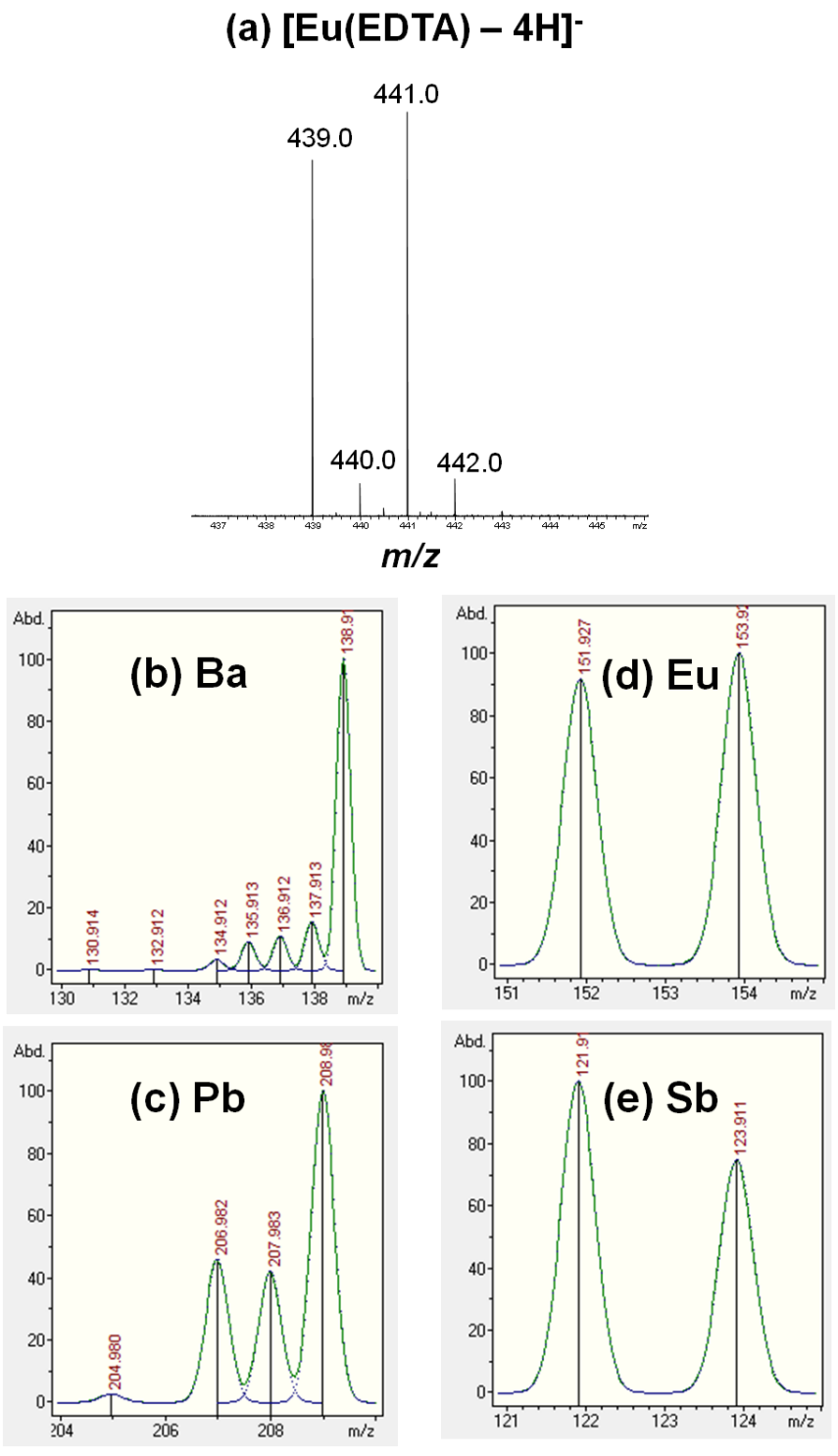


Figura 38. Comparação da série isotopóloga do **(a)** íon [Eu(EDTA) - 4H]$^-$ de m/z 441 e dos átomos **(b)** Ba, **(c)** Pb, **(d)** Eu e **(e)** Sb.

A técnica ESI(-)-FT-ICR MS também mostrou sensibilidade para detectar o GSR marcado coletado das mãos do atirador após disparos com cartuchos contendo pequenas massas (2 e 5 mg) de $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ (**Figura 39a-c**), o que não foi possível a partir da observação visual.

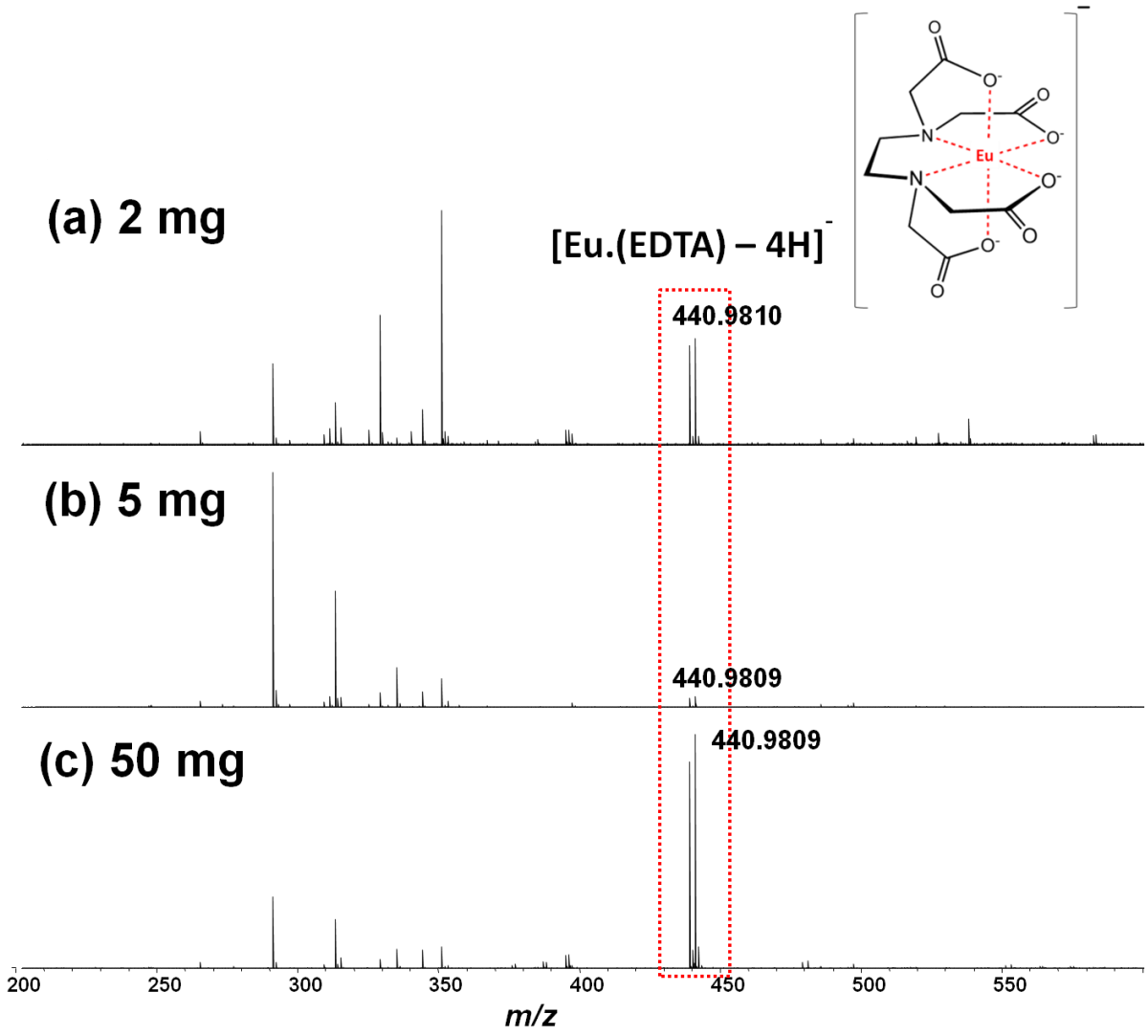


Figura 39. ESI(-)-FT ICR MS de GSRs coletados da mão direita dos atiradores após disparos com cartuchos marcados com **(a)** 2, **(b)** 5, e **(c)** 50 mg de $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$.

4.5. CONCLUSÃO

O complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ mostrou-se eficiente como marcador de munições. Os testes indicaram que sua fotoluminescência é facilmente visível no GSR presente nas regiões da superfície do alvo, estojo deflagrado, arma de fogo e nas mãos e braços do atirador, quando são utilizados nos disparos cartuchos .38 contendo massas a partir de 25 mg e cartuchos .40 contendo 50 mg do marcador. Essa diferença se deve à maior liberação e dispersão de GSR por revólveres .38, sendo necessária menor massa do complexo para gerar detecção. Também foi possível a sua identificação química na forma do íon diagnóstico $[Eu(EDTA) - 4H]^-$ através de ESI-FT-ICR MS, confirmando a presença do metal Eu nos resíduos. A técnica apresentou sensibilidade para detectar o complexo no GSR de munições marcadas com pequenas massas (2 e 5 mg por cartucho), nas quais a observação visual não foi eficiente. Portanto, o marcador se mostrou altamente fotoluminescente no GSR e suas propriedades ópticas permaneceram inalteradas após doze meses da realização do disparo. O custo final do processo também foi avaliado para as duas marcações e os cálculos mostraram valor aproximado de US$ 80.00 por grama de marcador sintetizado em condições laboratoriais. Dessa forma, foi estimado o valor de US$ 2,00 por cartucho de calibre .38, no qual um grama do marcador é suficiente para marcar cerca de 40 cartuchos, e o valor de US$ 4,00 por cartucho de calibre .40, no qual um grama do marcador é suficiente para marcar cerca de 20 cartuchos.

Como perspectivas para a continuação deste trabalho, o estudo da estabilidade do marcador quando submetido às condições de disparo com arma de fogo poderá fornecer informações mais conclusivas sobre o seu comportamento químico em altas temperaturas.

5. CAPÍTULO 3: Avaliação da toxicidade aguda do marcador fotoluminescente

5.1. INTRODUÇÃO

A toxicidade de uma substância a um organismo vivo pode ser considerada como a capacidade de lhe causar dano grave ou morte [49]. A ocorrência da resposta tóxica é dependente das propriedades químicas e físicas da substância, da condição de exposição e da susceptibilidade do sistema biológico ou do indivíduo. Assim, para se conhecer os efeitos tóxicos de uma substância, são realizados testes toxicológicos aplicados em animais de laboratório e sob condições previamente estabelecidas. Um dos estudos que pode ser realizado é o teste de toxicidade aguda.

A toxicidade aguda é definida como sendo os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após a administração de uma dose única ou doses múltiplas em 24 horas. Seu estudo tem como objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao cálculo da dose letal média (DL_{50}), ou seja, a probabilidade estatística de uma dose causar efeito letal em 50% dos animais de uma população [49].

Desde 2001, o protocolo 423, preconizado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), juntamente com os protocolos 420 e 425, substituiu o protocolo 401 para toxicidade aguda oral. Este último, altamente criticado pelas sociedades de proteção aos animais, determinava estatisticamente a DL_{50}, a partir de estudos com grupos de animais (normalmente vinte animais de ambos os sexos por grupo) expostos a doses crescentes da substância em estudo [50]. Os protocolos atualmente preconizados pela OECD são de grande aceitação pelos órgãos reguladores na avaliação da toxicidade aguda para qualquer tipo de substância, e atendem a requisitos da experimentação quanto aos princípios do bem estar animal [51].

5.1.1. Teste de Toxicidade Aguda (Protocolo 423 – OECD, 2011)

A determinação da toxicidade aguda, seguindo o protocolo 423 preconizado pela OECD para os ensaios de produtos químicos, classifica as substâncias de acordo com sistemas internacionalmente aceitos (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* - GHS) [52] e permite calcular um valor estimado de DL_{50}, sem, no entanto, empregar elevado número de animais. O método possibilita a determinação de um valor de DL_{50} somente quando, pelo menos, duas doses resultarem em mortalidade superior a 0 % e inferior a 100 %. A utilização de uma seleção de doses pré-definidas, independentemente da substância em teste, com a classificação especificamente dependente do número de animais observados em vários estados, melhora a oportunidade de se obter consistência de informação laboratorial e repetibilidade, empregando-se menor número de animais possível [53].

A substância é avaliada por meio de um processo passo a passo, em que cada etapa utiliza três animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas). Os animais recomendados para o ensaio são roedores, podendo ser ratos ou camundongos. Na avaliação de substâncias com baixa disponibilidade, pode ser empregado camundongo devido sua menor massa corporal quando comparado a ratos, o que garante a utilização de menor quantidade do material testado. A utilização de animais fêmeas é recomendada, pois, em testes convencionais de DL_{50}, observa-se que, apesar de existir uma pequena diferença de sensibilidade entre os sexos, as fêmeas são geralmente um pouco mais sensíveis. As fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas. Ausência ou presença de mortalidade dos animais tratados numa dada etapa associada ao composto determinará a etapa seguinte, ou seja: a não realização de mais testes, o emprego de três animais com a mesma dose, ou o emprego de três animais na próxima dose de valor superior ou inferior [53].

5.1.2. Ensaios bioquímicos de marcadores de função hepática e renal

Na prática clínica de pequenos animais é comum o estudo de marcadores séricos de função hepática e renal para a detecção de anormalidades desencadeadas por processos patológicos ou induzidas por agentes exógenos químicos. Neste trabalho serão avaliadas as concentrações séricas de ureia,

creatinina, proteínas totais, albumina, aspartato aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gamaglutamil transferase (GGT).

A ureia, produto final do metabolismo das proteínas, após sua síntese no fígado é transportada pelo plasma até os rins, onde é filtrada pelos glomérulos. Embora seja excretada na urina, 40 % a 70 % é reabsorvida por difusão passiva pelos túbulos e seus níveis sanguíneos podem servir como índice da taxa de filtração glomerular. Enfermidades renais com diferentes tipos de lesões causam o aumento dos teores de ureia plasmática, porém o seu uso como indicador da função renal é limitado pela interferência nos resultados causada por fatores não renais. O indicador mais recomendado para avaliar a função renal é a creatinina, devido sua taxa de excreção ser relativamente constante e sua produção não ser influenciada pelo metabolismo proteico ou por outros fatores externos. Além disso, os teores de creatinina sérica são mais sensíveis e específicos do que a medida da concentração da ureia plasmática no estudo da taxa de filtração glomerular reduzida. A creatinina é produzida como resultado da desidratação não enzimática da creatina muscular. Ela é sintetizada no fígado, nos rins e no pâncreas por duas reações mediadas enzimaticamente, e é transportada no sangue para outros órgãos, como músculos e cérebro, onde é fosforilada a creatina-fosfato, constituindo fonte de alta energia para os órgãos [54]. Baixos níveis de ureia sanguínea fornecem indícios de uma melhora da função renal, mas podem ser encontrados na presença de insuficiência hepática. Por outro lado, o aumento dos teores de ureia e creatinina plasmática indicam redução na taxa de filtração glomerular e, consequentemente, menor excreção urinária [54,55].

As proteínas plasmáticas constituem um grupo de diversas proteínas que são sintetizadas no fígado e circulam no sangue e entre o espaço extracelular. A maioria das proteínas plasmáticas é sintetizada no fígado, mas podem ser produzidas em outros locais. Apresentam papéis bioquímicos específicos, e suas concentrações podem ser afetadas por processos patológicos, sendo utilizadas na investigação de várias doenças. A diminuição excessiva de proteínas no sangue é encontrada em diferentes doenças renais [54].

A albumina é a proteína presente em maior concentração no plasma humano, cerca de 60 %. Apesar de não apresentar atividade enzimática e hormonal conhecida, ela exerce a função de reserva proteica nos casos de depleção nutricional e de regulador osmótico, e constitui a principal proteína de transporte do

organismo. É sintetizada, fundamentalmente, pelas células do parênquima hepático e seus níveis séricos são dependentes da velocidade de síntese, da secreção pelas células hepáticas, da distribuição pelos líquidos corporais e da degradação. A diminuição da concentração de albumina no sangue pode ocorrer, entre outras causas, em função da diminuição ou defeito da síntese devido a dano hepatocelular [54].

A medida das enzimas plasmáticas serve como ferramenta diagnóstica já que alterações em suas atividades fornecerem indicadores sensíveis de lesão ou proliferação celular. Essas modificações ajudam a detectar e, em alguns casos, localizar a lesão tecidual, podendo contribuir também para monitorar o tratamento e a progressão da doença. Muitos processos patológicos envolvendo o fígado podem causar elevações proporcionalmente distintas nas enzimas hepáticas, uma vez que concentrações relativas das enzimas variam consideravelmente em diferentes tecidos, bem como podem ser induzidas por agentes exógenos químicos [54,55].

As enzimas transaminases, aspartato-aminotransferase e alanina-aminotransferase, catalisam a reação de transferência reversível de grupos amino em aminoácidos, exercendo papel central tanto na síntese como na degradação dessas moléculas. Elas são amplamente distribuídas nos tecidos, sendo encontradas em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. São consideradas indicadores sensíveis de dano hepatocelular, pois são liberadas para a circulação quando há lesões ou destruição das células hepáticas. A ALT é encontrada, principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80 % da AST está presente na mitocôndria, o que contribui para diferenciar o grau de danos sofridos pelos hepatócitos [54].

A fosfatase alcalina pertence a um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de vários fosfomonoésteres em pH alcalino. Ela está amplamente distribuída nos tecidos humanos, notadamente associada com membranas e superfícies celulares localizadas na mucosa do intestino delgado, fígado (canalículos biliares), nos túbulos renais, no baço e nos ossos. Elevações na atividade da FA sérica são comumente originárias do fígado e do osso. Qualquer forma de obstrução da árvore biliar induz a síntese de FA pelos hepatócitos [54].

A enzima gama-glutamiltranspeptidase está envolvida no transporte de aminoácidos e peptídeos através das membranas celulares, na síntese proteica e na regulação dos níveis de glutationa tecidual. Ela é encontrada no fígado, nas vias

biliares, nos rins, nos intestinos, na próstata, no pâncreas, nos pulmões, no cérebro e no coração. Apesar da atividade enzimática ser maior no rim, a enzima presente no soro tem origem, principalmente, no sistema hepatobiliar, apresentando importância clínica ligada às doenças do fígado e vias biliares [53]. É considerada marcador de lesão hepatobiliar de alta sensibilidade mas de pouca especificidade, visto que pode estar alterada por uso de medicações, álcool e várias doenças sistêmicas [56].

5.1.3. Toxicidade dos metais: Pb, Ba e Sb

Os elementos chumbo (Pb), bário (Ba) e antimônio (Sb), principais marcadores químicos presentes nos GSR inorgânicos de munições convencionais, são metais de origem natural ou provenientes de atividade humana definidos como microcontaminantes ambientais. São considerados elementos não essenciais e tóxicos, pois podem competir com os elementos essenciais e inibir suas funções, devido sua configuração eletrônica e propriedades similares, sendo facilmente absorvidos, distribuídos e bioacumulados. Portanto, o seu acúmulo no organismo humano representa grande risco à saúde, podendo levar a uma variedade de patologias [49,57].

O Pb é um dos principais elementos definidos como metal pesado, ou seja, metal de gravidade específica elevada e que apresenta forte atração por estruturas de tecidos biológicos e eliminação lenta [49]. Ele não possui função fisiológica conhecida no organismo humano e apresenta ação cumulativa que desencadeia um envenenamento crônico denominado saturnismo ou plumbismo. Pb provoca efeitos tóxicos graves em quase todos os órgãos e sistemas do corpo humano, afetando principalmente os sistemas neurológico, hematológico, metabólico e cardiovascular [49,58]. Os compostos de Pb inorgânico entram no organismo por ingestão (via predominante para a população em geral) ou por inalação (rota mais importante na exposição ocupacional) [57, 59-61]. De acordo com a *International Agency for Research on Câncer* (IARC), Pb é classificado como possivelmente carcinogênico para seres humanos (Grupo 2B), sendo seus compostos inorgânicos classificados como prováveis carcinógenos (Grupo 2A) e os compostos orgânicos como não classificáveis quanto a carcinogenicidade (Grupo 3) [62]. A DL_{50} do Pb foi avaliada quando o mesmo está ligado à cadeia carbônica, sendo denominado chumbo

orgânico. A DL_{50} do tetraetilchumbo, determinada por dose oral em camundongos, foi de 11 $mg.kg^{-1}$, e em ratos, foi de 1200 $\mu g.kg^{-1}$ [63].

O Ba possui como principal via de exposição humana a ingestão através de alimentos e bebidas, porém quando inalado pode também ser absorvido pelos pulmões ou diretamente a partir da membrana nasal para o sangue. Ele apresenta propriedades químicas que lhe permitem competir e substituir o cálcio no organismo humano, particularmente nos mecanismos relacionados com a liberação de catecolaminas e neurotransmissores supra-renais. Além disso, ele acumula nos ossos, sendo depositado preferencialmente nas áreas mais ativas de crescimento ósseo. A exposição a altas concentrações pode causar efeitos tóxicos no sistema cardiovascular, no sistema renal, além de hipertensão, fraqueza muscular e paralisia, hipocalemia, náuseas e vômitos [64]. Não há relato sobre carcinogenicidade de compostos que contenham o Ba na classificação da IARC. Foram relatados valores de DL_{50} oral para o cloreto de bário entre 300 e 500 $mg.kg^{-1}$ para camundongos e ratos. Para o carbonato de bário foi determinada DL_{50} oral igual a 200 $mg.kg^{-1}$ em camundongos e entre 1480 e 1500 $mg.kg^{-1}$ em ratos [65].

A exposição humana ao Sb se dá principalmente pela inalação dos vapores de óxidos do metal. Seus efeitos crônicos incluem alterações respiratórias (pneumonite, traqueíte, laringite, bronquite), alterações miocárdicas, além de dermatites e alergias de contato. Acredita-se que a inalação dos vapores de óxidos de Sb fere o revestimento celular das vias aéreas, sendo o fator desencadeador de uma reação sistêmica [65,66]. A IARC classifica o trióxido de antimônio como do Grupo 2B (possivelmente carcinogênico para seres humanos) e o trissulfeto de antimônio é classificado como do Grupo 3 (não classificável como carcinogênico para seres humanos) [62]. Os valores de DL_{50} orais relatados para o potássio tartarato de antimônio em animais experimentais variam de cerca de 115 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal em ratos a 600 $mg.kg^{-1}$ em camundongos [67].

Esses dados evidenciam a elevada exposição a substâncias tóxicas a que policias e atiradores são constantemente sujeitos em estandes e treinamentos de tiro onde são utilizadas munições convencionais. Dessa forma, o uso de munições que não possuam Pb, Ba e Sb em sua composição, mas que contenham marcadores fotoluminescentes, se torna uma alternativa para solucionar o problema da exposição crônica aos metais tóxicos e contribui para as investigações de crimes que envolvam o uso de arma de fogo.

Dados sobre a segurança do marcador fotoluminescente proposto neste trabalho são desconhecidos até o momento. Torna-se necessário, portanto, realizar ensaios toxicológicos para avaliar sua toxicidade (DL_{50}) e comparar com os efeitos tóxicos dos metais pesados presentes nos resíduos de tiro gerados por munições convencionais, a fim de determinar o GSR com menor efeito nocivo sobre a saúde humana e avaliar se é justificável o emprego do composto testado como marcador de resíduo de tiro.

5.2. OBJETIVOS

5.2.1. Geral

Avaliar a toxicidade aguda do complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$, empregando-se o protocolo 423 preconizado pela OECD (2001).

5.2.2. Específicos

- Estimar o valor de DL_{50} para o marcador, empregando-se o protocolo 423 preconizado pela OECD (2001).
- Classificar a toxicidade aguda por via oral do marcador, de acordo com a escala de toxicidade da GHS.
- Comparar os dados de toxicidade do marcador com os efeitos tóxicos dos metais pesados presentes nos resíduos de tiro gerados por munições convencionais.

5.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A toxicidade aguda do composto foi avaliada empregando-se o protocolo 423, preconizado pela OECD [53]. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Experimentação Animal para Análise Farmacológica da Universidade Vila Velha.

5.3.1. Materiais e Reagentes

O composto analisado no teste de toxicidade aguda foi o complexo fotoluminescente $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$, que tem como ligantes o ácido pícrico (PIC) e a *n*-metil-ε-caprolactama (NMK), de fórmula molecular $Eu(C_6H_2N_3O_7)_3.(C_7H_{13}NO)_3$.

5.3.2. Animais experimentais

Os experimentos com animais camundongos *wild type* (*Mus musculus*) foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991), após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES, Protocolo n° 026/2014). Os animais possuíam entre 8 a 12 semanas de idade no início dos experimentos ($massa_{média±dp}$ = 20,0 ± 2 g) e foram mantidos em gaiolas de polipropileno com no máximo três animais. Permaneceram em sala com sistema de umidade e temperatura controladas, ciclo claro-escuro de 12h e acesso à água e comida *ad libitum*. Esses animais foram fornecidos pelo Laboratório de Acompanhamento Experimental do Complexo Biopráticas – UVV.

5.3.3. Protocolo experimental

Uma semana anterior ao início do protocolo, foram alojados três animais por gaiola com livre acesso à ingestão de água e ração (ração Probiotério, Moinho Primor, S.A) *ad libitum*. Os animais foram alimentados com ração e água durante todo o experimento, exceto nas 3 a 4 horas de jejum de comida que foram submetidos antes da administração do composto e por 1 a 2 horas após a administração.

Após o período de jejum de 3 a 4 horas, em tempo (t) = 0, os animais foram pesados e a substância administrada, em dose única, por sonda gástrica utilizando um tubo estomacal ou cânula de intubação adequada (gavagem).

Foram utilizados três animais para cada passo (n=3, grupo controle, e n=3, grupo teste), sendo testada cada dose em duplicata (exceto a dose de 2000 $mg.kg^{-1}$, conforme especificado pelo protocolo 423). A dose de partida para o grupo teste foi de 50 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal (**Figura 40**) e o grupo controle (CON) recebeu o veículo (água potável) em volume médio igual ao do composto, por via oral, ambos em dose única. Após o tratamento, os animais foram observados atentamente por 4 horas e em seguida, diariamente por 14 dias e qualquer alteração comportamental foi anotada. Após o 14º dia, foi contabilizado o número de mortes para cálculo da DL_{50} e todos os animais sobreviventes foram anestesiados com Tiopental sódico 120 $mg.kg^{-1}$ por via intraperitonial, e foi realizada a toracotomia. O sangue foi coletado por punção cardíaca no ventrículo direito e adicionado a tubo sem adição de anticoagulante, para testes bioquímicos de marcadores de função hepática (albumina, AST, ALT, FAL, GGT) e renal (ureia, creatinina e proteínas totais). Em seguida os animais foram eutanasiados e seus rins e fígados foram extraídos.

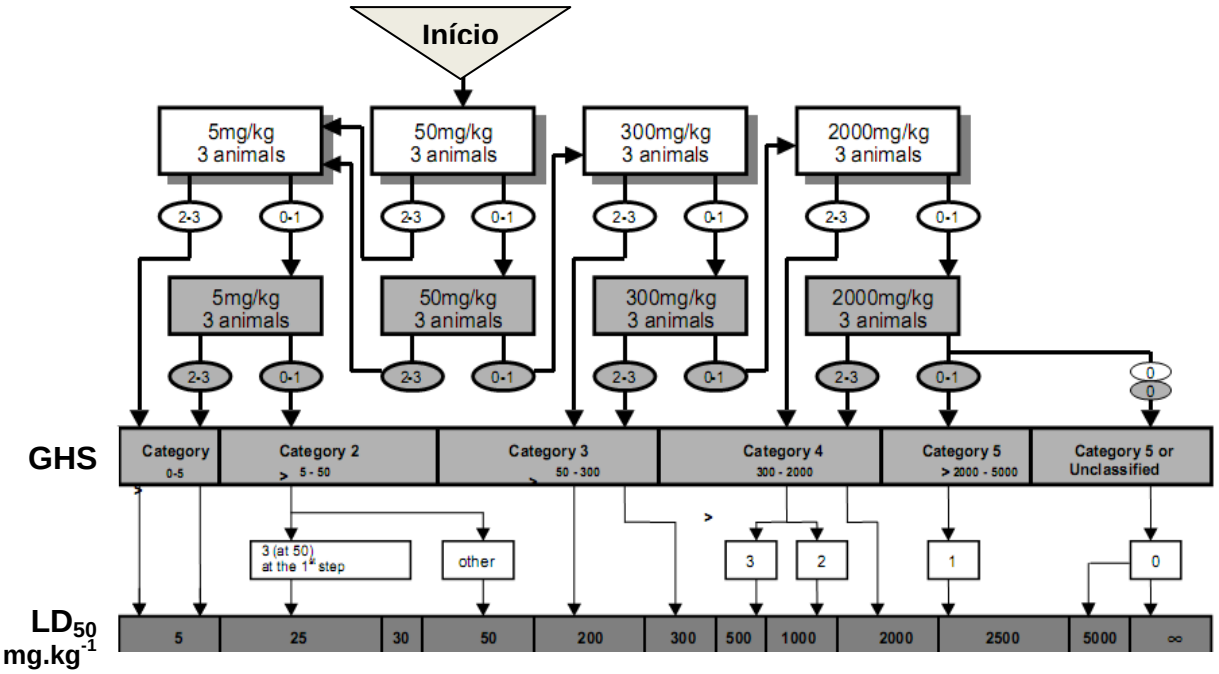


Figura 40. Esquema do protocolo 423 (OEDC, 2011) com dose de partida de 50 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal [53].

O peso dos animais foi medido individualmente no final do jejum (3-4h), e decorridos sete e quatorze dias da administração. Após os procedimentos relatados, os animais foram congelados e destinados a recolhimento especializado de lixo hospitalar.

Na **Figura 41** é apresentado um esquema cronológico com todos os procedimentos realizados com os animais em cada dose administrada.

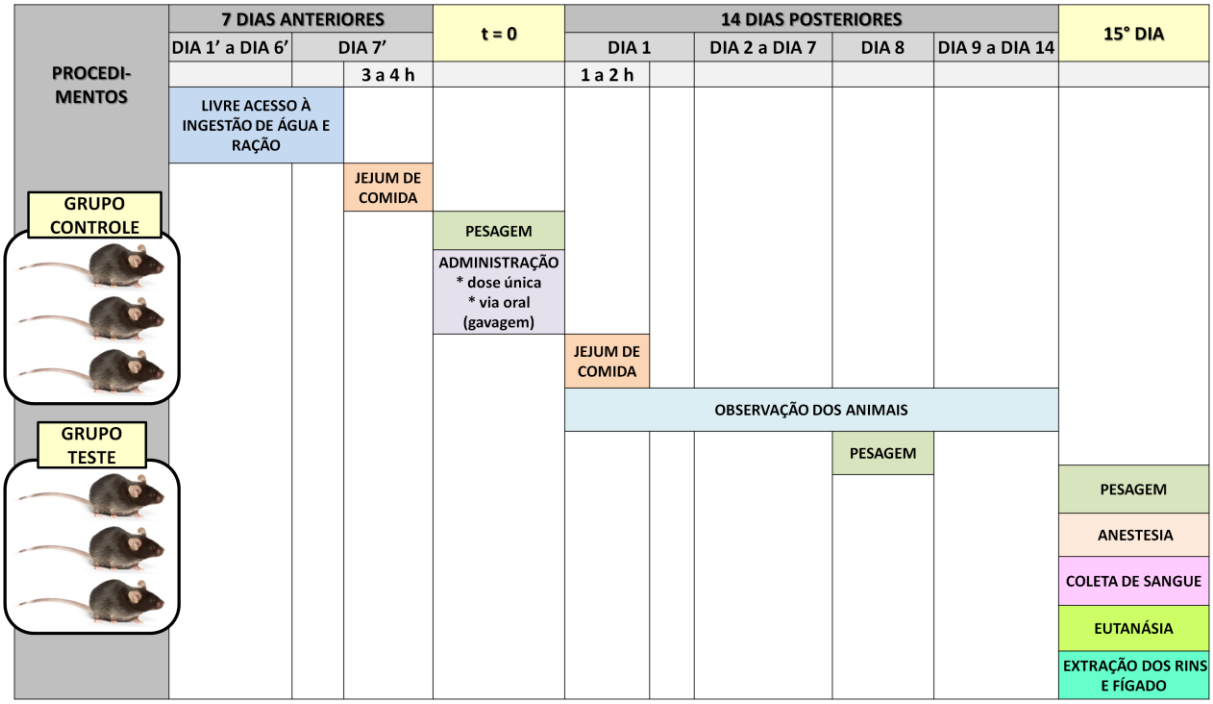


Figura 41. Esquema cronológico dos procedimentos executados em cada dose.

Os resultados observados nos experimentos foram registrados individualmente para cada animal e foram resumidos num quadro, indicando, para cada experiência, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentam sinais de toxicidade, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio e o números de animais que foram eutanasiados após o 14° dia. Foram realizadas, também, a descrição e a evolução temporal dos efeitos tóxicos e reversibilidade, e os resultados da autópsia.

5.3.4. Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas com o uso de um Analisador Bioquímico Semi-Automático e kits comerciais. Foram avaliadas as concentrações séricas de ureia, creatinina, proteínas totais, albumina, aspartato aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gamaglutamil transferase (GGT).

5.3.5. Análise estatística

Os resultados da avaliação dos pesos e das análises bioquímicas foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), a homecedasticidade foi avaliada empregando-se o teste de *Bartlett* e a significância da diferença entre as médias foi determinada por teste post-hoc pelo método de Tukey, ajustado para múltiplas comparações, ambos com significância aceita quando $p<0,05$.

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro a avaliar a toxicidade letal aguda do composto $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ em camundongos. Na **Figura 42**, apresenta-se um fluxograma das etapas do teste de toxicidade realizadas com o composto, mostrando o aumento da dose administrada em função do número de animais moribundos ou mortos na etapa anterior, tendo como dose de partida 50 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal. De acordo com os resultados, e em conformidade com o protocolo 423 (OECD, 2011), o complexo fotoluminescente apresentou DL_{50} de 1000 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal, e sua toxicidade aguda foi classificada como de categoria 4 na escala da GHS, que apresenta categorias de 1 a 5 (sendo a categoria 5 a mais segura), e desta forma considerado de média toxicidade [52].

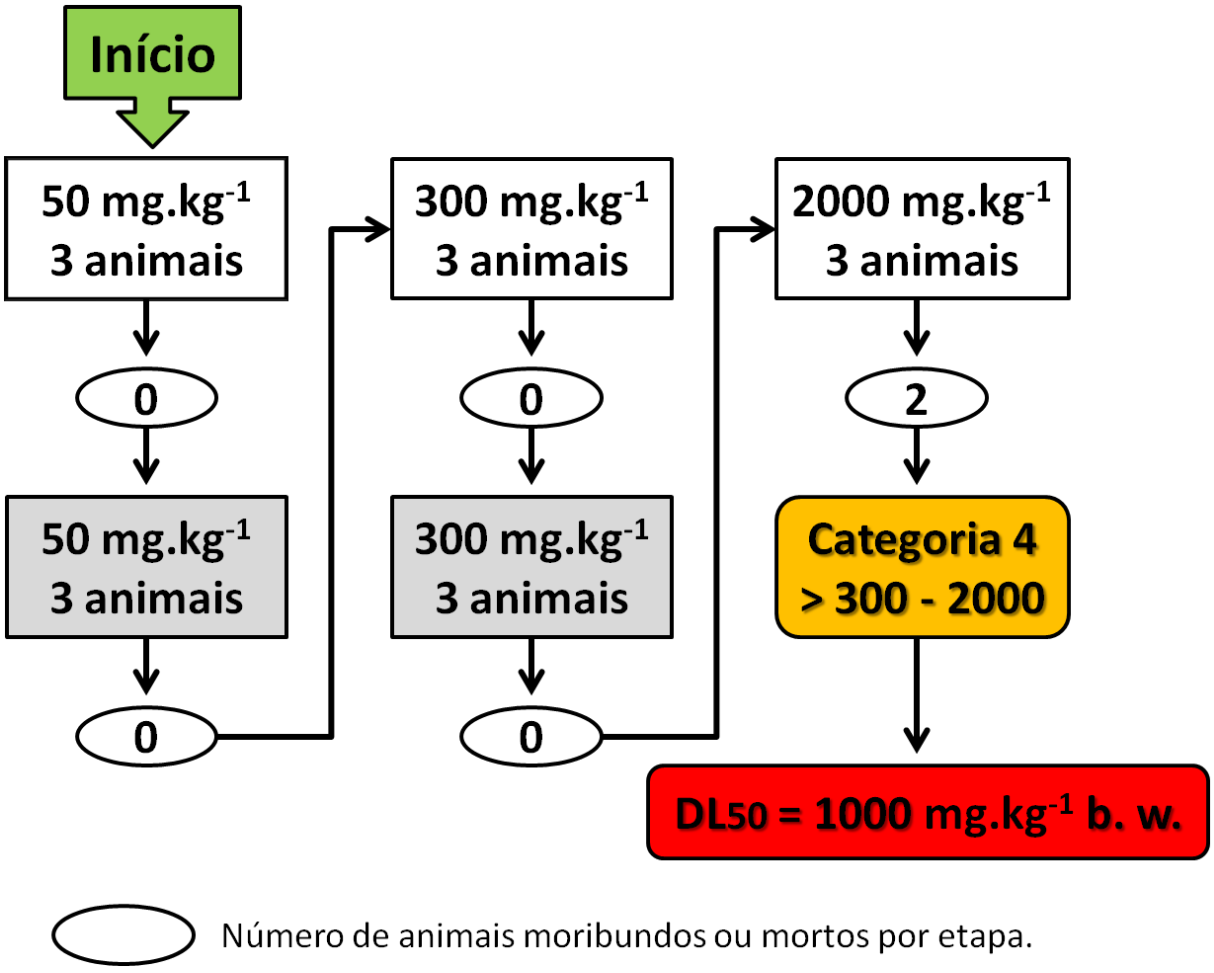


Figura 42. Fluxograma das etapas do teste de toxicidade e a determinação da DL_{50}.

O acompanhamento do peso corporal dos animais estudados é um importante indicador para avaliar a toxicidade de uma substância. No presente trabalho, em cada dose testada, os valores médios dos pesos corporais apresentaram variação semelhante ao longo dos 14 dias, quando comparados entre si o grupo controle (C) e o grupo teste (T), não sendo observada diferença ($p<0,05$). Conforme consta na **Tabela 3**, após a administração da dose de 50 $mg.kg^{-1}$ não houve variação nos valores médios dos pesos ao longo dos 14 dias, enquanto que nas doses de 300 e 2000 $mg.kg^{-1}$ foi observado um aumento proporcional entre os grupos C e T, embora sem diferença entre todas as doses avaliadas.

Tabela 3. Evolução do peso corporal dos animais tratados com as doses de 50 $mg.kg^{-1}$, 300 $mg.kg^{-1}$ e 2000 $mg.kg^{-1}$. Valores representados por média ± erro padrão da média.

DOSE ($mg.kg^{-1}$)	GRUPO	t = 0	APÓS 7 DIAS	APÓS 14 DIAS
50	**C**	20 ± 1	20 ± 2	20 ± 2
	T	21 ± 1	21 ± 2	21 ± 2
300	**C**	19 ± 2	19 ± 2	20 ± 2
	T	20 ± 3	21 ± 3	21 ± 2
2000	**C**	18 ± 1	20 ± 1	20 ± 1
	T	19 ± 1	19 ± 0	20 ± 0

O ensaio de toxicidade aguda, na menor dose testada (50 $mg.kg^{-1}$), não provocou efeitos comportamentais nos animais tratados e nem mortes foram observadas no período de 14 dias. Repetiu-se o teste nesta mesma dose com outros três animais, constatando-se o mesmo resultado. Na dose de 300 $mg.kg^{-1}$, durante as primeiras 4 horas, observou-se atividade motora reduzida, desorientação, perda da coordenação motora, respiração acelerada, taquicardia e tremores esporádicos em dois animais tratados, mas não houve mortes durante todo o período de avaliação (14 dias). Entretanto, estes sinais de toxicidade não foram observados

após 24 horas da administração. O resultado foi confirmado na replicata realizada utilizando a mesma dose. Nos animais que receberam o composto na dose de 2000 $mg.kg^{-1}$, foram constatadas as mesmas alterações citadas na dose anterior, porém em maior intensidade e frequência, sendo que dois animais foram a óbito na primeira hora após a administração e um animal sobreviveu depois dos 14 dias de observação, tendo os sinais de toxicidade revertidos após 24 h a administração. Seguindo os critérios do protocolo 423, a dose de 2000 $mg.kg^{-1}$ não foi repetida. Os resultados obtidos em todas as doses estão resumidos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Resultados da determinação da Toxicidade Aguda do composto fotoluminescente.

GRUPOS	DOSE ($mg.kg^{-1}$)	ANIMAIS UTILIZADOS	ANIMAIS COM ALTERAÇÕES	ANIMAIS MORTOS	ANIMAIS EUTANASIADOS
CONTROLE	veículo	15*	_	0	15
TESTE	50	3	0	0	3
	50	3	0	0	3
	300	3	2	0	3
	300	3	2	0	3
	2000	3	3	2	1

* Para cada grupo TESTE de 3 animais foi utilizado um grupo CONTROLE de 3 animais.

Neste estudo, não foi observada diferença nas concentrações de ureia e de creatinina quando comparados os grupos tratado e controle, sugerindo não haver sobrecarga renal. Pode-se inferir, também, que a substância avaliada não provoca danos renais, na concentração máxima de 300 $mg.kg^{-1}$, já que não foi observada diferença nas taxas de proteínas plasmáticas entre os grupos. Os indicadores de função hepática albumina, AST, ALT, FA e GGT também não apresentaram alterações estatísticas, indicando ausência de hepatopatia nos animais tratados. Portanto, os resultados mostraram não haver diferença entre os grupos tratados com

as doses de 50 e 300 mg.kg^{-1} e o grupo controle ($p<0,05$) para todos os parâmetros bioquímicos analisados, indicando segurança para o complexo [Eu(PIC)$_3$(NMK)$_3$] nessas doses. Mesmo nos animais que receberam a dose de 300 mg.kg^{-1} e apresentaram alterações comportamentais, não foi observada variação nas taxas bioquímicas, corroborando com essa interpretação. Os resultados das análises bioquímicas são apresentados na **Tabela 5**. Os valores relatados para a dose de 2000 mg.kg^{-1} são de apenas um animal, já que os outros dois camundongos do grupo tratado morreram na primeira hora após a administração. Observa-se que nesta dose, os valores dos parâmetros bioquímicos estão dentro da média do controle, exceto para o ALT.

Tabela 5. Resultados das análises bioquímicas após 14 dias da dose aguda do complexo [Eu(PIC)$_3$(NMK)$_3$]. Valores representados por média ± erro padrão da média.

PARÂMETROS	CONTROLE	50 mg.kg^{-1}	300 mg.kg^{-1}	2000 mg.kg^{-1}	Valor de P
Uréia (mg/dL)	46 ± 4	42 ± 5	42 ± 7	55	0,9162
Creatinina (mg/dL)	0,27 ± 0	0,28 ± 0	0,28 ± 0	0,27	0,7235
Proteína total (g/dL)	6,0 ± 1	5,9 ± 1	5,7 ± 0	5,32	0,5865
Albumina (g/dL)	2,5 ± 0	2,5 ± 0	2,9 ± 1	2,35	0,5096
AST (Ul/L)	136 ± 28	155 ± 19	215 ± 97	146	0,6396
ALT (Ul/L)	51 ± 6	51 ± 3	37 ± 15	70	0,5042
Fosfatase alcalina (Ul/L)	132 ± 25	140 ± 20	144 ± 34	153	0,9580
GGT (Ul/L)	5 ± 2	4 ± 2	3 ± 1	1	0,4914

Obs: Não foram considerados os valores da dose de 2000 mg.kg^{-1} para o cálculo de P.

Comparando os valores de DL_{50} oral de compostos contendo Pb, Ba e Sb com o valor estabelecido para $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ (**Tabela 6**), observa-se que em todos os casos as doses foram menores que a do complexo fotoluminescente. Em especial para o Pb, que mostrou a maior diferença em relação ao marcador, apresentando DL_{50} 90 vezes menor. Portanto, $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ apresentou uma maior margem de segurança quando comparado aos componentes inorgânicos de alta toxicidade presentes em munições convencionais, justificando o seu emprego como marcador de GSR.

Tabela 6. Valores de DL_{50} oral para camundogos [63, 65, 67].

DL_{50} ORAL			
Pb	**Ba**	**Sb**	**$Eu(PIC)_3(NMK)_3$**
$Pb(C_2H_5)_4$ 11 $mg.kg^{-1}$	**$BaCl_2$** 300-500 $mg.kg^{-1}$ *	**$C_8H_4K_2O_{12}Sb_2.3H_2O$** 600 $mg.kg^{-1}$	**1000 $mg.kg^{-1}$**
	$BaCO_3$ 200 $mg.kg^{-1}$		

* Faixa de valores de DL_{50} considerada para ratos e camundongos.

5.5. CONCLUSÃO

Os resultados do estudo de toxicidade aguda demonstraram que a administração oral do composto $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ em camundongos fêmeas causou mortalidade e/ou morbidade apenas na dose de 2000 $mg.kg^{-1}$, sendo classificado como de categoria 4 na escala GHS, com DL_{50} de 1000 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal. Em todas as doses não foi observada diferença nos pesos corporais e nos parâmetros bioquímicos dos animais do grupo teste e do grupo controle, mas foram constatados efeitos neurotóxicos quando administrado 300 e 2000 $mg.kg^{-1}$, que se apresentaram em maior intensidade e frequência na última dose. Apenas um animal sobreviveu após os 14 dias de observação na dose de 2000 $mg.kg^{-1}$. Desta maneira, de acordo com a classificação da GHS o composto fotoluminescente foi avaliado como de toxicidade média, apresentando uma maior margem de segurança quando comparado aos componentes inorgânicos de alta toxicidade presentes em munições convencionais (em especial o Pb), justificando o seu emprego como marcador de GSR. A DL_{50} do complexo proposto é 90 vezes maior do que a do Pb.

Como perspectivas para a continuação deste trabalho, os fígados e rins dos animais testados foram coletados para análise por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) com objetivo de determinar se houve acúmulo do metal európio nos órgãos em teste. Dessa forma, será possível avaliar com maior clareza a ocorrência de danos hepáticos e renais em função da exposição ao composto. Além disso, a determinação da toxicidade crônica do marcador por via inalatória e cutânea fornecerá informações mais fidedignas a respeito da ação tóxica sobre o organismo, haja vista a exposição ao GSR ser a longo prazo e pelas vias citadas.

6. CONCLUSÃO GERAL

O marcador óptico proposto é o complexo lantanídico $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$, que apresenta como ligantes o ácido pícrico (PIC) e a *n*-metil-ε-caprolactama (NMK). O espectro de emissão do composto confirmou a eficiência de emissão na cor vermelha característica do íon Eu^{3+}. De acordo com as análises por ATR-FTIR, TGA/DTA e ESI-FT-ICR, o íon Eu (III) apresenta número de coordenação igual a nove, estando coordenado a três NMK através do oxigênio de sua carbonila e a três picratos bidentados, cada um coordenado de forma quelante por meio do oxigênio fenólico e de um oxigênio de um grupo o-nitro. Essa estrutura foi confirmada por medida de difração de raios-X.

O complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ mostrou-se eficiente como marcador de munição. Os testes indicaram que sua fotoluminescência é facilmente visível no GSR quando são utilizados nos disparos cartuchos .38 contendo massas a partir de 25 mg e cartuchos .40 contendo 50 mg do marcador. Também foi possível a sua identificação química na forma do íon diagnóstico $[Eu(EDTA) - 4H]^-$ através de ESI-FT-ICR MS, confirmando a presença do metal Eu nos resíduos. A técnica apresentou sensibilidade para detectar o complexo no GSR de munições marcadas com pequenas massas (2 e 5 mg por cartucho), nas quais a observação visual não foi eficiente. Portanto, o marcador se mostrou altamente fotoluminescente no GSR e suas propriedades ópticas permaneceram inalteradas após doze meses da realização do disparo, comprovando sua estabilidade. O custo final do processo também foi avaliado para as duas marcações e os cálculos mostraram valor aproximado de US$ 80.00 por grama de marcador sintetizado em condições laboratoriais. Dessa forma, foi estimado o valor de US$ 2,00 por cartucho de calibre .38, no qual um grama do marcador é suficiente para marcar cerca de 40 cartuchos, e o valor de US$ 4,00 por cartucho de calibre .40, no qual um grama do marcador é suficiente para marcar cerca de 20 cartuchos.

Finalmente, sua toxicidade aguda foi testada através do Protocolo 423 (OECD, 2011) e apresentou DL_{50} de 1000 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal, sendo classificado como de categoria 4 na escala GHS, considerado, portanto, de média toxicidade. O composto mostrou ser menos tóxico do que os componentes

inorgânicos de munições convencionais (em especial o Pb), justificando o seu emprego como marcador de GSR.

Em termos gerais, a técnica de marcação de munições pelo complexo $[Eu(PIC)_3(NMK)_3]$ revelou-se promissora para a análise de resíduos de disparos de armas de fogo, possibilitando não somente a identificação do atirador como também a identificação precisa do GSR no local do disparo utilizando equipamentos portáteis e baratos que emitem luz UV. Dessa forma, os resultados apresentados ao longo deste trabalho, que envolveram deste as etapas de síntese, caracterização química, e aplicação do marcador, até estudos toxicológicos para a avaliação da viabilidade de seu uso, representam uma inovação na área criminalística para a elucidação de crimes que envolvam revólveres e pistolas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mapa da violência 2013: Mortes matadas por armas de fogo. Disponível em: www.mapadaviolencia.org.br. Acesso em 01 de julho de 2014.

2. Mapa da violência 2013: Homicídios e Juventude no Brasil. Disponível em: www.mapadaviolencia.org.br. Acesso em 01 de julho de 2014.

3. Meta 2: A impunidade como alvo. Disponível em: www.cnmp.mp.br/portal. Acesso em 01 de julho de 2014.

4. BRUNI, A. T.; VELHO, J. A.; OLIVEIRA, M. F. **Fundamentos da Química Forense**: uma análise prática da química que soluciona crimes. 1ª Ed. Campinas: Editora Millennium, 2012. 358 p.

5. TOCCHETTO, D. **Balística Forense**: Aspectos técnicos e jurídicos. 5ª Ed. São Paulo: Editora Millennium, 2009. 383 p.

6. ROMÃO, W.; SCHWAB, N. V.; BUENO, M. I. M. S.; SPARRAPAN, R.; EBERLIN, M. N.; MARTINY, A; SABINO, B. D.; MALDANER, A. O. Química Forense: perspectivas sobre novos métodos analíticos aplicados à documentoscopia, balística e drogas de abuso. *Quim. Nova*, **34**, 1717-1728, 2011.

7. DALBY, O.; BUTLER, D.; BIRKETT, J. W. Analysis of gunshot residue and associated materials-a review. *J. Forensic Sci.*, **55**, 924-943, 2010.

8. VANINI, G.; CARNEIRO, M. T. W. D.; SOUZA, R. M.; CASTRO, E. V. R.; DESTEFANI, C. A.; ROMAO, W. Analysis of gunshot residues produced by .38 caliber handguns using inductively couples plasma-optical emission spectrometry. *Microchem. J.,* **115**, 106-112, 2014.

9. SALLES, M. O.; NAOZUKA, J.; BERTOTTI, M. A forensic study: Lead determination in gunshot residues. *Microchem. J.*, **101**, 49–53, 2012.

10. REIS, E. L. T.; SARKIS, J. E. S.; RODRIGUES, C.; NETO, O. N.; VIEBIG, S. identificação de resíduos de disparos de armas de fogo por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo. *J. Forensic Sci.*, **27**, 409-413, 2003.

11. OLIVEIRA, M. F. Química Forense: a atualização da química na pesquisa de vestígio de crime. *Quím. Nova na Esc.*, **24**, 17-19, 2006.

12. PINTO, A. L.; MARTINY, A. Implantação de uma Rede de Microscopia Eletrônica para análise de provas periciais. *Perícia Federal*, ano VI, n. 22, setembro a

dezembro de 2005. Disponível em: www.apcf.org.br. Acesso em 01 de julho de 2014.

13. LENHARO, S. L. R.; QUEIROZ, C. M. S; JOST, M.; SATO, E. M.; MEINICKE, A. R.; SILVEIRA, A. L.. Contribuição à identificação de resíduos de disparo de arma de fogo. *Perícia Federal*, ano VI, n. 22, setembro a dezembro de 2005. Disponível em: www.apcf.org.br. Acesso em 01 de julho de 2014.

14. NIOSH. Reducing Exposure to Lead and Noise at Indoor Firing Ranges; U.S. Department of Health and Human Services (DHHS), National Institute Occupational Safety and Health (NIOSH), 2010, 113. Disponível em: www.cdc.gov. Acesso em 01 de julho de 2014.

15. PINTO, A. L.; OLIVEIRA, A. G.; MARTINY, A.; CARREIRO, A. P.; SILVA, L.; SADER, M. Análise de resíduos de tiro oriundos de munição sem chumbo por MEV/EDS. *Perícia Federal*, ano VI, n. 22, setembro a dezembro de 2005. Disponível em: www.apcf.org.br. Acesso em 01 de julho de 2014.

16. LEE, J. D. Química inorgânica não tão concisa. Tradução da 5ª Ed. Inglesa. São Paulo: Editora Blucher, 1999. 527 p.

17. JONES, C. J. A Química dos Elementos dos Blocos d e f. Porto Alegre: Editora Bookman, 2002. 184 p.

18. MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. Terras raras: aplicações industriais e biológicas. *Quim. Nova*, **28** (1), 111-117, 2005.

19. SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. Química Inorgânica. 4ª Ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2008. 847 p.

20. LIMA, P. P.; MALTA, O. L.; JUNIOR, S. A. Estudo espectroscópico de complexos de Eu^{3+}, Tb^{3+} e Gd^{3+} com ligantes derivados de ácidos dicarboxílicos. *Quim. Nova*, **28** (5), 805-808, 2005.

21. ANDRADE, A. V. M.; DA COSTA JR., N. B.; SIMAS, A. M.; LONGO, R. L.; MALTA, O. L.; SÁ, G. F. Uma metodologia para o projeto teórico de conversores moleculares de luz. *Quim. Nova*, **21**, 51-59, 1998.

22. WEISSMAN, S. I. Intramolecular Energy Transfer The Fluorescence of Complexes of Europium. *J. Chem. Phys*, **10**, 214-217, 1942.

23. WEBER, I. T.; DE MELO, A. J. G.; LUCENA, M. A. M.; RODRIGUES, M. O.; JUNIOR, S. A. High photoluminescent metal-organic frameworks as optical markers for the identification of gunshot residues. *Anal. Chem*., **83** (12), 4720-4723, 2011.

24. WEBER, I. T.; TERRA, I. A. A.; DE MELO, A. J. G.; LUCENA, M. A. M.; WANDERLEY, K. A.; PAIVA-SANTOS, C. O.; ANTÔNIO, S. G.; NUNES, L. A. O.; PAZ, F. A. A.; DE SÁ, G. F.; JUNIOR, S. A.; RODRIGUES, M. O. Up-conversion properties of lanthanide-organic frameworks and how to track ammunitions using these materials. *RSC Adv.*, **2**, 3083-3087, 2012.

25. DESTEFANI, C. A.; MOTTA, L. C.; VANINI, G.; SOUZA, L. M.; ALLOCHIO FILHO, J. F.; MACRINO, C. J.; SILVA, E. M.; GRECO, S. J.; ENDRINGER, D. C.; ROMÃO, W. Europium-Organic Complex as Luminescent Marker for the Visual Identification of Gunshot Residue and Characterization by Electrospray Ionization FT-ICR Mass Spectrometry. *Microchem. J.*, **116**, 216-224, 2014.

26. HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry**: Principles and Applications. 3ª Ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Bruxellas, Bélgica, 2007. 502p.

27. OBERACHER, H. On the use of different mass spectrometric techniques for characterization of sequence variability in genomic DNA. *Anal. Bioanal. Chem.*, **391**, 135–149, 2008.

28. SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Tradução da 7ª Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 490 p.

29. HAM, B. M. **Even electron mass spectrometry with bimolecular applications.** Hoboken: Jonh Wiley & Sons: 2008. 422 p.

30. ROMÃO, W. **Novas Aplicações da Espectrometria de Massas em Química Forense.** Tese de Doutorado. Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010. 170 p.

31. COLE, R. B. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **35**, 763-772, 2000.

32. KEBARLE, P. A. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. J. Mass Spectrom*., **35**, 804-817, 2000.

33. KEBARLE, P. A.; TANG, L. From ions in solution to ions in the gas phase. *Anal. Chem*., **65**, 972-986, 1993.

34. COLATI, K. A. P.; DALMASCHIO, G. P.; CASTRO, E. V. R.; GOMES, A. O.; VAZ, B. G.; ROMÃO, W. Monitoring the liquid/liquid extraction of naphthenic acids in brazilian crude oil using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry (ESI FT-ICR MS). *Fuel*, **108**, 647-655, 2013.

35. DALMASCHIO, G. P.; MALACARNE, M. M.; ALMEIDA, V. M. D. L.; PEREIRA, T. M. C.; GOMES, A. O.; CASTRO, E. V. R.; GRECO, S. J.; VAZ, B. G.; ROMÃO, W. Characterization of polar compounds in a true boiling point distillation system using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Fuel*, **115**, 190-202, 2014.

36. VAZ, B. G. **Petroleômica por FT-ICR MS: Desvendando a Composição de Polares do Petróleo e Derivados**. Tese de Doutorado. Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011. 154 p.

37. MARSHALL, A. G.; HENDRICKSON, C. L.; ERNMETTA, M. R.; RODGERS, R. P.; BLAKNEY, G. T.; NILSSON, C. L. Fourier transform ion cyclotron resonance: state of the art. *Eur. J. Mass Spectrom.*, **13,** 57-9, 2007.

38. PEREIRA, T. M. C. **Aplicações da Espectrometria de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier (FT-ICR ms) em Petroleômica**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013. 136 p.

39. MACRINO, C. J. **Estudo Comparativo da Fotoluminescência dos Picratos de Európio (III) com a 2-azaciclooctanona e N-metil-2-azacicloheptanona.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013. 81 p.

40. BARBOSA, L. C. A. Introdução à Química Orgânica. 2ª Ed. São Paulo: Pearson, 2011. 331 p.

41. LUIZ, J. M.; MATOS, J. R.; GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. Thermal behaviour of the basic carbonates of lanthanum-europium. *Thermochim. Acta*, **254**, 209-218, 1995.

42. D' ASSUNÇÃO, L. M.; GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. Thermal decomposition of the hydrated basic carbonates of lanthanides and yttrium. *Thermochim. Acta*, **137**, 319-330, 1989.

43. LIU, S.; MA, R. Synthesis and structure of hydrated europium carbonate. *J. Cryst. Growth,* **169**, 190-192, 1996.

44. MELO, W. C.; ZAIN, M.; MATOS, J. R.; ISOLANI, P. C.; ZINNER, K.; ZINNER, L. B. Studies of neodymium, europium and terbium picrate complexes with benzyl-t-butyl sulphoxide. *J. Alloys Compd.*, **225**, 344-346, 1995.

45. NAKAGAWA, K.; AMITA, K.; MIZUNO, H.; INOUE, Y.; HAKUSHI, T. Preparation of some lanthanoid picrates and the behavior of their water of hydration. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 2037-2040, 1987.

46. LUNN, G.; SANSONE, E. B. Destruction of hazardous chemicals in the laboratory. 3ª Ed. New York: John Wiley & Sons, 2012. 662 p.

47. Informativo técnico n° 43: Munições para armas curtas. Disponível em: www.cbc.com.br. Acesso em 01 de junho de 2014.

48. XU, L; JING, Y.; FENG, L; XIAN, Z.; YAN, Y.; LIU, Z.; HUANG, J. The advantage of reversible coordination polymers in producing visible light sensitized Eu(III) emissions over EDTA via excluding water from the coordination sphere. *Phys. Chem. Chem Phys.*, **15**, 16641-16647, 2013.

49. OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos da Toxicologia. 3ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 677 p.

50. BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity – prospects for tiered testing strategies. *Toxicol. in Vitro,* **18**, 227–230, 2004.

51. SACHETTI, C. G.; FASCINELI, M. L.; SAMPAIO, J. A.; LAMEIRA, O. A.; CALDAS, E. D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). *Rev. Bras. de Farmacog.*, **19** (4), 937-941, 2009.

52. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Disponível em: www.unece.org. Acesso em 01 de julho de 2014.

53. OECD. Test No. 423. OECD Guidelines for testing of Chemical Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 1–14, 2001.

54. MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório:** Princípios e Interpretações. 5ª Ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2009. 400 p.

55. COSTA, J. P.; LOURENÇO, N. V.; SANTOS, C. C. M. P. S.; TOMÉ, A. R.; SOUSA, G. F.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.; FREITAS, R. M. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. *Rev. Ciênc. Farm. Apl.*, **33** (3), 421-428, 2012.

56. ARAÚJO, L. M. B.; LIMA, D. S.; DALTRO, C. Associação da Gama-Glutamil Transferase e a Síndrome Metabólica em Mulheres Obesas. *Arq Bras Endocrinol Metabvol*., **49** (4), 557-562, 2005.

57. BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman**: as bases farmacológicas da terapêutica. 11ª Ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. 1848 p.

58. PASSAGLI, M. **Toxicologia Forense**: Teoria e Prática. 3ª Ed. Campinas: Millennium, 2011. 459 p.

59. European Union emission inventory report 1990–2011 under the UNECE Convention on Long-range Transboundary Air Pollution (LRTAP). Disponível em: www.eea.europa.eu. Acesso em 01 de julho de 2014.

60. SCHIFER, T. S.; JUNIOR, S. B.; MONTANO, M. A. E. Aspectos Toxicológicos do Chumbo. *Infarma*, **17**, 67-72, 2005.

61. MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, **9** (1), 167-181, 2004.

62. IARC Monographs on the Evatuation of Carcinogenic Risks to Humans. Disponível em: www.iarc.fr. Acesso em 01 de julho de 2014.

63. Organic lead. Disponível em: http://www.inchem.org/. Acesso em 18 de julho de 2014.

64. Toxicological review of barium and compounds (CAS No. 7440-39-3): In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). Disponível em: www.epa.gov/iris. Acesso em 01 de julho de 2014.

65. NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. Handbook on the toxicology of metals. 3a Ed. Copenhague: Elsevier, 2007. 975p.

66. Antimônio Elementar. Disponível em: www.toxnet.nlm.nih.gov/. Acesso em 01 de julho de 2014.

67. WHO - World Health Organization (2003): Antimony in Drinking-water. Disponível em: www.who.int/en/. Acesso em 01 de julho de 2014.