



UnB

Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA TOXICIDADE DE MARCADORES LUMINESCENTES PARA
RESÍDUOS DE TIRO: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE, DA TOXICIDADE
AGUDA POR INALAÇÃO E ORAL DA MOF ∞ [Eu(DPA)(HDPA)]**

ANDRÉ LOPES RUIZ TALHARI

ORIENTADORA: INGRID TÁVORA WEBER

Brasília, DF
2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **André Lopes Ruiz Talhari**, matrícula nº **15/0103085**, intitulada “**ESTUDO DA TOXIDADE DE MARCADORES LUMINESCENTES PARA RESÍDUOS DE TIRO: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE, DA TOXICIDADE AGUDA POR INALAÇÃO E ORAL DO MOF [Eu(DPA)(HDPA)]**”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 14 de junho de 2017.

Prof.^a Dra. Ingrid Távora Weber
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof. Dr. Severino Alves Júnior
Membro Titular (UFPE)

Prof.^a Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza
Membro Titular (IB/UnB)

Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 14 de junho de 2017.

Gostaria de agradecer primeiramente a toda minha família pelo carinho, apoio e por ser a melhor família do mundo!

Aos meus pais, que me apoiaram a todo o momento e sempre se dispuseram a ajudar. Além disso, agradeço pelos ótimos conselhos que sempre me fizeram uma pessoa melhor. À minha mamãe por ser a pessoa que eu mais admiro e amo no mundo.

Agradeço também à minha cadelinha Estrelinha (*in memoriam*) que sempre encheu minha casa de alegria e que todos gostavam.

À Deus.

À minha orientadora, professora e chefe maravilhosa, pela paciência, compreensão, dedicação, carinho e por ter acreditado em mim e no meu potencial até o fim.

À Marcella Lucena, por ter sido a minha co-orientadora extra oficial até o fim. Uma pessoa dedicada, que supriu todas as minhas dúvidas, que sempre me direcionou para o caminho certo me desejando sempre o melhor e que me proporcionou uma grande amiga em quem eu sempre pude contar.

Ao Filipe Gabriel e ao José Yago, por todo o tempo e dedicação fornecido, por todos os auxílios, pela incrível companhia e pela grande amizade.

À Carime Rodrigues, pelas análises do fluorímetro e pela ótima companhia.

Ao Gabriel Cardoso (Mendigo), pela ajuda nos estudos, pelas análises no DRX e por ter me auxiliado resolvendo problemas em Brasília quando eu não podia.

Ao Idio Filho pela ajuda nas medidas de pH, dicas, apoio e pela ótima companhia.

À Aline Arouca por todo o suporte fornecido e pela ótima companhia.

À Flávia Borba, principalmente por ter me acolhido quando eu mais precisei, pelo carinho e dedicação, além de muita paciência.

Ao Prof. Severino Alves Junior pela oportunidade de realizar meu trabalho em cooperação e a Dra. Iane Alves pela ajuda com os experimentos.

Ao Rodrigo Silva, ao Cícero Inácio, à Ohanna Menezes, ao Aluiz Magno, à Valéria Rejane, ao Ricardo e à todos que me proporcionaram uma ótima estadia em Recife –PE.

À todos os amigos do BSTR, do LIMA e de outros laboratórios colaboradores, por todas as brincadeiras, conversas, descontração e pelos ótimos momentos que passamos juntos.

À Profa. Fabiane Veiga e a Marina Firmino pela incrível ajuda, tempo, paciência e dedicação com o meu trabalho.

Ao Prof. Marcelo Rodrigues pelas orientações fornecidas na minha qualificação, as quais foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos peritos que me receberam muito bem na Polícia Federal do Distrito Federal, em especial ao Márcio Talhavini.

Aos melhores amigos que sempre estiveram comigo e me apoiaram em todos os momentos da vida, em especial ao Alexandre Barros, Rômulo Klein, Vitor Nogueira, Humberto Jorge e Pedro Braz.

À família da minha comadre, Tauana Santos, em especial ao meu afilhadinho Miguel.

À minha irmã, pela nossa história de vida.

Ao laboratório Sabin pelas análises fornecidas.

À Capes e a FAPDF, pelo apoio financeiro.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade de ter realizado este trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho. Muito obrigado!

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO	ii
AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A Criminalidade	2
1.2. Resíduo de Tiro (GSR)	4
1.3. Munições NTA e Marcadores Luminescentes	6
1.3.1. Redes Metal-Orgânicas	10
1.4. Toxicidade	12
1.4.1. GHS e OECD	15
1.4.2. Toxicidade Aguda por Inalação e Oral	16
1.4.3. Toxicidade relacionada às MOFs	17
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivos Específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Caracterização do R-Marker	26
3.2. Animais	26
3.3. Testes de toxicidade aguda por inalação	27
3.3.1. Montagem da câmara de inalação e otimização dos parâmetros operacionais 27	
3.3.2. Testes <i>in vivo</i>	28
3.4. Teste de observação da traqueia	30
3.5. Testes de toxicidade aguda oral	30
3.6. Teste da gaiola metabólica	31
3.7. Teste de estabilidade em meio ácido do R-Marker	32
3.8. Análise e comparação do marcador excretado	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Caracterização do R-Marker	35
4.2. Testes de toxicidade aguda por inalação <i>in vivo</i>	38
4.3. Testes de toxicidade aguda oral	49

4.4. Teste da gaiola metabólica.....	54
4.5. Teste de estabilidade em meio HCl.....	55
4.6. Análise e comparação do marcador excretado.....	57
5. CONCLUSÕES	59
6. PERSPECTIVAS.....	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8. APÊNDICE	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução do número de homicídios por AF (Armas de Fogo) no Brasil entre 1980 e 2014 ⁴	3
Figura 2 - a) Partes da munição (figura adaptada); ²¹ b) Cone de fumaça gerado após o disparo; ²² c) Morfologia e composição de uma partícula de GSR por MEV/EDS (figura adaptada) ¹⁷	4
Figura 3 - Regiões de coleta de GSR (figura adaptada); ²⁴ 2) stubs de coleta para uso em MEV/EDS; ²⁵	6
Figura 4 - Composição e morfologia de GSR de munições Clean Range por MEV/EDS (figura adaptada) ²³	7
Figura 5 – Imagens obtidas sob radiação UV (254 nm) da a) mão do atirador contendo ZnAl _{1.95} Eu _{0.05} O ₄ ; ¹¹ b) arma contendo ZnAl _{1.95} Eu _{0.05} O ₄ ; ¹¹ c) stand de tiro contendo ZnAl _{1.95} Tb _{0.05} O ₄ ; ¹¹ d) stand de tiro contendo ZnAl _{1.95} Eu _{0.05} O ₄ ; ¹¹ e) arma contendo YVO ₄ : Er ³⁺ ; ¹⁵ f) carregador da pistola contendo YVO ₄ : Er ³⁺ . ¹⁵	9
Figura 6 – Imagens obtidas sob radiação UV (254 nm) do a) arma após o disparo contendo Eu(DPA); b) arma contendo Tb(DPA)(HDPa); ¹³ c) cartucho deflagrado contendo Tb(DPA)(HDPa); ¹² d) mão do atirador contendo Tb(DPA)(HDPa) + Eu(DPA)(HDPa); ¹² e) cartuchos deflagrados contendo Eu(BTC); ³⁴ e h) resíduos de tiro coletados contendo Eu(BTC); ³⁴	10
Figura 7 - Fórmula estrutural do ácido dipicolínico	11
Figura 8 - Estrutura da MOF Eu(DPA) ⁷	12
Figura 9 – Sistema 2: Compressor de ar (1); Fluxômetro (2); Agitador (3); Trap (4); Câmara de inalação (5)	28
Figura 10 -a) Espectro de absorção da solução padrão (5%) de DPA em HCl 1,0 M, pH 1,6; b) curva analítica obtida a partir de todos os padrões	33
Figura 11 – Difratoograma de raios X do marcador R-Marker.	35
Figura 12 - Espectro de excitação e emissão do R-Marker.	36
Figura 13 – Imagem de MEV do marcador luminescente-Marker.	37
Figura 14 – a) Granulometria do R-Marker mostrando a distribuição do tamanho de partícula; b) Granulometria do R-Marker após a maceração.	38
Figura 15 - Relação entre a concentração obtida nos experimentos de inalação, a temperatura e a umidade relativa do ar. FI = Fêmea Inalação; MI = Macho Inalação; FTT = Fêmea do Teste da Traqueia.	40
Figura 16 - Ratos Wistar (machos e fêmeas) após o teste de 4 horas de inalação com o R-Marker.	41
Figura 17 – Animais dormindo durante o experimento (Fêmea 1, 2, TT e Macho 1, 2 e 3) e com sinais de sonolência (Fêmea 3).	42
Figura 18 - Presença do marcador no corpo do animal nas orelhas, olhos, patas e cauda após 1 dia, 2 dias, 3 dias e majoritariamente na cauda após 4 dias, 5 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 14 dias (nas últimas 5 figuras, as três fêmeas já se encontravam na mesma gaiola)	43
Figura 19 - a) Evolução das massas dos grupos; b) Consumo de água dos grupos; c) Consumo de ração dos grupos; d) Massa dos órgãos.	44
Figura 20 – Fígado, baço, pulmão, coração e rins respectivamente dos grupos FI e MI. As imagens não estão em escala.	45
Figura 21 - Análise bioquímica do sangue dos animais dos grupos FI e MI associado ao erro padrão da média. **diferença significativa	46

Figura 22 - a) esôfago; b) Traqueia ligada ao pulmão; c) corte longitudinal do esôfago sob radiação UV; d) corte longitudinal da traqueia sob radiação UV.....	49
Figura 23 – Evolução da temperatura corporal dos grupos GC, G1 e G2. Inset: Evolução da temperatura nas 4 primeiras horas após a administração.	50
Figura 24. a) Evolução das massas dos grupos; b) Consumo de água dos grupos; c) Consumo de ração dos grupos; d) Massa dos órgãos.	51
Figura 25 - Fígado, baço, pulmão, coração e rins respectivamente dos grupos G1, G2 e GC. As imagens não estão em escala.	52
Figura 26 - Análise bioquímica do sangue dos animais dos grupos GC, G1 e G2 associado ao erro padrão da média. *diferença significativa	53
Figura 27 - a) Fezes com aspecto normal; b) Fezes luminescentes com aspecto pastoso após 8 horas da administração via oral.	54
Figura 28 - Teste de estabilidade do R-Marker e da MOF $\text{Eu}_2(\text{DPA})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ em HCl 1,0M, pH 1,6	56
Figura 29 – Espectro de fluorescência da fase $[\text{Eu}(\text{DPA})(\text{HDPA})]$ (rosa), do marcador luminescente R-Marker administrado (preto), encontrado nas fezes (Verde), do teste de estabilidade em HCl (vermelho) e contendo a fase $[\text{Eu}_2(\text{DPA})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ (azul).	58

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Tabela comparativa de estabilidade de MOFs e complexos	18
Tabela II - Tabela comparativa de toxicidade in vivo de MOFs e complexos.....	21
Tabela III. Dados principais a respeito do teste de inalação individual de cada animal.....	39
Tabela IV - Tabelas comparativa de faixas de valores bioquímicos de ratos Wistar fêmeas. Em vermelho, valores que apresentaram discrepâncias com a literatura.....	48
Tabela V - Tabelas comparativa de faixas de valores bioquímicos de ratos Wistar machos. Em vermelho, valores que apresentaram discrepâncias com a literatura.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

- GSR – *Gunshot residue* (resíduo de disparo de arma de fogo)
- IGSR – *Inorganic Gunshot Residue* (resíduo de tiro inorgânico)
- OGSR – *Organic Gunshot Residue* (resíduo de tiro Orgânico)
- Pb – Chumbo
- Ba – Bário
- Sb – Antimônio
- Eu – Európio
- Tb - Térbio
- NTA – *Non toxic ammunition* (Munição não-tóxica)
- UV – Ultravioleta
- LGSR – *Luminescent Gunshot Residue* (resíduo de tiro luminescente)
- MOF – *Metal Organic Framework*
- BTC – Ácido Trimésico
- BDC – Ácido Tereftálico
- DPA – Ácido Dipicolínico
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- EDS – *Energy Dispersive Spectroscopy*
- Stub* – Suporte metálico com uma resina adesiva na ponta utilizado para coleta e fixação de material para análise no MEV/EDS
- DRX – Difração de Raios X
- UNODC – *United Nations Office on Drugs and Crime*
- ASTM – *American Society for Testing and Materials*
- OECD - *Organization for Economic Co-Operation and Development*
- GHS – *Globally Hamonized System of Classification and Labelling of Chemicals*
- WB – *Whole-Body*
- SAWB – *Single-Animal Whole-Body*
- NO – *Head and Nose-Only*
- UnB – Universidade de Brasília
- UFPE – Universidade Federal de Pernambuco
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- HCl – Ácido Clorídrico

RESUMO

As mortes causadas por armas de fogo e a introdução de munições livres de chumbo no mercado fizeram com que as metodologias já estabelecidas e utilizadas pelas ciências forenses para identificação de resíduos de tiro (GSR, do inglês *gunshot residues*) se tornassem insuficientes e ineficientes. Para suprir tal necessidade, foram desenvolvidos marcadores luminescente que, ao serem adicionadas à pólvora das munições, são capazes de auxiliar na determinação do local do disparo, da arma utilizada, direção do tiro, pessoas envolvidas no disparo e as munições utilizadas, apenas com o auxílio de uma lâmpada ultravioleta. Contudo, para que a aplicação dos marcadores seja possível, os mesmos não devem representar um risco a saúde dos atiradores. Uma vez que as principais vias de absorção dos marcadores pelo atirador são a inalatória e a oral, este trabalho teve por objetivo determinar a toxicidade aguda por inalação e oral, além da estabilidade em meio ácido de um marcador luminescente de GSR que já possuía sua eficácia comprovada intitulado R-Marker. Para o teste de inalação, foi utilizado o protocolo da OECD de número 436 e construída uma câmara de inalação *labmade* para a realização dos experimentos. Para este teste foram utilizados 3 ratos *Wistar* de ambos os sexos. Os parâmetros analisados nos testes de inalação foram a integridade do animal, mortalidade e sinais clínicos de intoxicação, a evolução da massa corpórea, o consumo de água e de ração durante 14 dias, além da massa dos órgãos e de indicadores bioquímicos (proteínas totais, albumina, globulina, TGO ou AST, TGP ou ALT, Gama GT, creatinina, ureia e fosfatase alcalina). Nenhum animal veio a óbito e todos os parâmetros apresentaram valores normais com exceção da ureia do grupo MI, justificada pelo jejum dos animais. Percebeu-se que não há uma padronização de valores de referência na literatura, o que dificulta uma comparação precisa. A presença de marcador na pele dos animais foi verificada durante o período de observação não resultou em qualquer sinal de inflamação e/ou irritação. Além disso, um teste para verificação do alcance das partículas no trato respiratório do animal demonstrou que o marcador estava sendo, em sua maioria, deglutido ao invés de inalado, justificado pela larga distribuição do tamanho de partícula do marcador (~20 µm). Para o teste de toxicidade aguda oral, foi utilizado o protocolo 423 da OECD. Foram utilizadas 9 fêmeas de ratos *Wistar* e avaliados os mesmos parâmetros do teste de inalação assim como a temperatura corporal dos animais. Não foram verificados sinais de toxicidade em nenhum dos parâmetros avaliados sendo o marcador classificado na categoria GHS 5, com uma DL₅₀ de 5000 mg/Kg que é a categoria mais segura para este teste. Observou-se ainda que os animais excretaram parte do marcador pelas fezes, podendo este fato ter contribuído para a baixa toxicidade observada, o que levou a realização de um teste em gaiola metabólica. Neste, foi verificado que as fezes luminescentes são produzidas entre 4 e 24 horas após a administração, sendo a maior parte excretada após 8 horas. O ensaio de estabilidade do marcador, bem como da MOF [Eu₂(DPA)₃(H₂O)₃] em meio ácido demonstraram que ambos sofrem degradação similar em 8 horas. Também foram realizados espectros de emissão do material excretado nas fezes, do marcador utilizado na administração dos animais e do material resultante do ensaio de estabilidade. Quando comparados, verificou-se semelhanças do R-Marker administrado com a fase [Eu(DPA)(HDPA)], mas observou-se uma incompatibilidade entre o marcador presente nas fezes e o marcador administrado. Também foi possível observar que o material obtido no ensaio de estabilidade e o marcador excretado possuem mais semelhanças com a fase

[Eu₂(DPA)₃(H₂O)₃]. Infere-se destes resultados que, no processo de dissolução e excreção, pode haver uma nova organização no material ou ocorrer a solubilização preferencial de algumas fases presentes no marcador administrado, o que pode justificar as observações do espectro de emissão das fezes. Por fim, os resultados obtidos neste trabalho abrem novas portas para estudos de toxicidade, uma vez que é possível a detecção visual do marcador nas fezes, sendo sua aplicação possível em sistemas de *drug-delivery*.

Palavras chave: MOF; marcador luminescente; toxicidade aguda por inalação; toxicidade aguda oral; *in vivo*

ABSTRACT

Deaths caused by fire guns and the introduction of lead-free ammunition in the market made methodologies already established and used by forensic science to identify gunshot residues (GSR) become insufficient and inefficient. To overcome this problem, luminescent markers were developed that, when added to the gunpowder, are capable of assisting in the determination of the gunshot location, the fire gun used, the direction of the gunshot, personnel involved with the gunfire and the ammunition used, only by using an ultraviolet lamp. However, the use of these markers will only be possible if they do not present any risk to the shooter's health. Since the main absorption pathways by the shooter are by inhalation and orally, this study's objective is to determinate acute inhalation and oral toxicity, in addition of the acidic stability of a GSR luminescent marker with its proved efficacy entitled R-Marker. The OECD 436 protocol was used and a labmade inhalation chamber was built for the inhalation test. For this test, 3 Wistar rats of each sex were used. The parameters analyzed were the animal integrity, mortality and clinical signs of intoxication, the body weight evolution, water and food consumption during 14 days, besides the organs weight and biochemistry indicators (total protein, albumin, globulin, AST, ALT, gamma GT, creatinine, urea and alkaline phosphatase). No animal died during the experiments and all parameters showed normal values with the exception of the urea of the MI group, justified by the fasting of the animals. It was noticed that there is no standardization of the reference values in the literature, which makes an accurate comparison difficult. The presence of marker on the skin of the animals was noticed during the 14 days period of observation and no signs of inflammation or skin irritation could be seen. In addition, a test performed to check the reach of the particles in the respiratory tract showed that most of the marker was being swallowed instead of being inhaled, justified by the large particle size distribution of the marker (~20 μ). The oral toxicity test was performed, using the OECD 423 protocol. 9 female Wistar rats were used and the same parameters from the inhalation toxicity test and the animal's body temperature were evaluated. No signs of toxicity were observed in none of the parameters, allowing the marker to be classified in the GHS 5 category, with a LD₅₀ 5000 mg/Kg which is the safest category for this test. It was also noticed that the marker was being partially excreted through the feces, and that this fact may have contributed for the low toxicity observed in the animals, which led to the execution of a metabolic cage test. Herein, the period of excretion of the luminescent feces was between 4 and 24 hours after administration, the majority being excreted after 8 hours. The acidic stability test for the marker and the MOF [Eu₂(DPA)₃(H₂O)₃] performed presented a similar degradation in 8 hours for both. Emission spectra was obtained from the excreted material in the feces, the material used for administration in the animals and from the marker obtained in the acid stability test. Through the comparison we noticed resemblance between the material used for administration in the animals and the phase [Eu(DPA)(HDP)], however it was also noticed incompatibility between this material and the one in the feces. Likewise it was observed that the marker obtained in the acid stability test, along with material in the feces had more resemblance to the phase [Eu₂(DPA)₃(H₂O)₃]. It could be possible that in the process of dissolution and excretion, a new organization of the material or a selected phase dissolution may be occurring, justifying the emission spectra of the feces. Finally, the results presented in this study open new ways for toxicity studies, when the visual detection of the marker is possible on the feces, also allowing its application in drug-delivery systems.

Keywords: MOF; Luminescent marker; Acute inhalation toxicity; Acute oral toxicity; in vivo

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Criminalidade

O homicídio, a sua tentativa e derivados como latrocínio e outros, são os crimes mais graves em nosso ordenamento jurídico, pois são praticados contra o bem maior, que é a vida. Para a prática destes crimes, a arma de fogo é normalmente o objeto mais empregado, principalmente por não exigir contato físico direto entre o atirador e a vítima. Dados da UNODC (*United Nations Office on Drugs and Crime*) apontam que, a nível mundial, 42% dos homicídios envolvem armas de fogo. Entretanto, no Brasil esse índice é ainda mais elevado, chegando a 71% dos homicídios.^{1,2}

Segundo pesquisa divulgada pelo Instituto Sangari, em 2012, o Brasil apresentou uma taxa de 21,9 mortes por arma de fogo para cada 100 mil habitantes, ocupando a 11ª posição entre os 90 países analisados.³ A título de comparação, países como Canadá, Inglaterra e Alemanha apresentaram índices tão baixos quanto 2,0, 1,0 e 0,2 respectivamente, ocupando as posições 46ª, 66ª e 82ª no ranking. E mesmo quando comparado a países emergentes como a Índia (que é integrante do grupo BRICS, como o Brasil e que é 5 vezes mais populosa) que apresentou um índice de 0,3, o Brasil apresenta índices de homicídios ainda mais elevados.

Em 2014, um estudo apontou que 44.861 pessoas foram vítimas de arma de fogo no Brasil, o que significa 123 vítimas a cada dia do ano ou 5 óbitos a cada hora. Esse resultado traz um crescimento assustador de 415,1% na taxa de homicídio quando comparado a 1980 onde esse número foi de apenas 8.710 vítimas.⁴ Entre os anos de 1980 e 2014, no país foram 967.851 vítimas de disparo de arma de fogo (homicídio, causas indeterminadas, acidentes e suicídio) sendo que somente homicídios foram 830.420.⁴ No Brasil, onde não há disputas territoriais ou de fronteiras, onde não há guerra civil ou enfrentamentos políticos, há mais vítimas por armas de fogo do que em países que enfrentam estes problemas.

A situação brasileira se mostrou ainda mais alarmante após um levantamento feito pela ABC (Associação Brasileira de Criminalística) apontar que apenas 5 a 8% dos crimes são plenamente elucidados. Esses índices, em países desenvolvidos como Estados Unidos, França e Reino Unido, chegam a 65%, 80% e 90% respectivamente.⁵ Tais dados mostram a preocupante situação da criminalidade brasileira no cenário internacional.

A figura 1 mostra a evolução do número de homicídios por arma de fogo no Brasil. Apesar da diminuição apresentada nos últimos anos devido a implementação do estatuto

do desarmamento, ao Plano Nacional de Segurança Pública junto com o Fundo de Segurança Pública, a tendência da curva continua crescente.



Figura 1 – Evolução do número de homicídios por AF (Armas de Fogo) no Brasil entre 1980 e 2014⁴

As causas do alto número de homicídios no Brasil são múltiplas e a redução do índice requer ações integradas de várias áreas. Dentre elas, o desenvolvimento de tecnologias que auxiliem peritos e policiais na resolução de crimes. Sabe-se que há uma correlação entre as altas taxa de homicídio e a incapacidade das instituições policiais em investigar plenamente crimes.⁶ Portanto, desenvolver metodologias que facilitem a investigação de crimes é uma forma indireta de contribuir com a redução da alta taxa de violência no país. Uma destas metodologias é a caracterização de resíduos de tiro. Os métodos usados hoje pelas policias brasileiras são ou muito morosos ou apresentam altas taxas de falso negativo, e portanto são incompatíveis com as necessidades da rotina pericial.

Neste contexto, foi proposta a adição de marcadores luminescentes às munições como forma de auxiliar na identificação de resíduos de tiro (GSR, do inglês *Gunshot residue*). Tais marcadores mostraram ser uma ferramenta muito versátil para identificação de resíduos de armas de fogo, uma vez que permitem a visualização dos resíduos *in loco* utilizando apenas uma lâmpada UV, além de facilitar a coleta, a análise por diversas técnicas e auxiliar na investigação de cenas de crime⁷⁻¹⁵ Entretanto, o emprego dos mesmos só será possível caso seja conhecida a toxicidade apresentada por eles. Não é razoável que sejam adicionados marcadores que coloquem em risco a saúde de atiradores

frequentes, como policiais. Por esta razão, neste trabalho será estudada a toxicidade de um marcador luminescente para resíduos de tiro.

1.2. Resíduo de Tiro (GSR)

A munição é composta pelo estojo, o projétil, a cápsula de espoletamento, a espoleta (primer) e pela pólvora (figura 2a). Quando a cápsula de espoletamento sofre o choque mecânico do pino percutor, o primer gera energia suficiente para fazer com que a pólvora entre em combustão muito rapidamente produzindo assim, uma pressão muito elevada (9600 kPa) no interior da arma. Esta alta pressão faz com que o projétil seja deflagrado a uma alta velocidade para fora da arma.

A alta pressão junto às altas temperaturas (1500 a 2000 °C)¹⁶ geradas em um disparo fazem com que seja produzida uma mistura complexa e heterogênea que é liberada na forma de gases (figura 2b), vapores e matéria particulada através dos orifícios da arma (como cano, tambor, saídas de escape do gás).¹⁶ Essas partículas, de morfologia esférica¹⁷ (figura 2c) e de composição característica, são conhecidos como GSR (do inglês, *gunshot residue*),¹⁸ FDR (*firearm discharge residue*) ou ainda como CDR (*cartridge discharge residue*) e podem se depositar em qualquer superfície próxima ao disparo, incluindo o corpo (mãos, face, cabelos, narinas, etc.), vestimentas e pertences do atirador.^{19,20}

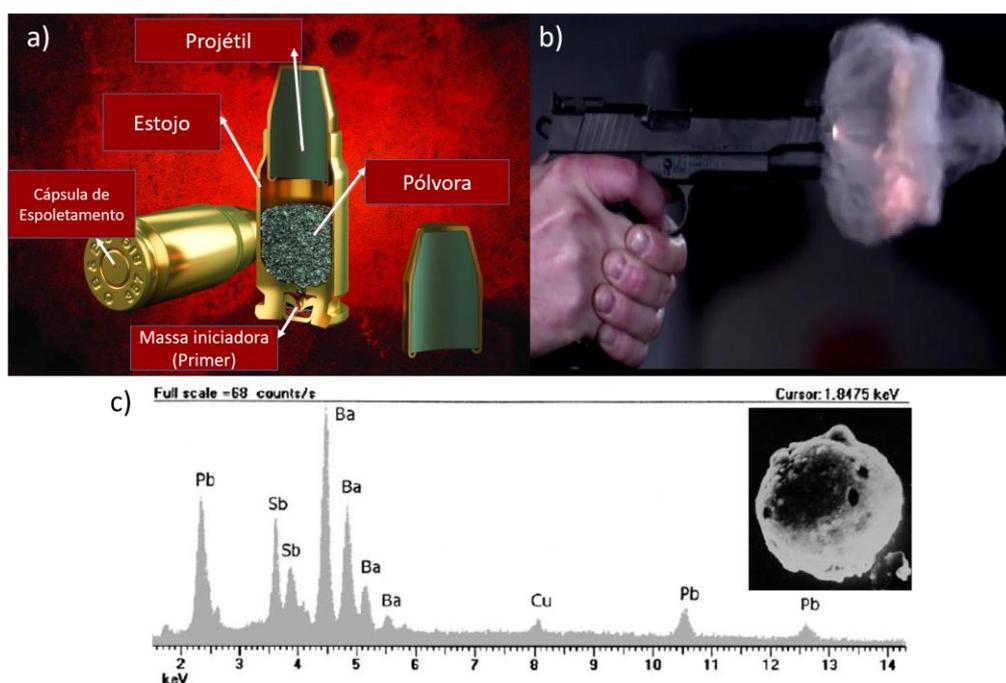


Figura 2 - a) Partes da munição (figura adaptada);²¹ b) Cone de fumaça gerado após o disparo;²² c) Morfologia e composição de uma partícula de GSR por MEV/EDS (figura adaptada)¹⁷

O GSR é tradicionalmente classificado quanto a sua natureza orgânica, sendo chamado de OGSR, ou inorgânica, sendo chamado de IGSR (ou simplesmente GSR). Esses resíduos de munições convencionais possuem em sua composição elementos específicos que não são usualmente encontrados concomitantemente no mesmo ambiente e que, portanto, permitem sua identificação como IGSR. Tais elementos são provenientes dos sais que compõem o *primer*: estifinato de chumbo, trissulfeto de antimônio e nitrato de bário.²³ Apesar destes elementos serem característicos de IGSR, sua análise deve ser feita com cuidado, uma vez que fontes externas também podem produzir os mesmos elementos. O chumbo, por exemplo, pode ser encontrado em ligas metálicas, gasolina, vidro, fósforo, dentre outros. O bário pode ser encontrado em corantes de tinta, inseticidas e produtos de papel, assim como o antimônio em pastilhas de freios e rolamentos.²⁰ Entretanto, estas fontes geram também outros resíduos que não são condizentes com GSR.

Os locais de deposição mais prováveis, bem como a quantidade destes resíduos são extremamente afetados pelas características da arma (tipo de arma, orifícios presentes, tamanho do cano da arma, etc.), da munição (tipo de pólvora, carga da munição, etc) e por fatores externos (como as condições do ambiente de disparo).²⁰ A coleta do GSR normalmente é realizada nas mãos do atirador, em regiões específicas (figura 3) que possuem elevada probabilidade de se encontrar estes resíduos. Para a coleta, normalmente são utilizados *swabs* embebidos com 5% de ácido nítrico ou *stubs* de microscopia revestidos com fita adesiva de carbono condutora. O método de coleta escolhido deve ser apropriado para o tipo de análise realizada em cada laboratório. Quando métodos colorimétricos são utilizados, por exemplo, o uso de *swabs* é recomendado, assim como para a análise por técnicas instrumentais como AA (absorção atômica) ou ICP (plasma acoplado indutivamente).²⁰ Entretanto, estas técnicas não descartam a possibilidade de que os elementos encontrados sejam provenientes de partículas e fontes distintas, além de não proporcionar informações quanto a sua morfologia. Por isso, para a caracterização inequívoca de IGSR, recomenda-se o uso de MEV/EDS (MEV, microscopia eletrônica de varredura e EDS, do inglês, *electron dispersive spectroscopy*),²³ uma vez que é possível garantir que os três elementos estejam presentes em uma mesma partícula esferóide. Neste caso, a coleta deve ser realizada com os *stubs*.²⁰

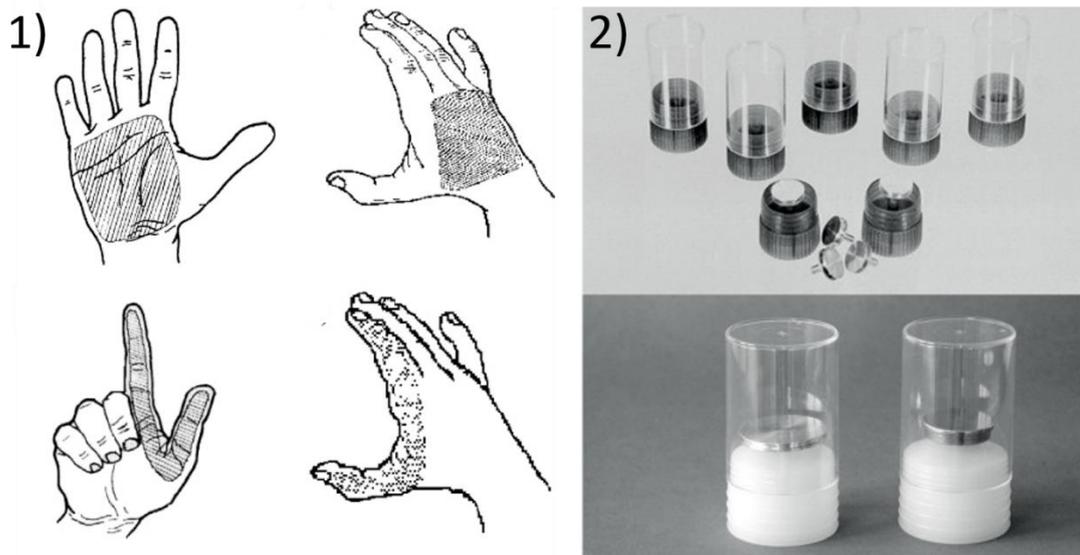


Figura 3 - Regiões de coleta de GSR (figura adaptada);²⁴ 2) stubs de coleta para uso em MEV/EDS;²⁵

Assim, as análises dos resíduos, além de colocar um suspeito em um evento envolvendo disparo de arma de fogo, podem auxiliar a determinar a distância e ângulo do disparo, local de entrada e saída do projétil, a identificar a munição e a arma suspeita, dentre outros.¹⁸

1.3. Munições NTA e Marcadores Luminescentes

Com as munições convencionais, o ambiente e atiradores frequentes são constantemente expostos ao chumbo dos resíduos e do próprio projétil. Após o disparo, a fumaça gerada contendo Pb pode ser inalada e as partículas aderidas à mão podem ser fonte de intoxicação direta por ingestão.^{26,27} Além disso, o simples manuseio de estojos deflagrados, bem como o manuseio de projéteis (prática comum na recarga da arma) também são fontes de contaminação.²⁶ Quando o chumbo entra na corrente sanguínea, parte é filtrada pelos rins e eliminada pela urina. Entretanto, aquilo que não é eliminado, se acumula nos órgãos e nos ossos, sendo liberado para a corrente sanguínea com o tempo.²⁸ Esse acúmulo nos órgãos e ossos, pode levar a concentrações no sangue acima do recomendado ($40 \mu\text{g}/\text{m}^3/\text{h}$)²⁸ e, dependendo da dose e do tempo de exposição, os efeitos podem ser irreversíveis. Em concentrações elevadas, o Pb pode causar danos a eritrócitos, ao cérebro, rins e aos sistemas reprodutivos, sendo que os sintomas podem aparecer de forma aguda ou crônica.²⁸

Nesse contexto, a indústria de munições desenvolveu munições livres de chumbo (*lead-free ammunition* ou *Clean Range Ammunition*), visto que atiradores frequentes estavam apresentando níveis elevados de Pb no sangue e stands de tiro também apresentavam níveis elevados de Pb no ar.²⁹ Contudo, esse tipo de munição trouxe um novo desafio para os cientistas forenses na identificação de GSR, devido a retirada dos metais pesados que compunham o primer.^{26,30} Tais elementos eram considerados característicos na identificação inequívoca de resíduo de tiro.^{11,23} Além disso, a morfologia esferoide, também utilizada na caracterização de um resíduo de tiro, não pode ser utilizada como parâmetro quando esse tipo de munição é utilizada visto que os resíduos podem, ou não, apresentar essa morfologia (figura 4).²³

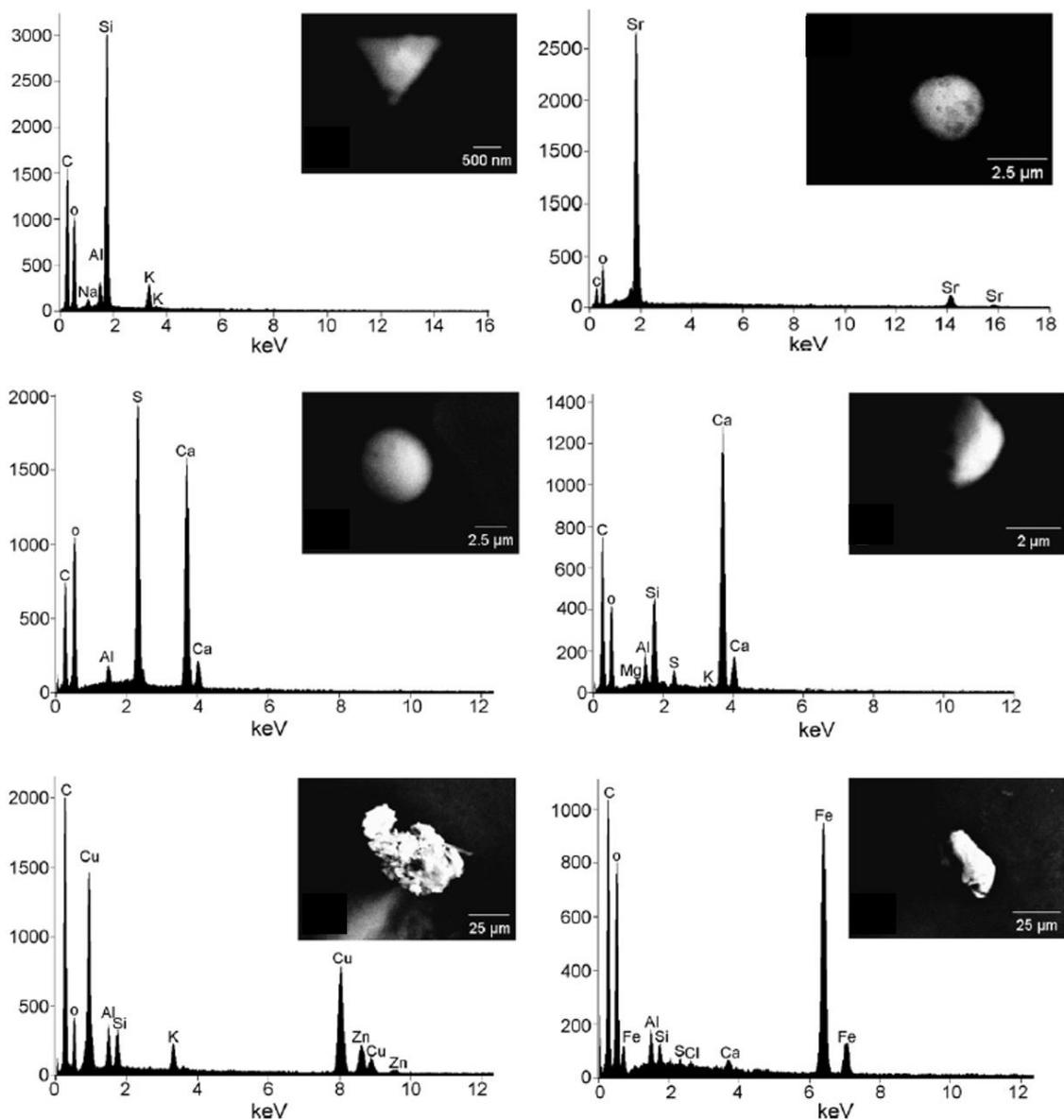


Figura 4 - Composição e morfologia de GSR de munições Clean Range por MEV/EDS (figura adaptada)²³

Logo, o desenvolvimento de metodologias capazes de caracterizar os resíduos provenientes desse novo tipo de munição e superar as limitações das técnicas descritas anteriormente tornou-se uma necessidade. Neste sentido, nosso grupo desenvolveu marcadores luminescentes^{7-15,31} capazes de fornecer evidências do disparo de uma arma de fogo. Esses marcadores são incorporados a carga de projeção das munições, e após o disparo formam o que são chamados de GSR luminescente (LGSR).

Com os marcadores, a coleta dos resíduos se torna mais fácil, e a análise da cena do crime mais rápida. Os resultados são bastante confiáveis, otimizando assim o trabalho rotineiro, muitas vezes com alta demanda, da perícia criminal.⁹ Tais marcadores também trazem a possibilidade de uma possível codificação das munições, podendo ser aplicados, por exemplo, para diferenciar calibres, origem ou até mesmo munições de uso policial e civil. Para servirem ao propósito de marcadores luminescentes para resíduos de tiro, os mesmos devem possuir alta luminescência, serem inertes (pois não podem reagir com os componentes da munição), serem capazes de resistir a altas temperaturas geradas no interior da arma e continuarem estáveis quimicamente por períodos longos.^{15,16,32}

Dois tipos de marcadores luminescentes para GSR já foram desenvolvidos pelo grupo sendo eles os inorgânicos e os que utilizam redes metal-orgânicas. Os inorgânicos utilizam o ortovanadato de ítrio dopado com Er^{3+} e Yb^{3+} ,¹⁵ e o aluminato de zinco dopado com Eu^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Eu^{3+} - Dy^{3+} ou Tb^{3+} - Dy^{3+} ,^{11,32}. Já os que utilizam as redes metal-orgânicas (MOFs) se baseiam nas redes $[\text{Ln}_2(\text{BDC})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ ($\text{Ln} = \text{Eu}$ e Tb e $\text{BDC} =$ ácido tereftálico),³³ a MIL-78 $[\text{Ln}(\text{BTC})]$ ($\text{Ln} = \text{Eu}$, Sm , Tb e Yb e $\text{BTC} =$ ácido trimésico),⁸ e $[\text{Ln}(\text{DPA})(\text{HDP A})]$ (em que $\text{Ln} = \text{Eu}^{3+}$, Tb^{3+} , Dy^{3+} ou $\text{Yb}^{3+}/\text{Tb}^{3+}$ e o ligante $\text{H}_2\text{DPA} =$ ácido dipicolínico).^{7,9} Alguns dos resultados em diversos trabalhos envolvendo estes marcadores são apresentados nas figuras 5 e 6. Dentre os sistemas utilizados, as MOFs foram os que apresentaram resultados mais promissores.

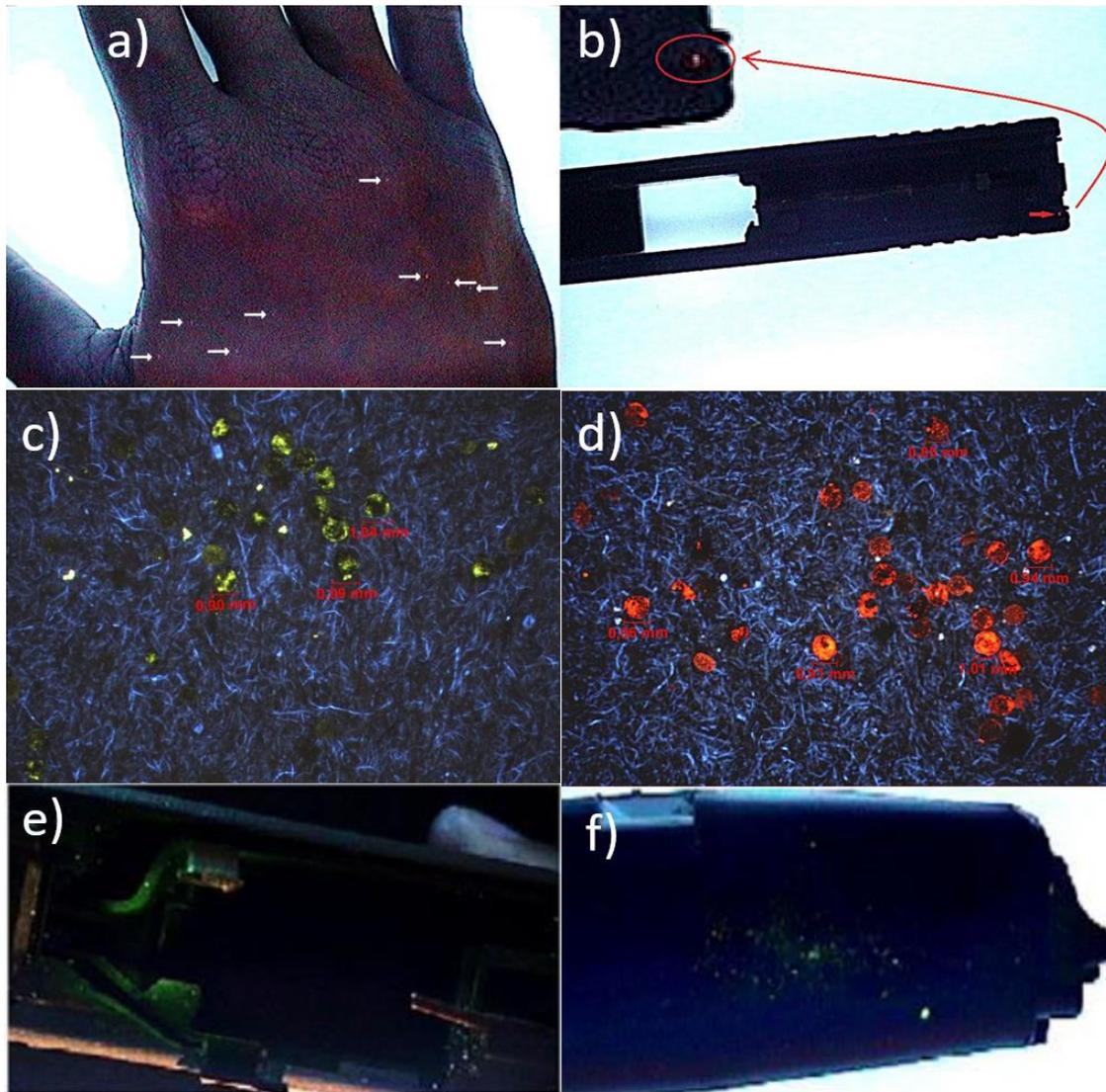


Figura 5 – Imagens obtidas sob radiação UV (254 nm) da a) mão do atirador contendo $\text{ZnAl}_{1.95}\text{Eu}_{0.05}\text{O}_4:^{11}$ b) arma contendo $\text{ZnAl}_{1.95}\text{Eu}_{0.05}\text{O}_4:^{11}$ c) stand de tiro contendo $\text{ZnAl}_{1.95}\text{Tb}_{0.05}\text{O}_4:^{11}$ d) stand de tiro contendo $\text{ZnAl}_{1.95}\text{Eu}_{0.05}\text{O}_4:^{11}$ e) arma contendo $\text{YVO}_4: \text{Er}^{3+},^{15}$ f) carregador da pistola contendo $\text{YVO}_4: \text{Er}^3,^{15}$

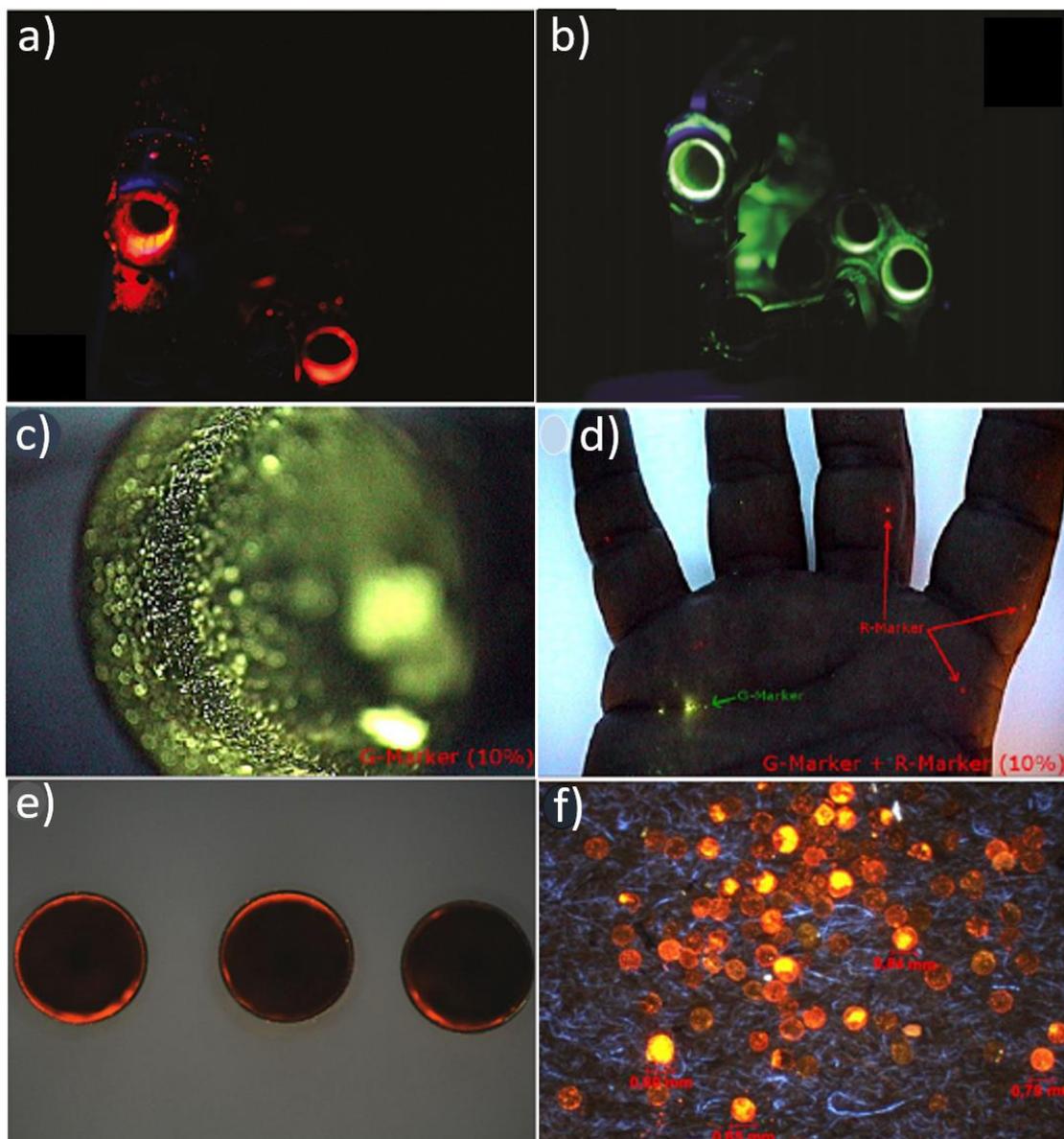


Figura 6 – Imagens obtidas sob radiação UV (254 nm) do a) arma após o disparo contendo Eu(DPA); b) arma contendo Tb(DPA)(HDPA);¹³ c) cartucho deflagrado contendo Tb(DPA)(HDPA);¹² d) mão do atirador contendo Tb(DPA)(HDPA) + Eu(DPA)(HDPA);¹² e) cartuchos deflagrados contendo Eu(BTC);³⁴ e h) resíduos de tiro coletados contendo Eu(BTC);³⁴

1.3.1. Redes Metal-Orgânicas

As MOFs (do inglês, *metal organic frameworks*) são formadas por ligações fortes entre um ligante orgânico multidentado e um centro metálico.³⁵ Este ligante e o metal podem se conectar através de diferentes modos de coordenação, possibilitando a formação de uma grande variedade de estruturas rígidas e cristalinas que crescem em duas ou três dimensões. O grande atrativo destas redes é resultado de sua elevada porosidade, capacidade de se controlar o tamanho de poro e arquitetura, bem como a possibilidade de

funcionalização.³⁶ Estas propriedades tornam as MOFs interessantes para aplicações em armazenamento de gás^{37,38}, catálise,³⁹ *drug delivery* (do inglês, carregamento de fármacos),⁴⁰⁻⁴⁵ entre outros.

Estas MOFs, quando utilizam como centro metálico íons lantanídeos, abrem uma nova gama de aplicações no campo dos dispositivos moleculares conversores de luz (DMLC),⁴⁶ como em diodos orgânicos e inorgânicos emissores de luz (OLED e LED),⁴⁷ sensores, nanotermômetros,⁴⁸ assim como marcadores luminescentes para resíduos de tiro^{7-16,31,32,34} e explosivos.^{49,50} O marcador estudado neste trabalho é composto pelo íon Eu^{3+} , que tem como principal característica a emissão na região vermelho do espectro eletromagnético.

Os íons lantanídeos apresentam baixa absorvidade molar, o que os torna ineficientes na absorção de energia quando excitados diretamente, resultando em uma fraca luminescência. Entretanto, ao excitar o ligante orgânico, presente na MOF, há o favorecimento do efeito antena (energia absorvida pela matriz que é transferida para o lantanídeo).³⁴ Neste trabalho o ligante utilizado na composição do marcador foi o ácido dipicolínico (ácido piridina-2,6-dicarboxílico, DPA) (figura 7).

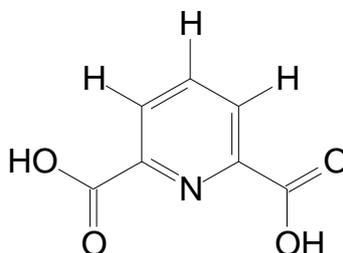


Figura 7 - Fórmula estrutural do ácido dipicolínico

O ligante utilizado tem como principal característica a presença de grupos carboxilatos que podem ser parcialmente ou completamente desprotonados, podendo gerar diversos modos de coordenação⁵¹⁻⁵³ e, conseqüentemente, estruturas diferentes. A coordenação pode ocorrer também através do grupo amina, formando uma espécie tridentada, como já demonstrado na formação de complexos com íons metálicos (Cu, Pb e Cd).⁵⁴ Além disso, esse grupo tem a característica de formar estruturas rígidas, conferindo estabilidade à rede. A partir da coordenação deste ligante com o európio, uma estrutura tridimensional foi gerada, sendo ela a rede $\infty[\text{Eu}(\text{DPA})(\text{HDPA})]$ (figura 8). Esta rede, já estudada,⁵⁵⁻⁵⁷ apresentou excelentes resultados quando utilizada como marcador

luminescente,^{13,31} pois apresentou alta luminescência e estabilidade térmica após o disparo de arma de fogo (figura 6).

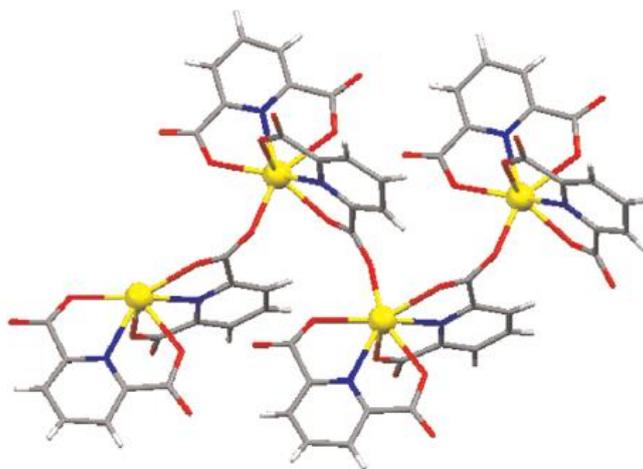


Figura 8 - Estrutura da MOF Eu(DPA)⁷

Em trabalhos anteriores do grupo, foi desenvolvido um marcador luminescente que utiliza como centro metálico o íon európio e como ligante orgânico o DPA. Este marcador foi intitulado R-Marker e apresentou excelentes resultados após testes de eficiência¹³. Entretanto, para que este marcador possa ser implementado, é preciso conhecer a respeito de sua estabilidade e toxicidade, uma vez que esta rede estará em contato direto com o atirador.

1.4. Toxicidade

Os agentes tóxicos podem ser classificados em função de vários fatores, como órgãos-alvo, origem, uso, efeitos, estado físico, estabilidade química ou reatividade, estrutura química e principalmente por seu potencial de intoxicação. A toxicologia é definida como a ciência que estuda os efeitos adversos causados por substâncias químicas através de mecanismos de ação bioquímicos, celulares ou moleculares em organismos biológicos, classificando-as quanto a sua toxicidade.⁵⁸⁻⁶⁰ A toxicologia engloba grandes áreas de estudo como a biologia, bioquímica, química, genética, matemática, medicina, farmacologia, fisiologia e física, não se limitando somente a estas, com objetivo de entender as causas de um efeito tóxico em um sistema biológico. Por efeito tóxico ou

adverso, entende-se como qualquer mudança bioquímica, morfológica, fisiológica, etc., que um organismo venha a sofrer de forma prejudicial.

A toxicidade pode ser descrita como a medida do potencial tóxico de uma substância. Este potencial pode ser influenciado por parâmetros como a dose, duração e frequência da exposição, via de administração, características e propriedades da substância estudada, tipo e a intensidade dos efeitos produzidos, assim como as características e estado do indivíduo exposto.^{59,61} A toxicidade pode ser ainda classificada em função da duração, da severidade e da reversibilidade. Quanto a duração, a toxicidade pode ser classificada em aguda, subcrônica e crônica- subdividida em local aguda, sistêmica aguda, local crônica, sistêmica crônica, etc. Quanto a severidade, pode ser classificada em leve, moderada ou severa, não sendo somente estas as classificações possíveis, mas sim as principais.⁶¹ Pode ainda ser imediata ou retardada, reversível ou irreversível. Um efeito pode ser reversível quando o dano provocado por ele pode ser reparado ou refeito.⁵⁹ As respostas tóxicas variam bastante e vão desde uma lesão patológica até sua forma mais complexa, como resposta bioquímica ou farmacológica.

Estudos envolvendo a análise da toxicidade aguda geralmente são realizados a partir de uma única exposição a uma concentração específica ou múltiplas exposições por qualquer via de administração dentro de um curto período de tempo, que geralmente não ultrapassa 24 horas.⁶² Com isso, os chamados “efeitos agudos” tendem a ocorrer rapidamente dentro das primeiras 24 horas ou em até 14 dias após sua exposição.^{62,63} Geralmente quando um animal morre pouco tempo após uma exposição é indício de que algum sistema bioquímico ou fisiológico foi afetado, assim como mudanças na massa do animal ou de algum órgão também são indícios de toxicidade.⁵⁹

Todas as substâncias possuem a capacidade de produzir lesão ou morte em quantidades suficientes. Para determinar esta quantidade suficiente, estudos envolvendo células e animais são realizados para se estimar a CL_{50} e DL_{50} , as quais são, respectivamente, a concentração e a dose letal com que se espera que 50% dos indivíduos envolvidos morram.^{60,62,64} Antigamente, uma grande quantidade de animais era empregada na determinação da DL_{50} . Entretanto, este parâmetro não trazia maiores informações a respeito de mecanismos envolvidos na toxicidade, e sim informações sobre a dose limite daquele composto.^{59,60,62} Atualmente o número de animais utilizados em experimentos vêm sendo reduzido, assim como procura-se extrair o máximo de informações sobre a toxicidade das substâncias (além de CL_{50} e DL_{50}).^{59,62,63}

Estudos de toxicidade que envolvem períodos mais prolongados de exposição, são chamados de subcrônico e crônico. O subcrônico baseia-se no estudo dos efeitos adversos provocados a partir de uma exposição em doses repetidas diárias a um organismo durante 1 – 3 meses.⁶² Já os estudos de toxicidade crônica geralmente envolvem uma exposição a longo prazo, normalmente ultrapassando 3 meses. O chamado “efeito crônico” se desenvolve lentamente a partir de exposições repetidas ou prolongadas. Tais efeitos tendem a ser irreversíveis e podem vir acompanhados de acumulação do toxicante testado bem como dos seus metabólitos, e tendem a causar uma perda progressiva das funções dos órgãos do indivíduo afetado.⁶² Quando as informações do estudo de toxicidade aguda são analisadas junto com as informações obtidas no estudo de toxicidade subcrônica e crônica, pode-se inferir com maior precisão quais são os possíveis órgãos-alvos daquela substância, bem como seus efeitos mais prováveis.

Outro fator importante a ser discutido em um estudo de toxicidade é a relação dose/resposta. De acordo com a IUPAC (do inglês, *international union of pure and applied chemistry*), dose é a quantidade total de uma substância administrada em um organismo, diferentemente da dosagem que é mais específica por incluir alguma característica do indivíduo como peso corpóreo ou área superficial.^{60,62} Visto que o organismo possui diversos mecanismos de defesa, e que outros fatores como o comportamento animal podem influenciar biologicamente, nem sempre a dose aplicada atinge seu alvo na mesma proporção ou concentração aplicada.

Quando sofrem elevado nível de estresse, os animais podem reagir de formas diferentes e absorverem quantidades diferentes da substância. Um exemplo claro é no teste de inalação, em que a frequência respiratória sofre grande influência do estresse, aumentando ou diminuindo a quantidade de substância absorvida. A análise da porcentagem de indivíduos na população estudada que apresentam alguma resposta a uma determinada dose permite apenas inferir o quanto uma resposta tóxica é proporcional à sua concentração e fazer a avaliação de risco daquela substância.⁶⁰

A avaliação dos riscos é a identificação e a quantificação de risco resultante do uso específico de uma substância química. Essa avaliação é feita levando-se em conta possíveis efeitos prejudiciais em um indivíduo ou uma população através de todas as formas de exposição. Pode ser resumida em 4 etapas: (i) a identificação do perigo, (ii) a avaliação dose-resposta, (iii) a avaliação de exposição e a (iv) caracterização de risco. A identificação do perigo determina fatores que contribuem para um possível efeito adverso na qual a população ou o meio ambiente poderiam ser expostos. A avaliação dose-

resposta analisa a quantidade absorvida para cada grupo de organismos e os efeitos adversos desenvolvidos por estes. Já a avaliação de exposição trata da análise qualitativa e quantitativa da presença daquela substância em um determinado ambiente. Por fim, a caracterização de risco agrega todas essas informações e estimativa o perigo dessa substância aquela população.⁶²

Vale ressaltar que nem sempre todas as doses geram algum tipo de manifestação clínica ou uma resposta mensurável (NOAEL – *No Observed Adverse Effect Level*).⁶⁰

Através destes estudos com animais, é possível formular hipóteses sobre a natureza dos fenômenos biomédicos em humanos. Desta forma, a comercialização de marcadores luminescentes só será possível após demonstrada a presença de riscos suficientemente baixos e de efeitos previsíveis.

1.4.1. GHS e OECD

O desenvolvimento de sistema global harmonizado de classificação e marcação de produtos químicos começou na década de 80, quando se identificou que diferentes países possuíam diferentes formas de identificar e regular produtos químicos perigosos, ou até mesmo possuíam pouco ou nenhuma forma de identificação. Outro problema encontrado foi a inconsistência nas classificações e marcações dos mesmos produtos em países diferentes, regiões do mesmo país ou até mesmo entre fabricantes. Assim, a GHS (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) foi iniciada em 1989 com o intuito de proporcionar uma forma de classificação global, consistente e coerente de produtos químicos. Para a classificação de uma substância, métodos científicos internacionalmente reconhecidos devem ser conduzidos. Só assim, os resultados podem ser aceitos e classificados segundo a GHS e utilizados na determinação de riscos à saúde e/ou ao ambiente.⁶⁵

Uma das instituições que desenvolve metodologias para a classificação de substâncias de acordo com a GHS é a OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*). A OECD é uma organização com a missão de promover políticas para melhorar o bem-estar econômico e social das pessoas em todo mundo, através do desenvolvimento de padrões internacionais.⁶⁶ A organização auxilia os países a desenvolver boas práticas laboratoriais e harmonizar metodologias de avaliação de riscos para a saúde humana e meio ambiente. A OECD tem disponível hoje uma série de

protocolos para a avaliação da toxicidade de substâncias, considerando efeitos agudos ou crônicos e diferentes vias de administração/contato.

1.4.2. Toxicidade Aguda por Inalação e Oral

A via respiratória é uma das principais vias de entrada de substâncias exógenas ao organismo. Dentre as principais funções das vias aéreas superiores podemos destacar a de filtro e a de defesa que remove agentes exógenos (infecciosos, tóxicos e alérgicos) do ar inalado ou através da mucosa, identificando e metabolizando diversos xenobióticos.⁶⁷ Pode haver ainda uma inflamação da mucosa nasal sendo esta, ação citotóxica direta do próprio aerossol. Sendo assim, o uso de animais de laboratório em experimentos de inalação é realizado para avaliar a toxicidade de gases, vapores e aerossóis de interesse industrial, ambiental ou até mesmo comercial. Estes experimentos são realizados em condições controladas, na tentativa de se reproduzir as mesmas condições em que a substância seria inalada pelos seres humanos.

A dose administrada por inalação é bastante imprecisa devido à dificuldade de se medir o ar inalado pelo animal e conseqüentemente a dose inalada.⁶⁸ A ventilação por minuto, por exemplo, pode variar muito de animal para animal dependendo da atividade do mesmo, assim como alterações nos padrões de respiração em resposta ao material inalado podem ser observadas.

Estudos feitos por Guyton *et al.*⁶⁹ e por Bide *et al.*⁷⁰ demonstraram que valores médios da ventilação por minuto podem ser estimados a partir da massa corpórea. Assim, os autores estimaram ventilações médias de 116 cm³/min⁶⁹ e 136 cm³/min⁷⁰ para um rato de 200 gramas. Porém o valor estimado pode diferir muito do valor experimental.⁷¹ Além da atividade do animal, diversos fatores podem alterar a taxa de ventilação, como a temperatura do ambiente, níveis de iluminação, barulho, oxigênio, umidade, atmosfera de exposição e até mesmo a presença de outros animais.⁶⁸ Além disso, esses fatores podem afetar os animais de maneiras diferentes, impactando diretamente em seu metabolismo, nível de estresse, comportamento, resposta ao composto administrado e sua ventilação por minuto.

A via oral é uma das alternativas de absorção de material particulado presente na atmosfera, visto que nem todas as partículas inaladas vão diretamente para o pulmão. Parte destas partículas ficam retidas nas vias aéreas superiores, principalmente na mucosa e posteriormente são deglutidas. Partículas depositadas em partes do corpo, como mãos,

e em objetos também podem ser absorvidas por via oral. Como nem todo material deglutido é previamente metabolizado, esta constitui assim uma via de entrada para a substância-teste em sua forma íntegra.

Poucos estudos avaliam a toxicidade de MOFs^{10,34,43,72,73} e pouquíssimos trabalhos se dedicam ao estudo da toxicidade de marcadores luminescentes para resíduos de tiro.^{10,34,74} Nos 3 trabalhos que tratam do assunto o protocolo utilizado foi OECD 423.

1.4.3. Toxicidade relacionada às MOFs

As MOFs possuem um grande potencial de aplicação em diversas áreas, sendo uma delas a biomédica. Um dos grandes interesses em se utilizar MOFs é para realização de *drug-delivery*.^{40-45,75} Contudo, para que sejam utilizadas, rigorosos estudos *in vitro* relacionados à estabilidade destas redes, *in vivo* relativos a toxicidade das MOFs precisam ser realizados. Por esta razão a toxicidade de diversas MOFs vem sendo estudada nos últimos anos, com resultados cada vez mais promissores.^{41-44,73,75-77}

Ao se testar uma MOF para aplicações biomédicas, um dos fatores a ser levado em consideração é a composição desta rede, visto que ela pode se dissociar e liberar os componentes que a integram. Neste caso, as redes compostas por ligantes e metais endógenos, e/ou não tóxicos se apresentam como opções mais viáveis, não descartando a possibilidade de uso de outras redes, caso estas apresentem benefícios.⁷⁵

A primeira etapa do estudo da viabilidade de uma MOF para aplicações bioquímicas são os testes de estabilidade. Estes testes são realizados visando compreender a dinâmica da substância-teste em algum meio simulado. Com estes testes é possível se obter dados quanto a degradação destes materiais em determinado local de atuação (ex. estômago ou intestino), para se inferir sobre o seu comportamento quando aplicado *in vivo*. Para isso, dados importantes como a via de administração, pH do meio, possíveis interações, biodegradação, dentre outros, devem ser levados em consideração na realização destes testes.

Uma característica de grande importância das redes metalorgânicas para fins biomédicos, é que estas permaneçam íntegras durante tempo suficiente para liberação do agente terapêutico. Mesmo assim, poucos trabalhos têm relatado o estudo de estabilidade de MOFs. Hinks *et al.*⁷⁵ estudaram a estabilidade da MOF Ni-CPO-27 em soro fetal bovino. Como resultado, observou-se que menos de 10% da estrutura havia se dissociado

após 4 dias. Esta rede, apesar de utilizar o níquel como centro metálico, se mostrou uma boa alternativa para aplicação em *drug-delivery*, no carreamento de NO (óxido nitroso).

Horcajada *et al.*⁴³ estudaram a estabilidade das MOFs MIL-88A e MIL-100 (MIL = *Materials of Institute Lavoisier*) meio fisiológico. Após 7 dias observou-se que ambas apresentaram mais de 50% de degradação, demonstrando uma boa estabilidade. Neste caso, estas redes utilizam como centro metálico o Fe, que apresenta baixa toxicidade (DL₅₀ = 30 g/Kg) e é endógeno do organismo, assim como o fumarato, ligante utilizado na MIL-88A, podendo inclusive ser reciclado no ciclo de Krebs.

Ruyra *et al.*⁷³ estudaram a estabilidade em diversas nanoMOFs (UIO-66, UIO-66-NH₂, UIO-67, MIL-100, MIL-101, , ZIF-7, ZIF-8, MOF-5, Mn-MOF-74, Co-MOF-74, Zn-MOF-74, Ni-MOF-74, Cu-MOF-74, Mg-MOF-74, NOTT-100 e HKUST-1), com concentração de 10 mM, utilizando como meio de cultura 10% de soro bovino fetal, a 37 °C durante 24h. Observaram por difração de raios X que parte das nanoMOFs se mantiveram estáveis (MIL-100, UIO-66, UIO-66-NH₂, ZIF-7, ZIF-8, Zn-MOF-74 e Ni-MOF-74), parte formaram novos compostos inorgânicos (MOF-5 E Mn-MOF-74) e outras tiveram perda de cristalinidade (Mn-MOF-74, Co-MOF-74, HKUST-1, NOTT-100, Cu-MOF-74 e Mg-MOF-74). Um resumo esquematizado a respeito da variabilidade encontrada na degradação de MOFs e complexos está representado na tabela I.

Tabela I - Tabela comparativa de estabilidade de MOFs e complexos

Autor	Ruyra <i>et al.</i>⁷³	Hinks <i>et al.</i>⁷⁵	Horcajada <i>et al.</i>⁴³
MOF	UIO-66, UIO-66- NH ₂ , UIO-67, MIL-100, MIL-101, ZIF-7, ZIF-8, MOF-5, Mn-MOF-74, Co-MOF-74, Zn-MOF-74, Ni-MOF-74, Cu-MOF-74, Mg-MOF-74, NOTT-100 e HKUST-1	Ni-CPO-27	MIL-88A e MIL-100
Meio	Soro fetal bovino	Soro fetal bovino	Meio fisiológico
Período	1 dia	4 dias	7 dias
Degradação	Estáveis, perda de cristalinidade, novas espécies cristalinas (0,3 – 62,9 %)	10%	>50%

Além disso, Ruyra *et al.*⁷³ também estudaram a toxicidade *in vivo* de 9 dessas nanoMOFs (UiO-66, UiO-67, Co-MOF-74, Mg-MOF-74, ZIF-7, ZIF-8, MIL-100, MIL-101 e HKUST-1) em embriões de peixe zebra. O peixe zebra é um modelo animal

alternativo aceito pela NIEHS (do inglês, *National Institute of Environmental Health Science*) e pela IES (do inglês, *Institute for Environment and Sustainability*) para estudos comparativos de toxicidade em humanos. Diversos parâmetros de toxicidade (mortalidade, taxa de eclosão e fenótipos anormais) foram avaliados a cada 24 h, durante 120 h, nos embriões em concentrações que variaram de 1 a 200 μM de suspensões das nanoMOFs. Foi observado que a maioria das nanoMOFs testadas (UiO-66, UiO-67, Co-MOF-74, Mg-MOF-74, MIL-100, MIL-101) na concentração mais alta (200 μM) não alteraram significativamente a viabilidade dos embriões, enquanto que a ZIF-7, ZIF-8 e HKUST-1 provocaram uma queda significativa sendo a nanoHKUST-1 a mais tóxica, pois provocou a morte de todos os embriões, mesmo em concentrações mais baixas (200 μM).

Os testes de toxicidade *in vivo* em MOFs ainda são muito escassos. A exemplo, Horcajada *et al.*⁴³ estudou a toxicidade aguda das MOFs MIL-88A, MIL-88Bt e MIL-100 e a toxicidade subaguda da MOF MIL-88A, pela via intravenosa com concentrações que variaram de 25 a 220 mg/Kg. Em todos os testes não houveram óbitos nos períodos avaliados (1 dia e 3 meses após a administração para os testes de toxicidade aguda, e 5 e 10 dias de avaliação após 4 dias consecutivos de administração para o teste de toxicidade subaguda) nem alteração no comportamento dos animais. Não houveram alterações nos parâmetros avaliados, a exceção de uma queda da massa ganha proporcional ao aumento da concentração administrada (toxicidade subaguda), o que acarretou em consumos menores de água e ração.

Os órgãos como rins, baço e fígado tiveram aumento de massa nos testes de toxicidade aguda das MOFs MIL-88A e Bt, sendo que os valores voltaram ao normal com o passar do tempo. Já para a MOF MIL-100, órgãos como pulmão, baço e fígado apresentaram aumento de massa, não sendo constatados se estes valores retornaram ao normal, uma vez que para esta MOF só foram avaliados os períodos de 1 dia e 1 semana após a administração. No teste de toxicidade subaguda o pulmão apresentou aumento de massa e o fígado uma queda de massa, não sendo estas alterações em nenhum dos casos significativa. Em relação aos parâmetros bioquímicos, houveram oscilações dos valores que retornaram ao normal posteriormente indicando, dentre outros, que a função hepática estava preservada e que quaisquer efeitos adversos observados nestes testes, apresentaram possíveis sinais de reversibilidade.

Da Cunha⁷² estudou a toxicidade aguda da MOF $[\text{Zn}(\text{BDC})(\text{H}_2\text{O})_2]$, para carreamento de um fármaco antitumoral, utilizando o protocolo 423 da OECD. Neste

estudo, foi testada a concentração mais alta sugerida pelo protocolo (2000 mg/Kg) e, apesar desta MOF ter sido classificada na categoria GHS 5 que é a menos tóxica, vários órgãos como rins, fígado coração e pulmão apresentaram elevada toxicidade tecidual, acarretando em alterações fisiológicas nesses órgãos.

Lucena *et al.*¹⁰ realizou um teste de toxicidade aguda em ratas Wistar fêmeas pela via oral da MOF [Eu(BTC)]. Neste estudo, foi testado a dose mais alta (2000 mg/Kg) utilizando o protocolo da OECD 423. Não foram observados sinais anormais de comportamento dos animais bem como de toxicidade. Além disso, os parâmetros avaliados como evolução das massas dos animais e dos órgãos (coração, fígado, baço e rins), consumo de água e ração não apresentaram diferença. Com isso, essa MOF foi classificada na categoria GHS 5 com DL₅₀ 5000 mg/Kg garantindo uma boa margem de segurança para o uso desta MOF como marcador luminescente. Quando avaliados indicadores bioquímicos como ALT e a ureia dos animais, não foram verificadas alterações, indicando que as funções hepáticas e renais estavam preservadas. A tabela comparativa (tabela II) apresentada abaixo, mostra os vários resultados de toxicidade obtidos ao se estudar MOFs e complexos, quando estudadas em modelos animais períodos, vias de exposição e concentração variadas.

Tabela II - Tabela comparativa de toxicidade in vivo de MOFs e complexos

Autor	Ruyra <i>et al.</i> ⁷³	Horcajada <i>et al.</i> ⁴³	Da Cunha ⁷²	Lucena <i>et al.</i> ¹⁰
MOFs e Complexos	UiO-66, UiO-67, Co-MOF-74, Mg-MOF-74, MIL-100 e MIL-101 ZIF-7*, ZIF-8* e HKUST-1**	MIL-88A, MIL-88Bt e MIL-100 (aguda) MIL-88A (subaguda)	Zn(BDC)(H ₂ O) ₂	Eu(BTC) (Marcador Luminescente)
Modelo animal	Embriões de peixe zebra	Rato	Camundongo	Rato
Concentração	1 a 200 µM	25 a 220 mg/Kg	2000 mg/Kg	2000 mg/Kg
Período	5 dias	1 dia, 1 semana, 1 mês e 3 meses (aguda) 5 e 10 dias com 4 dias de administração (subaguda)	14 dias	14 dias
Via		Intravenoso	Oral	Oral
Toxicidade	Sem alterações. *Queda significativa na taxa de eclosão. **Morte de todos os embriões	Sem óbitos. Órgãos com ganho de massa reversível (aguda) Queda do ganho de massa (subaguda)	Sem óbitos. Elevada toxicidade tecidual (rins, fígado, coração e pulmão)	Sem óbitos Valores dos parâmetros normais
Protocolo			423 OECD	423 OECD

É possível verificar a alta variabilidade da toxicidade que as MOFs, estudadas por esses grupos, apresentam em meios biológicos. Essa variabilidade pode estar atrelada aos componentes constituintes das MOFs estudadas (metal e o ligante). Nesse sentido, estudos de estabilidade das MOFs tornam-se um requisito na melhor compreensão de seus efeitos sob um organismo. Este trabalho, além de ser o primeiro envolvendo a toxicidade aguda por inalação de um marcador luminescente, traz a primeira descrição do estudo de toxicidade do R-Marker por via inalatória e oral, além de sua estabilidade em meio ácido.

Entretanto estudos preliminares da toxicidade desta rede já foram conduzidos por Arouca.³¹ Arouca verificou a degradação da MOF Eu(DPA) usada como marcador para resíduo de tiro, após o disparo de arma de fogo. Os resultados mostraram a liberação de compostos orgânicos tóxicos como a piridina, que deve ser originária do anel piridínico do ácido dipicolínico. Além disso, Arouca verificou que a presença do marcador Eu(DPA) não altera significativamente a distribuição de tamanho de partículas do GSR. Este dado é relevante pois a presença de partículas muito pequenas aumentaria a chance de absorção e pode ser associado a um aumento na toxicidade. Além disso, o DPA na sua forma pura pode causar irritações à pele, aos olhos e ainda causar irritações respiratórias.⁷⁸ Caso inalado, pode causar efeitos no sistema nervoso central, além de problemas de memória, tonturas e fadiga anormal.⁷⁹

Outro possível causador de efeito tóxico é o íon Eu^{3+} . Bruce *et al.*⁸⁰ conduziram experimentos com o óxido e o nitrato de terras raras, entre eles o európio. Neste estudo foram avaliadas as toxicidades aguda dos nitratos de terras raras pelas vias intraperitoneal, oral e intravenosa. Em relação ao nitrato de európio, foram obtidas as DL_{50} de 210 mg/Kg, >5000 mg/Kg e entre 30 - 60 mg/Kg respectivamente para as vias citadas, em ratos. Em camundongos foi obtida uma DL_{50} de 320 mg/Kg pela via intraperitoneal.

Tais resultados indicam que ratos são mais suscetíveis do que camundongos e que a via de administração tem forte influência sobre a toxicidade. Indica também que a via oral é a menos agressiva, apresentando toxicidade muito baixa, possivelmente devido à baixa absorção pelo trato gastrointestinal. Além disso, foi realizado um teste para se verificar a toxicidade do íon nitrato via intraperitoneal em ratos. Para isso, foi administrado nitrato de sódio a uma concentração do composto que obteve a menor toxicidade dos terras raras (nitrato de lutécio) em um grupo de 10 ratas. Não foram observados óbitos nem alterações patológicas, indicando que o metal é o maior responsável pela toxicidade do nitrato de terra rara. Nesse sentido, infere-se que se for levado em consideração somente a massa do metal utilizado, as DL_{50} do nitrato de európio pelas vias intraperitoneal e oral deixam de ser 210 mg/Kg e >5000 mg/Kg (massa total de sal), e passam a ser 72 mg/Kg e >1704 mg/Kg (massa do európio) respectivamente.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda por inalação e oral do marcador R-Marker, assim como a sua estabilidade em meio ácido, visando a sua aplicação como marcador luminescente para resíduo de tiro.

2.1. Objetivos Específicos

- Definir a CL_{50} e DL_{50} do R-Marker;
- Classificar o R-Marker de acordo com o *Globally Harmonised System* (GHS);
- Avaliar possíveis efeitos tóxicos resultantes da exposição do R-Marker sobre uma ampla variedade de órgãos (como fígado, rins, suprarrenais, baço, coração, estômago, pulmão, traqueia e esôfago) e sobre os parâmetros bioquímicos dos animais;
- Avaliar a estabilidade do marcador R-Marker;
- Avaliar a segurança para a utilização do R-Marker como marcador luminescente para resíduo de tiro, considerando os possíveis impactos da toxicidade oral e inalatória aguda na saúde de atiradores frequentes como policiais.

Todos os experimentos com animais foram devidamente aprovados pelo comitê de ética CEUA-UnB sob o número UnBDoc n.º 66743/2016 (apêndice figura A).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização do R-Marker

Para a realização do trabalho foram utilizadas amostras de R-Marker previamente preparadas por Weber *et al.*, segundo o método hidrotermal assistido por micro-ondas (10 min a 160 °C).¹³ O material fornecido foi analisado por difração de raios X para verificar a fase formada, assim como a cristalinidade. Para tal, foi utilizado um difratômetro de raios X da marca Rigaku, modelo Miniflex 300, contendo tubo de raios X de cobre e monocromador de grafite, em modo θ - 2θ , com varredura de 5 à 50° e passo de 0,1 °/min.

Também foram adquiridos espectros de excitação e emissão das amostras a temperatura ambiente. As análises foram realizadas com um Espectrofluorímetro Fluorolog da marca Horiba Scientific, com suporte para análise de materiais sólidos. Foi utilizada uma lâmpada de xenônio de 400 W. Os espectros de excitação foram adquiridos na faixa entre 200 e 550 nm, monitorando a emissão em 615 nm. Os espectros de emissão foram obtidos na região entre 550 e 750 nm, excitando a amostra em 395 nm. Por fim, o tamanho hidrodinâmico das partículas foi analisado por espalhamento dinâmico de luz (Malvern Mastersizer 2000).

3.2. Animais

Todos os testes com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UnB conforme mostrado no apêndice A. Foram utilizados ratos *Wistar*, como sugere os protocolos OECD 423 e 436, e estes foram provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais chegaram à UnB com 8 semanas de idade e foram separados em 5 grupos intitulados: FI (Fêmeas de Inalação); MI (Machos de Inalação); GC (Grupo Controle); G1 (Grupo 1); e G2 (Grupo 2). Cada grupo continha 3 animais do mesmo sexo por gaiola. Também foi utilizada uma fêmea para o teste de observação da traqueia.

Todos os grupos foram então alojados no biotério do Instituto de Biologia da UnB durante uma semana para aclimatarem, em sala com ciclo de luz artificial automático (12h claro e 12h escuro).

3.3. Testes de toxicidade aguda por inalação

3.3.1. Montagem da câmara de inalação e otimização dos parâmetros operacionais

Para o estudo da toxicidade por inalação, foram construídas e avaliadas duas câmaras de inalação tipo SAWB (*single animal whole body*) visando atender os parâmetros exigidos pelo protocolo 436 da OECD (apêndice 2). Na primeira câmara a geração do aerossol foi feita por um micronebulizador e partículas dispersas em surfactante (*tween 80*). Na segunda o micronebulizador foi substituído por um compressor conectado a um *trap* de vidro (113,1 mm de altura x 26,1 mm de diâmetro) contendo as partículas para geração do aerossol seco. Após uma série de testes preliminares, observou-se que o segundo sistema apresentou melhor desempenho, e por isso o primeiro sistema foi descartado. Dados relativo a construção da câmara utilizada encontram-se no apêndice 4.

Como os marcadores testados aqui são insolúveis nos solventes conhecidos, sua administração foi realizada na forma de aerossol. Entretanto, a realização de testes com aerossol pode encontrar, dificuldades como, por exemplo, estabelecer uma concentração constante na câmara de inalação e atingir concentrações mais elevadas (como a de 5 mg/L_{ar}). Por outro lado, concentrações elevadas de aerossol podem provocar obstrução física das vias aéreas do animal, levando a uma insuficiência respiratória. Neste caso, o efeito tóxico pode ser erroneamente classificado como proveniente da substância.⁸¹

Para garantir a formação de um aerossol contínuo, parâmetros operacionais foram otimizados antes da realização dos testes de toxicidade, como (i) fluxo do gás de arraste (ar) na saída do compressor e na entrada do trap, (ii) agitação do material particulado contido no trap (sistema de agitação magnética associado às bolas de vidro, como mostra a figura 9) e (iii) massa utilizada. Estes 3 parâmetros foram otimizados para garantir um fluxo homogêneo de partículas dentro da câmara durante todo o experimento. Os testes foram realizados em triplicatas e o tempo de duração variou entre 30 min, 1 hora e 4 horas. Também foi construído um anteparo de metal na base da câmara, para evitar o contato do animal com o pó que se deposite na base, minimizando assim a absorção por via oral e dérmica (embora ambas não tenham podido ser eliminadas pois observou-se a deposição de partículas sobre os animais). Por fim, procurou-se vedar as saídas de ar da câmara, ocasionadas pelo encaixe imperfeito da tampa com a base, para manter a

concentração de partículas dentro da câmara constante. Com isso, pode-se evitar também a contaminação do ambiente ao redor da câmara.



Figura 9 – Sistema 2: Compressor de ar (1); Fluxômetro (2); Agitador (3); Trap (4); Câmara de inalação (5)

3.3.2. Testes *in vivo*

Após a otimização dos parâmetros operacionais da câmara de inalação, foram realizados os testes *in vivo*. Os animais foram testados um a um, visto que a câmara de inalação é do tipo SAWB. Para realização dos testes foi utilizado o protocolo da OECD de número 436 e testando-se apenas a concentração inicial de $1 \text{ mg.L}_{\text{ar}}^{-1}$ durante 4h. A escolha da concentração inicial baseou-se em 3 parâmetros: (i) a dificuldade operacional em obter uma concentração constante na câmara; (ii) possibilidade de causar ou provocar obstrução física das vias aéreas do animal, levando a uma insuficiência respiratória e (iii) não necessidade de obter concentrações muito elevadas, devido a aplicação desejada, uma vez que utilizando a concentração de $1 \text{ mg.L}_{\text{ar}}^{-1}$ obtém-se uma atmosfera equivalente a aproximadamente 12.500 munições disparadas dentro de um stand de tiro de 200 m^3 . Isto equivale ao uso de 200 g de marcador, usados na proporção de 5% em massa por munição. Esta atmosfera é mantida por 4 horas.

No dia do teste as fêmeas pesavam entre 174 e 185 g, e os machos entre 278 e 319 g. A ração e a água do animal foram suspensas, conforme previsto no protocolo. Além disso, foi realizado um período de aclimatação à câmara, onde o animal foi deixado durante 1 hora antes do início do experimento. Durante o experimento o animal ficou

isolado na câmara durante um período de 4 horas submetido a inalação do marcador luminescente R-Marker. Para isso, foi utilizado um fluxo de ar constante de 1,75 L_{ar}/min, 120 esferas de vidro (elementos de moagem do moinho de bolas com aproximadamente 0,1 mm de diâmetro) e uma barra magnética (15,9 mm x 5,4 mm) dentro do trap sob agitação de aproximadamente 780 rpm.

Durante estas 4 horas, o animal foi observado para avaliar qualquer sinal de toxicidade, bem como alterações comportamentais. A temperatura interna da câmara foi medida a cada hora. A temperatura ambiente (externa à câmara) e a umidade foram estimadas por informações meteorológicas do dia do experimento. Estes dados estão relacionados na tabela I.

Após a realização do experimento, o animal foi mantido separado dos outros em uma gaiola como sugere o protocolo. Tal procedimento foi realizado para evitar contaminação cruzada entre os animais, já que os mesmos tendem a se acariciar muito, dormir junto e limpar uns aos outros. Passado um dia do teste, o animal isolado foi então devolvido à gaiola junto aos outros animais que já haviam passado pelo teste também. Caso fosse o primeiro do grupo a ser testado, este permaneceu isolado até que os outros fossem testados e posteriormente colocados juntos. Parâmetros como a evolução da massa dos animais, bem como consumo de água e ração foram registrados durante os 14 dias de observação. Foi observada também a persistência do material luminoso sobre a pele dos animais também foi analisada durante este período.

Ao fim do 14º dia de experimento, todos os animais foram eutanasiados utilizando dose letal de anestésicos (cetamina e xilazina) via intraperitoneal e órgãos como o coração, baço, fígado, suprarrenais, rins, estômago, traqueia, esôfago e pulmão foram coletados, analisados e armazenados em formol 10%. O sangue de todos os animais foi coletado e centrifugado a 5000 g por 5 minutos para coleta do soro, o qual foi armazenado a -18 °C em tubos de ensaio contendo heparina. As amostras foram posteriormente analisadas pelo laboratório Sabin, para avaliação dos parâmetros bioquímicos como proteínas totais, albumina, globulina, TGO (transaminase glutâmica oxalacética), TGP (transaminase glutâmica pirúvica), gama GT (gama glutamil transpeptidase), creatinina, ureia e a fosfatase alcalina no sangue dos animais. Esses parâmetros são capazes de fornecer indícios de alteração no funcionamento de órgãos como fígado, rins, vesícula biliar e sistema imunológico.

3.4. Teste de observação da traqueia

Para complementar o teste de toxicidade aguda por inalação, foi realizado um teste de observação da traqueia. Para tal foi utilizada uma rata fêmea com idade próxima de 9 semanas, e pesando aproximadamente 168 g. Os procedimentos adotados com as fêmeas do teste de toxicidade aguda por inalação também foram adotados neste teste. Ao final do teste de 4 horas, a fêmea foi eutanasiada e órgãos como a traqueia, esôfago e pulmão extraídos para análise visual e para análise de luminescência sob radiação UV.

3.5. Testes de toxicidade aguda oral

Para os testes de toxicidade aguda oral foi utilizado o protocolo internacionalmente aceito da OECD nº 423 (apêndice 3). Após o período de aclimatação de 1 semana, os animais foram submetidos à cirurgia para implantação de transmissores operados à bateria (*Subcue dataloggers*, Calgary, Canadá) na cavidade abdominal com o intuito de se avaliar a temperatura corporal dos animais durante o experimento. O procedimento foi realizado sob anestesia com uma mistura de cetamina e xilazina (60 e 10 mg/kg, intraperitoneal – i.p.). Os animais foram separados em grupos intitulados grupo controle (GC), grupo 1 (G1) e grupo 2 (G2) o qual foi a repetição do G1. Após uma semana sem nenhuma mortalidade dos animais em recuperação da cirurgia, os animais do primeiro grupo teste (G1) foram deixados em jejum durante 12 horas como recomenda o protocolo, para início dos testes. Este procedimento foi repetido para os demais grupos.

No dia da administração, as fêmeas pesavam entre 168 e 184 g (GC), 169 e 179 g (G1) e entre 162 e 174 g (G2). Foi preparada uma suspensão salina de marcador baseada na dose inicial sugerida de 2000 mg/Kg. Sendo assim, a suspensão continha concentração de 100 mg do R-Marker por ml de soro fisiológico. A suspensão foi levada ao banho ultrassônico por 4 min e posteriormente a um agitador tipo vórtex durante 1 minuto para homogeneização. Este procedimento foi realizado duas vezes. A suspensão final foi levada ao vórtex por mais 1 minuto antes da administração em cada animal seguindo assim o mesmo procedimento realizado por Lucena *et al.*^{10,34} Dados referentes a esse procedimento encontram-se no apêndice 3.

Os animais foram imobilizados manualmente e a cânula de polietileno (PE-50, com 4 cm de comprimento) conectada a uma seringa de plástico de 5 ml, foi então inserida por via oral e utilizada para administração da suspensão. O volume administrado (3,3 - 3,7 ml) variou de acordo com a massa do animal (162 - 184 g) nos dias dos experimentos. Ao grupo controle foi administrado apenas solução salina, enquanto que aos grupos G1 e G2 foram administrados a suspensão do marcador.

Após a administração, os animais foram mantidos em jejum e com restrição hídrica durante 4 horas para serem avaliados por qualquer sinal de toxicidade e/ou alterações comportamentais. Terminado o período de observação, a ração e a água foram fornecidos aos animais e os mesmos foram avaliados mais uma vez no mesmo dia para verificação de sinais de severidade ou mortalidade. Os ratos foram então mantidos em gaiolas padrão no biotério da UnB, em sala com luminosidade controlada durante todo o experimento. Assim como no teste de toxicidade aguda por inalação, os parâmetros evolução da massa dos animais, consumo de água e ração também foram avaliados durante os 14 dias de observação.

Ao fim do 14º dia de experimento, todos os animais foram eutanasiados e órgãos como o coração, baço, fígado, suprarrenais, rins, estômago, traqueia, esôfago e pulmão foram coletados, analisados e armazenados em formol 10%. O sangue coletado foi centrifugado a 5000 g por 5 minutos e o soro foi coletado e armazenado a -18 °C em tubos de ensaio contendo heparina. As amostras foram analisadas pelo laboratório Sabin, e no qual foram avaliados parâmetros como proteínas totais, albumina, globulina, TGO (transaminase glutâmica oxalacética) ou AST (aspartato aminotransferase), TGP (transaminase glutâmica pirúvica) ou ALT (alanina aminotransferase), GGT (gama glutamil transpeptidase), fosfatase alcalina creatinina e ureia no sangue dos animais.

3.6. Teste da gaiola metabólica

Adicionalmente ao teste de toxicidade aguda oral, foi realizado um teste em gaiola metabólica, com a finalidade de avaliar a excreção do material administrado. Para tal, foi utilizada apenas uma fêmea de rato Wistar, pesando 192 g. O procedimento para administração do marcador e avaliação do animal foram os mesmos adotados no teste de toxicidade aguda oral (com dose de 2000 mg/kg), exceto que não foi implementado transmissor de temperatura, e o animal foi mantido em gaiola metabólica. E após as 4 horas de observação, água e ração foram fornecidas *ad libidum*. A urina e as fezes foram

coletadas nos intervalos de 1, 4, 8, 24 e 48 horas após a administração, e o material coletado foi armazenado na geladeira. A presença de luminescência na urina e nas fezes do animal foi visualizada sob radiação ultravioleta (254 nm).

3.7. Teste de estabilidade em meio ácido do R-Marker

Para o teste de estabilidade em meio ácido foi preparada uma solução de HCl 1,0 M com pH 1,6. O pH escolhido reflete uma situação de jejum estomacal,⁸² a qual é uma possível situação em ambiente envolvendo disparo de arma de fogo pelos atiradores. Foram então adicionados 12 mg de R-Marker e da MOF [Eu₂(DPA)₃(H₂O)₃] a 20 ml da solução HCl.

As suspensões foram então deixadas sob agitação magnética a aproximadamente 110 rpm, seguindo os mesmos intervalos de tempos utilizados no teste da gaiola metabólica, sendo 1, 4, 8 e 24 horas para o R-Marker e 1, 4 e 8 horas para a MOF [Eu₂(DPA)₃(H₂O)₃]. Esses períodos foram escolhidos uma vez que ratos em jejum, podem vir a apresentar comida ainda no estômago 18 horas depois da última refeição.⁸³ Contudo, não foi utilizado o período de 48 horas, visto que os períodos já utilizados são mais que suficientes para simular o meio estomacal. Após o período determinado, as suspensões foram centrifugadas à 6000 rpm durante 30 minutos e o sobrenadante levado para análise por espectroscopia UV-Vis (Varian, modelo Cary 5000), monitoradas o pico em 271 nm. O material particulado restante (apenas do R-Marker remanescente) foi seco em estufa e levado para análise por espectroscopia de emissão.

Para análise dos resultados obtidos, foi obtida uma curva analítica (figura 10) utilizando-se a mesma solução de ácido dipicolínico em HCl 1,0 M, com concentrações de 5 a 100% da concentração utilizada no experimento.

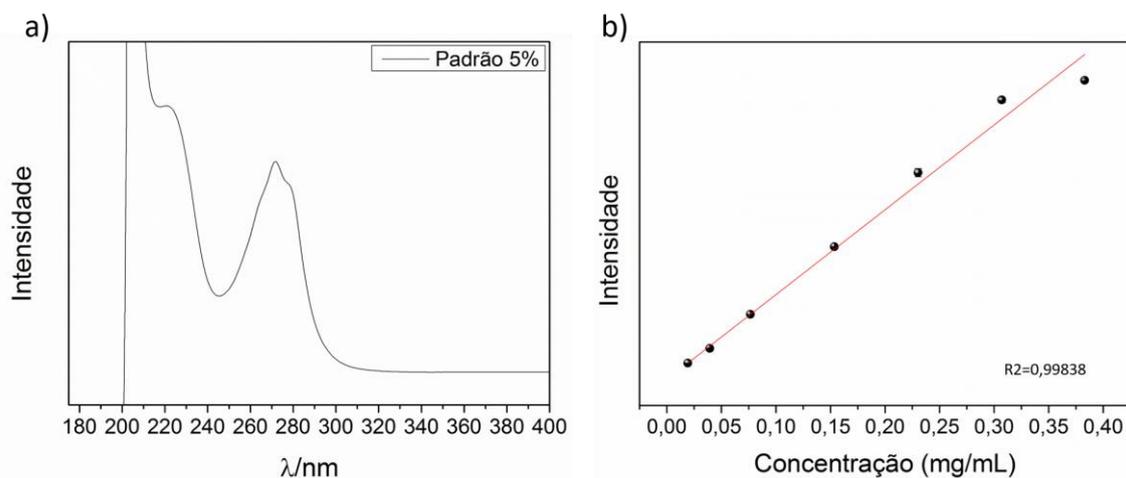


Figura 10 -a) Espectro de absorção da solução padrão (5%) de DPA em HCl 1,0 M, pH 1,6; b) curva analítica obtida a partir de todos os padrões

3.8. Análise e comparação do marcador excretado

As fezes coletadas no teste da gaiola metabólica foram desidratadas em estufa a 60°C por 3 dias, e analisadas no espectrofluorímetro Fluorolog FL-3 (Horiba) para obtenção de espectro de emissão (com excitação em 395 nm). O espectro de emissão obtido das fezes foi comparado com aquele obtido do marcador antes da administração, com o material resultante do teste de estabilidade, e com espectros de MOFs já conhecidas ([Eu(DPA)(HDPa)]¹³ e [Eu₂(DPA)₃(H₂O)₃]⁵⁰).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do R-Marker

O marcador utilizado neste trabalho foi previamente sintetizada pela via hidrotermal assistida por micro-ondas a partir dos procedimentos já descritos pelo grupo¹³ e possui elevada cristalinidade. Contudo, não foi obtida a fase esperada (figura 11), e nenhuma das fases já publicadas para esta MOF,^{56,84} sendo que a fase com maior semelhança foi descrita por Weber *et al.*¹³ Observou-se, na verdade, a formação de uma mistura de fases. Isto pode ser explicado pelo fato do material fornecido ter sido oriundo de uma mistura de diversas sínteses, as quais foram realizadas para os testes de eficiência do marcador – testes os quais foram obtidos excelentes resultados (figura 6). Arouca,³¹ utilizando a mesma via de síntese, também não obteve a fase esperada, reforçando que o material desejado não apresenta boa reprodutibilidade na síntese, apesar dos excelentes resultados como marcador para GSR.

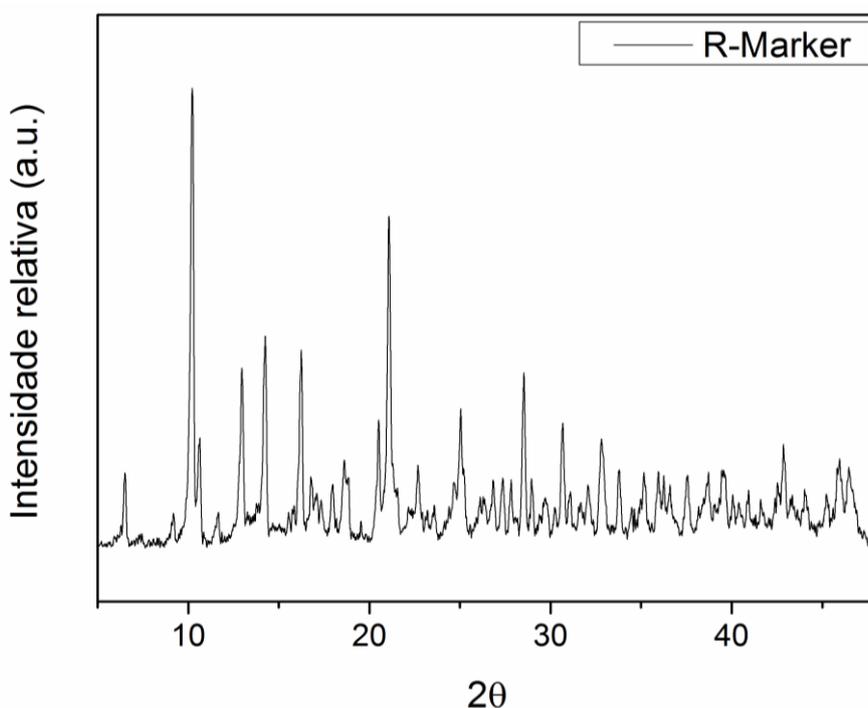


Figura 11 – Difratograma de raios X do marcador R-Marker.

Os espectros de emissão e excitação do R-Marker estão apresentados na figura 12. A banda larga entre 250 e 350 nm é referente a absorção do ligante, e mostra que ocorre transferência da radiação do ligante para o íon Eu (efeito antena). As principais transições do íon Eu^{3+} , ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_J$ ($J = 0 - 4$), são observadas no espectro de emissão. Entretanto, a

multiplicidade do pico na transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ do marcador R-Marker é maior do que a permitida ($2J + 1$), sugerindo assim mais de um sítio, corroborando os resultados obtidos na difração de raios X, que indicam a presença de mais de uma fase cristalina.

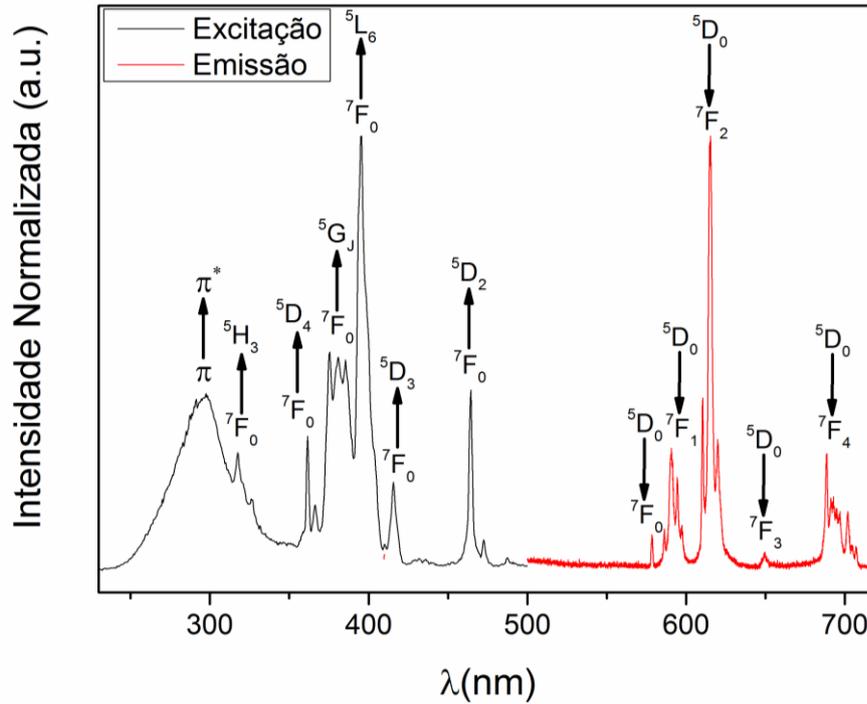


Figura 12 - Espectro de excitação e emissão do R-Marker.

As micrografias das partículas do R-Marker (figura 13) mostram heterogeneidade quanto a distribuição de tamanho e forma das partículas, variando de partículas submicrométricas a agregados com dimensão superior a $110 \mu\text{m}$. A presença de grandes agregados podem interferir na concentração de particulado dentro da câmara, bem como no local de deposição da partícula no trato respiratório do animal.^{85,86}

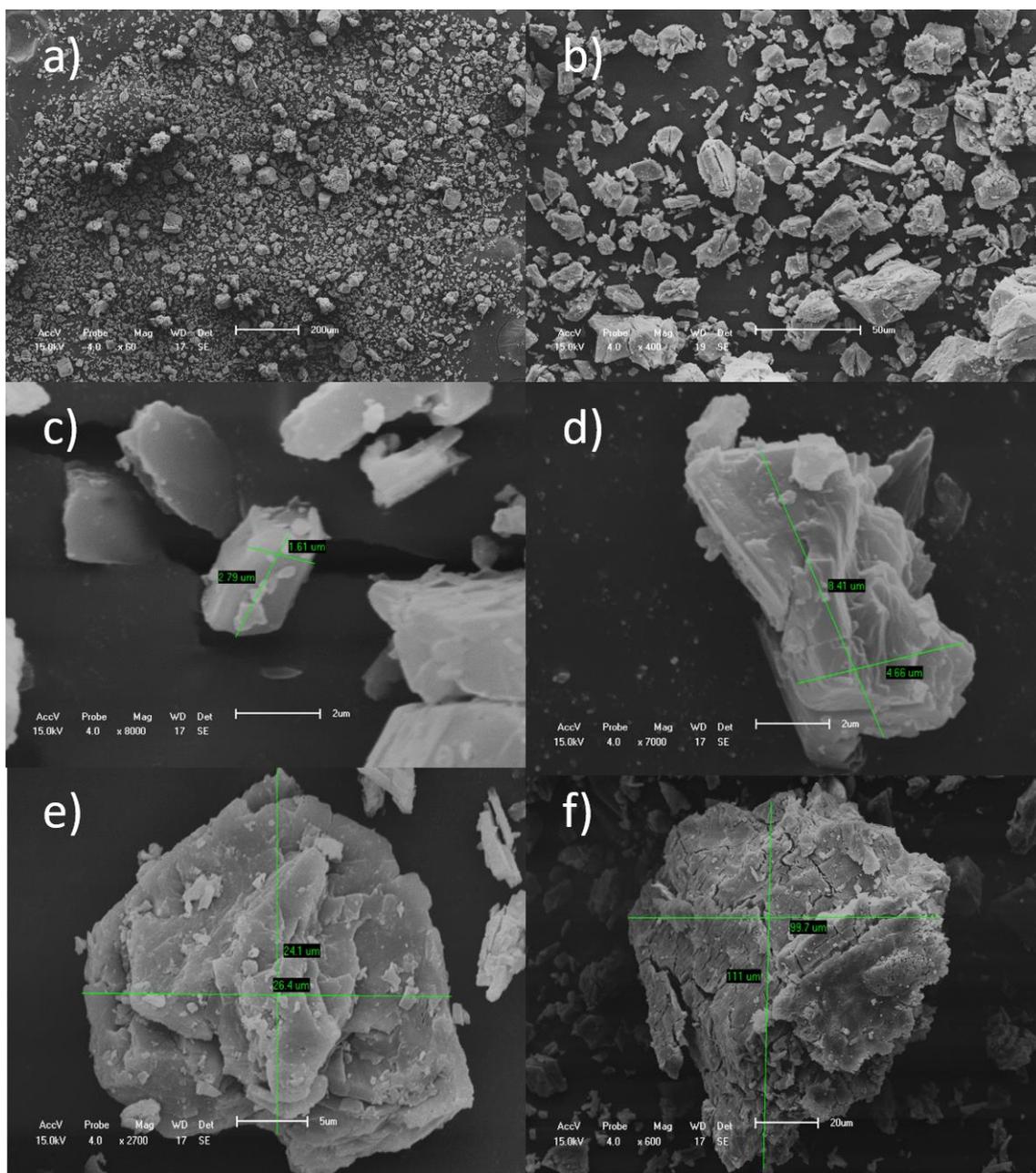
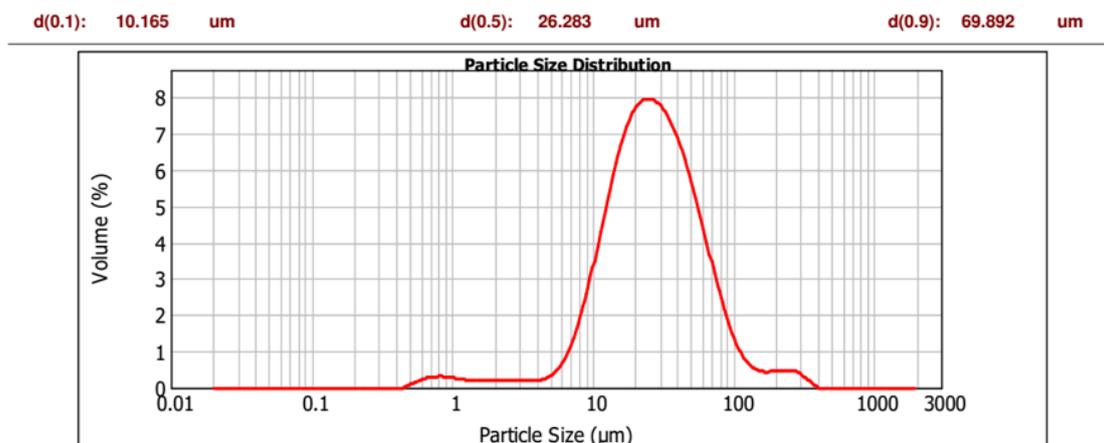


Figura 13 – Imagem de MEV do marcador luminescente-Marker.

A análise do tamanho de partícula por espalhamento de luz, feita para se obter uma medida da distribuição de partícula do marcador (figura 14a), permite inferir que o tamanho médio (aproximadamente 26 μm) das partículas do marcador encontram-se bem acima do recomendado pela OECD (1 a 4 μm) para os testes de inalação. Partículas acima do recomendado ficam retidas logo na faringe, podendo causar uma variação na toxicidade.^{81,86} Nota-se que mesmo após a maceração, o tamanho médio das partículas não variou muito, mantendo-se em 26 μm aproximadamente. Para a redução do tamanho de partícula, seriam necessários procedimentos mais eficazes de moagem e

desaglomeração, visto que somente a maceração não foi suficiente para atingir o tamanho adequado (figura 14b). Entretanto, optou-se neste trabalho por utilizar as partículas com tamanho do marcador recém preparado (sem procedimentos adicionais para redução de tamanho), visto que o objetivo principal era avaliar a toxicidade do material que havia demonstrado bons resultados como marcador luminescente para GSR.

a)



b)

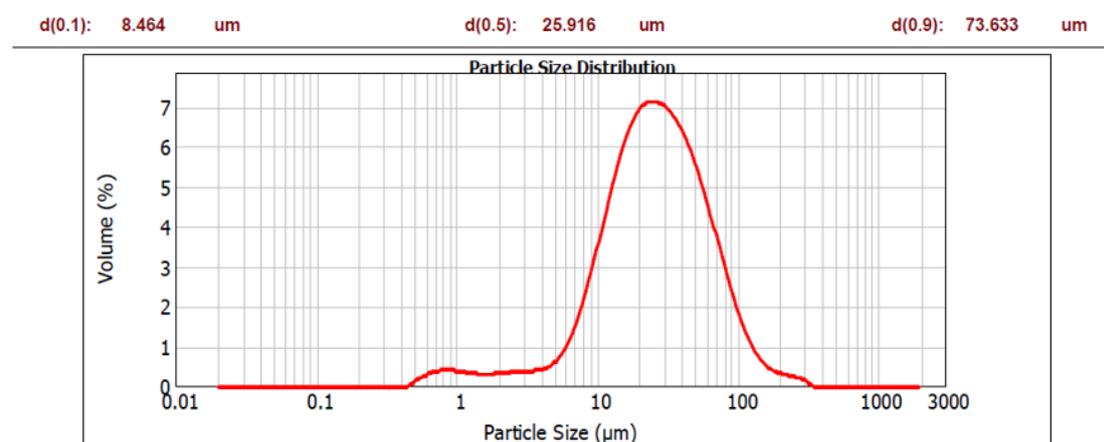


Figura 14 – a) Granulometria do R-Marker mostrando a distribuição do tamanho de partícula; b) Granulometria do R-Marker após a maceração.

4.2. Testes de toxicidade aguda por inalação *in vivo*

Na primeira etapa de avaliação da toxicidade do R-Marker foram realizados os testes de toxicidade aguda por inalação como descrito no item 3.3.2. Participaram do teste 6 animais, sendo 3 machos e 3 fêmeas, os quais ficaram expostos ao aerossol do R-Marker por 4 horas seguidas a temperatura ambiente. Entretanto antes de discutir os resultados

de toxicidade propriamente ditos serão discutidos alguns aspectos relativos às condições dos experimentos os quais são considerados relevantes.

Todas as condições de cada experimento encontram-se descrita na tabela I. Durante os experimentos foram monitoradas a umidade e a temperatura (interna e externa). Observou-se que tanto a umidade quanto a temperatura influenciam a concentração de marcador dentro da câmara. Os testes com as fêmeas (FI) foram realizados em dias mais quentes e com menor umidade, o que acarretou em uma maior concentração e menor desvio padrão da concentração (FI: $C_{\text{média}}=1,28 \pm 0,03$; MI $C_{\text{média}}=1,07 \pm 0,17$. Contudo, foi possível obter valores próximos a concentração inicial de $1 \text{ mg.L}_{\text{ar}}^{-1}$ durante 4h definida como ponto de partida.

Tabela III. Dados principais a respeito do teste de inalação individual de cada animal

Grupo	FI (Fêmeas de Inalação)				MI (Machos de Inalação)			
	Fêmea 1	Fêmea 2	Fêmea 3	Média ± Desv. Pad.	Macho 1	Macho 2	Macho 3	Média ± Desv. Pad.
Temperatura externa	30°C	32°C	32°C	31±1	28°C	21°C	30°C	26±4
Temperatura na câmara	35°C	33°C	32°C	33±1	29°C	25°C	32°C	28±3
Umidade	32%	35%	45%	37%±6	73%	93%	42%	69%±20
Tempo de experimento (h)	4	4	4	-	4	4	4	-
Fluxo (L_{ar}/min)	1,75	1,75	1,75	-	1,75	1,75	1,75	-
Volume de ar enviado à câmara (L)	420	420	420	-	420	420	420	-
Bolas de vidro	120	120	120	-	120	120	120	-
Agitação da chapa agitadora (rpm)	780	780	780	-	780	780	780	-
Massa residual no trap (após 4h de experimento)	172,2	145,6	170,8	162,9±12,2	251	334,9	165,5	250,5±69,2
Massa total enviada	530,5	555,1	531	538,9±11,5	449,7	366	535,8	450,5±69,3
Massa total utilizada (mg)	702,7	700,7	701,8	701,73±0,82	700,7	700,9	701,3	700,97±0,25
Concentração final (mg/L_{ar})	1,26	1,32	1,26	1,28±0,03	1,07	0,87	1,28	1,07±0,17

Analisando em detalhes a influência da umidade e da temperatura no experimento, observa-se que a umidade relativa do ar estava bem mais alta quando foram realizados os

experimentos do grupo MI, assim como a temperatura estavam menores. O aumento na umidade pode justificar uma maior retenção de partículas no trap (ver dados de M1 e M2) e portanto a menor concentração de partículas. A figura 15 mostra a relação obtida entre a umidade do ar, a temperatura e a concentração final dos experimentos.

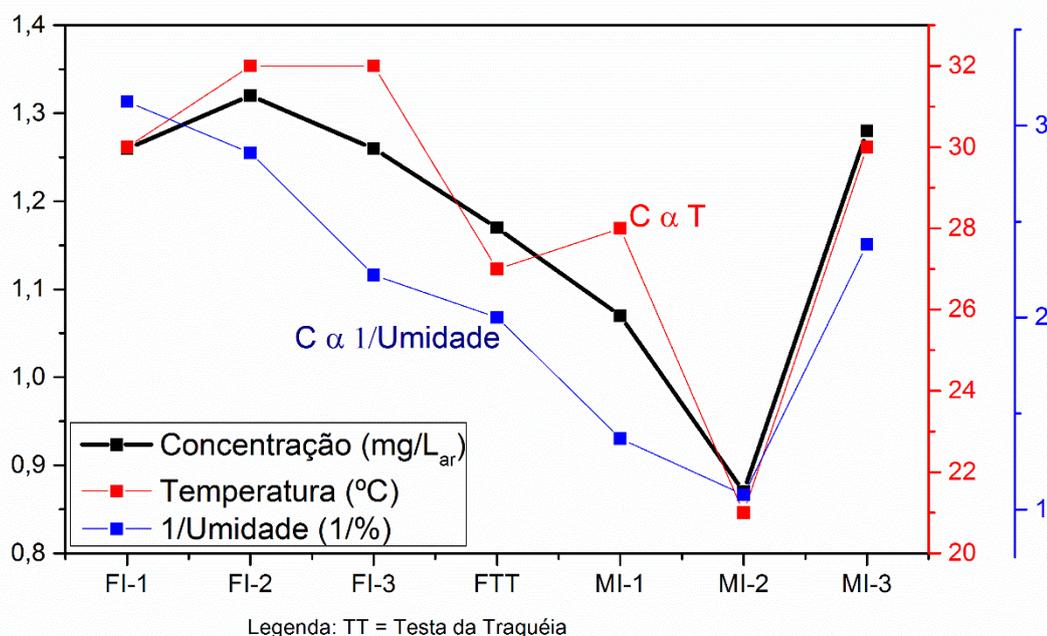


Figura 15 - Relação entre a concentração obtida nos experimentos de inalação, a temperatura e a umidade relativa do ar. FI = Fêmea Inalação; MI = Macho Inalação; FTT = Fêmea do Teste da Traqueia.

A concentração média obtida para o grupo FI, que foi a mais alta dos dois grupos, corresponde em aproximadamente a exposição de um atirador a 16.000 munições marcadas (considerando o uso de 5% em massa de marcador por munição com relação a massa da carga de projeção) em um stand de tiro de 200 m³ durante 4 h. É muito difícil estimar qual o percentual de marcador seria inalado em um disparo. Entretanto é razoável considerar que com essa concentração, é possível garantir uma boa margem de segurança para o uso do marcador.

Com relação aos testes de inalação propriamente ditos, observou-se que os animais submetidos à câmara de inalação não apresentaram quaisquer sinais de toxicidade durante as 4 horas de experimento. Reações comportamentais como estereotipia, autolimpeza e coceira foram intensas na 1^a hora de experimento sendo julgadas como normais, visto que o marcador sendo liberado na forma de aerossol sólido, recobriu tanto a pele do animal, como a região dos olhos, focinho, orelhas, patas (figura 16) causando desconforto induzindo-o a tentar se limpar.

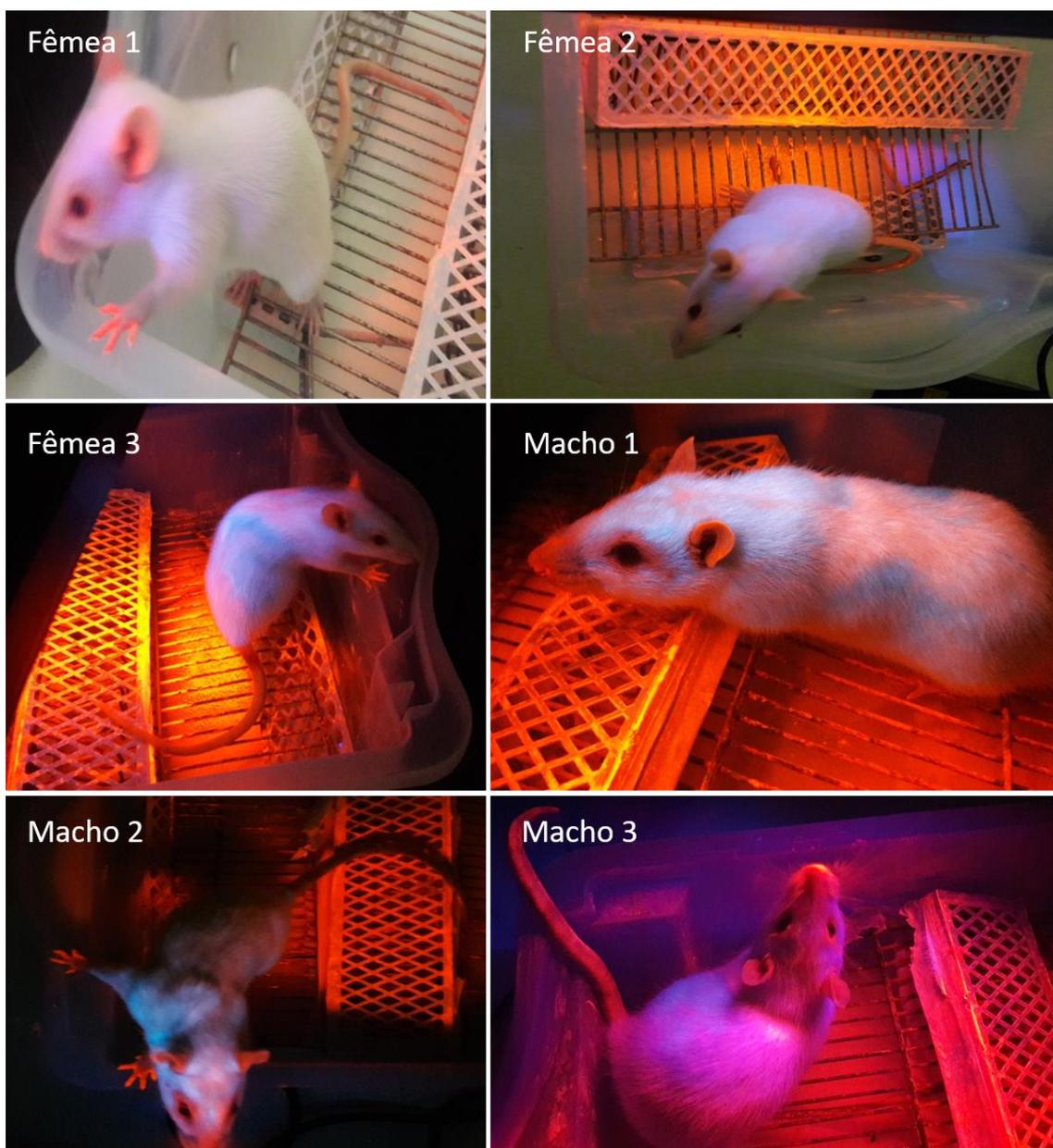


Figura 16 - Ratos Wistar (machos e fêmeas) após o teste de 4 horas de inalação com o R-Marker.

No restante do experimento os animais dormiram, ou mantiveram-se em estado de sonolência, como mostra a figura 17. Este comportamento é justificado pelo horário no qual os experimentos foram realizados (no início da tarde) por se tratarem de animais noturnos.

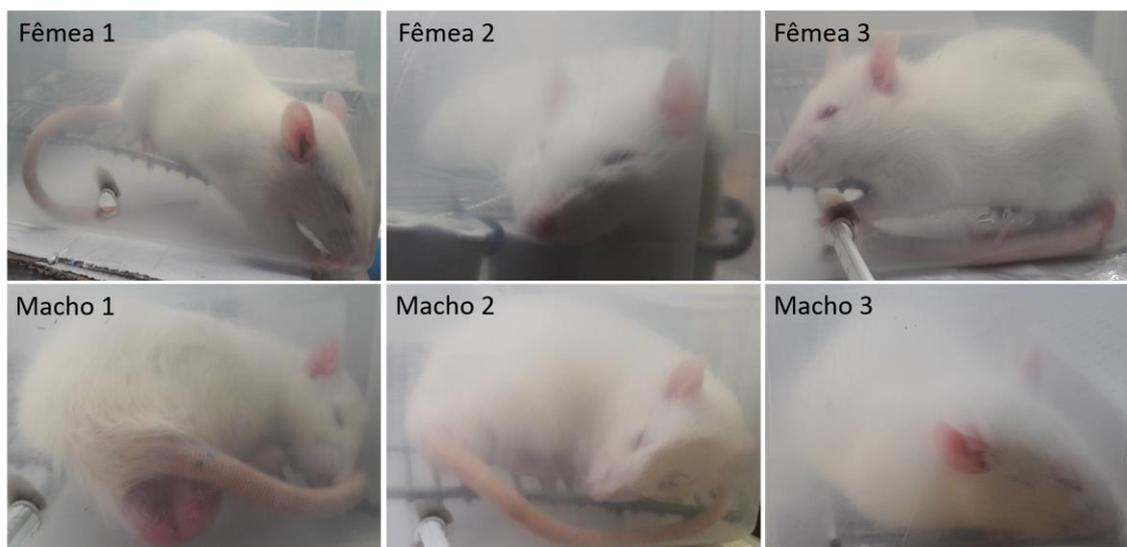


Figura 17 – Animais dormindo durante o experimento (Fêmea 1, 2, TT e Macho 1, 2 e 3) e com sinais de sonolência (Fêmea 3).

Durante o período de observação de 14 dias não foi constatada nenhuma alteração comportamental, bem como indícios de toxicidade aparente. Além disso, nenhum dos animais veio a óbito ou teve que ser sacrificado, sendo estes os primeiros indícios da baixa toxicidade do marcador. Não foi observada nenhuma alteração na pele, no pelo, nos olhos, bem como nos sistemas respiratório, nervoso central e periférico dos animais. Também não foram observados tremores, convulsões, salivação, diarreia ou coma.

Observou-se, porém, que o marcador se depositou sobre a superfície dos animais, em especial sobre as orelhas, patas, região dos olhos e cauda. Isto é evidenciado pela luminescência vermelha observada nestas áreas. Após alguns dias, o marcador persistiu no corpo dos animais, em especial na cauda – provavelmente devido aos hábitos de limpeza dos animais que retiraram as partículas da região da face. Nos dois grupos, foi observada luminescência na cauda até o dia da eutanásia (figura 18). Apesar da permanência do marcador na pele dos animais, não foi constatado nenhum sinal de irritação, inflamação ou toxicidade na pele dos animais. Estudos de toxicidade mais específicos envolvendo o tecido epitelial são necessários para garantir a segurança dos atiradores. Entretanto, este resultado traz fortes indícios de que o marcador possivelmente não venha apresentar reações inflamatórias caso entre em contato com a pele do atirador, corroborando as observações de pesquisadores do grupo ao realizar os testes de disparo com munição marcada.

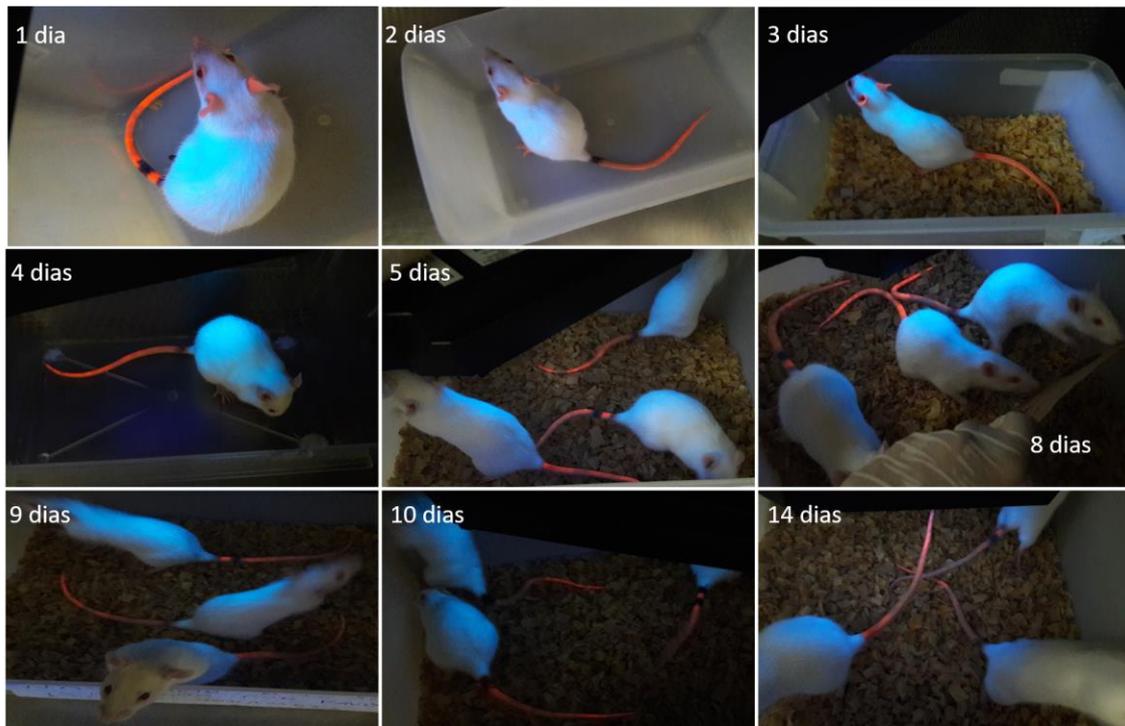


Figura 18 - Presença do marcador no corpo do animal nas orelhas, olhos, patas e cauda após 1 dia, 2 dias, 3 dias e majoritariamente na cauda após 4 dias, 5 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 14 dias (nas últimas 5 figuras, as três fêmeas já se encontravam na mesma gaiola)

Em relação ao ganho de massa dos grupos, não foi observada nenhuma alteração anormal (figura 19a) quando comparado à valores de referência (entre 275 g e 300 g para machos) já estudados para esta linhagem.⁸⁷ O grupo FI também não apresentou nenhum ganho ou queda anormal de massa. Os animais mantiveram-se saudáveis durante todo o período de observação, o que pode ser entendido como um sinal de baixa ou nenhuma toxicidade, uma vez que a massa corpórea é reconhecida como um indicador crítico de toxicidade.⁶³ Quanto ao consumo de água e de ração, tanto as fêmeas quanto os machos utilizados nos testes não apresentaram quedas ou elevações anormais (figura 19b e c) indicando que para este parâmetro, o marcador apresenta baixa ou nenhuma toxicidade.

Após a eutanásia não foram verificadas alterações macroscópicas (figura 20) e nem nas massas dos órgãos extraídos (figura 19d), Uma atenção especial foi dada aos pulmões, por se tratar de um teste de inalação, entretanto nenhuma alteração macroscópica foi observada. Não foi realizado teste histopatológico, porque o protocolo só indica a necessidade de fazê-los quando alterações macroscópicas são percebidas ou quando a substância teste é muito reativa com água (ex. ácidos e substâncias higroscópicas).

É importante ressaltar que o protocolo 436 da OECD não pede grupo controle, por isto, e visando reduzir o número de animais usados no estudo, não foi feito um grupo controle para o teste de inalação.

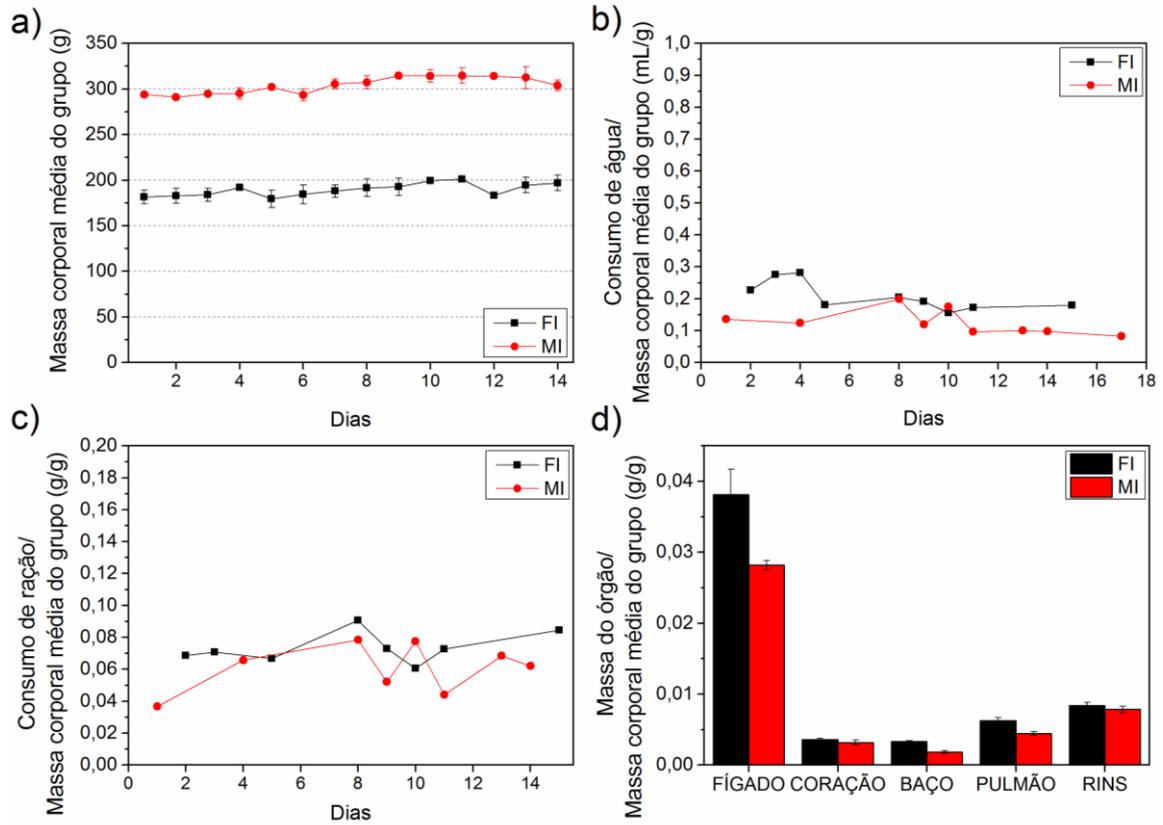


Figura 19 - a) Evolução das massas dos grupos; b) Consumo de água dos grupos; c) Consumo de ração dos grupos; d) Massa dos órgãos.

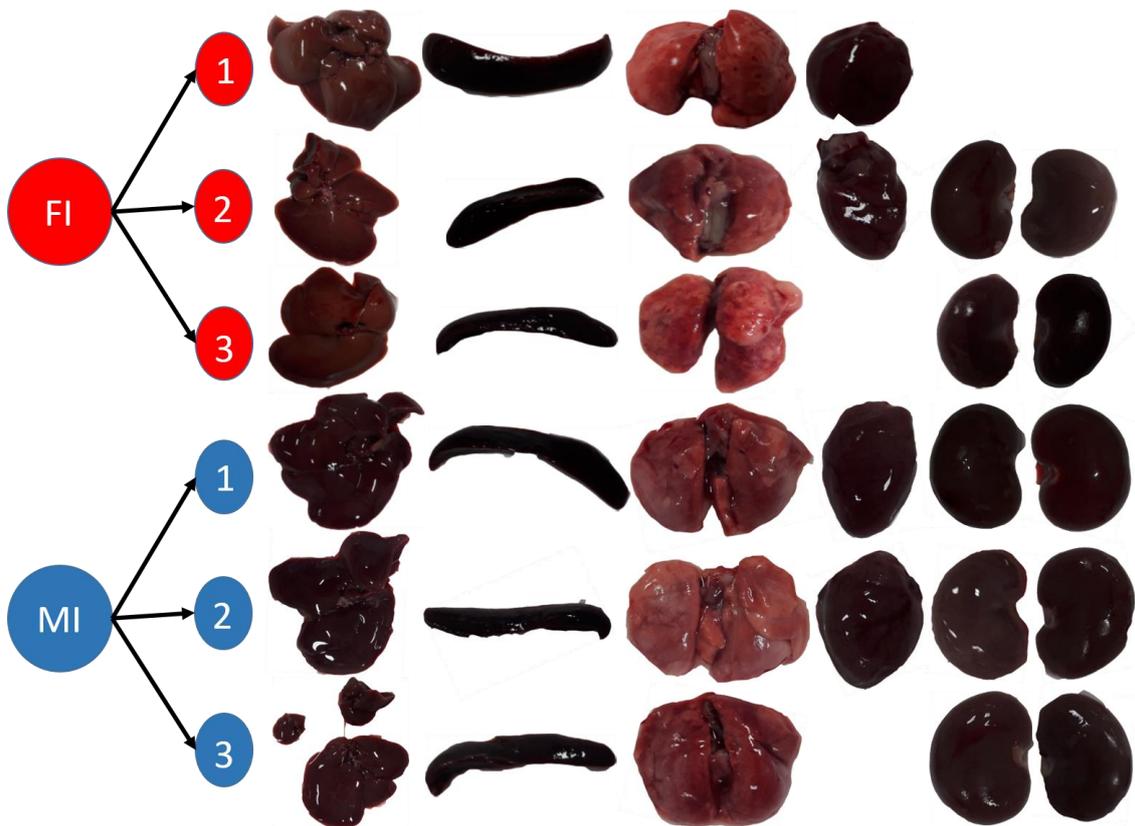


Figura 20 – Fígado, baço, pulmão, coração e rins respectivamente dos grupos FI e MI. As imagens não estão em escala.

Os resultados das análises bioquímicas estão apresentados na figura 21 e os grupos foram avaliados utilizando o teste t de *student* com $P < 0,05$.

A albumina e as proteínas totais (representado pela quantidade total de albumina e de globulina) não apresentaram alterações significativas. O fígado é fonte primária de vários componentes séricos incluindo a albumina. Uma redução na massa hepática pode ter efeito direto na produção de albumina. Já uma inflamação a longo prazo no fígado pode apresentar aumento de globulinas no sangue, o que associado a uma redução nas taxas de albumina pode fazer com que os valores das proteínas totais estejam dentro dos valores de referência.⁸⁸.

Quanto a TGP e a TGO, também não foram verificadas alterações significativas. Um aumento nessas duas enzimas pode sugerir de alguma forma uma possível lesão hepática, uma vez que essas enzimas são encontradas em várias células do organismo, principalmente em hepatócitos. Quando estas células sofrem algum tipo de lesão, estas enzimas são liberadas na corrente sanguínea aumentando a concentração.⁸⁸⁻⁹⁰.

Em relação a ureia e a creatinina, foi possível verificar que a ureia apresenta diferença significativa entre os grupos. O valor baixo da ureia de MI pode ser explicado pelo jejum a que este grupo foi submetido antes da eutanásia, enquanto que o grupo FI não foi. Podemos esperar que quanto mais alto os valores de ureia e a creatinina no sangue, maior é a ineficiência do organismo em filtrar esses compostos, acarretando assim uma possível insuficiência renal.⁹¹ Entretanto, o teor de ureia é dependente de uma série de fatores como metabolismo de proteínas na dieta do animal, resultado da produção de energia e da atividade muscular.^{89,92,93}

Já a Gama GT e a fosfatase alcalina, não foi verificada nenhuma alteração significativa. Estas enzimas possuem isoenzimas em diversos tecidos do corpo, sendo que a sua maior atividade está relacionada às células do trato biliar. Um aumento sérico tanto da Gama GT, quanto da fosfatase alcalina está associado geralmente a coléstase, que é uma interrupção no fluxo dos canais biliares.⁸⁹

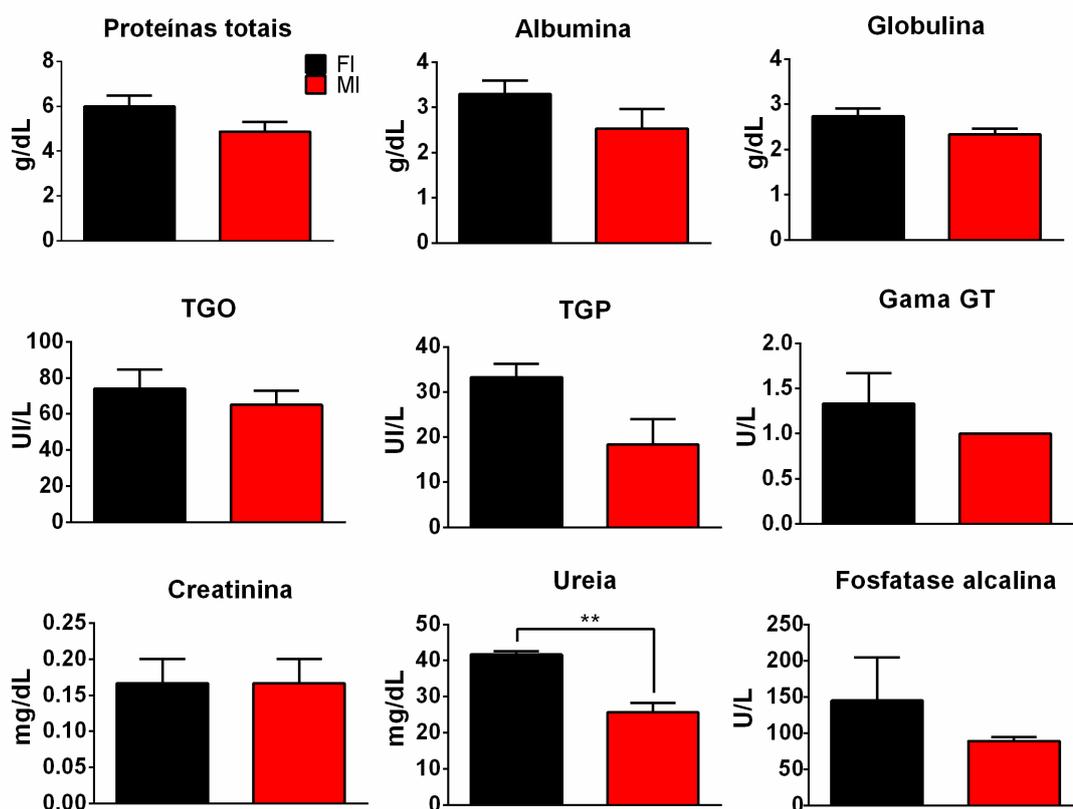


Figura 21 - Análise bioquímica do sangue dos animais dos grupos FI e MI associado ao erro padrão da média.
**diferença significativa

Ao comparar os valores obtidos neste trabalho do grupo FI com os valores de referência da literatura com os obtidos por Giknis *et al.*,⁹⁴ verifica-se que os valores bioquímicos das proteínas totais, albumina, TGO, Gama GT, creatinina e ureia encontram-se alterados (tabela IV). Entretanto, quando os mesmos parâmetros são comparados aos valores de referência obtidos por River,⁹⁵ a TGO, que anteriormente estava com valor alterado, passa a apresentar valores normais. Contudo, a fosfatase alcalina, que estava dentro dos valores de referência, passa a apresentar valores mais baixos. Quando estes valores são comparados aos valores de referência de Lima *et al.*,⁹⁶ apenas a gama GT e a creatinina apresentaram valores alterados. Porém, a TGP, que não apresentou valor alterado em nenhum dos outros valores de referência, passa a estar levemente alterada, com valores pouco abaixo da faixa de referência.

Quando os valores obtidos com o grupo MI são comparados aos de referência da literatura, a mesma divergência pôde ser observada, mostrando que o gênero não é o principal fator das alterações. Quando os valores obtidos para este grupo são comparados com Giknis *et al.*,⁹⁷ os valores das proteínas totais, albumina, TGO, TGP, creatinina, ureia e fosfatase alcalina encontram-se alterados (tabela V). Entretanto, quando os mesmos parâmetros são comparados aos valores de referência de River,⁹⁵ a TGO e a ureia, que anteriormente estavam com valores alterados, passam a apresentar valores considerados normais. Contudo, quando comparado aos valores de referência de Lima *et al.*,⁹⁶ apenas a TGO, a TGP, a creatinina e a ureia apresentaram valores alterados.

Nota-se uma dificuldade de padronização entre os estudos quando os valores bioquímicos obtidos dos animais são comparados a outros valores de referência encontrados na literatura. Percebe-se que, para um mesmo parâmetro bioquímico, existe uma grande discrepância entre os valores considerados normais. Esse mesmo comportamento já havia sido reportado por Lima *et al.*⁹⁶ que, ao comparar seus valores de referência com os de outro laboratório, que adotava procedimentos de análises semelhantes, observou que os valores divergiram em vários parâmetros.⁹⁶ Essas variações podem ser justificadas por diversos fatores, como variáveis ambientais, o local de coleta do sangue (artérias, veias ou mesmo o coração, por exemplo), o tempo de jejum, o estresse durante a coleta em que os animais são submetidos, o uso de diferentes métodos analíticos, assim como a ausência de padronização da dieta dos animais.⁹⁶

Tabela IV - Tabelas comparativa de faixas de valores bioquímicos de ratos Wistar fêmeas. Em vermelho, valores que apresentaram discrepâncias com a literatura.

		Ratos Wistar Fêmeas			
		FI	Giknis <i>et al.</i> ⁹⁴	River ⁹⁵	Lima <i>et al.</i> ⁹⁶
Parâmetros Bioquímicos	Proteínas totais	5,3 - 6,7	6,1 - 7	6,66 - 7,94	5 - 7,7
	Albumina	2,89 - 3,71	3,5 - 5,1	3,39 - 4,45	1,3 - 3,8
	Globulina	2,48 - 2,98	-	-	2,1 - 5,9
	TGO / AST	58,88 - 89,12	85 - 123	46,77 - 176,99	51 - 211
	TGP / ALT	29,14 - 37,52	25 - 36	24,32 - 89,12	32 - 63
	Gama GT	0,86 - 1,8	0 - 0,4	1,21 - 5,55	2,0 - 5,0
	Creatinina	0,12 - 0,22	0,5 - 0,6	0,34 - 0,57	0,28 - 1,1
	Ureia	40,42 - 42,92	23,54 - 34,24	19,82 - 37,75	24 - 49
	Fosfatase Alcalina	60,84 - 229,16	90 - 147	140,15 - 265,49	51 - 116

Tabela V - Tabelas comparativa de faixas de valores bioquímicos de ratos Wistar machos. Em vermelho, valores que apresentaram discrepâncias com a literatura.

		Ratos Wistar Machos			
		MI	Giknis <i>et al.</i>	River	Lima <i>et al.</i>
Parâmetros Bioquímicos	Proteínas totais	4,26 - 5,48	5,9 - 6,6	6,44 - 7,6	4 - 6,9
	Albumina	1,93 - 3,13	3,3 - 4,6	3,46 - 4,12	2 - 3,5
	Globulina	2,16 - 2,5	-	-	2,1 - 5,4
	TGO / AST	53,57 - 76,43	87 - 114	49,21 - 178,13	61 - 210
	TGP / ALT	10,27 - 26,39	28 - 40	32,73 - 97,29	38 - 82
	Gama GT	1	0 - 1	0,58 - 5,28	1,0 - 6,0
	Creatinina	0,12 - 0,22	0,5 - 0,6	0,34 - 0,56	0,24 - 1,2
	Ureia	21,99 - 29,35	27,82 - 34,24	21,19 - 39,55	26 - 58
	Fosfatase Alcalina	80,71 - 97,29	136 - 188	289,07 - 476,29	56 - 153

Uma avaliação precisa sobre a toxicidade através dos parâmetros bioquímicos se torna difícil, uma vez que o protocolo não exige um grupo controle. Além disso, as divergências encontradas na literatura e o fato dos animais serem de sexos diferentes e terem sido submetidos à condições diferentes, dificulta ainda mais esse processo. Entretanto, vale ressaltar que um dos pontos do protocolo é a redução do uso de animais e que, apesar das dificuldades mencionadas, observa-se que os valores dos parâmetros avaliados não apresentaram divergências tão elevadas em relação à literatura (por exemplo, mais de uma ordem de grandeza). Este é o primeiro estudo de toxicidade aguda por inalação de um marcador luminescente que avalia parâmetros bioquímicos. Como resultado, recomenda-se que os biotérios passem a fornecer padrões bioquímicos de seus animais.

Para complementar o teste de toxicidade aguda por inalação, foi realizado um ensaio adicional com o intuito de entender melhor a interação do marcador R-Marker com o trato respiratório do animal. Não foi observado nenhum sinal de inflamação ou qualquer alteração toxicológica na fêmea submetida a este teste. Visualmente foi observado a presença de marcador somente no esôfago (figura 22), e não na traqueia como era esperado. Com isso, infere-se que os animais tenham deglutido o marcador durante os testes de inalação, e que a quantidade inalada seja muito pequena para detecção visual. O fato do tamanho médio de partícula estar acima do recomendado, pode estar contribuindo para este fato, visto que partículas acima de 5 μm tipicamente são retidas pelas vias aéreas superiores, mais especificamente na orofaringe, sendo posteriormente deglutidas.⁸⁶

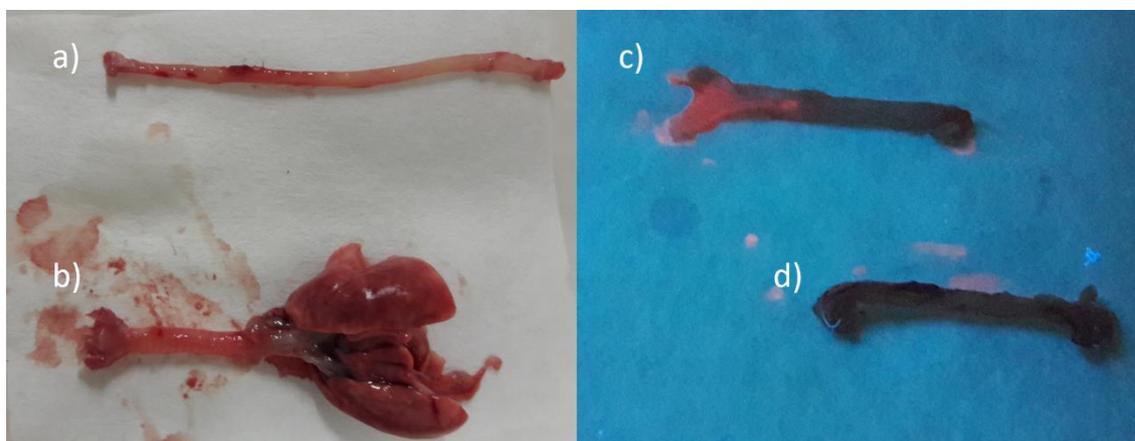


Figura 22 - a) esôfago; b) Traqueia ligada ao pulmão; c) corte longitudinal do esôfago sob radiação UV; d) corte longitudinal da traqueia sob radiação UV

4.3. Testes de toxicidade aguda oral

O teste de toxicidade oral aguda foi realizado em dois grupos de fêmeas (G1 e G2, que foi a repetição de G1) além de um grupo controle. Após a administração do marcador, uma das fêmeas do grupo G1 permaneceu quieta durante o período de observação, enquanto que as outras do mesmo grupo estavam mais agitadas. Contudo, não foi observado piora no estado de saúde desta fêmea e, posteriormente no mesmo dia, a mesma voltou ao normal.

Quanto ao período de observação de 14 dias não foi constatada nenhuma alteração comportamental, bem como indícios de toxicidade aparente assim como no teste de toxicidade aguda por inalação. Nenhum dos animais veio a óbito ou teve que ser sacrificado. Também não foram observadas nenhuma alteração na pele, no pelo, nos

olhos, bem como nos sistemas respiratório, nervoso central e periférico dos animais. Tremores, convulsões, salivação, diarreia e coma não foram observados. Quanto as alterações comportamentais também não foram verificadas, à exceção da situação acima relatada, bem como sinais de toxicidade durante todo o período de observação.

Não foram verificadas anomalias na temperatura corporal dos animais medidas com os sensores de temperatura (figura 23). Tais anomalias poderiam ser consideradas indícios de intensas atividades metabólicas, como inflamações, febre ou hipotermia. No gráfico é possível observar a presença de pequenos picos, demonstrando um aumento na temperatura dos animais momentaneamente. Tais aumentos correspondem ao manuseio dos animais tanto nos dias de limpeza e troca de gaiolas, quanto nos momentos de pesagem, no qual os animais eram manuseados.

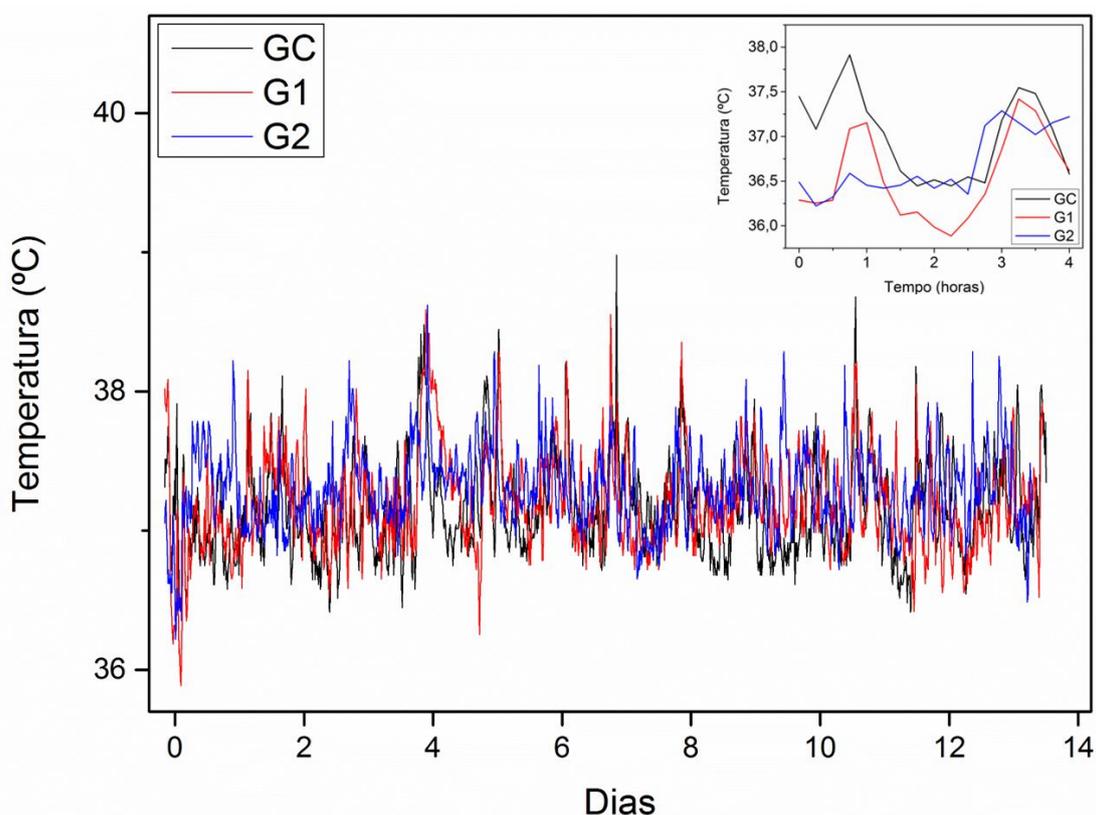


Figura 23 – Evolução da temperatura corporal dos grupos GC, G1 e G2. Inset: Evolução da temperatura nas 4 primeiras horas após a administração.

A lâmpada UV foi utilizada na gaiola dos animais e foi possível verificar a presença de marcador na maravalha e nas fezes, entre 24 e 48 h após a administração da suspensão. Não foi possível concluir se o marcador encontrado era proveniente das fezes e espalhado

para a maravalha pelos animais, ou se provinha da urina também. Por conta desta observação, foi realizado um experimento adicional, em gaiola metabólica.

Em relação ao ganho de massa dos grupos, não foi observada nenhuma queda significativa (figura 24a), indicando também que neste quesito os animais mantiveram-se saudáveis, assim como em relação ao consumo de água e de ração, no qual não foi verificado nenhuma alteração aparente em relação ao grupo controle (figura 24b e c). Os órgãos extraídos apresentaram aspectos macroscópicos normais, com exceção do baço da rata 3 do grupo G1, que apresentou tamanho e massa aproximadamente 2 vezes maior do que os dos outros animais, elevando assim o desvio padrão do grupo G1 no gráfico 24d. Entretanto, macroscopicamente não foi possível verificar nenhuma anormalidade quando comparado ao grupo controle (figura 25), podendo ser, inclusive, um fator genético do animal, e não causado pelo marcador. Contudo, análises mais aprofundadas devem ser realizadas para confirmar tal fato.

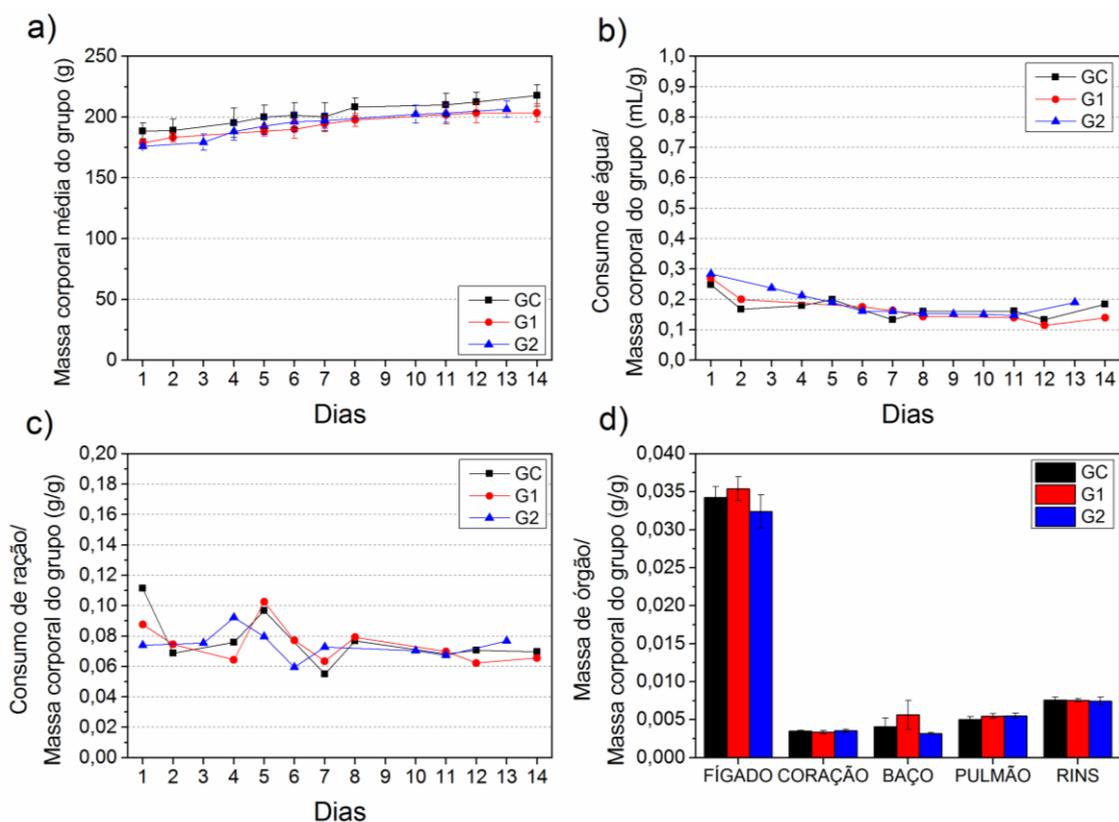


Figura 24. a) Evolução das massas dos grupos; b) Consumo de água dos grupos; c) Consumo de ração dos grupos; d) Massa dos órgãos.

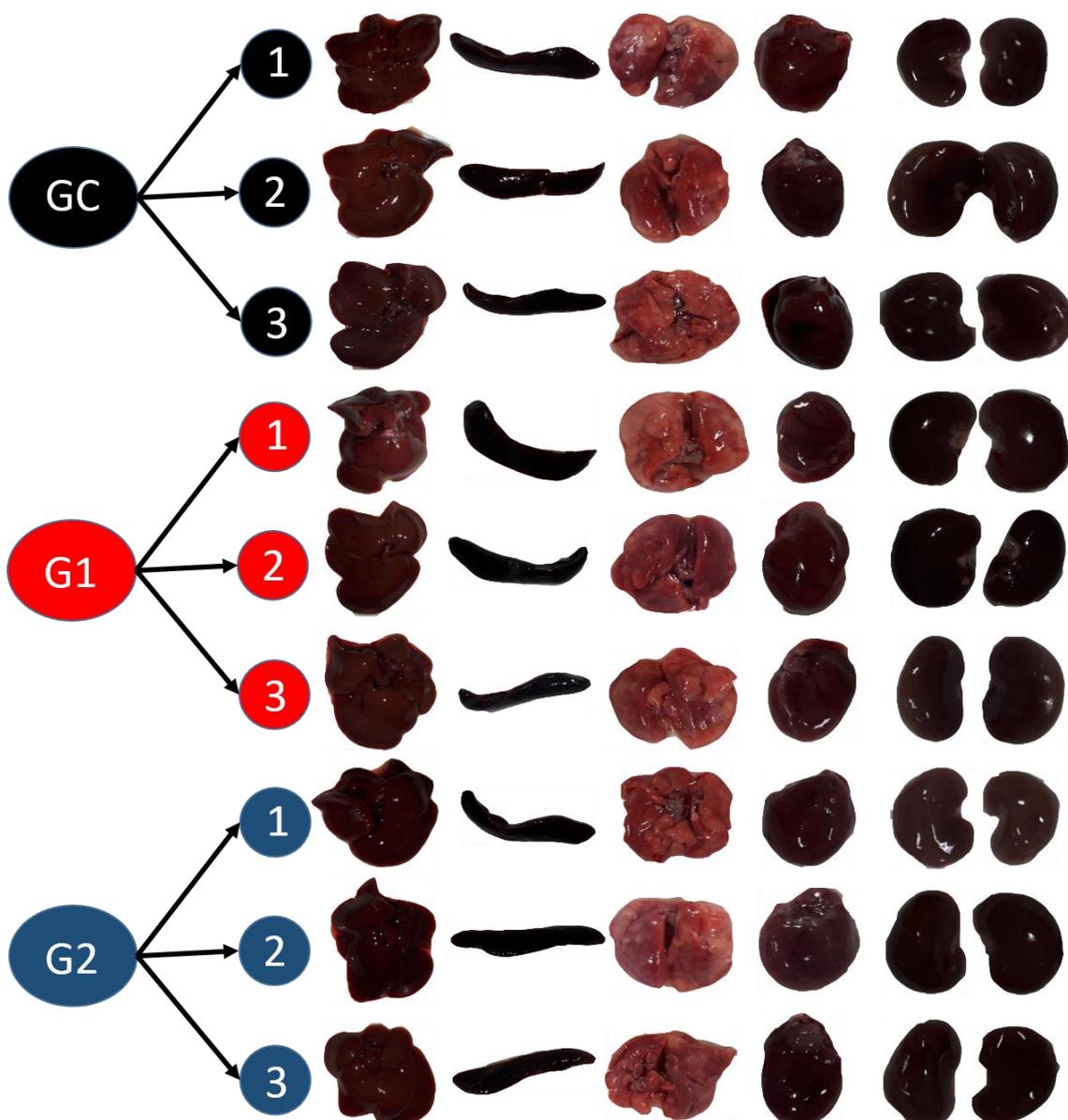


Figura 25 - Fígado, baço, pulmão, coração e rins respectivamente dos grupos G1, G2 e GC. As imagens não estão em escala.

Para a análise bioquímica do sangue novamente foram considerados 9 parâmetros (proteínas totais, albumina, globulina, TGO, TGP, gama GT, creatinina, ureia e fosfatase alcalina). Os resultados das análises estão apresentados na figura 28. Os resultados foram avaliados utilizando o teste ANOVA (do inglês, *analysis of variance*) com comparação entre os grupos com $P < 0,05$.

Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros avaliados para os grupos GC, G1 e G2 exceto para o TGP e para a ureia, que apresentaram diferenças significativas entre os grupos G1 e G2, e entre os grupos GC e o G2 respectivamente (figura 26). Entretanto, quando comparado o TGP dos dois grupos (G1 e G2) ao GC, não

houveram diferenças significativas indicando assim que estes parâmetros estavam normais.

Em relação a ureia, o valor baixo encontrado no grupo G2 pode ser explicado pelo fato deste grupo ter sido colocado em jejum antes da eutanásia, acarretando em uma diferença significativa entre o GC e o G2. Quando os parâmetros bioquímicos avaliados dos grupos G1 e G2 são comparados aos do GC, todos apresentaram valores normais, sendo essa alteração possível de ser oriunda do jejum do grupo G2, ou biologicamente natural dos próprios animais. Sendo assim, infere-se que estes parâmetros não apresentam indicativos de sinais de toxicidade para órgãos como fígado, rins e vesícula biliar. Parâmetros como ureia, TGO e TGP já foram avaliados em testes de toxicidade *in vivo* utilizando MOFs e também não apresentaram alterações significativas.^{10,43}

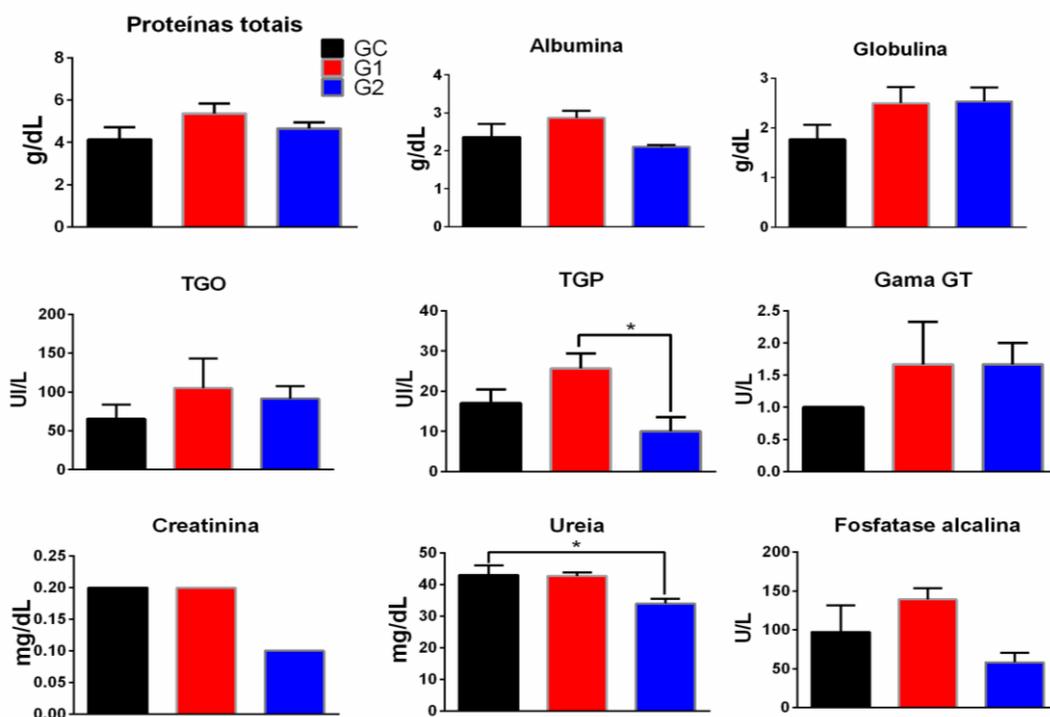


Figura 26 - Análise bioquímica do sangue dos animais dos grupos GC, G1 e G2 associado ao erro padrão da média.
*diferença significativa

Devido à ausência de mortalidade após a administração da concentração mais alta (2000 mg/Kg), durante todo o período de observação (14 dias) e devido à ausência de alterações tanto na temperatura dos animais, nos órgãos extraídos, bem como nos parâmetros bioquímicos avaliados, o marcador R-Marker foi classificado na categoria GHS 5, com DL₅₀ de 5000 mg/Kg, sendo esta a categoria de menor toxicidade para este tipo de teste. Lucena *et al.*¹⁰ também classificou o marcador luminescente Eu(BTC) na

categoria GHS 5 mostrando um alto nível de segurança em se utilizar estes tipos de marcadores para resíduo de tiro.

4.4. Teste da gaiola metabólica

Durante a realização deste experimento não foi encontrado nenhum material fecal para a coleta no intervalo de 1 hora. Já no intervalo de 4 horas, a urina teve que ser diluída em água destilada para poder ser coletada, pois já apresentava aspecto seco. No intervalo de 8 horas foi possível a coleta tanto da urina quanto das fezes. Já nos intervalos de 24 e 48 horas não foi possível coletar a urina separadamente, visto que esta já se encontrava seca e misturada as fezes.

Os resultados obtidos com o teste da gaiola metabólica indicam que a presença do marcador é visualmente predominante nas fezes e que começa a ser excretado a partir de 4 horas da administração. Contudo, a maior parte foi excretada após 8 horas (figura 27) da administração. As fezes não apresentaram aspecto normal com a devida consistência e aparência como mostra a figura 27, possivelmente indicando uma pequena diarreia ou mistura com a urina. Após 24 horas, ainda foi possível encontrar marcador nas fezes do animal, mas foi notável uma redução na quantidade excretada. A partir de 48 horas da administração, já não foi mais possível visualizar o marcador nas fezes do animal indicando assim que o marcador administrado tenha sido totalmente excretado. Este resultado é interessante pois sugere uma rápida excreção do marcador, o que desfavorece efeitos de acumulação ou toxicidade crônica.

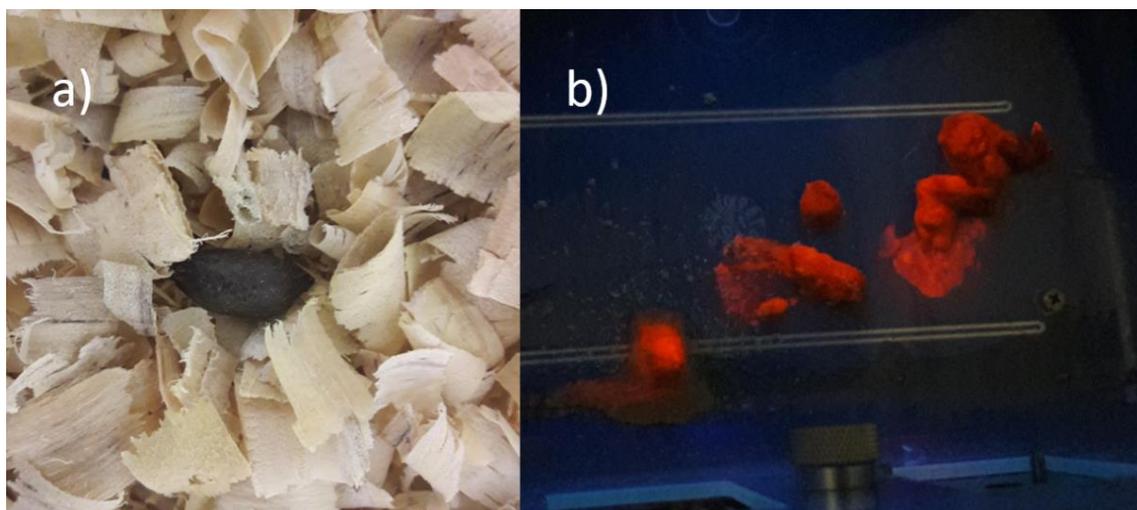


Figura 27 - a) Fezes com aspecto normal; b) Fezes luminescentes com aspecto pastoso após 8 horas da administração via oral.

A urina coletada após 4h da administração, após ser seca em estufa, não apresentou luminescência perceptível visualmente. Tal fato indica que neste período, não há excreção por esta via, ou que a quantidade excretada é muito pequena para detecção visual.

4.5. Teste de estabilidade em meio HCl

Uma vez verificada que a maior fonte de absorção do R-Marker é por via oral e que a excreção se dá por meio das fezes, sentiu-se a necessidade de avaliar a sua degradação no meio estomacal, pois é razoável supor que se houver degradação deste marcador, ela ocorrerá no estômago.

Foi possível verificar pelo teste de estabilidade (figura 28) que o marcador tende-se a degradar em meio ácido (pH =1,6) como utilizado neste teste. Além disso, observa-se que essa degradação ocorre de forma mais pronunciada nas primeiras 8 horas. Na primeira hora, aproximadamente 46% do marcador sofre degradação no meio. Após 4 horas, a degradação aumenta para 67%. Após 8 horas aumenta para aproximadamente 80% e praticamente não sofre alteração após esse período, uma vez que após 24 horas a degradação foi próxima de 83%.

Para corroborar os espectros de emissão obtidos deste teste de estabilidade, bem como o das fezes do item 4.6 deste trabalho que será apresentado posteriormente, foi realizado um teste de estabilidade da MOF [Eu₂(DPA)₃(H₂O)₃]. Esta MOF apresentou degradação de aproximadamente 51, 77 e 82% nos períodos de 1, 4 e 8 horas respectivamente, mostrando degradação muito similar à do R-Marker nas primeiras 8 horas. Neste caso, é possível observar que as degradações, tanto do R-Marker, quanto da MOF não diferiram expressivamente em meio ácido (pH 1,6).

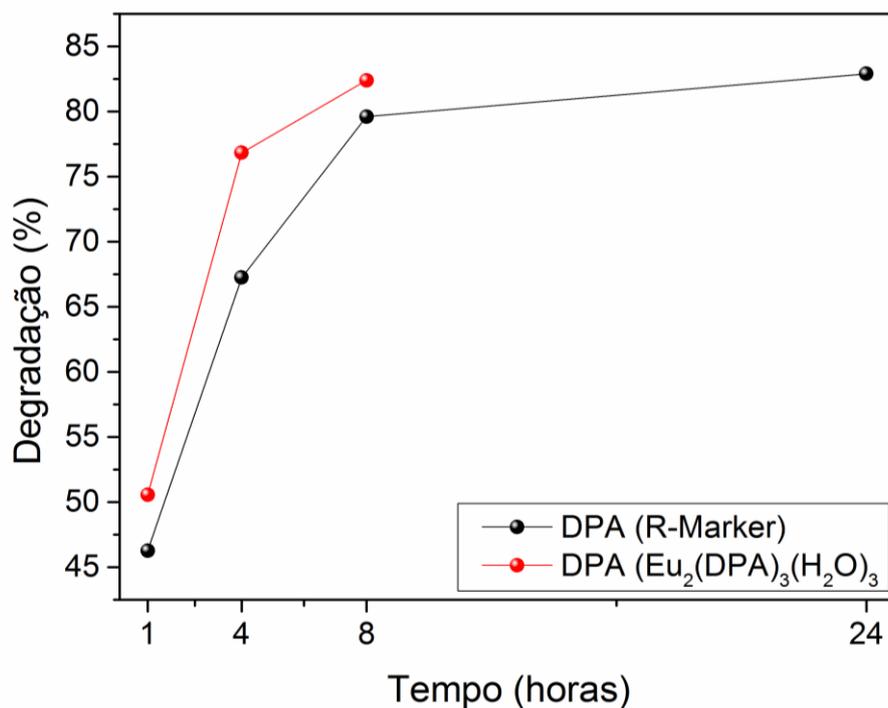


Figura 28 - Teste de estabilidade do R-Marker e da MOF $\text{Eu}_2(\text{DPA})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ em HCl 1,0M, pH 1,6

Estes dados ajudam a entender os resultados observados no teste da gaiola metabólica. Aparentemente, uma parte do marcador R-Marker é excretado de forma inalterada, o que justificaria a luminescência das fezes. Camilleri *et al.*⁹⁸ demonstraram que 50% do esvaziamento gástrico humano leva em média 3 horas, e que um esvaziamento total pode chegar a 5 horas, implicando que ocorreria pouco mais de 70% de degradação do marcador nesta situação.

A outra parte é degradada no meio estomacal e libera tanto o ligante (quantificado por UV-Vis) quanto o metal. O metal pode ser excretado diretamente ou formar novos complexos antes da excreção. Tais complexos podem eventualmente apresentar luminescência e contribuir para a observação nas fezes. Infelizmente, devido à elevada complexidade da matriz, não foi possível identificar a presença de outros compostos de európio ou mesmo inferir sobre a quantidade de R-Marker intacto excretado nas fezes.

Se levarmos em consideração uma fêmea de 175 g de massa corpórea, seriam necessários 298,2 mg de európio no organismo do animal para causar algum tipo de toxicidade, visto que a DL_{50} definida por Bruce *et al.*⁸⁰ para o európio foi de 1704 mg/Kg. Sabendo que foi administrado, em média, 350 mg do R-Marker (tabela A do apêndice 3), e levando em consideração uma degradação superestimada de 83% (24 horas no estômago), seriam degradados 290,5 mg do R-Marker. Da massa degradada, apenas 91,36

mg seriam de európio. Neste caso hipotético, o metal liberado estaria em quantidade insuficiente para causar algum tipo de toxicidade. Esta hipótese ajuda a entender os testes *in vivo* via oral, que não evidenciaram nenhum sinal de toxicidade aguda para os animais. Com relação à toxicidade associada ao ligante, não foram encontrados na literatura dados para sua avaliação além de uma CL_{50} em peixes.^{99–102}

4.6. Análise e comparação do marcador excretado

Ainda com o objetivo de melhor compreender o processo de degradação e excreção do marcador R-Marker nos testes de toxicidade aguda por via oral, foram obtidos espectros de emissão das fezes. Estes espectros foram comparados aos espectros de emissão do R-Marker recém preparado, assim como o do R-Marker parcialmente degradado no ensaio de estabilidade em meio ácido e o da MOF $[Eu_2(DPA)_3(H_2O)_3]$ previamente sintetizado por Maurício.⁵⁰ Procurou-se avaliar mudanças no marcador, por meio da mudança no ambiente químico do íon Eu^{3+} .

A figura 29 mostra os espectros de emissão das diferentes amostras analisadas. Em todas as amostras, observa-se tipicamente as principais transições do íon Eu^{3+} , $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ ($J = 0 - 4$). O espectro de emissão do marcador administrado mostra semelhanças com a fase $[Eu(DPA)(HDP A)]$, apesar de apresentar multiplicidade da transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ maior do que a permitida ($2J + 1$), sugerindo assim a presença de mais de uma fase, em acordo com o observado no DRX.

Amostra submetida ao teste de estabilidade, bem como as fezes apresentaram grande semelhança com a fase $[Eu_2(DPA)_3(H_2O)_3]$, sugerindo que no processo de dissolução e excreção pode haver uma nova organização no material ou ocorrer a solubilização preferencial de algumas fases presentes no marcador administrado.

Com relação aos espectros discutidos, vale ressaltar que a matriz (fezes) é bastante complexa e de difícil manuseio para obtenção dos espectros. Além disso, a complexidade da matriz pode favorecer interferências nos espectros. Portanto, a análise não é trivial. Um estudo mais detalhado é necessário para se obter conclusões definitivas a respeito das possíveis modificações do marcador em virtude da digestão/solubilização e excreção – incluindo um teste simulando meio entérico.

Apesar destas dificuldades, os testes de toxicidade, conduzidos conforme os protocolos OECD 436 e 423, demonstraram uma baixa toxicidade do marcador, sugerindo uma larga margem de segurança para o seu uso.

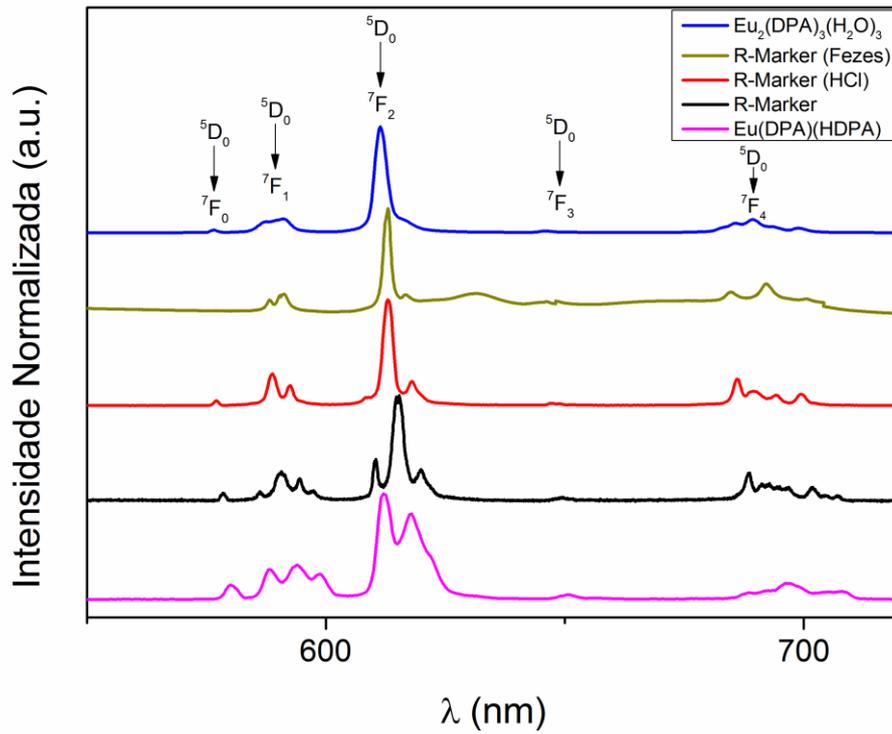


Figura 29 – Espectro de fluorescência da fase $[\text{Eu}(\text{DPA})(\text{HDPA})]$ (rosa), do marcador luminescente R-Marker administrado (preto), encontrado nas fezes (Verde), do teste de estabilidade em HCl (vermelho) e contendo a fase $[\text{Eu}_2(\text{DPA})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ (azul).

5. CONCLUSÕES

O marcador utilizado não apresentou nenhuma das fases descrita na literatura, verificadas por DRX. Entretanto, por ter apresentado excelentes resultados como marcador luminescente foi utilizado para os estudos realizados neste trabalho. A multiplicidade observada na transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ dos espectros de excitação sugerem a presença de mais de uma fase, corroborando com os resultados do DRX. Observou-se ainda que o marcador apresenta larga distribuição e elevado tamanho médio de partículas (o qual permaneceu inalterado após maceração). Este tamanho médio é superior ao solicitado pelo protocolo de avaliação de toxicidade aguda por inalação (OECD de nº 436) entretanto nenhum procedimento adicional para redução do tamanho de partículas foi adotado uma vez que o objetivo era avaliar a toxicidade do R-Marker (como obtido em sua síntese).

Foi desenvolvido um sistema para realização de teste de inalação de baixo custo, no qual foi possível a obtenção da concentração inicial sugerida pelo protocolo 436 da OECD (1 mg.L^{-1}) e com distribuição homogênea do marcador em todo o ambiente onde o animal foi exposto. Observou-se que fatores externos, como a temperatura e a umidade, influenciam no desempenho da câmara. Sugere-se a otimização do sistema para minimizar tal dependência.

Em relação à toxicidade aguda por inalação do marcador, nenhum animal veio a óbito. Também não foi possível verificar alterações na maioria dos parâmetros avaliados (massa corpórea, integridade dos animais, consumo de água e ração, massa e aspecto macroscópico dos órgãos). Quanto a avaliação bioquímica do sangue, apenas a ureia apresentou diferença significativa quando os dois grupos foram comparados entre si, justificada pelo jejum de um dos grupos (MI). Quando os mesmos valores foram comparados aos valores de referência da literatura, alterações na gama GT, creatinina e TGP foram verificadas para o grupo FI, e alterações na TGO, TGP, creatinina e ureia foram verificadas para o grupo MI. Contudo, percebeu-se que não há padronização nos valores de referência, visto que diversos fatores podem contribuir para as variações encontradas nos parâmetros avaliados. Além disso, os animais comparados não foram submetidos às mesmas condições, dificultando uma comparação precisa. Portanto, essas diferenças nos parâmetros bioquímicos devem ser interpretadas com cautela. O conjunto dos resultados dos testes de toxicidade por inalação indicaram uma baixa toxicidade do marcador pela via respiratória.

Durante os testes de inalação observou-se a deposição do marcador sobre a pele dos animais. Não foi constatado nenhum tipo de irritação e/ou inflamação na pele durante todo o período de observação, sugerindo assim um grau de segurança ao seu manuseio

caso o marcador venha a entrar em contato com regiões como olhos, boca e pele do atirador. Em relação ao teste de observação da traqueia, verificou-se visualmente uma grande quantidade de marcador no esôfago do animal indicando que, a maior parte das partículas é deglutida, possivelmente devido ao seu tamanho (>1 a $4 \mu\text{m}$).

Os resultados obtidos com o estudo de toxicidade aguda oral permitiram inferir que o marcador também não apresenta toxicidade por esta via de administração, uma vez que nenhum animal veio a óbito, e a dose inicial foi a mais alta sugerida pelo protocolo. O marcador foi classificado na categoria GHS 5 com a $DL_{50} = 5000 \text{ mg/Kg}$, sendo esta a categoria de menor toxicidade para o teste realizado. Os parâmetros avaliados (os mesmo do teste por inalação, somado a temperatura dos animais) não apresentaram variações expressivas. Apesar do baço aumentado de um dos animais experimentados do grupo G1, os testes bioquímicos não indicaram nenhuma alteração significativa (exceto nos valores referentes a ureia, justificado pelo jejum do grupo G2), sugerindo que este aumento possa ser uma alteração genética do animal.

Observou-se que as fezes produzidas entre 4 e 24 horas após a administração apresentavam luminescência, sugerindo a excreção de parte do marcador por esta forma de excreção. Em relação a estabilidade do marcador em meio ácido, pode-se observar degradação do R-Marker ocorre de forma mais pronunciadas nas primeiras 8 horas ($\sim 80\%$), sugerindo que 20-30% do marcador deve ser excretado nas fezes. A outra parte, degradada no meio estomacal, libera tanto o ligante quanto o metal, que pode ser excretado diretamente ou formar novos complexos corroborando (luminescentes ou não). Essa degradação, entretanto, liberaria o metal em quantidades insuficientes para causar algum tipo de toxicidade, verificada nos testes *in vivo*.

O espectro de emissão do R-Marker apresentou semelhanças com o espectro da fase [Eu(DPA)(HDPa)]. Já a amostra submetida ao teste de estabilidade, bem como as fezes apresentaram grande semelhança com a fase $[\text{Eu}_2(\text{DPA})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$, sugerindo que no processo de dissolução e excreção, pode haver uma nova organização no material ou ocorrer a solubilização preferencial de algumas fases presentes no marcador administrado.

Por fim, este trabalho apresentou os primeiros testes de toxicidade do marcador R-Marker pelas vias inalatória e oral. Apesar das dificuldades, os testes de toxicidade, conduzidos conforme os protocolos OECD 436 e 423, demonstraram uma baixa toxicidade do marcador para as vias utilizadas (oral e respiratória), sugerindo uma larga margem de segurança para testes em humanos. Esta margem é prevista, uma vez que,

utilizando-se as concentrações obtidas e a dose administrada nos testes, seria necessário expor um atirador a 16.000 munições marcadas (5% m/m) em um stand de tiro de 200 m³ durante 4 horas inalando, ou expô-lo a mais de 20.000 munições oralmente em uma única dose, sendo essas situações superestimadas de acontecerem.

Contudo, o estudo da toxicidade de qualquer composto é um trabalho muito demorado e complexo, não podendo ser aferida somente por estes testes e sim por um conjunto amplo de testes de toxicidade. Além disso, é possível que a avaliação dos subprodutos oriundos da queima do marcador após o disparo de uma arma de fogo proporcionem resultados diferentes dos obtidos aqui, uma vez que o marcador estudado encontrava-se na sua forma íntegra. Além disso, a utilização deste marcador passa a ser possível, não só em aplicações forenses, mas em diversos estudos de toxicidade e envolvendo sistemas de *drug-delivery* por ser possível sua detecção visual pela excreção após a administração por via oral, além de possuir uma DL₅₀ alta.

6. PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, propõem-se como perspectivas futuras:

- Otimizar a câmara de inalação, para que não haja influência de fatores externos como temperatura e umidade.
- Realizar testes de toxicidade por inalação com os outros marcadores, como o Eu(BTC) e Eu(BDC).
- Realizar o teste de toxicidade aguda oral, seguindo o protocolo da OECD 423 para o marcador Eu(BDC).
- Realizar testes de toxicidade por doses repetidas para os marcadores citados. Por conveniência, o marcador será introduzido em uma ração modificada, já que esta mostrou-se uma alternativa viável e não invasiva para a realização dos testes de toxicidade em doses repetidas, em que o estresse provocado por outros tipos de administração, como a gavagem, será evitado.
- Estudar mais detalhadamente as fezes luminescentes, visando compreender o que ocorre na metabolização do marcador R-Marker.
- Realizar testes de estabilidade simulando o meio entérico é uma ótima alternativa para se compreender melhor a degradação do marcador no trato digestivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Vazsonyi, A.; Wittekind, J.; Belliston, L.; Loh, T.; Unodc. *Global Study on Homicide*; 2014; Vol. 20.
- (2) Sistema Nacional de Informação de Segurança Pública - SINESP, B. *Diagnóstico Dos Homicídios No Brasil*; 2015.
- (3) Waiselfisz, J. J. *Mapa Da Violência 2015: Mortes Matadas Por Armas de Fogo*; 2015.
- (4) Waiselfisz, J. J. *Mapa Da Violência 2016: Homicídios Por Armas de Fogo No Brasil*; Brasil, F., Ed.; 2016.
- (5) ENASP, E. N. de J. e S. P. *Meta 2 - A Impunidade Como Alvo*; Brasília, 2012.
- (6) Declaration Secretariat, G. Fardo Global Da Violência Armada. **2011**, 10.
- (7) Lucena, M. A. M.; Rodrigues, M. O.; Gatto, C. C.; Talhavini, M.; Maldaner, A. O.; Alves, S.; Weber, I. T. Synthesis of [Dy (DPA)(HDPA)] and Its Potential as Gunshot Residue Marker. *J. Lumin.* **2016**, *170*, 697–700.
- (8) Lucena, M. A. D. M.; Weber, I. T.; Rodrigues, M. O.; Júnior, S. A.; Wanderley, K. a.; Talhavini, M. Marcadores Luminescentes Nas Ciências Forenses: Aplicação Da MOF MIL-78 Como Marcadores Luminescente de Resíduo de Tiro. *Livro resumos Congr. Terras Raras* **2014**, 31.
- (9) Melo Lucena, M. a; Rodrigues, M. O.; Gatto, C. C.; Talhavini, M.; Maldaner, A. O.; Alves Jr, S.; Weber, I. T. Synthesis of [Dy(DPA)(HDPA)] and Its Potential as Gunshot Residue Marker. *J. Lumin.* **2015**, 1–4.
- (10) Lucena, M. A. de M.; Oliveira, M. F. L.; Arouca, A. M.; Talhavini, M.; Ferreira, E. A.; Alves Junior, S.; Veiga-Souza, F. H.; Weber, I. T. Application of the MOF [Eu (BTC)] as a Luminescent Marker for GSR: A Synthesis, Characterization and Toxicity Study. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**.
- (11) Lucena, M. a M.; De Sá, G. F.; Rodrigues, M. O.; Alves, S.; Talhavini, M.; Weber, I. T. ZnAl₂O₄-Based Luminescent Marker for Gunshot Residue Identification and Ammunition Traceability. *Anal. Methods* **2013**, *5* (3), 705–709.
- (12) Weber, I. T.; Melo, A. J. G.; Lucena, M. A. M.; Consoli, E. F.; Rodrigues, M. O.; de Sá, G. F.; Maldaner, A. O.; Talhavini, M.; Alves, S. Use of Luminescent Gunshot Residues Markers in Forensic Context. *Forensic Sci. Int.* **2014**, *244*, 276–284.
- (13) Weber, I. T.; Melo, A. J. G.; Lucena, M. A. M.; Rodrigues, M. O.; Alves Junior, S. High Photoluminescent Metal-Organic Frameworks as Optical Markers for the

- Identification of Gunshot Residues. *Anal. Chem.* **2011**, 83 (12), 4720–4723.
- (14) Weber, I. T.; Terra, I. A. A.; Melo, A. J. G. de; Lucena, M. A. de M.; Wanderley, K. A.; Paiva-Santos, C. de O.; Antônio, S. G.; Nunes, L. A. O.; Paz, F. A. A.; Sá, G. F. de; Júnior, S. A.; Rodrigues, M. O. Up-Conversion Properties of Lanthanide-Organic Frameworks and How to Track Ammunitions Using These Materials. *RSC Adv.* **2012**, 2 (7), 3083.
- (15) Câmara, S. S.; Weber, I. T. Propriedades Luminescentes Upconversion Do YVO₄:Er,Yb Aplicadas Ao Estudo Forense de Resíduo de Tiro. Universidade de Brasília 2014.
- (16) Melo, A. J. G. de. Desenvolvimento de Marcadores Luminescentes Para Detecção de Resíduos de Tiros, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, 2009.
- (17) Chemello, E. Ciência Forense: Balística. *Quim Virtual* **2007**, 1–10.
- (18) Wallace, J. S. *Chemical Analysis of Firearms, Ammunition, and Gunshot Residue*; Crc Press, 2008.
- (19) Dalby, O.; Butler, D.; Birkett, J. W. Analysis of Gunshot Residue and Associated Materials - A Review. *J. Forensic Sci.* **2010**, 55 (4), 924–943.
- (20) Schwoeble, A. J.; Exline, D. L. *Current Methods in Forensic Gunshot Residue Analysis*; CRC Press, 2000.
- (21) Group, C. ammo. Handgun ammunition - Full Metal Jacket (FMJ)
http://www.magtechammunition.com/files/cache/26a5ee97e3a9c4f36f0a0c646acd727b_f340.jpg (accessed Sep 2, 2017).
- (22) Disparo de uma arma de fogo em super slow motion
<http://atl.clicrbs.com.br/infosfera/2015/08/23/voce-vai-se-impressionar-ao-ver-o-disparo-de-uma-arma-em-super-slow-motion/> (accessed Feb 9, 2017).
- (23) Martiny, A.; Campos, A. P. C.; Sader, M. S.; Pinto, M. A. L. SEM/EDS Analysis and Characterization of Gunshot Residues from Brazilian Lead-Free Ammunition. *Forensic Sci. Int.* **2008**, 177 (1).
- (24) Reis, E. L. T. dos; Sarkis, J. E. de S.; Rodrigues, C.; Negrini Neto, O.; 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 . *Química Nova* . scielo 2004, pp 409–413.
- (25) Scientific, A. Storage/transport tubes for SEM stubs
<http://www.agarscientific.com/storage-transport-tubes-for-sem-stubs.html>

(accessed Feb 9, 2017).

- (26) CBC, C. B. de C.-. *Informativo Técnico Nº 61 Munições NTA - Non Toxic Ammunition*; 2013.
- (27) National Institute Occupational Safety and Health (NIOSH); U.S. Department of Health and Human Services (DHHS). *Reducing Exposure to Lead and Noise at Indoor Firing Ranges*; 2010; Vol. 113.
- (28) Foundation, N. S. S. *Lead Management and Osha Compliance for Indoor Shooting Ranges, Facility Development Series No. 15*. 2005.
- (29) Kardous, C. A.; King, B. F.; Khan, A. NIOSH ALERT Preventing Occupational Exposures to Lead and Noise at Indoor Firing Ranges. *CDC DHHS* **2009**, 135.
- (30) CBC, C. B. de C.-. *A Munição NTA - CBC*; 2011.
- (31) Arouca, A. M.; Weber, I. T. *Estudo Da Aplicabilidade de Marcadores Luminescentes de Disparos de Arma de Fogo*, Universidade de Brasília - UnB, 2016.
- (32) Lucena, M. A. de M. *Síntese, Caracterização E Avaliação Do Sistema ZnAl₂O₄:TR₃+ Como Marcador Luminescente Para Resíduo de Tiro*. **2012**.
- (33) Carvalho, M. A. de. *Utilização Da Análise de Imagem Hiperespectral No Infravermelho Próximo Para Identificação de Marcadores Luminescentes a Base de Redes Metalorgânicas MOF*, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, 2015.
- (34) Lucena, M. A. de M. *Marcadores Luminescentes Para Identificação de Resíduos de Tiro – Síntese, Aplicação E Avaliação Da Toxicidade*, Universidade Federal de Pernambuco, 2016.
- (35) Allendorf, M. D.; Bauer, C. A.; Bhakta, R. K.; Houk, R. J. T. Luminescent Metal–organic Frameworks. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (5), 1330.
- (36) Yaghi, O. M.; Li, H.; Davis, C.; Richardson, D.; Groy, T. L. Synthetic Strategies , Structure Patterns , and Emerging Properties in the Chemistry of Modular Porous Solids † Decorated Diamond Nets : Porous Metal. *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31 (8), 474–484.
- (37) Li, H.; Eddaoudi, M.; O’Keeffe, M.; Yaghi, O. M. Design and Synthesis of an Exceptionally Stable and Highly Porous Metal-Organic Framework. *Nature* **1999**, 402 (November), 276–279.
- (38) Van de Voorde, B.; Bueken, B.; Denayer, J.; De Vos, D. Adsorptive Separation on Metal-Organic Frameworks in the Liquid Phase. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43

- (16), 5766–5788.
- (39) Dantas Ramos, A. L.; Tanase, S.; Rothenberg, G. Redes Metalorgânicas E Suas Aplicações Em Catálise. *Quim. Nova* **2014**, *37* (1), 123–133.
- (40) Horcajada, P.; Serre, C.; Vallet-Regí, M.; Sebban, M.; Taulelle, F.; Férey, G. Metal-Organic Frameworks as Efficient Materials for Drug Delivery. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, *45* (36), 5974–5978.
- (41) McKinlay, A. C.; Morris, R. E.; Horcajada, P.; Férey, G.; Gref, R.; Couvreur, P.; Serre, C. BioMOFs: Metal–organic Frameworks for Biological and Medical Applications. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, *49* (36), 6260–6266.
- (42) Giménez-Marqués, M.; Hidalgo, T.; Serre, C.; Horcajada, P. Nanostructured Metal–organic Frameworks and Their Bio-Related Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *307*, 342–360.
- (43) Horcajada, P.; Chalati, T.; Serre, C.; Gillet, B.; Sebrie, C.; Baati, T.; Eubank, J. F.; Heurtaux, D.; Clayette, P.; Kreuz, C. Porous Metal-Organic-Framework Nanoscale Carriers as a Potential Platform for Drug Delivery and Imaging. *Nat. Mater.* **2010**, *9* (2), 172–178.
- (44) Horcajada, P.; Serre, C.; Maurin, G.; Ramsahye, N. A.; Balas, F.; Vallet-Regi, M.; Sebban, M.; Taulelle, F.; Férey, G. Flexible Porous Metal-Organic Frameworks for a Controlled Drug Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (21), 6774–6780.
- (45) Horcajada, P.; Gref, R.; Baati, T.; Allan, P. K.; Maurin, G.; Couvreur, P.; Férey, G.; Morris, R. E.; Serre, C. Metal–organic Frameworks in Biomedicine. *Chem. Rev.* **2011**, *112* (2), 1232–1268.
- (46) Rodrigues, M. O.; Paz, F. A. A.; Freire, R. O.; de Sá, G. F.; Galembeck, A.; Montenegro, M. C.; Araújo, A. N.; Alves Jr, S. Modeling, Structural, and Spectroscopic Studies of Lanthanide-Organic Frameworks. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (36), 12181–12188.
- (47) Cui, Y.; Yue, Y.; Qian, G.; Chen, B. Luminescent Functional Metal–organic Frameworks. *Chem. Rev.* **2011**, *112* (2), 1126–1162.
- (48) Cadiau, A.; Brites, C. D. S.; Costa, P. M. F. J.; Ferreira, R. A. S.; Rocha, J.; Carlos, L. D. Ratiometric Nanothermometer Based on an Emissive Ln³⁺-Organic Framework. *ACS Nano* **2013**, *7* (8), 7213–7218.
- (49) Mauricio, F. G. M.; Pralon, A. Z.; Talhavini, M.; Rodrigues, M. O.; Weber, I. T. Identification of ANFO: Use of Luminescent Taggants in Post-Blast Residues.

- Forensic Sci. Int.* **2017**, 275, 8–13.
- (50) Mauricio, F. G. B. Marcação de Explosivos Baseado Em Fotoluminescência Para Codificar E Identificar Resíduos de Pós-Explosão, Universidade de Brasília, 2015.
- (51) Chauhan Jayprakash, S.; Pandya Ajit, V. Spectrophotometric Determination of Mn (II) Ion by Pyridine 2, 6 Dicarboxylic Acid. *Int J Eng Sci Inven.* **2013**, 2, 36–43.
- (52) Bulut, I.; Ucar, I.; Kazak, C. Spectroscopic and Structural Study of Ni (II) Dipicolinate Complex with 2-Amino-4-Methylpyrimidine. *Turkish J. Chem.* **2009**, 33 (3), 347–354.
- (53) Schneemann, A.; Bon, V.; Schwedler, I.; Senkovska, I.; Kaskel, S.; Fischer, R. A. Flexible Metal–organic Frameworks. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43 (16), 6062–6096.
- (54) Norkus, E.; Stalnionienė, I.; Crans, D. C. Cu (II), Pb (II) and Cd (II) Complex Formation with Pyridine-2, 6-Dicarboxylate and 4-Hydroxypyridine-2, 6-Dicarboxylate in Aqueous Solutions.
- (55) Rodrigues, M. O.; da Costa Junior, N. B.; de Simone, C. A.; Araujo, A. A. S.; Brito-Silva, A. M.; Paz, F. A. A.; de Mesquita, M. E.; Junior, S. A.; Freire, R. O. Theoretical and Experimental Studies of the Photoluminescent Properties of the Coordination Polymer [Eu (DPA)(HDPA)(H₂O) 2]⊙ 4H₂O. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112 (14), 4204–4212.
- (56) Fernandes, A.; Jaud, J.; Dexpert-Ghys, J.; Brouca-Cabarrecq, C. Study of New Lanthanide Complexes of 2, 6-Pyridinedicarboxylate: Synthesis, Crystal Structure of Ln (Hdipic)(dipic) with Ln= Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Yb, Luminescence Properties of Eu (Hdipic)(dipic). *Polyhedron* **2001**, 20 (18), 2385–2391.
- (57) Rodrigues, M. O. Síntese, Caracterização, Estudos Espectroscópicos e Estruturais de Redes Híbridas de Coordenação Contendo Íons Lantanídeos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Sergipe 2007.
- (58) AAFS, A. A. of F. S. Types of Forensic Scientists Disciplines of AAFS <http://www.aafs.org/students/choosing-a-career/types-of-forensic-scientists-disciplines-of-aafs/> (accessed Apr 20, 2016).
- (59) Timbrell, J. *Principles of Biochemical Toxicology*; CRC Press, 1999.
- (60) Timbrell, J. *Introduction to Toxicology*; CRC Press, 2001.
- (61) Fundação Oswaldo Cruz. FIOCRUZ. Toxicidade

- http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/lab_virtual/toxidade.html (accessed Apr 15, 2016).
- (62) Nordberg, M.; Duffus, J. H.; Templeton, D. M. Explanatory Dictionary of Key Terms in Toxicology (IUPAC Recommendations 2007). *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79* (9), 1583–1633.
- (63) OECD/OCDE. TG 436: Acute Inhalation Toxicity - Acute Toxic Class Method. **2009**, *TG 436* (September), 1–27.
- (64) Hodgson, E.; Levi, P. E. *A Textbook of Modern Toxicology*; Wiley Online Library, 2010.
- (65) Winder, C.; Azzi, R.; Wagner, D. The Development of the Globally Harmonized System (GHS) of Classification and Labelling of Hazardous Chemicals. *J. Hazard. Mater.* **2005**, *125* (1–3), 29–44.
- (66) OECD. Better Policies for Better Lives: The OECD at 50 and beyond. **2011**.
- (67) Bagatin, E.; Costa, E. A. da. Doenças Das Vias Aéreas Superiores. *J Bras Pneumol* **2006**, *32* (Supl 1), S17–S26.
- (68) Wong, B. A. Inhalation Exposure Systems: Design, Methods and Operation. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35* (1), 3–14.
- (69) Guyton, A. C. Measurement of the Respiratory Volumes of Laboratory Animals. *Am. J. Physiol.* **1947**, *150* (1), 70–77.
- (70) Bide, R. W.; Armour, S. J.; Yee, E. Allometric Respiration/body Mass Data for Animals to Be Used for Estimates of Inhalation Toxicity to Young Adult Humans. *J. Appl. Toxicol.* **2000**, *20* (4), 273–290.
- (71) Cassee, F. R.; Muijsers, H.; Duistermaat, E.; Freijer, J. J.; Geerse, K. B.; Marijnissen, J. C.; Arts, J. H. Particle Size-Dependent Total Mass Deposition in Lungs Determines Inhalation Toxicity of Cadmium Chloride Aerosols in Rats. Application of a Multiple Path Dosimetry Model. *Arch. Toxicol.* **2002**, *76* (5), 277–286.
- (72) Cunha, D. P. da. *Redes de Coordenação: Novos Sistemas Carreadores de Fármacos*, Universidade Federal de Pernambuco, 2009.
- (73) Ruyra, À.; Yazdi, A.; Espín, J.; Carné-Sánchez, A.; Roher, N.; Lorenzo, J.; Imaz, I.; Maspoch, D. Synthesis, Culture Medium Stability, and In Vitro and In Vivo Zebrafish Embryo Toxicity of Metal-Organic Framework Nanoparticles. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21* (6), 2508–2518.
- (74) Destefani, C. A.; Motta, L. C.; Costa, R. A.; Macrino, C. J.; Bassane, J. F. P.;

- João Filho, F. A.; Silva, E. M.; Greco, S. J.; Carneiro, M. T. W. D.; Endringer, D. C. Evaluation of Acute Toxicity of Europium–organic Complex Applied as a Luminescent Marker for the Visual Identification of Gunshot Residue. *Microchem. J.* **2016**, *124*, 195–200.
- (75) Hinks, N. J.; McKinlay, A. C.; Xiao, B.; Wheatley, P. S.; Morris, R. E. Metal Organic Frameworks as NO Delivery Materials for Biological Applications. *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, *129* (3), 330–334.
- (76) Huxford, R. C.; Della Rocca, J.; Lin, W. Metal-Organic Frameworks as Potential Drug Carriers. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14* (2), 262–268.
- (77) Kundu, T.; Mitra, S.; Patra, P.; Goswami, A.; Díaz Díaz, D.; Banerjee, R. Mechanical Downsizing of a Gadolinium (III)-based Metal–Organic Framework for Anticancer Drug Delivery. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (33), 10514–10518.
- (78) Sigma-Aldrich. 2,6-Pyridinedicarboxylic acid
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/p63808?lang=pt®ion=BR> (accessed Feb 11, 2017).
- (79) Okafor, A.; Uddin, M.; Ocando, J. E.; Jespersen, N.; Fan5a, J.; Wang, E. Spectroscopic Study of Dipicolinic Acid Interaction with Bovine Serum Albumin. *J. Chem.* **2016**, *4* (1), 23–46.
- (80) Bruce, D. W.; Hietbrink, B. E.; DuBois, K. P. The Acute Mammalian Toxicity of Rare Earth Nitrates and Oxides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1963**, *5* (6), 750–759.
- (81) The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. *Environ. Heal. Saf. Monogr. Ser. Test. Assess.* **2009**, *39*, 71.
- (82) Marques, M. R. C.; Loebenberg, R.; Almukainzi, M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technol.* **2011**, *18* (August), 15–28.
- (83) Nebendahl, K. Routes of Administration. *Lab. rat. San Diego Acad. Press.* **2000**, 463–483.
- (84) Brouca-Cabarrecq, C.; Fernandes, A.; Jaud, J.; Costes, J. P. Hydrothermal Investigation of the Lanthanide (Ln= La, Ce, Pr, Nd, Sm) 2, 6-Pyridinedicarboxylate System. *Inorganica Chim. Acta* **2002**, *332* (1), 54–60.
- (85) De Boer, A. H.; Gjaltema, D.; Hagedoorn, P.; Frijlink, H. W. Characterization of Inhalation Aerosols: A Critical Evaluation of Cascade Impactor Analysis and Laser Diffraction Technique. *Int. J. Pharm.* **2002**, *249* (1), 219–231.

- (86) Andrade-Lima, M.; Pereira, L. F. F.; Fernandes, A. L. G. Pharmaceutical Equivalence of the Combination Formulation of Budesonide and Formoterol in a Single Capsule with a Dry Powder Inhaler. *J. Bras. Pneumol.* **2012**, *38* (6), 748–756.
- (87) Tomanari, G. Y.; Pine, A. de S.; Silva, M. T. A. Ratos Wistar Sob Regimes Rotineiros de Restrição Hídrica E Alimentar. *Rev. Bras. Ter. Comput. e Cogn.* **2003**, *5* (1), 57–71.
- (88) Dial, S. M. Clinicopathologic Evaluation of the Liver. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **1995**, *25* (2), 257–273.
- (89) Emanuelli, M. P.; dos Anjos Lopes, S. T.; Maciel, R. M.; Garmatz, B. C.; de Oliveira Tavares, M. Concentração Sérica de Fosfatase Alcalina, Gama-Glutamil Transferase, Uréia E Creatinina Em Coelhos (*Oryctolagus Cuniculus*). *Ciência Anim. Bras.* **2008**, *9* (1), 251–255.
- (90) Bertolami, M. C. Mechanisms of Hepatotoxicity. *Arq. Bras. Cardiol.* **2005**, *85*, 25–27.
- (91) Bellomo, R.; Ronco, C.; Kellum, J. A.; Mehta, R. L.; Palevsky, P. Acute Renal Failure—definition, Outcome Measures, Animal Models, Fluid Therapy and Information Technology Needs: The Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit. care* **2004**, *8* (4), R204.
- (92) Schossler, D.; Alievi, M. M.; Emanuelli, M. P.; Schossler, J. E. Função Renal de Cães Tratados Com Doses Terapêuticas de Flunixin Meglumine E Ketoprofen Durante O Trans E Pós-Operatório. *Acta cir. bras* **2001**, *16* (1), 46–51.
- (93) Pocock, S. J.; Ashby, D.; Shaper, A. G.; Walker, M.; Broughton, P. M. Diurnal Variations in Serum Biochemical and Haematological Measurements. *J. Clin. Pathol.* **1989**, *42* (2), 172–179.
- (94) Giknis, M. L. A.; Clifford, C. B. Clinical Laboratory Parameters for Crl: CD (SD) Rats. *Charles River* **2006**, 1–14.
- (95) River, C. CD IGS Rats Nomenclature: Crl:(CD)SD. 2011.
- (96) Lima, C. M.; Lima, A. K.; Melo, M. G. D.; Dória, G. A. A.; Serafini, M. R.; Albuquerque-Júnior, R. L. C.; Araújo, A. A. S. Valores de Referência Hematológicos E Bioquímicos de Ratos (*Rattus Novergicus* Linhagem Wistar) Provenientes Do Biotério Da Universidade Tiradentes. *Sci. Plena* **2014**, *10* (3).
- (97) Giknis, M. L. A.; Clifford, C. B. Clinical Laboratory Parameters for Crl: WI

- (Han). *Charles river* **2008**.
- (98) Camilleri, M.; Colemont, L. J.; Phillips, S. F.; Brown, M. L.; Thomforde, G. M.; Chapman, N.; Zinsmeister, A. R. Human Gastric Emptying and Colonic Filling of Solids Characterized by a New Method. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **1989**, 257 (2), G284–G290.
- (99) Food-Contact Notification (FCNL. *Revised Environmental Assessment For Peroxyacetic Acid/ Hydrogen Peroxide Formulation*.
- (100) Spectrum. *Material Safety Data Sheet - Dipicolinic Acid*.
- (101) Drugbank. Dipicolinic acid <https://www.drugbank.ca/drugs/DB04267> (accessed Dec 15, 2016).
- (102) Sigma-Aldrich. *Ficha de Dados de Segurança: 2,6-Pyridinedicarboxylic Acid*; 2010.

8. APÊNDICE



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 17 de fevereiro de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "ESTUDO DA TOXICIDADE DE MARCADORES LUMINESCENTES PARA RESÍDUOS DE TIRO: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA ORAL E POR INALAÇÃO DA MOF [Eu(DPA) (HDPA)].", UnBDoC n.º 66743/2016, sob responsabilidade da Professora Ingrid Távora Weber foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Rattus Norvegicus* (12 machos e 27 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de 12/12/2016 a 30/6/2017.



Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



ufpaua

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Figura A. - Declaração de aprovação do uso de animais, nº 66743/2016, fornecido pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília CEUA-UnB

APÊNDICE 2 - Protocolo OECD 436

O protocolo 436 da OECD trata do teste de toxicidade aguda por inalação de compostos capazes de formar gases, vapores e/ou aerossóis. Este protocolo é baseado em um sistema passo-a-passo, onde a etapa seguinte irá depender dos resultados obtidos na etapa anterior (figura 9).

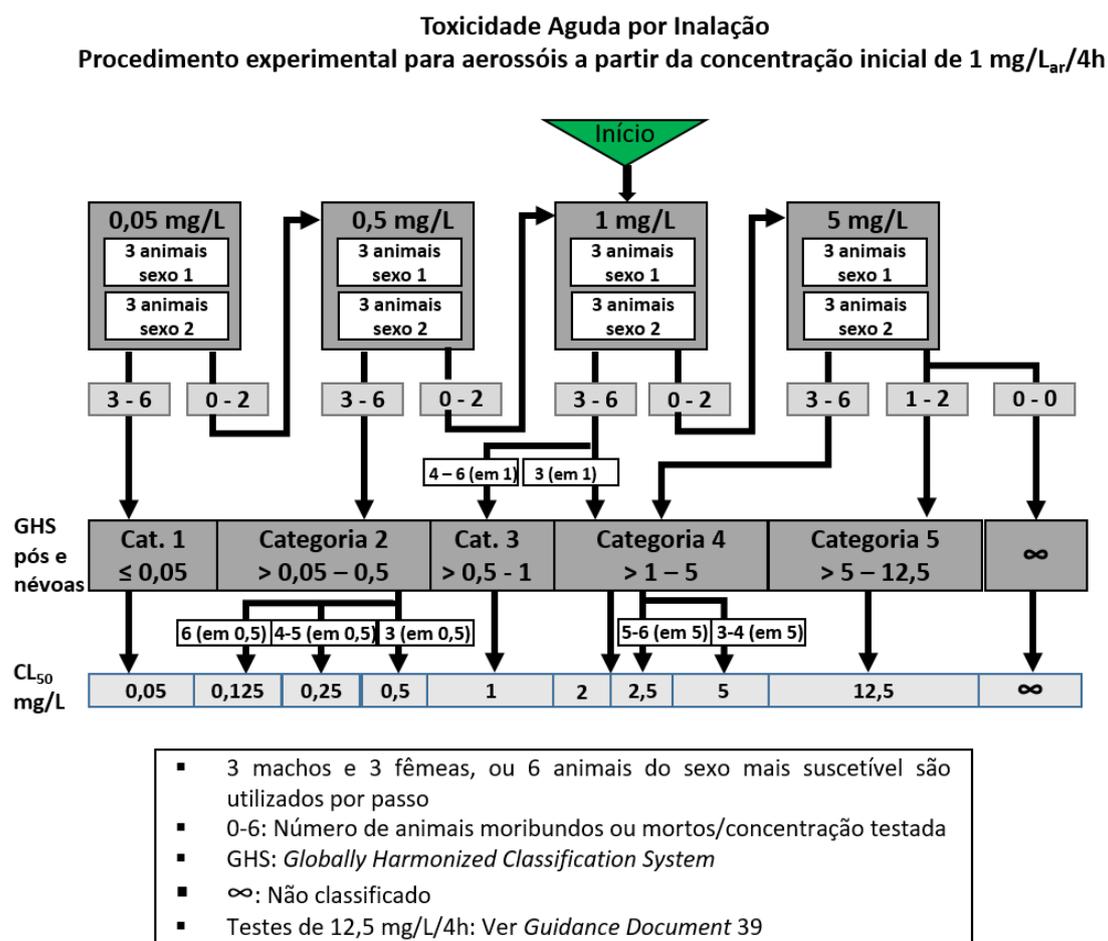


Figura B - Fluxograma de passos adaptado do protocolo 436 da OECD.⁶³

Em cada etapa, um total de 6 animais são utilizados (3 animais de cada sexo), e de acordo com o protocolo, normalmente dois passos são suficientes para finalização do experimento e para inferir sobre a toxicidade da substância testada. Para realização do teste, o animal deve ser mantido por 4 horas dentro da câmara de inalação sobre um fluxo constante da substância a ser analisada. Durante este período, qualquer comportamento anormal deve ser registrado, incluindo o tempo, intensidade e duração dos mesmos. Animais apresentando sinais de dor severa, sofrimento, aflição ou morte iminente, devem ser eutanasiados e considerados na interpretação dos resultados. Após a exposição, os

animais devem ser observados diariamente por um período de 14 dias, e ao final devem ser eutanasiados. Neste caso, atenção especial deve ser dada aos órgãos do sistema respiratório. Com isto, espera-se obter informações sobre as propriedades tóxicas da substância e classificá-la de acordo com a GHS.

Para a realização do teste de toxicidade aguda por inalação o protocolo da OECD preconiza alguns cuidados. Por exemplo, devem ser utilizados ratos com idade entre 8 e 12 semanas e com pesos variando não mais do que 20% da média do grupo. As fêmeas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. Os animais devem ser aclimatizados em suas gaiolas por pelo menos 5 dias antes de iniciar os experimentos, e à câmara de inalação por um curto período antes do início dos testes, para reduzir o estresse causado pela introdução do animal a um ambiente novo. A temperatura no biotério deve ser mantida entre $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ e a umidade relativa entre 30 e 70%. Antes e após a exposição, os animais devem ser agrupados por sexo e concentração. A iluminação deve ser artificial e sequencial, sendo 12 horas de luz e 12 horas de escuro.⁶³

Para que todas as principais regiões do trato respiratório sejam expostas a substância, é aconselhado que esta apresente tamanho de partícula variando entre 1 e 4 μm . Entretanto, caso este tamanho não seja alcançado, o mesmo não é um fator impeditivo para a realização do teste, desde que justificado. A comida deve ser suspensa durante toda a exposição, porém poderá ser fornecido água. Um grupo controle para o ar não é necessário. Além disso o fluxo de ar na câmara deve ser cuidadosamente monitorado, controlado e gravado pelo menos a cada hora de exposição.⁶³ Os testes podem ser realizados em câmaras de corpo inteiro (WB, do inglês *whole-body*) ou tipo cabeça e nariz (NO, do inglês *head and nose-only*).

APÊNDICE 3 - Protocolo OECD 423

Este protocolo consiste em procedimento de passos, no qual os resultados obtidos no passo inicial indicarão os próximos passos a serem tomados. Para cada passo são utilizados 3 animais de um único sexo, geralmente fêmeas. Em média são necessários de 2 a 4 passos para se inferir sobre a toxicidade aguda de uma substância. Assim como no protocolo da OECD 436, animais moribundos ou demonstrando sinais severos de dor devem ser eutanasiados e considerados na interpretação dos resultados. Dependendo da quantidade de animais que venham a óbito, o passo seguinte se baseia em aumentar, diminuir ou repetir a dose utilizada. A figura 10 mostra a sequência de passos prevista no protocolo OECD 423.

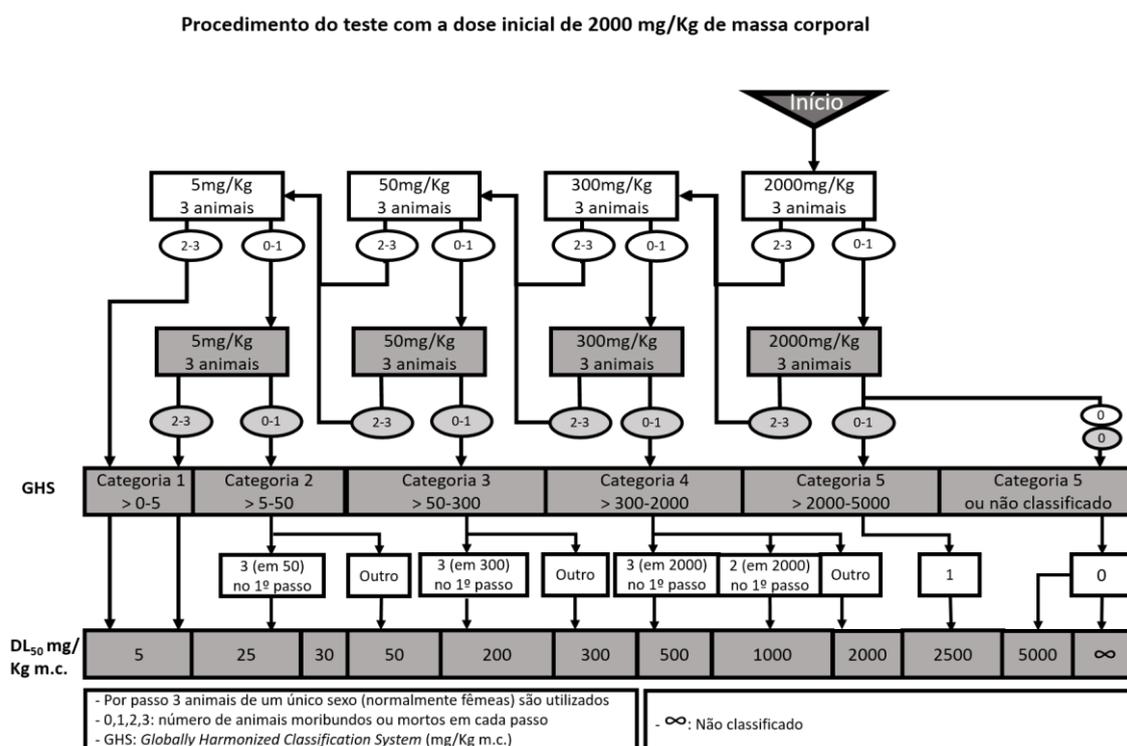


Figura C. Fluxograma de passos adaptado do protocolo da OECD 423

O protocolo utiliza doses pré-definidas e os resultados obtidos são utilizados para classificar uma substância de acordo com a GHS. A escolha da dose inicial deve ser aquela que possivelmente causará mortalidade aos animais do grupo, mas caso não haja dados a respeito da toxicidade do material, a dose inicial deve ser a de 300mg/Kg. Quando há dados que justifiquem, a dose mais alta (2000 mg/Kg) pode ser usada como dose inicial, para reduzir o número de passos (e o número de animais utilizados). Lucena *et*

al.^{10,34} demonstrou que o marcador Eu(BTC) não apresentou toxicidade mesmo utilizando a concentração mais alta (2000 mg/Kg). Tais resultados podem ser um indício de que o marcador Eu(DPA) também não venha apresentar toxicidade nesta concentração, e por este motivo foi utilizada a dose mais alta para realização dos testes *in vivo*.

Nos testes de toxicidade oral aguda, a substância é administrada oralmente aos animais em uma das doses definidas sendo que os animais mais utilizados para este tipo de teste são os ratos. A preferência em se utilizar fêmeas vem do fato delas apresentarem maior sensibilidade aos testes em relação aos machos. Elas devem ser nulíparas e não estar prenhas, além de serem jovens entre 8 e 12 semanas. O local de armazenamento dos animais deve manter a temperatura controlada entre 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) e a umidade deve ser mantida preferencialmente entre 30% e 70%. A iluminação deve providenciar luz durante 12 horas ao dia e as outras 12 devem garantir um ambiente escuro aos animais.

Para a administração de uma suspensão aquosa, o volume de administração não deve exceder 2 ml/100g de massa corporal do animal. Após o preparo, a suspensão deve ser administrada em uma única dose ou em pequenas doses durante o dia, não excedendo 24 horas. Os animais devem estar em jejum antes da administração, e após a administração, os animais podem ser mantidos por mais 3 ou 4 horas em jejum para observação. O intervalo de administração das doses entre os grupos é definido pela severidade e pela duração dos efeitos clínicos da dose anterior, sendo que o próximo grupo só deve ser iniciado quando se tiver plena convicção de que os animais do grupo anterior irão sobreviver.

Após a administração, os animais devem ser observados rigorosamente nas primeiras 4 horas, para avaliar qualquer sinal de toxicidade. Depois, os animais devem ser observados, periodicamente durante as primeiras 24 horas e diariamente durante 14 dias. Animais eutanasiados ou encontrados mortos devem ser registrados, principalmente o horário da morte de forma bem precisa. A massa dos animais deve ser medida antes do procedimento e semanalmente após o experimento. Os animais encontrados mortos e os animais eutanasiados ao final do experimento devem ter seus órgãos removidos e analisados para identificação de qualquer sinal de patologia. Caso algum órgão venha a apresentar alguma patologia, este deve ser submetido à análise microscópica.

APÊNDICE 4 - Construção da câmara de inalação

Para o estudo da toxicidade por inalação, foram construídas e avaliadas duas câmaras de inalação tipo SAWB (*single animal whole body*) visando atender os parâmetros exigidos pelo protocolo 436 da OECD. Na primeira câmara a geração do aerossol foi feita por um micronebulizador e partículas dispersas em surfactante (*tween 80*). Os resultados (não apresentados) obtidos com a 1ª câmara de inalação mostraram a clara necessidade de otimização, tanto para que maiores concentrações fossem atingidas, como para que uma menor quantidade de marcador fosse utilizada, tornando o teste viável financeiramente (uma vez que o material estudado ainda apresenta elevado custo de produção). Logo, viu-se a necessidade de reduzir o fluxo do compressor, uma vez que enviando uma menor quantidade de ar para a câmara, uma menor quantidade de marcador também seria necessária. Com isso, após inúmeras tentativas mal sucedidas, somadas a diversos erros experimentais bem como a necessidade do uso de uma quantidade de marcador igual a 8,4 g ao longo das 4 horas de experimentação, o primeiro sistema de inalação foi desconsiderado para a realização dos testes de toxicidade aguda por inalação.

Na segunda o micronebulizador foi substituído por um compressor conectado a um *trap* de vidro (113,1 mm de altura x 26,1 mm de diâmetro) contendo as partículas para geração do aerossol seco. Após uma série de testes preliminares, observou-se que a 2ª câmara apresentou melhor desempenho. Além disso, verificou-se que visualmente que esse sistema foi capaz de enviar o marcador para toda a câmara (figura D).

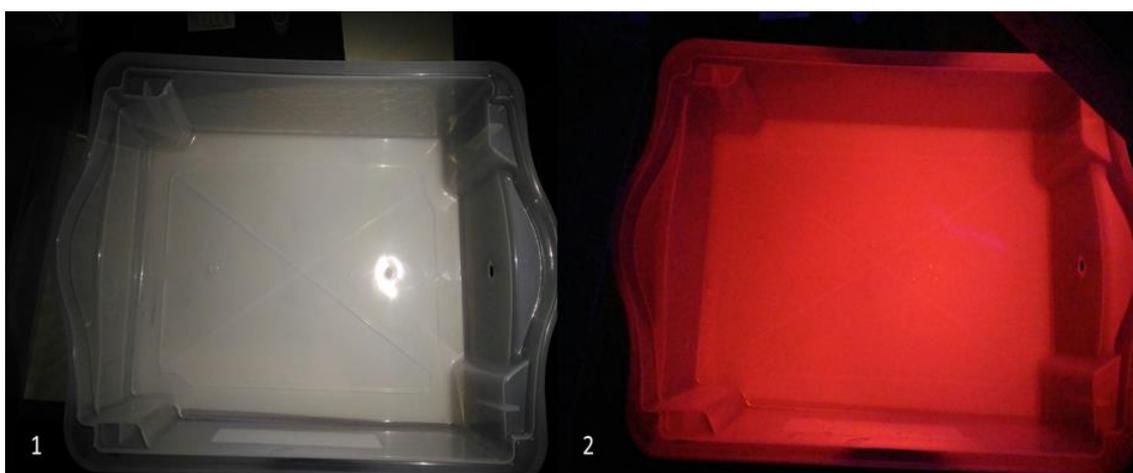


Figura D - Visão superior da Câmara 1) sem e 2) sob radiação UV.

Para garantir a formação de um aerossol contínuo, parâmetros operacionais foram otimizados antes da realização dos testes de toxicidade, como (i) fluxo do gás de arraste

(ar) na saída do compressor e na entrada do trap, (ii) agitação do material particulado contido no trap (sistema de agitação magnética associado às bolas de vidro, como mostra a figura 11, para garantir que o material fosse enviado à câmara, uma vez que testes preliminares mostraram que sem essa agitação, o material não era arrastado para fora do trap, como mostra a figura C) e (iii) massa utilizada, para que concentrações mais elevadas pudessem ser atingidas, além de compensar o material que fica retido na superfície interna do trap após os testes.

Os testes foram realizados em triplicatas e o tempo de duração variou entre 30 min, 1 hora e 4 horas. Durante os testes de 4 horas, para manter a concentração do marcador dentro da câmara o mais constante possível, a cada uma hora de experimento, foi adicionado ao trap 175 mg de R-Marker para repor o material enviado. Ao final do experimento, a determinação da quantidade de material enviado à câmara foi calculada pela massa residual no trap. A concentração média dentro da câmara foi calculada considerando-se a massa de material enviado à câmara, a duração do experimento e o fluxo médio de ar.

A partir destes testes, foi possível verificar que outros fatores influenciavam a concentração. Uma observação importante é a respeito das cidades onde os testes foram realizados, sendo que até esse ponto, os testes foram realizados na cidade de Recife/PE (apresenta umidade relativa do ar alta o ano inteiro). Após inúmeros testes, obteve-se uma concentração constante e próxima de $1 \text{ mg.L}_{\text{ar}}^{-1}$ durante 4h, como sugerida pelo protocolo da OECD 436. Também foi construído um anteparo de metal na base da câmara, para evitar o contato do animal com o pó que se deposite na base, minimizando assim a absorção por via oral e dérmica (embora ambas não tenham podido ser eliminadas pois observou-se a deposição de partículas sobre os animais). Por fim, procurou-se vedar as saídas de ar da câmara, ocasionadas pelo encaixe imperfeito da tampa com a base, para evitar a contaminação do ambiente ao redor da câmara.

APÊNDICE 5 – Tabela de administração (teste oral)

Tabela A – Massa corporal e o volume administrado nos animais. Os números 1, 2 e 3 são a identificação do animal; Suspensão = Soro fisiológico + Eu(DPA); GC = Grupo Controle; G1 – Grupo 1 (2000 mg/Kg); G2 = Grupo 2 (2000 mg/Kg); GM = Gaiola Metabólica

Animal	Massa corporal (g)	Massa de marcador utilizado (C = 2000 mg/Kg)	Volume administrado (ml) (C = 100 mg/mL)	Tipo
GC 1	183	-	3,7	Soro fisiológico
GC 2	168	-	3,4	Soro fisiológico
GC 3	184	-	3,7	Soro fisiológico
G1 1	179	358	3,6	Suspensão
G1 2	169	338	3,4	Suspensão
G1 3	175	350	3,5	Suspensão
G2 1	174	348	3,5	Suspensão
G2 2	162	324	3,3	Suspensão
G2 3	173	346	3,5	Suspensão
GM 1	192	384	3,9	Suspensão