

O uso de matrizes biológicas e testes analíticos presentes na Toxicologia Forense

M.R.S. da Lomba ^{a,*}, M.M. Pinc ^b, J. Cogo ^a, M.M. Alexandre ^a, F.S. Quemel ^a,
O. Alberton ^b, E.L.B. Lourenço ^a, D.C.F. Boleta-Ceranto ^a, A.A. Rodrigues ^c, C.C. Braga ^c,
G. Zardeto ^a

^a Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama/PR, Brasil

^b Departamento de Ciências Agrária da Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama/PR, Brasil

^c Departamento de Segurança Pública, Umuarama/PR, Brasil

*Endereço de e-mail para giulianazardeto@prof.unipar.br. Tel.: +55 44 99926-5388.

Recebido em 09/03/2023; Revisado em 18/04/2023; Aceito em 28/04/2023

Resumo

A toxicologia forense é uma ciência que estuda, analisa, classifica e determina os elementos ou substâncias que foram encontradas nas cenas dos crimes, ou que podem ter relação com o mesmo. O papel dos investigadores é o de desvendar os crimes e deste modo, possibilitar que os culpados sejam punidos e os inocentes libertados. Diante disto, este trabalho teve como objetivo apresentar as matrizes biológicas e as principais técnicas de extração e análises laboratoriais utilizadas na toxicologia forense. Para a elaboração da pesquisa, foram realizadas buscas de dados eletronicamente disponíveis em órgãos oficiais, livros, artigos científicos disponíveis nas bases de dados Google acadêmico® e PubMed, entre os anos de 2012 a 2023. A complexidade das matrizes de uso na toxicologia forense e o aumento das substâncias que podem ser utilizadas como meios de investigação criminal tornam este campo da ciência de grande importância, devendo sempre levar em consideração a escolha correta da matriz que se deseja analisar e de acordo com o objetivo que se pretende buscar na solução de um crime que envolve a toxicologia forense. Sendo assim, conclui-se que esta área tem sido de muita importância devido ao fato de haver diversas técnicas e procedimentos que possam possibilitar a resolução de crimes como por exemplo, homicídios, suicídios e crimes facilitados pelo uso de drogas ilícitas. Neste sentido, mais estudos acerca do assunto são necessários.

Palavras-chave: Toxicologia forense; Análise forense; Investigação; Análise toxicológica; Ciência Forense; Toxicologia.

Abstract

Forensic toxicology is a science that studies, analyzes, classifies, and determines the elements or substances that have been found at, or may have a bearing on, crime scenes. The role of investigators is to unravel crimes and thus enable the guilty to be punished and the innocent to be set free. In view of this, this work aimed to present the biological matrices and the main extraction techniques and laboratory analyses used in forensic toxicology. For the preparation of the research, searches were conducted for data electronically available in official agencies, books, scientific articles available in Google academic® and PubMed databases, between the years 2012 to 2023. The complexity of the matrices used in forensic toxicology and the increase in substances that can be used as a means of criminal investigation make this field of science of great importance, and it should always take into account the correct choice of the matrix to be analyzed and according to the objective that is sought in the solution of a case. Thus, it is concluded that this area has been of great importance due to the fact that there are several techniques and procedures that can make it possible to solve crimes such as, for example, homicides, suicides, and crimes facilitated by the use of illicit drugs. In this sense, more studies on the subject are needed.

Keywords: Forensic toxicology; Forensic analysis; Investigation; Analytical toxicology; Forensic Science; Toxicology.

1. INTRODUÇÃO

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos das substâncias químicas nos organismos vivos, tendo por isso uma vasta aplicação [1-4]. O principal objetivo da justiça é resolver os crimes e, desta forma, punir os culpados. O papel dos investigadores é o de desvendar os crimes, permitindo assim, que os culpados sejam punidos e os inocentes libertados [3,4]. Dentre essas aplicações, a toxicologia forense é o ramo que utiliza os princípios fundamentais da toxicologia com o objetivo de auxiliar no esclarecimento de fatos que apresentam interesse médico legal [5].

Nesse sentido, o escopo do toxicologista forense abrange a detecção, identificação e quantificação de xenobióticos possivelmente envolvidos, parcial ou totalmente, nas circunstâncias que levaram à instauração de um inquérito [5,6]. Para tal, são utilizadas matrizes biológicas e/ou não biológicas, algumas das quais são submetidas a processos de extração e, posteriormente, a procedimentos analíticos que fornecerão resultados sobre a presença ou a ausência de uma determinada substância, bem como, a sua quantidade em alguns casos específicos [5,7].

Nesse sentido, todo o processo utiliza matrizes biológicas para essas análises. Existem vários tipos de amostras que podem ser utilizadas em análises forenses, nas quais, as principais são separadas para pacientes *post-mortem*, dentre elas, sangue periférico ou cardíaco, urina (quando disponível), cabelo, humor vítreo e outros tecidos e órgãos. Em análises forenses envolvendo pacientes *ante-mortem*, ou seja, pacientes vivos, as opções de matrizes podem ser: urina, sangue, pelos/cabelo, entre outros [8].

Quando se trata do uso de matrizes convencionais na análise forense de resolução de crimes em pacientes vivos, por exemplo, o sangue e a urina têm se mostrado eficazes, porém, atualmente, a amostra não convencional na literatura, o cabelo, vem ganhando espaço, pois tem sua investigação de histórico de uso de xenobióticos [4].

As análises toxicológicas são solicitadas com o objetivo de detectar a presença de substâncias, bem como a sua quantificação no organismo e, por fim, relacioná-las com efeitos tóxicos. Em geral, essas análises são realizadas em amostras coletadas, denominadas matrizes biológicas [9]. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de apresentar as matrizes biológicas e as principais técnicas de extração e análises laboratoriais utilizadas na toxicologia forense.

2. MÉTODOS

Para este estudo, optou-se por uma pesquisa de revisão integrativa da literatura, que determina o

conhecimento atual sobre um tema específico, uma vez que é realizada com o intuito de identificar, analisar e sintetizar resultados de estudos independentes sobre o mesmo assunto. Assim, com base em referências bibliográficas e científicas, visando uma contínua atualização da toxicologia forense, com ênfase em suas matrizes biológicas, métodos de extrações de amostras biológicas e seus métodos analíticos.

Para a elaboração da pesquisa, foram realizadas buscas de dados disponíveis eletronicamente em órgãos oficiais (Ministério da Saúde, resoluções, leis, etc.), livros e artigos científicos disponíveis nas bases de dados Google acadêmico® e PubMed. As buscas foram realizadas pelas palavras-chave: "*toxicology*", "*forensic toxicology*", "*analytical toxicology*", "ciência forense", "testes analíticos", nos idiomas de inglês e português.

Como critério de inclusão, foram analisadas todas as bibliografias sobre o tema, sendo as mais atuais e utilizadas. Como critério de exclusão, utilizaram-se artigos que estavam com assuntos muito sucintos ou desatualizados em determinados itens.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A investigação dos locais de crime e dos seus elementos de interesse forense deve ser documentada através de fotografias, tal como foram encontrados pelos peritos, ou através de desenhos sob a forma de esquemas e plantas, aceites pelo Código de Processo Penal [7,10].

Todo vestígio encontrado no local de um crime, seja ele de qualquer natureza (instrumentos, peças, produtos químicos, entre outros), deve passar por uma análise, ser interpretado pelo profissional forense e relatado na forma de um laudo que o descreva, denominado laudo técnico pericial [11]. A reprodução minuciosa realizada pelo perito técnico no local onde ocorreu o crime, é entendida como laudo pericial, sendo que todos os vestígios coletados são importantes e interessam ao demonstrar se possuem relação ou não com o fato ocorrido [7].

As principais evidências que podem ser encontradas são manchas de sangue, impressões digitais, pegadas, marcas de pneus e, em geral, marcas de alguma informação que seja considerada importante, armas de fogo ou armas brancas como facas, cabelos, pelos, venenos, pós, poeiras, cinzas, produtos químicos, entre outros [7]. Dentro das manchas podemos destacar as matrizes mais utilizadas, como as matérias orgânicas, sangue, sêmen, vômito, fezes, urina, e as inorgânicas, como a tinta, ferrugem, pólvora, lama, cera, entre outras [7,12]. Por outro lado, é importante destacar que a toxicologia forense atua em estreita cooperação com os Institutos Médico-Legais (no Brasil) e, dessa forma, raramente são coletadas amostras biológicas em locais de

crimes para realização de análises toxicológicas, frente a outros vestígios.

3.1. Matrizes biológicas na análise toxicológica forense

Para a escolha de uma matriz ideal a ser utilizada em toxicologia forense, deve-se sempre considerar a situação em que o corpo se encontra, se o paciente em questão está vivo ou morto, e o tipo de análise que se deseja fazer para identificar possíveis metabólitos. As matrizes de escolha irão variar em cada caso, podendo ser necessária apenas uma, no caso de uma matriz específica, ou no caso do paciente *post-mortem*, considera-se necessária a utilização de várias matrizes [4,13]. Entre as matrizes biológicas amplamente utilizadas estão a urina, o sangue, o cabelo ou pelos e o humor vítreo [4,14].

O sangue e a urina são as matrizes convencionais mais prevalentes para a realização de análises toxicológicas. No entanto, nas últimas décadas, matrizes biológicas alternativas ou não convencionais têm apresentado importância relevante na toxicologia, principalmente devido às suas vantagens, como por exemplo, a urina de ser de fácil coleta, componentes podendo ser identificados entre 2-5 dias ou o sangue por apresentar metabólitos em até 24 horas aproximadamente, quando comparadas às amostras convencionais [14].

3.1.1. Matrizes convencionais

Com o avanço da tecnologia na extração de analitos, foi utilizada uma gama de amostras biológicas, neste sentido, as extrações tornaram-se mais acessíveis e possíveis. As matrizes biológicas são o sangue e a urina [4,13]. Para que os resultados dos exames sejam garantidos, é necessário que haja uma boa execução no momento da coleta, devendo sempre atentar para as questões éticas e cuidados para que não ocorram alterações nas matrizes coletadas [14].

Para a escolha de uma matriz ideal a ser utilizada em toxicologia forense, deve-se sempre considerar a situação em que o corpo se encontra, se o paciente em questão está vivo ou morto e o tipo de análise que se deseja fazer a fim de identificar possíveis metabólitos. As matrizes de eleição irão variar em cada caso, podendo ser necessária apenas uma escolha específica ou em casos, a utilização de vários tipos de amostras [4,13].

3.1.1.1. Urina

A utilização da urina como matriz biológica é uma escolha tradicional e a sua utilização está bem estabelecida [3]. A principal via de eliminação de substâncias é através da urina, que é a matriz alvo para investigações de metabólitos [3,4]. É constituída em sua

maioria por água e substâncias químicas orgânicas e inorgânicas dissolvidas. Geralmente, a urina é mais utilizada para a investigação de metabólitos [14].

Autores [16] relatam que pode ser útil em casos de agressão sexual, assédio, entre outros, porém nesta matriz é possível encontrar fármacos e metabólitos em concentrações elevadas, sendo estas substâncias metabolizadas pelo fígado (na etapa de metabolização e/ou biotransformação da farmacocinética) e, posteriormente, eliminadas através da urina, pelo sistema renal.

A excreção de metabólitos pela urina, última fase da farmacocinética, é maior e mais rápida quando comparada às drogas originais, assim como as concentrações dos metabólitos também são mais altas quando comparadas às drogas em sua fase inicial, ou seja, antes da biotransformação [1,15,16]. A maioria das drogas são encontradas na urina por um período de dois a cinco dias após o consumo, variando de acordo com a droga e a quantidade utilizada pelo paciente, sendo detectado apenas o seu uso recente [1,15,16].

3.1.1.2. Sangue

O sangue é uma matriz convencional amplamente estudada na análise toxicológica forense, pois é o fluido corporal mais comum encontrado nas cenas dos crimes, fornece uma correlação adequada da concentração de drogas no sangue. Por ser uma matriz com uma janela de detecção restrita, sabe-se que, dependendo do xenobiótico a ser investigado, por exemplo, drogas de abuso, os seus metabólitos podem ser rapidamente metabolizados e subsequentemente excretados em poucas horas (aproximadamente 24 horas). No entanto, em pacientes *post-mortem*, considera-se necessário coletar sangue periférico imediatamente, porque quando o sangue cardíaco é colhido, pode envolver um maior risco de contaminação [14].

Trata-se de uma matriz complexa, sendo um fluido constituído principalmente por água, mas que também contém proteínas, gorduras, células suspensas, íons, gases dissolvidos e produtos dos tecidos, como creatinina, ureia e lactato, além de drogas e seus metabólitos [4]. Uma limitação de uso desse tipo de matriz é que ela possui uma janela de detecção restrita para as drogas de abuso, uma vez que elas podem ser rapidamente metabolizadas, de acordo com a meia vida de cada substância [14]. Outra desvantagem seria a dificuldade de amostragem em casos *ante-mortem*, uma vez que se trata de um processo invasivo, que exige material adequado e profissional qualificado [4,15].

As amostras de sangue não são suficientes em situações em que o corpo é encontrado em estado avançado de putrefação, em exumação ou morte por

choque traumático [1,15,16]. Assim, para estas identificações são utilizadas matrizes não convencionais como órgãos, tecidos, cabelos e humor vítreo [4].

3.1.2. Matrizes não convencionais

Nas últimas décadas, as matrizes biológicas alternativas ou não-convencionais têm apresentado relevante importância em toxicologia, principalmente devido às suas vantagens quando comparadas às amostras convencionais, considerando que possuem características relevantes quanto à estabilidade dos analitos, com métodos de coleta com maior detecção [17].

Os cabelos ou também chamados de pelos, são as matrizes biológicas mais utilizadas quando o assunto está relacionado a testes toxicológicos, pois é considerado um tipo de matriz vantajosa, permitindo a determinação de exposição passada a fármacos, com uma janela de detecção estendida, com semanas ou até aproximadamente 4-6 meses, porém não sendo possível seu uso recente, devido ao processo de incorporação na queratina demorar alguns dias, dependendo do tipo de substância utilizada [4,7,14]. Entre as matrizes não convencionais, podemos citar cabelos/pelos, fluido oral (saliva), suor, unhas, humor vítreo, entre outros [4].

3.1.2.1. Cabelo

As matrizes não convencionais mais utilizadas são o cabelo e o pelo, no entanto, são classificadas como matrizes biológicas usuais para testes toxicológicos [18,19]. A utilização deste tipo de matriz é bastante vantajosa, pois possibilita a determinação da exposição passada de fármacos, com uma janela alargada na detecção, sendo detectado o histórico do paciente, mas não sendo possível o seu uso recente, uma vez que o processo de incorporação das drogas à matriz é lento e pode levar dias. O tempo de detecção varia entre 90 a 180 dias, dependendo do tipo de substância utilizada [4,13].

A amostragem de cabelo é relativamente simples, não invasiva, de fácil armazenamento e transporte. Recomenda-se a raspagem rente ao couro cabeludo, coletando cerca de 100 mg de cabelo [4]. Entretanto, uma desvantagem desse tipo de matriz seria a baixa concentração de analitos, o que requer métodos analíticos de alta sensibilidade [14].

O uso de cosméticos capilares, como descoloração, tinturas e permanentes, tende a reter a estabilidade das drogas ficarem retidas no cabelo, sendo interferentes nas identificações das amostras. As bases das formulações dos produtos para cabelo são fortes e ocasionam danos às fibras capilares, processos estes que associados à exposição em excesso a luz do sol, clima etc., podem

danificar a cutícula do cabelo, reduzindo as concentrações em até 80% das drogas [4,13].

3.1.2.2. Fluido oral ou saliva

Além do sangue e do sêmen, o fluido oral ou também chamado de saliva é outro fluido corporal comumente encontrado em cenas de crime [18]. A saliva é muito comum na monitoração de condutores no trânsito e para se verificar o uso de drogas de abuso. As drogas passam do sangue para a saliva através de infiltrações ou difusão passiva, e podem ser detectadas nesta matriz em sua forma metabolizada. A incorporação das drogas na saliva é restringida para as moléculas de peso molecular alto, como as drogas ionizadas ou ligadas a proteínas plasmáticas [4,13]. Sua pesquisa se dá em casos de uso recente, dependendo da natureza as substâncias podem ser detectadas em até dois dias após a exposição, como no caso da maconha e anfetamina [18,19].

A grande desvantagem é a quantidade de amostra coletada, pois devido ao local e ao processo de metabolização, a quantidade do metabólito via saliva é muito pequena, podendo também apresentar muitas contaminações por outras drogas utilizadas por via oral, possíveis interferências no momento da coleta, uso de adulterantes, uso de água ou outros líquidos minutos antes da coleta, o ato de escovar os dentes antes da coleta, entre outros [18,19].

3.1.2.3. Humor vítreo

O humor vítreo é um líquido gelatinoso, presente no interior dos olhos [16]. Os fármacos chegam ao humor vítreo através da passagem entre as barreiras sanguínea e ocular, por transporte ativo. Nesta matriz há presença do fármaco original em predominância sobre os metabólitos [16].

É uma das matrizes de maior interesse nas análises toxicológicas *post-mortem*, pois possui enorme estabilidade frente à putrefação ou estados parciais de carbonização, o líquido encontra-se em ambientes estéreis e sob a proteção de traumas, com quantidades de aproximadamente 2-2,5 mL. Essa matriz pode fornecer informações sobre a causa da morte, bem como dosagens de glicose no sangue do paciente no momento do óbito [8].

3.1.2.4. Outros órgãos e tecidos em análises post-mortem

A coleta de órgãos e/ou tecidos (fígado, rins, pulmões, vísceras, bile, conteúdo estomacal, rins, cérebro, músculos, medula óssea, etc.), para análise em autópsia *post-mortem*, pode ser útil na presença de cadáveres em estado avançado de putrefação, mortes por intoxicações

letais de xenobióticos, sendo eles, drogas de abuso, medicamentos em dosagens tóxicas e letais, gases tóxicos, pesticidas, metais pesados, entre outros [4,11].

Os resultados quantitativos a partir de órgãos não são fáceis de interpretar, mas podem ser úteis no esclarecimento dos resultados do sangue periférico ou cardíaco *post-mortem*. Recomenda-se que os órgãos sejam colhidos apenas após a evisceração [11]. As amostras de tecido adiposo também podem ser utilizadas, mesmo sendo com maior dificuldade de obtenção. É necessário um cuidado especial durante a coleta, manuseio e armazenamento desta matriz biológica, a fim de evitar possíveis contaminações cruzadas [4,11].

Os ossos, órgãos de menores vascularizações, são colhidos a partir de restos esqueléticos, onde os ossos longos, por exemplo, o fêmur é preferível e particularmente na forma de segmentos de anéis de fêmur, e, portanto, o grau de contato com as estruturas ósseas depende da sua localização anatômica e aporte sanguíneo, por serem ossos longos e supridos com maiores quantidades de sangue [4,11].

Alguns fatores influenciam a deposição dos xenobióticos nesta matriz, incluindo o tempo de exposição (aguda ou crônica), o local da colheita do osso, tipo de osso, distribuição *post-mortem* e as características físico-químicas do xenobiótico [11,20].

As amostras coletadas devem ser identificadas e encaminhadas ao laboratório para análise, juntamente com as informações referentes de onde e amostra foi encontrada, o local onde foi coletada, data, hora da coleta a idade do indivíduo, a estimativa do horário em que ocorreu o óbito do paciente, assim como o período do tempo entre o falecimento e a realização da necropsia [14].

O fígado é um dos principais órgãos a serem coletados, frente a uma intoxicação medicamentosa ou outra intoxicação por via oral. Dentre os órgãos de maior vascularização (fígado, rins, coração, pulmões, entre outros órgãos e tecidos), ele é o primeiro a ser escolhido, quando a pesquisa forense está sendo realizada nos órgãos [11,21]. A farmacocinética e a toxicocinética explicam que é este órgão o responsável pelo efeito de primeira passagem e pelo processo de metabolização das substâncias ingeridas por via oral [11].

Os rins acusam a presença de algum agente tóxico que possa ter causado algum dano nocivo devido a uma possível intoxicação. No que tange, a coleta nos pulmões serve para a identificação de uma possível intoxicação inalatória/respiratória [4,11].

3.2. Rastreamento das matrizes biológicas da toxicologia forense

As matrizes biológicas aplicadas nas análises de toxicologia forense são, em sua maioria, muito complexas e apresentam concentrações muito grandes de interferentes, quando comparadas à concentração do analito de interesse [4]. Desta forma, antes da realização das análises, as amostras devem passar por etapas de tratamento prévio, que visam isolar os analitos de interesse, diminuindo a concentração de interferentes, além de possibilitar a concentração da amostra, obtendo assim, uma amostra mais limpa [14].

Sendo assim, diversas técnicas podem ser empregadas, dependendo das propriedades relacionadas à matriz, aos analitos de interesse e seus metabólitos e à técnica instrumental aplicada. Primeiramente, as amostras passam por processos de pré-tratamento para que posteriormente, sejam submetidas às técnicas de extração. No pré-tratamento das amostras, diversas técnicas podem ser empregadas, tais com: lavagem e pulverização (no caso de amostras queratinizadas), centrifugação, separação de compostos lipídicos, precipitação de proteínas, hidrólise de conjugados, digestão enzimática, entre outros [18,21].

Os procedimentos ocorrem de acordo com a metodologia que foi empregada e de acordo com os parâmetros internacionais de análises, onde se faz preciso que ocorra a validação da metodologia, assim, garantindo com exatidão e reprodutibilidade dos dados encontrados, e desta forma evitar que erros e falsos positivos ocorram e comprometam o doador da amostra analisada [4,13]. A garantia de que ocorreu a extração de forma adequada das substâncias de interesse da amostra, o uso de técnicas específicas que as detectam, varia de acordo com o tipo de amostra que se deseja analisar [8].

3.2.1. Métodos de extração para matrizes biológicas

O preparo de amostra é parte fundamental do procedimento analítico, pois reduz os interferentes que podem comprometer a seletividade e a sensibilidade ao analito de interesse na matriz biológica [14]. As técnicas de preparo de amostras exigem condições mínimas para serem aplicadas, dentre elas, a perda mínima de amostra com remoção eficaz de interferentes, a alta recuperação do analito, baixo tempo de análise e custo [14].

A técnica de centrifugação é relativamente simples e é empregada na preparação de amostras como o sangue, para separação de coágulos, e outras matrizes, como urina e humor vítreo, para separação de partículas. Já a técnica de separação de lipídios é importante para evitar a formação de emulsões durante as etapas de extração. Uma maneira de realizar essa separação seria o uso de centrifugação refrigerada (4°C) [4,18].

3.2.1.1. Precipitação de proteínas

A precipitação de proteínas é uma técnica simples e rápida de preparação de amostras. Consistem na desnaturação das proteínas (perda da estrutura terciária) presentes na matriz através da adição de agentes precipitantes (ácido ou base forte, temperatura ou solventes orgânicos, como acetonitrila e metanol). Após a adição do agente, a amostra é submetida a agitação e centrifugação, permitindo assim, a separação do precipitado proteico e do sobrenadante, utilizado para análise toxicológica [14].

Em outras palavras, ela pode ocorrer por meio da utilização de diversos tipos de agentes precipitantes, sejam eles sais inorgânicos (por exemplo, sulfato de zinco), solventes orgânicos miscíveis em água (metanol, acetona, acetonitrila, etc.) ácidos (perclórico, tricloroacético e sulfossalicílico) ou temperatura [14]. Os solventes orgânicos são mais indicados por minimizarem a degradação de compostos termolábeis [4].

Apresentam várias vantagens em relação à extração líquido-líquido (ELL) convencional, tais como a aplicabilidade a uma gama de analitos e melhores valores de recuperação de analitos. Apesar das vantagens citadas, é um processo efetuado manualmente, o que pode aumentar o tempo de preparação de um grande número de amostras [4,14].

3.2.1.2. Salting-out

A precipitação de proteínas utilizando sais inorgânicos ocorre por meio de uma técnica conhecida como *salting-out* [14]. É uma técnica muito utilizada para estudos moleculares e forenses. Esta técnica caracteriza-se pela adição de um sal inorgânico à amostra aquosa e a um solvente orgânico miscível em água, formando um sistema bifásico, com o objetivo de auxiliar na separação do solvente orgânico miscível em água, além de melhorar as extrações em solventes orgânicos apolares. Desta forma, as partículas de água da amostra passam a interagir com os íons em solução, deixando de interagir com as proteínas do meio. A interação entre as proteínas aumenta o que diminui sua solubilidade em meio aquoso, levando a sua precipitação [14].

A eficácia deste procedimento depende das características físico-químicas da substância a ser analisada e do tipo de sal utilizado. Apresenta várias vantagens em relação à ELL convencional, tais como a aplicabilidade a uma vasta gama de analitos, melhores valores de recuperação dos analitos e uma grande variedade de sais disponíveis (natureza química, peso molecular e a volatilidade) [4,14].

Após tratamento prévio, as amostras podem seguir para as etapas de extração, caso necessário. Vários

procedimentos podem ser empregados, sendo os mais comuns a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS) [14].

3.2.1.3. Extração líquido-líquido (ELL)

A extração líquido-líquido (ELL) é um método de preparo de amostras e tem como base a partição das amostras entre duas fases imiscíveis, a orgânica e a aquosa [18,19]. Para que a extração ocorra de forma eficaz dependerá da afinidade do analito a ser investigado com o solvente de extração, a razão das fases e dos números de amostras em que foram extraídas [8].

O processo de extração envolve a adição de solvente que vai extrair a substância e seguida de uma agitação mecânica que irá promover um contato maior entre as fases orgânicas e a aquosa [18,19]. Após, a mistura é submetida a uma centrifugação que vai aperfeiçoar a separação entre as fases, e depois disto, é colhido a fase de interesse para ser analisada (Figura 1) [4,22,23].

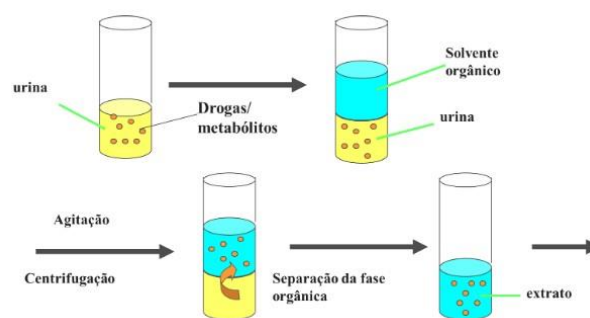


Figura 1. Esquema ilustrativo do processo de extração líquido-líquido (ELL). **Fonte:** os autores (2023).

Geralmente, a fase polar (aquosa) é constituída pela matriz biológica, como sangue e urina, já a fase mais apolar, é constituída por solventes orgânicos. As características físico-químicas importantes para a compreensão dessa técnica são os valores de coeficiente de partição ($\log P$) do analito de interesse no solvente extrator, o coeficiente de ionização do analito (pK_a) e o pH da solução aquosa. Quando o analito de interesse se encontra na forma não ionizada, existe uma afinidade maior pelo solvente apolar. Desta forma, conhecendo o pK_a do analito, é possível ajustar o pH do meio, para que o equilíbrio se desloque para a forma não ionizada, favorecendo a extração [4,18,21].

Por ser um procedimento muito rápido, simples e com grande número de solventes que fazem extrações, a ELL é o método mais aplicado em análises toxicológicas [18,19]. O grande problema desta técnica analítica é a geração de resíduos de solventes, sendo que muitos deles são tóxicos, em muitos casos, até mais do que o próprio

analito de interesse, podendo afetar tanto o analisador, por estar exposto, assim como o meio ambiente, por ser de difícil descarte [8].

3.2.1.4. Extração em fase sólida (EFS)

A Extração em fase sólida (EFS) baseia-se no princípio da separação por afinidade, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG) e/ou a eletroforese capilar (EC). No que se baseiam na CLAE, as etapas incluem a retenção e a eluição de analitos do fluido biológico, a remoção de interferentes e a concentração da amostra [22-24].

A EFS está disponível nos modos de fase normal, fase reversa e permuta iônica; no entanto, um dos formatos mais utilizados é a fase reversa. Devido à variação das propriedades físico-químicas dos analitos de interesse, estes formatos tradicionais nem sempre são adequados, sendo necessária a disponibilidade de diferentes fases estacionárias e diferentes abordagens. Nesta técnica, os analitos contidos numa matriz aquosa são extraídos, juntamente com os compostos interferentes, depois de passarem por um cartucho que contém um solvente sólido [14,22-24].

Os principais objetivos da EFS são a remoção da interferência da matriz, a concentração e o isolamento dos analitos [22-24]. Geralmente, é utilizado um solvente orgânico seletivo para remover a interferência e, em seguida, outro solvente é utilizado para remover os analitos de interesse da fase. A EFS convencional oferece várias vantagens, destacando-se o consumo de menores volumes de solvente em comparação com a ELL, o menor tempo de operação da técnica, a elevada recuperação de analitos e a possibilidade de automatização [18,19,22]. No entanto, também apresentam algumas limitações, como a etapa de dessorção dos analitos que requer o uso de solventes tóxicos e a ocorrência de efeitos de matriz [14,23,24].

3.2.1.5. Extração por Headspace (HS)

Para a determinação do etanol e de outros compostos voláteis (tais como inalantes e gases venenosos) presentes no sangue, fluídos e homogenatos de tecidos, esta é a técnica mais conveniente a ser aplicada para a extração dos xenobióticos. Nesta técnica, a amostra é inserida em recipiente hermeticamente fechado e termostaticado, por determinado tempo de incubação, permitindo adequado equilíbrio dinâmico entre as fases líquida e gasosa da amostra. Em seguida, uma alíquota da fase gasosa da amostra é recolhida e analisada por CG (Figura 2).

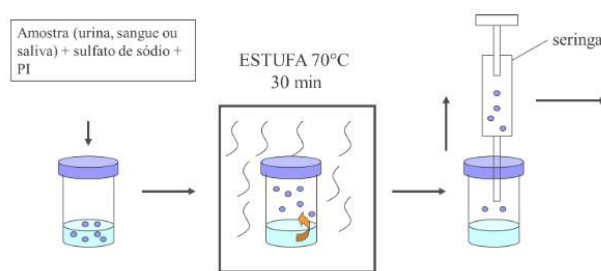


Figura 2. Esquema ilustrativo da Extração por Headspace (HS). Fonte: os autores (2023).

Trata-se de uma técnica que permite o isolamento dos analitos voláteis da matriz de modo simples, eficiente, consideravelmente rápido e de baixo custo [14].

3.2.1.6. Extração com ponteiras descartáveis (DPX)

A extração em ponteiras descartáveis (DPX), recente técnica de preparo de amostra, é baseada no equilíbrio de sorção do analito presente na amostra com o sorvente. Esta técnica consiste em uma variante da extração em fase sólida (EFS) convencional. A DPX utiliza uma ponteira convencional de pipeta (1 ou 5 mL), no qual o sorvente está contido livremente entre dois filtros. A amostra aspirada pela ponteira é misturada dinamicamente com o sorvente por meio da aspiração de ar. A extração ocorre em fase sólida dispersiva, assegurando adequada superfície de contato (amostra/sorvente) e consequentemente, eficiente extração [14].

A extração consiste no condicionamento da ponteira com o solvente adequado, seguido de aspiração da amostra e da promoção do contato com a fase estacionária contida na pipeta. Após o tempo de contato, a matriz é descartada, seguindo-se as etapas de lavagem e eluição. O uso desta técnica combina com a rapidez, uso mínimo de solventes com alta recuperação, alta eficiência de extração, produtividade e rendimento, além da possibilidade de automação [14].

A DPX é uma técnica de preparo de amostra rápida e simples que utiliza reduzido volume de amostra e de solvente orgânico [14]. Esta técnica minimiza normalmente os passos de condicionamento necessários, acelerando assim o processo de preparação da amostra. Trata-se de um método único em que o solvente contido no interior de uma ponta é completamente misturado na solução da amostra por meio da aspiração de ar. As principais áreas de aplicação, nas quais a extração DPX foram reportadas por sua utilização são nas análises forenses, quando se trata de drogas de abuso e de contaminantes alimentares, principalmente quando estes estão com a presença de pesticidas [25].

3.2.1.7. Microextração em fase sólida (MEFS)

A microextração em fase sólida (MEFS) consiste na remoção de compostos voláteis e semivoláteis em amostras constituídas por água, ou seja, aquosas, empregando uma seringa modificada contendo um microtubo de aço inoxidável com uma agulha interna. O microtubo possui cerca de 1 cm de fibra de sílica fundida revestida com um polímero orgânico [14]. O método consiste na captura dos analitos em uma fibra capilar de sílica fundida quimicamente modificada, coberta com uma película de material apropriado, com posterior análise direta por técnicas cromatográficas de alta eficiência, como a CG e a cromatografia líquida (CL) [14,22,23].

O procedimento de extração utilizando MEFS pode ser realizado de duas formas. A primeira consiste na imersão direta da fibra na amostra, mantendo-a sob agitação durante a extração do analito; a segunda consiste na utilização da técnica de HS, em que a amostra é aquecida e os componentes voláteis são adsorvidos na fibra. É essencial que as condições para a extração na fibra MEFS sejam otimizadas, tais como o pH, a concentração de sal (para o efeito de *salting-out*), o volume da amostra, o tempo e a velocidade de agitação da amostra, a temperatura e o tempo de extração. O espaço livre no frasco de amostra pode influenciar a extração da substância [15,16,22].

A fibra MEFS é introduzida no recipiente que contém a amostra, o protetor da agulha da fibra é retraído e a fibra de sílica é exposta ao meio, onde ocorre a extração dos analitos. O revestimento polimérico da fibra atua concentrando os analitos por processos de absorção ou adsorção [14,23].

Após o processo de extração, as substâncias a serem analisadas, e concentradas na fibra, são dissolvidas termicamente através da introdução da fibra no injetor aquecido de um cromatógrafo de gás. A dessorção também pode ser efetuada por CL, utilizando o próprio solvente da fase móvel [15,16,22].

As principais vantagens da técnica são a elevada sensibilidade, seletividade, precisão, a possibilidade de automatização e a eliminação da utilização de solventes. As desvantagens são os elevados custos associados à técnica, a fragilidade das fibras e o elevado tempo de extração [15,16,22].

3.2.1.8. *Microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD)*

Microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD) baseia-se no equilíbrio da distribuição da substância a analisar entre a amostra e o solvente de extração. Caracteriza-se por um sistema de extração ternário, em que o solvente extrator e o solvente dispersante são rapidamente injetados na amostra aquosa com o auxílio de

uma seringa, formando uma solução turva no tubo (amostra aquosa/solvente extrator/solvente dispersante) que é submetida a centrifugação, onde as partículas do solvente extrator são sedimentadas. Esta fase sedimentada é recolhida e submetida a análise toxicológica [22,23,26].

As vantagens desta técnica incluem menor tempo de extração, simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, alta recuperação do analito alto fator de enriquecimento, utilização de volumes reduzidos de solvente orgânico e aplicação a uma vasta gama de analitos. No entanto, as desvantagens são: utilização de solventes tóxicos, todo o processo de extração é realizado de forma manual e a centrifugação limita o volume de amostra a ser utilizado, é a etapa mais demorada do processo, dificuldade de automatização devido à necessidade de etapas de separação de fases e de centrifugação [26].

3.3. *Testes analíticos*

A utilização da toxicologia analítica vem crescendo e se desenvolvendo dentro da toxicologia forense nos últimos anos e é amplamente utilizada para auxiliar em investigações de morte, em questões civis e criminais envolvendo uso de drogas, em testes de drogas de abuso em ambientes correcionais e medicina prisional, em segurança rodoviária e no local de trabalho, em questões envolvendo poluição ambiental, bem como em doping esportivo [4,14].

As técnicas modernas dependem fortemente de análises de triagem de imunoensaio e espectrometria de massa (EM) e para análises confirmatórias, usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e/ou cromatografia gasosa (CG) como técnica de separação [4,14,25].

3.3.1. *Imunoensaio*

Os imunoensaios são testes bioquímicos usados para detectar ou quantificar uma substância específica, o analito, em uma amostra biológica, por meio do reconhecimento de um antígeno por um anticorpo. Caracterizam-se por serem testes simples e práticos, fáceis para o preparo da amostra e apresentam resultados em tempo consideravelmente curto, em poucos minutos, a partir da leitura visual do dispositivo na presença ou ausência de coloração [20].

Os imunoensaios são técnicas para a detecção ou quantificação de antígenos ou anticorpos, podendo utilizar reagentes marcados ou não marcados. Os ensaios com reagentes não marcados possuem sensibilidade de detecção menor, pois é necessário que se forme grande quantidade de imunocomplexos para que se processe a visualização do fenômeno [27].

Há vários kits de imunoenaios que são utilizados na toxicologia forense. De forma simplificada, todos eles se baseiam na competição da ligação entre anticorpos e antígenos (fármacos, drogas etc.) [2].

Os testes de imunoenaios podem ser classificados em testes de imunocromatografia ou automatizados. Caracterizam-se por serem testes simples e práticos, fáceis para o preparo da amostra e apresentam resultados em tempo consideravelmente curto. Podem ser aplicados in loco, utilizando teste imunocromatográficos rápidos, como por meio automatizado, como por exemplo, teste de Elisa, o resultado mostra-se pronto em poucos minutos (15-20 minutos) com presença ou ausência de cor [25].

3.3.1.1. Imunocromatografia

Os testes de Imunocromatografia são utilizados para análises qualitativas e também para monitorizações em ambientes não laboratoriais ou deficientes de recursos, sem acesso a aparelhos mais sofisticados. Suas aplicações incluem pesquisa de antígenos, anticorpos, drogas,

hormônios e metabólitos. Existem variações nos formatos dos testes imunocromatográficos, podendo ser de fluxo, lateral ou cervical (Figura 3) [25,28].

O teste imunocromatográfico é um imunoenasão por competição, onde a droga ou os seus metabólitos de uma amostra de urina competem com a droga fixada na membrana pelo anticorpo específico conjugado. O dispositivo contém uma tira de membrana, no qual é fixado com a droga sobre a banda do teste (T). Um anticorpo monoclonal antidroga específico conjugado ouro coloidal está fixada numa “almofadinha” por onde passa a urina, logo após a absorção. Após mergulhar a membrana na urina, o conjugado ouro coloidal move cromatograficamente por ação da capilaridade e o anticorpo migra para a região do teste. Se não há moléculas de droga na urina, o anticorpo conjugado ouro coloidal se liga à droga fixada na região do teste formando uma linha visível. Portanto, a formação de uma linha visível precipitante na zona de teste ocorre quando a urina é negativa para a droga (Figura 4) [25,29,30].



Figura 3. A: Cartuchos para testes imunocromatográficos contendo 10 parâmetros, com 5 parâmetros em cada lado. B: Cartuchos de testes imunocromatográficos contendo 10 parâmetros, com 5 parâmetros em cada lado. C: Cartuchos de testes imunocromatográficos contendo 12 parâmetros. **Fonte:** Imagem de aula prática da disciplina de Toxicologia geral e clínica do curso de Medicina da Universidade Paranaense (UNIPAR), com a professora responsável Profa. Dra. Giuliana Zardeto (2022).

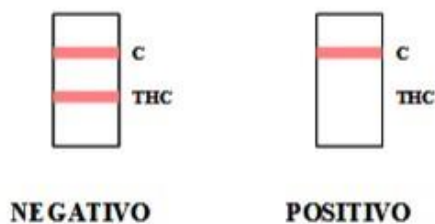


Figura 4. Demonstração do teste negativo e do teste positivo. **Fonte:** os autores (2023).

Quando a droga está presente na urina, a droga/metabólito (antígeno) reage com conjugado antidroga específico e não reagindo com a droga fixada na região do teste. Quando a concentração suficiente da droga está presente, este preencherá a porção limitada do anticorpo. Isto não permitirá a ligação do anticorpo conjugado ouro coloidal com a droga conjugada fixada na região do teste. Portanto, a ausência da faixa colorida na região do teste indica um resultado positivo (Figura 4). Uma faixa controle com uma reação antígeno/anticorpo é também fixada imunocromatograficamente na membrana da tira na região do controle (C) para indicar que o teste foi executado apropriadamente. Esta linha de controle deve sempre aparecer, independente da presença da droga e dos

seus metabolitos. Isto significa que urina negativa produzirá 2 faixas coloridas, e urina positiva somente uma faixa colorida. A presença dessa faixa colorida na região do controle, portanto, serve como: 1) verificação de que o volume de urina foi suficiente, e 2) e que a absorção e o fluxo foram corretos (Figura 4) [25,29,30].

O teste imunocromatográfico na área forense só foi possível após adaptação por parte dos investigadores, provando que pode ser utilizado para identificar a presença de sangue ou urina humana em amostras de interesse criminal, mesmo que estejam envelhecidas, contaminadas ou em estado de putrefação, na análise forense podem ser utilizados três procedimentos diferentes, variando de acordo com o tipo de amostra encontrada [25,31].

De acordo com estudos e pesquisas, ficou comprovado que a imunocromatografia pode ser empregada para detectar hemoglobina humana em amostras obtidas de roupas, armas de fogo, armas brancas, pedaços de madeira e outros objetos de interesse criminal e superfícies que fazem parte da cena do crime. A confirmação da presença de hemoglobina humana, auxilia o perito criminal a esclarecer uma investigação e permite a identificação da vítima quando desconhecida e do possível suspeito através de técnicas de biologia molecular [25,28].

3.3.1.2. Imunoensaio automatizado

O instrumento automatizado do sistema reagente foi projetado especificamente para a seleção preliminar de fármacos de abuso em urina, análise qualitativa de vários analitos em soro e a análise quantitativa de álcool etílico na urina, soro ou plasma. O analisador possui um painel completo de acesso aleatório e um carrossel projetado para analisar 16 amostras de urina [32].

Quando as moléculas do analito de interesse se ligam aos anticorpos, os analitos marcados deslocam-se e reagem com o substrato que foi adicionado no sistema, gerando um sinal, podendo ser medido pela espectroscopia [7].

3.2.2. Cromatografia

A cromatografia é o método analítico mais utilizado pelos químicos forenses. Nela constam diferentes tipos, entre eles, a cromatografia gasosa (CG), com detecção de ionização de chama e o amostrador rarefeito (usado para material biológico), a cromatografia líquida (CL) (usada na identificação de anfetamina, efedrina e epinefrina) e a cromatografia em camada delgada (CCD) [14]. Além disso, a espectrometria, a microscopia, a calorimetria e outros métodos também são utilizados. O uso depende do objetivo da identificação, do método adequado e dos recursos disponíveis no laboratório forense [14,33,34].

Dentre as metodologias de cromatografia, a cromatografia em camada delgada é a mais simples. Trata-se de uma técnica de separação, onde a amostra é aplicada sobre uma placa, que pode ser de diferentes materiais, como papel ou sílica (fase estacionária), e depois é eluída por um solvente (fase móvel). Depois disso, a placa deve ser revelada, utilizando reações colorimétricas. Essa técnica não é muito empregada atualmente, uma vez que fornece pouca especificidade e seletividade [34,35].

Outros métodos cromatográficos podem ser utilizados para confirmar a identidade do sangue, por exemplo. A cromatografia em papel (CP) foi a primeira técnica e envolveu a separação da hemoglobina e seus derivados [35]. Um reagente em spray alcoólico de benzidina em conjunto com um spray de peróxido de hidrogênio foi utilizado para detectar manchas e o componente hematóporfirina foi visualizado devido à fluorescência sem pulverização [35].

A principal desvantagem dessa técnica era o longo tempo de revelação e a necessidade de pré-saturação. A cromatografia em camada fina (CCF) também foi utilizada com uma técnica de revelação semelhante, no entanto, esses testes não são usados atualmente em laboratórios forenses [35].

3.3.2.1. Cromatografia líquida (CL)

A cromatografia líquida (CL) é uma alternativa de técnicas cromatográficas mais antigas, e os avanços na área permitiram desenvolver métodos de análises [33]. Nos últimos anos, a CL tem sido muito utilizada, principalmente acoplada ao espectro de massas, pois oferece maior sensibilidade e detecção de compostos termicamente lábeis [36]. Em CL, a fase móvel é formada por um líquido. Quando se utilizam técnicas como a CL de alta pressão, este líquido é introduzido na coluna através de uma bomba, de forma a aumentar a sua pressão [22,23,33].

3.3.2.2. Cromatografia líquida acoplada ao espectro de massa (CLAE)

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou chamada de cromatografia líquida acoplada ao espectro de massas (CLAE) trata-se de uma técnica muito importante, pois determina a separação, a quantificação, purificação e a análise de componentes presentes em misturas de substâncias não voláteis ou instáveis termicamente, ou seja, a CLAE possui a capacidade de realizar separações de análises quantitativas de compostos presentes em vários tipos de matrizes biológicas [7].

Uma das vantagens da CLAE é que as separações podem ser realizadas em poucos minutos, com o auxílio

de uma coluna de alta resolução; já as suas desvantagens: a grande quantidade de amostra requerida e o tempo gasto no caso da cromatografia em coluna (CC) aberta [33-35].

A HPLC apresenta uma vantagem em relação à cromatografia gasosa, pois não é necessária a realização de uma etapa de derivatização. A utilização da técnica acoplada à espectrometria de massas é a mais indicada, uma vez que sua sensibilidade é maior, para detecção de substâncias em concentrações mais baixas [36]. Entretanto, a utilização de detectores UV (ultravioleta) ou DAD (*Diode Array Detector*) ainda desempenha um papel importante, principalmente para análises qualitativas ou mesmo quantitativas, apesar da identificação do composto não ser indubitavelmente comprovada [36,37].

3.3.2.3. Cromatografia gasosa (CG)

A cromatografia gasosa (CG) foi desenvolvida no final da década de 70. A técnica tem sido escolhida para identificar se o cabelo/pelo de uma pessoa, por exemplo, foi exposto às drogas e substâncias xenobióticas. Essa técnica, em especial nos Estados Unidos (EUA), vem sendo aplicada em cadáveres, o que tem sido muito útil na resolução de inúmeros crimes [4,34,35].

A CG é uma técnica de análise, separação e identificação de compostos presentes em misturas de substâncias voláteis e semivoláteis por interação diferencial dos seus componentes entre uma fase estacionária (líquido ou sólido) e uma fase móvel (gás), na qual é utilizada em muitos ambientes, tal como na perícia forense para a separação de determinados analitos que devem apresentar baixo ponto de ebulição em relação às demais substâncias contidas na amostra, pois possibilita a detecção de quantidades muito pequenas e uma ampla variedade de amostras a serem analisadas [7,22,23].

3.3.2.4. Cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectro de massa (CG-EM)

A cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectro de massa (CG-EM) é amplamente utilizado para a análise, pois oferece vantagens como sensibilidade e especificidade de detecção que facilitam a identificação inequívoca e a determinação de níveis residuais presentes nas amostras testadas [36,37].

A incorporação de cromatografia gasosa para sistemas GC-MS passíveis de campo também provou ser bastante bem-sucedida, pois esses instrumentos foram usados pelos EUA Exército em laboratórios móveis em áreas de conflito, como Iraque e Afeganistão, para identificação rápida de drogas e explosivos no teatro de operações [36].

Embora a tecnologia de GC-MS de laboratório seja uma tecnologia madura há algum tempo, o uso mais

significativo de GC-MS comercializável é um desenvolvimento relativamente recente. O grande intervalo de tempo entre o uso generalizado de GC-MS no laboratório e GC-MS no campo pode indicar que podemos esperar um intervalo semelhante entre a recente adoção de espectrometria de massa (EM) de ionização ambiente em laboratórios forenses e a implementação de sistemas de campo baseados em ambiente ionização para análise forense [22,36].

O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) [20,23,34].

3.3.2.5. Espectrometria de massa (EM)

A espectrometria de massa (EM) é comumente utilizada em laboratórios de química forense para análises sensíveis e definitivas [34]. Tem havido esforços significativos para levar a análise de espectrometria de massa ao local por meio do desenvolvimento de instrumentos robustos e utilizáveis em campo [35,36].

Testar amostras no campo é de particular interesse em ciência forense, segurança nacional e aplicações de defesa. Na química forense, testar drogas apreendidas no campo pode melhorar significativamente a eficiência no processamento de casos criminais relacionados [36]. A EM pode fornecer dados confiáveis para locais de teste de pessoal militar para possível liberação de armas químicas [36].

Dois fatores motivadores no desenvolvimento de EM forense em campo são para melhorar o fluxo de trabalho e a triagem de alto nível de evidências potenciais. A evidência forense mais comum analisada com EM são drogas apreendidas [36].

A maioria das análises de campo atuais de drogas são realizadas usando testes colorimétricos. Os policiais podem realizá-los com treinamento mínimo e não requerem instrumentação. Embora a triagem de campo com testes de cores tenha se mostrado eficaz em fornecer causa provável para prisão no caso de drogas apreendidas mais “tradicionais”, como cocaína, opiáceos e anfetaminas, sabe-se que elas produzem falsos positivos. Os testes de cores são apenas testes preliminares antes do teste de confirmação em um laboratório forense [36].

A EM é uma técnica analítica utilizada para a detecção e a identificação de compostos de interesse por meio de sua massa e estrutura química, ela consiste em analisar os átomos e as moléculas através da relação massa/carga dos íons presentes nas substâncias analisadas no estado gasoso [7].

A análise é desenvolvida para a qualificação e quantificação de analitos, diante da ionização dos átomos

e moléculas neutras, pois os analisadores dependem da aceleração dos íons envolvidos, frente a relação m/z (massa/carga), no qual é colocada com um outro fator na análise, e não tendo unicamente a massa como fator determinante [7,34].

É uma técnica extremamente valiosa no qual as moléculas contidas em uma determinada amostra são convertidas em íons na fase gasosa e separadas sequencialmente por um espectrômetro de massa onde a separação é realizada rapidamente por um espectrômetro de massa onde separa os íons em movimento com base nas suas relações massa/carga. Através do bombardeamento com elétrons, a produção de íons torna-se possível. Os íons passam através de um campo magnético fazendo diferentes trajetórias dependendo das suas massas [7].

3.3.2.6. Eletroforese capilar (EC)

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica de separação em fase líquida que se baseia na migração diferencial de espécies iônicas ou ionizáveis quando as mesmas são submetidas a um campo elétrico. Nos tempos, a EC tem sido reconhecida como uma das maiores inovações na área de separações, com aplicação em diversos campos da química analítica. O potencial desta técnica para análises forenses foi demonstrado pela primeira vez em 1991. Os instrumentos de EC são significativamente menores na EC, principalmente pelo baixo consumo de solventes e com o baixo custo das colunas capilares [4,14].

3.3.2.7. Espectrometria de Absorção Atômica (EAA)

A espectrometria de absorção atômica (EAA) é uma técnica analítica de detecção qualitativa e determinação quantitativa de determinados elementos, recorrendo à absorção de radiação pelos átomos no seu estado gasoso. Ocorre quando um átomo na forma de vapor absorve ou emite radiação em determinados comprimentos de onda, característicos dos elementos [39].

É uma técnica muito difundida para determinação de elementos-traço. Essa técnica envolve radiação eletromagnética que pode ser absorvida pelos átomos dos constituintes químicos das amostras. Ela é baseada na quantificação de espectros de linhas finas que surgem da transição eletrônica, envolvendo a camada mais externa do átomo. A amostra a ser analisada é decomposta por intenso calor, produzindo átomos livres capazes de absorver radiação eletromagnética, em comprimentos de ondas característicos, produzindo espectros atômicos [38,39].

Os componentes básicos de um espectrômetro de absorção atômica incluem: fonte de radiação, que emite o espectro do elemento de interesse; sistema de atomização,

na qual a amostra é introduzida e os átomos da amostra são produzidos; monocromador, para a dispersão da luz e seleção do comprimento de onda a ser utilizado; detector, que mede a intensidade de luz, transforma este sinal luminoso em um sinal elétrico e o amplifica; e um display (ou registrador) que registra e mostra a leitura depois do sinal ser processado. Essa técnica é monoelementar e é usada para leitura de metais (Figura 5).

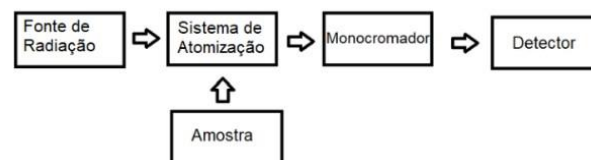


Figura 5. Diagrama de blocos da espectrometria de absorção atômica (EAA). **Fonte:** Adaptado de [39].

3.5.2.8. Outros tipos de Métodos analíticos

Métodos espectroscópicos, como a absorção UV-vis, são considerados confiáveis para confirmar a presença de sangue em uma mancha. Muitos derivados diferentes da hemoglobina têm uma banda de absorção forte característica em torno de 400 nm que é chamada de Banda Soret. Muitos desses testes podem distinguir entre diferentes derivados de hemoglobina e também mostrar um resultado positivo para manchas mais antigas que tiveram um resultado negativo com outros testes presuntivos e testes de cristal [38].

No entanto, existem muitas condições que podem interferir nos resultados espectrais, como a submersão em água, exposição à luz solar, aquecimento e ferrugem [38]. Um microespectrofotômetro pode ser usado para medir um espectro de absorção após uma amostra ter sido tratada com o reagente de Takayama [33,38].

Outro teste espectroscópico é baseado na fluorescência da hematoporfirina por excitação com luz ultravioleta. Verificou-se que este método é especialmente bem-sucedido ao lidar com manchas de sangue em metais oxidados, manchas de sangue de até 10 anos e manchas de sangue expostas a condições não adequadas para absorção UV-vis, como calor, luz solar e umidade [36,38]. Os melhores resultados podem ser obtidos analisando um extrato salino da mancha de sangue, e é importante ter em mente que existem possíveis falsos positivos, uma vez que compostos de porfirina ocorrem com frequência em sistemas biológicos [38]. Esses testes espectroscópicos não são usados há muitos anos para a investigação de crimes, mas é importante incluí-los nessa discussão para ajudar a entender a evolução dos testes de fluidos corporais [38].

A análise de isoenzimas é outra técnica que pode confirmar a presença de sangue comparando as diferenças nos padrões de isoenzimas da lactato desidrogenase

(LDH) de diferentes fluidos [29,34]. Ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) é outro método que tem sido usado para identificar sangue [35] bem como identificar grupos sanguíneos usando diferentes anticorpos [38].

É essencial que os sistemas analíticos sejam totalmente validados e adequados para o propósito e os lotes de ensaio sejam monitorados com controles de qualidade. Programas externos de proficiência monitoram tanto o ensaio quanto o pessoal que executa o trabalho. Para que um laboratório tenha um desempenho ideal, é vital que as circunstâncias e o contexto do caso sejam conhecidos e que o laboratório entenda as limitações dos sistemas analíticos usados, incluindo a estabilidade do medicamento [37].

Os radioimunoensaios foram as primeiras metodologias utilizadas nas análises toxicológicas, principalmente para os cabelos, por exemplo, porém devido a disponibilidade para um pequeno número de drogas, baixa sensibilidade e a utilização de material radioativo são pouco utilizados atualmente e apenas como métodos de triagem [39].

Diante de todos os itens demonstrados no presente estudo, pode-se observar que hoje em dia os peritos possuem diversos testes analíticos para identificação de possíveis crimes, sabendo-se da importância correta da matriz onde se deseja investigar, assim como, caso seja necessário, a extração das mesmas para que possam ser incluídas nos equipamentos analíticos.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que as ciências criminais, através de diversas técnicas e procedimentos, têm sido de grande importância na resolução de crimes vindos, por exemplo, de violência sexual, homicídios, utilização de drogas ilícitas, entre outros, indo além da simples identificação de um possível suspeito, mas também, afastando a possibilidade de um inocente responder por um crime que não cometeu. Ao lidar com matrizes biológicas, considera-se necessário que o analista de perícia criminal, juntamente com toda a equipe, conheça os xenobióticos que estão presentes e o tempo (horas, dias, meses, anos) em que se encontra em cada matriz biológica, minimizando assim, as chances de erros na leitura e interpretação dos resultados, bem como, alinhar o método analítico mais adequado diante da escolha das matrizes. Nesse sentido, mais estudos acerca do assunto são necessários.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram para a concepção do estudo, análise e interpretação dos resultados e conclusões. Todos os autores fizeram a revisão crítica do

manuscrito, deram a aprovação final e concordaram em ser responsáveis por todos os aspectos do trabalho.

AGRADECIMENTOS

Universidade Paranaense (UNIPAR).

FONTE DE FINANCIAMENTO

Universidade Paranaense (UNIPAR).

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A.A. Matos, M.M. de Oliveira, L.I.F. Santos, P.P. Boareto, L.P. Moreira, M.D.A.O. Shimabukuro, et al. & M. do Nascimento. Cocaína: intoxicação aguda e suas alterações fisiológicas: Cocaine: acute intoxication and its physiological alterations. *Brazilian Journal of Development* **8(10)**, 65804-65809, 2022.
- [2] C.D.C. Santos, C.H.B. Sabino, C.R. Pereira, T.O. Queiroz, & F.J. Mininel. Química Forense: a Ciência e sua Importância para a Sociedade. *Revista de Ciências Exatas e Tecnologia* **16(16)**, 16-23, 2021.
- [3] N. Fernández, L.M. Cabanillas, N.M. Olivera, & P.N. Quiroga. Optimization and validation of simultaneous analyses of ecgonine, cocaine, and seven metabolites in human urine by gas chromatography–mass spectrometry using a one-step solid-phase extraction. *Drug Testing and Analysis* **11(2)**, 361-373, 2019.
- [4] S. Oga, M.M.A. Camargo, J.A.O. Batistuzzo. *Fundamentos de Toxicologia*. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2021.
- [5] D.J. Dorta, M. Yonamine, J.L. da Costa, & B.S. de Martinis. *Toxicologia forense*. Editora Blucher, 2018.
- [6] J.L. Carvalho. Cadeia de Custódia e sua relevância na persecução penal. *Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics* **5(4)**, 371-382, 2016.
- [7] K. Alencar, C. de Goes Sampaio, & F.D.A.F. Alves. Toxicologia forense: estudo bibliográfico sobre as técnicas relacionadas à química analítica nas investigações criminais. *Revista Brasileira de Criminalística* **11(1)**, 59-64, 2022.
- [8] D.K. Molina, & V. Hargrove. *Manual de toxicologia forense para médicos legistas*. Imprensa CRC, 2018.
- [9] J.C. Medeiros Júnior, M.A.G. Júnior, R.S. Duran, & Y.R. Antunes. Toxicologia forense: o estudo dos agentes tóxicos nas ciências forenses. *Brazilian Journal of Development* **9(1)**, 1475-1493, 2023.
- [10] A. Salomone, P. Oliveri, & G. Zadora. Novas Abordagens em Química Analítica Forense. *Frontiers in Chemistry* **8**, 638460, 2021.
- [11] H.J. Hamnett, S. Russell, & S. Baginski. Challenges in the Analysis of Toxicological Samples. *In Challenges in Detection Approaches for Forensic Science* 72-104,

- 2021.
- [12] T. Estella Fokunang, V.E.T. Mayoudom, G.M. Annih, P. Isaac, D. Okpuno, E. Ubuara, ... & C. Ntungwen Fokunang. Forensic Toxicology Concepts and Applications in Pharmaceutical Medicine. *AJMPCP*, 2022. Disponível em: <http://eprints.asianrepository.com/id/eprint/3320/1/30187-Article%20Text-56593-1-10-20220304.pdf>. Acesso em: 14 de fev. 2023.
- [13] B. Zhu, L. Meng, J. Cao, W. Yang, & X.A. Conlan. Simultaneous determination of 10 new psychoactive piperazine derivatives in urine using ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Forensic Sciences* **66(2)**, 748-757, 2021.
- [14] D.C.M. Bordin, F.F.S.S. Monedeiro, E.D. Campos, M. Alves, L. Bueno, & B. Martinis. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. *Sci Chromatogr* **7(2)**, 125-43, 2015.
- [15] A.R. Fukushima, J. Zaccarelli-Magalhães, C. Munhoz, G.R. de Abreu, E.R.A. Camargo, P.A.F. Waziry, & H. de Souza Spinosa. Review on Requirements for Methodological Validations and Forensic Applications. *Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics* **7(4)**, 265-282, 2018.
- [16] A.D. Ribeiro, & D.A.C. Cusinato. Avaliação da Publicações Brasileiras Envolvendo Humor Vítreo como Amostra Alternativa para Análises Toxicológicas Forenses. *Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics* **11(1)** 49-61, 2021.
- [17] J. de Paula Campos. Análise Criminal como ferramenta de reformulação da Perícia Criminal. *Revista Brasileira de Criminalística* **11(1)**, 29-36, 2022.
- [18] R. Lanaro. Como o serviço de toxicologia clínica pode contribuir em casos forenses?. *Toxicologie Analytique et Clinique* **34 (3)**, S17, 2022.
- [19] J.A. Velho. New Trends in Analytical Chemistry for the Examination and Interpretation of Traces of Crimes. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry* **9(34)**, 13-14, 2022.
- [20] A.E. Santos. As principais linhas da biologia forense e como auxiliam na resolução de crimes. *Revista Brasileira de Criminalística* **7(3)**, 12-20, 2018.
- [21] S. Jones, C. McGowan, S. Boyle, Y. Ke, C.H.M. Chan, & H. Hwang. An overview of sample preparation in forensic toxicology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science* **4(2)**, e1436, 2022.
- [22] L. Meng, Y. Dai, C. Chen, & J. Zhang. Determination of amphetamines, ketamine and their metabolites in hair with high-speed grinding and solid-phase microextraction followed by LC-MS. *Forensic sciences research* **6(3)**, 273-280, 2021.
- [23] L. Meng, S. Ye, Y. Wu, & L. You. Determination of multiple drugs of abuse in human urine using dispersive liquid-liquid microextraction and capillary electrophoresis with PDA detection. *Forensic Sciences Research* **7(2)**, 265-271, 2022.
- [24] R.B. Hoff, & T.M. Pizzolato. Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **109**, 83-96, 2018.
- [25] R.G. Nogueira, V.D. Alves, E.V.S. Matias, & G. Veras. Applications of NIR spectroscopy and chemometrics to illicit drug analysis: An example from inhalant drug screening tests. *Forensic science international* **328**, 111043, 2021.
- [26] F.R. Mansour, & N.D. Danielson. Microextração líquido-líquido dispersiva terminada por solvente: um tutorial. *Analytica Chimica Acta* **1016**, 1-11, 2018..
- [27] M. Akhgari, L. Bahmanabadi, F.S.S. Iravani, & F. Jokar. Forensic laboratory validation of immunochromatography and gas chromatography/mass spectrometry methods for the detection of methamphetamine and amphetamine in postmortem urine specimens. *Toxicologie Analytique et Clinique*, **33(2)**, 109-115. 2021.
- [28] A.F. Maluque. Química Forense: O Papel e Desafios na Investigação Criminal. *Revista Científica do Ictac* **3(7)**, 2017.
- [29] L.S. Goodman, & A. Gilman A. *The pharmacological basis of therapeutics*. The Macmillan Publishing, New York, 1990. 613.
- [30] K.R. Allen. Triagem para drogas de abuso: qual matriz, fluido oral ou urina?. *Annals of Clinical Biochemistry*, **48 (6)**, 531-541. 2011.
- [31] F.T. Peters, O.H. Drummer e F. Musshoff . Validação de novos métodos. *Ciência Forense Internacional*, **165(2-3)**, 216-224. 2007.
- [32] H. Gjerde, J. Mordal, A. S. Christophersen, J. G. Bramness, & J. Mørland J. Comparison of drug concentrations in blood and oral fluid collected with the Intercept® sampling device. *Journal of Analytical Toxicology* **34(4)**, 204-209. 2010.
- [33] J.C. Medeiros Júnior, M.A.G. Júnior, R.S. Duran RS, & Y.R. Antunes. Toxicologia forense: o estudo dos agentes tóxicos nas ciências forenses. *Brazilian Journal of Development* **9(1)**, 1475-1493, 2023.
- [34] R.C. Cavalcanti . Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida e gasosa: sua aplicação nas ciências forenses. *Acta de Ciências e Saúde* **1(1)**, 1-5, 2016. Disponível em: <http://www2.ls.edu.br/actacs/index.php/ACTA/article/view/116>. Acesso em: 14 de fev. 2023.
- [35] R. Linden, S. Sartori, E. Kellermann, & A.A. Souto. Substance identification in systematic toxicological analysis using a computer system for chromatographic

parameter calculation and database retrieval. *Química Nova* **3**, 468-475, 2007.

[36] K. Evans-Nguyen, A.R. Stelmack, P.C. Clowser, J.M. Holtz, & C.C. Mulligan. Fieldable mass spectrometry for forensic science, homeland security, and defense applications. *Mass Spectrometry Reviews*, **40(5)**, 628-646, 2021.

[37] A. Orfanidis, O. Mastrogianni, A. Koukou, G. Psarros, H. Gika, G. Theodoridis, & N. Raikos. A GC-MS method for the detection and quantitation of ten major drugs of abuse in human hair samples. *Journal of Chromatography B*, **1047**, 141-150, 2017.

[38] R. Wagner. O cabelo como matriz analítica para o exame toxicológico de motoristas profissionais na Lei N 13.103/15. *Visão Acadêmica*, **20(2)**, 2019.

[39] K.A. Pacheco. Espectroscopia Atômica: Uma breve revisão. Monografia do Curso de Bacharel em Química Industrial do Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Vila Velha, 2022. 53p.