

## Aplicabilidade e eficiência de testes de diatomáceas em incidentes de afogamento: uma revisão da literatura

M.A. Leão <sup>a,\*</sup>, C.A. Hartwig <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas (RS), Brasil

\*Endereço de e-mail para correspondência: [marceloleaoufpel@outlook.com](mailto:marceloleaoufpel@outlook.com).

Recebido em 05/10/2023; Revisado em 17/12/2023; Aceito em 17/12/2023

---

### Resumo

O estudo abordou a aplicação do teste de diatomáceas na determinação forense de ocorrências de afogamento. O objetivo foi avaliar sua eficácia e comparar métodos de extração, com base em publicações científicas relacionadas. Foram discutidos três métodos: extração ácida, Microscopia Eletrônica de Varredura Automatizada - Digestão por Micro-ondas - Filtração a Vácuo (MD-VF-Auto MEV) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A extração ácida se destacou pela simplicidade e baixo custo (72% de taxa de uso entre as publicações científicas selecionadas neste estudo), enquanto o MD-VF-Auto MEV mostrou-se eficiente, porém mais complexo e de maior custo, e a PCR foi eficaz, com destaque para locais com poucas diatomáceas. A presença de diatomáceas em pulmões e órgãos distantes indicou afogamento, sendo correlacionada à ocorrência de ruptura alvéolo-capilar. Diatomáceas menores atravessam mais facilmente essa barreira. Os testes apresentaram alta eficácia em casos típicos de afogamento, variando, no entanto, em imersões *post mortem* e locais com poucas diatomáceas. A seleção criteriosa do método de extração, a prevenção da contaminação e a consideração das circunstâncias do afogamento foram enfatizadas para análises com maior exatidão. O estudo destaca a relevância do teste como abordagem confiável na análise forense de casos de afogamento.

*Palavras-Chave:* Teste de diatomáceas; Casos de afogamento; Extração ácida; PCR; MD-VF Auto MEV; Alvéolo-capilar.

---

### Abstract

The study addressed the application of the diatom test in the forensic determination of drowning incidents. The aim was to assess its effectiveness and compare extraction methods based on related scientific publications. Three methods were discussed: acidic extraction, Microwave Digestion-Vacuum Filtration-Automated Scanning Electron Microscopy (MD-VF Auto MEV), and Polymerase Chain Reaction (PCR). Acidic extraction stood out for its simplicity and low cost (72% usage rate among selected scientific publications in this study), while MD-VF Auto MEV proved to be efficient but more complex and costly, and PCR was effective, particularly in cases with few diatoms. The presence of diatoms in lungs and distant organs indicated drowning, correlated with alveolar-capillary rupture. Smaller diatoms more easily traverse this barrier. The tests demonstrated high efficacy in typical drowning cases, varying, however, in *post-mortem* immersions and locations with few diatoms. Careful selection of the extraction method, contamination prevention, and consideration of drowning circumstances were emphasized for more accurate analyses. The study highlights the relevance of the test as a reliable approach to forensic analysis of drowning cases.

*Keywords:* Diatom test; Drowning cases; Acidic extraction; PCR; MD-VF Auto MEV; Alveolar-capillary.

---

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, o afogamento tem sido uma causa de morte desafiadora de ser detectada. Um dos principais

indicadores de afogamento é a presença de espuma branca na boca da vítima. Contudo, essa espuma pode desaparecer rapidamente com o passar do tempo, dificultando sua

observação caso o corpo não seja recuperado prontamente. Além disso, durante a necropsia, os achados macroscópicos e microscópicos em casos de afogamento são complexos de serem interpretados. Quanto maior for o intervalo entre o momento do óbito e o procedimento de análise, mais difícil se torna o diagnóstico preciso do afogamento [1]. Portanto, para aprimorar a investigação policial em casos de afogamentos, foram desenvolvidos alguns testes específicos, sendo o teste de diatomáceas o mais amplamente aceito para a identificação desse tipo de morte. Esse teste foi inicialmente descrito por Revenstorff em 1904, quando ele detectou a presença de diatomáceas nos tecidos pulmonares de uma vítima de afogamento [2]. Primeiramente, quando uma pessoa se afoga, a água entra nos pulmões e, em seguida, a pessoa fica sem poder respirar e acaba vindo a óbito. Neste contexto, o teste de diatomáceas fundamenta-se na ideia de que, durante o afogamento, algumas das diatomáceas presentes na água são inaladas e alcançam os alvéolos nos tecidos pulmonares. A partir desse ponto, essas diatomáceas atravessam a barreira alvéolo-capilar, ingressam na corrente sanguínea e são transportadas para órgãos e tecidos distantes do pulmão, o que não se espera observar em situações de corpos submersos já sem vida [3-4]. Assim, a detecção dessas diatomáceas nos órgãos da vítima é essencial para auxiliar na confirmação de ocorrência de afogamento. Além disso, a presença de diatomáceas também pode fornecer informações valiosas para a investigação do caso. Como existem diferentes tipos de diatomáceas presentes em diferentes locais aquáticos, sua identificação pode auxiliar na determinação do local onde a pessoa se afogou, por exemplo. A variedade de diatomáceas existentes torna possível correlacionar as espécies encontradas no corpo da vítima com aquelas presentes em corpos d'água específicos, o que contribui para a reconstituição dos eventos e para esclarecer os detalhes do incidente [5].

As diatomáceas são organismos unicelulares, fotossintéticos e eucarióticos, amplamente classificados como algas, que se encontram em quase todos os tipos de corpos de água. Elas podem ser encontradas em nascentes, rios, lagoas, lagos, valas e em águas doces, salobras e marinhas [6]. Uma característica distintiva dessas microalgas é a presença de uma parede celular composta por sílica, chamada de valva, tornando-as altamente resistentes à degradação. Por outro lado, esta mesma característica estrutural as torna mais fáceis de serem extraídas, sendo o método ácido o mais comum. Ainda, a característica de elevada resistência à degradação, faz com que sejam facilmente encontradas em locais de crime, em função do alto potencial de persistência nos ambientes [7]. Tradicionalmente, as diatomáceas são classificadas em

duas ordens: as diatomáceas centradas, que apresentam simetria radial, e as diatomáceas penadas, que possuem simetria bilateral. No entanto, alguns pesquisadores optam por classificá-las em três classes distintas, como proposto por Pollanen. Nessa abordagem, elas são agrupadas como diatomáceas centradas (*Coscinodiscophyceae*), diatomáceas penadas sem uma ráfia (*Fragilariophyceae*) e diatomáceas penadas com uma ráfia (*Bacillariophyceae*) [8].

O método mais comum para identificação de diatomáceas em um determinado tecido é conhecido como método de extração ácida. Esse procedimento envolve o uso de um pedaço específico do tecido, como o pulmão, que é colocado em um balão de destilação junto com uma quantidade de ácido nítrico concentrado. Em seguida, essa solução é fervida por várias horas. Após a etapa de fervura, a parte indesejável da mistura é removida, e o líquido resultante, chamado de sobrenadante, é submetido a centrifugação e lavagem para purificação. As substâncias que permanecem são cuidadosamente depositadas em lâminas de microscópio limpas para serem examinadas detalhadamente. Por meio desse exame microscópico, os pesquisadores podem determinar a quantidade de diatomáceas presentes no tecido analisado e também identificar a família à qual essas diatomáceas pertencem, através da visualização de características taxonômicas como forma, tamanho das valvas, padrão e número de estrias, presença ou ausência de ráfia, formato dos polos proximais e distais da ráfia, e presença ou ausência da área central [9]. Além do método de extração ácida, existem outras abordagens menos frequentemente utilizadas para identificar diatomáceas em órgãos de vítimas de afogamento. Entre elas, destacam-se o método de Microscopia Eletrônica de Varredura Automatizada - Digestão por Micro-ondas - Filtração a Vácuo (MD-VF-Auto MEV), e o método de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), entre outros. O método MD-VF-Auto MEV é um processo complexo que envolve a digestão das amostras usando micro-ondas, seguido de filtração e posterior análise com microscopia eletrônica de varredura automatizada. Por sua vez, o método de PCR é uma técnica de biologia molecular que amplifica o DNA (ácido desoxirribonucleico) presente nas diatomáceas, permitindo a sua detecção através de análise genética. Apesar da promessa desses métodos alternativos, eles também enfrentam desafios semelhantes ao método de extração ácida, como a possibilidade de perda de diatomáceas durante o processamento rigoroso das amostras. Portanto, é essencial considerar cuidadosamente a escolha do método de análise, levando em conta a confiabilidade e a eficiência na detecção das diatomáceas, para que a

investigação forense possa obter resultados mais precisos e conclusivos em casos de afogamento [10-11].

Ressalta-se ainda, que o teste de diatomáceas enfrenta desafios significativos devido à possibilidade de falsos positivos relacionados à contaminação ou à ausência de diatomáceas em vítimas de afogamento. Esse cenário é mais comum em casos de afogamentos ocorridos em piscinas. Por essas razões, é crucial realizar o teste de forma extremamente cuidadosa para evitar qualquer tipo de contaminação [12].

Assim, este estudo teve por objetivo realizar uma análise descritiva de publicações científicas recentes com relevância na área de investigação de diatomáceas em situações de afogamentos. A análise aos materiais selecionados para o estudo teve foco na avaliação da eficácia do teste de diatomáceas abordado em cada uma das publicações. Além disso, buscou-se verificar, de maneira conclusiva, a viabilidade desse teste como uma ferramenta de apoio em situações relacionadas a afogamentos.

## 2. METODOLOGIA

Neste estudo, realizou-se uma pesquisa de literatura científica recente relacionada ao tema, utilizando as bases de dados do Google Acadêmico e *ResearchGate*. A busca foi conduzida de forma combinada com as palavras-chave 'Teste de diatomáceas', 'Casos de afogamento', 'Extração ácida', 'PCR', 'Alvéolo-capilar' e 'MD-VF Auto MEV'. Foram selecionados artigos abrangendo o período de produção científica de 2014 a 2023, e critérios de exclusão foram aplicados a publicações que não estavam diretamente relacionadas ao assunto em questão.

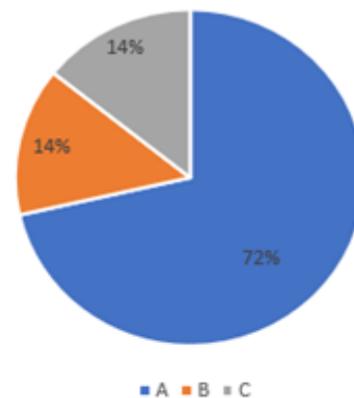
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando os critérios apresentados no item referente à Metodologia do trabalho, foram selecionadas para a discussão, sete publicações científicas que abordam incidentes de afogamento, sendo que em seis destas a técnica de teste de diatomáceas foi aplicada com o propósito de determinar a real causa do óbito e/ou a localização do evento aquático. A sétima publicação corresponde a um estudo de avaliação da transposição das diatomáceas através da barreira alvéolo-capilar, constituindo, portanto, uma discussão complementar ao objetivo do estudo [10-12,14-16,19].

De modo geral, todos os artigos trazidos para esta discussão enfrentaram dois desafios primordiais: a escolha adequada do método de extração e teste de diatomáceas, e a potencial contaminação durante a análise. Conforme

relatado na introdução, a contaminação representa o cerne da relutância de diversos profissionais em adotar esse método, visto que há registros de casos em que o teste de diatomáceas apresentou resultados positivos para afogamento, embora a causa da morte não tenha sido realmente por afogamento. Estes casos de falso-positivos se referem à contaminação na análise. Tal contaminação pode decorrer de negligência na necropsia durante a remoção da amostra de órgão, ou durante a própria análise. Ademais, no que tange ao método de extração, destaca-se que sua execução incorreta pode ocasionar a degradação das diatomáceas, resultando na perda de material orgânico passível de avaliação. Portanto, a escolha do método desempenha um papel fundamental para a eficácia da técnica do teste de diatomáceas [16].

Nas seis publicações científicas selecionadas para este estudo, referentes a aplicação do teste de diatomáceas, há menção de três métodos distintos para a extração e teste, sendo que uma das publicações inclui discussão sobre uma comparação entre os métodos. Os métodos descritos nas publicações se referem à extração ácida, MD-VF-Auto MEV e PCR, corroborando com a informação presente na introdução deste trabalho, a qual aponta estes métodos como os de maior aplicação para a finalidade proposta [10-12,14-16,19]. Na **Figura 1** encontra-se apresentado um gráfico referente à porcentagem de aplicação dos diferentes métodos de extração e testes de diatomáceas nos artigos selecionados para discussão neste estudo.



**Figura 1.** Porcentagem dos métodos utilizados nos artigos: Método de extração ácida: A (azul), Método de MD-VF-Auto MEV: B (laranja) e Método de PCR: C (cinza).

Como pode ser observado, em 72% das situações avaliadas, a opção recaiu sobre o método de extração ácida ao se deliberar sobre a abordagem a ser adotada objetivando o teste de diatomáceas. Isso se justifica em virtude de sua simplicidade e economia, constituindo-se em um método consolidado, comprovadamente eficaz e

acessível. Adicionalmente, destaca-se a facilidade de encontrar metodologias relacionadas ao uso deste método na literatura, o que certamente também contribui para que seja escolhido frente aos demais métodos disponíveis para o mesmo propósito [16].

No que se refere ao método de extração ácida, quando mencionado nas publicações científicas selecionadas para o estudo, foi desenvolvido a partir da obtenção de um fragmento de tecido da vítima, tipicamente do pulmão. Nesse processo, o tecido é submetido a oxidação utilizando ácido nítrico concentrado em um recipiente aquecido. Posteriormente, o material degradado resultante é transferido para tubos, nos quais é realizado um processo de lavagem para remover o ácido. Essa lavagem é executada por meio de centrifugação. A seguir, a amostra é minuciosamente analisada através de microscopia óptica para verificar a presença de diatomáceas [10,12,14-16]. É importante salientar, no entanto, que existem diversas variações do método de extração ácida, permitindo sua realização com diferentes tipos de ácidos ou combinações entre eles, além da possibilidade de associação de diferentes métodos buscando melhores resultados [16].

Por sua vez, o método denominado MD-VF-Auto MEV, cuja aplicação também foi evidenciada dentre as publicações científicas selecionadas, constitui um procedimento que, apesar de também envolver a seleção de uma amostra de tecido corpóreo, tal como o pulmão, mostra-se mais complexo do que a extração ácida. Nesse processo, os tecidos escolhidos passam por uma lavagem minuciosa utilizando água de extrema pureza. Em seguida, esses tecidos são acondicionados em um recipiente destinado a ser introduzido no sistema de digestão por micro-ondas. Nesse estágio, uma solução composta por ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio a 30% é adicionada à amostra. O conjunto é submetido a um tratamento de micro-ondas durante um período de 20 minutos, em temperatura e pressão apropriadas. A amostra resultante desse procedimento passa por um processo de filtragem através de uma membrana filtrante. Esta membrana, por sua vez, é então automaticamente escaneada por um microscópio eletrônico de varredura (MEV), com as imagens resultantes sendo subsequentemente analisadas a fim de examinar as diatomáceas presentes na amostra [11].

O outro método utilizado em uma das publicações científicas selecionadas, a Reação em cadeia por polimerase (PCR), é descrito como uma abordagem molecular amplamente empregada na ciência para a amplificação e detecção de sequências do ácido desoxirribonucleico (DNA) específicas. No contexto do estudo abordado, inicialmente uma amostra proveniente do baço foi homogeneizada. Em seguida, foi iniciado um ciclo

de congelamento e descongelamento visando a ruptura das paredes celulares das diatomáceas presentes, com a assistência de um agente químico denominado Chelex®, composto de resina de troca catiônica fraca, em uma concentração de 10%. Após o último ciclo de descongelamento, as amostras foram submetidas a um processo de fervura em água por um período de 8 minutos e, posteriormente, passaram por centrifugação. O líquido resultante desse processo, intitulado sobrenadante, foi empregado para a amplificação por PCR, após isolamento do DNA das diatomáceas. Assim, a etapa final compreendeu a amplificação do DNA das diatomáceas, utilizando géis de agarose como plataforma para essa observação [10].

Entre os três métodos mencionados, se avaliarmos critérios de eficácia, praticidade e economia, o método de digestão ácida ainda se destaca em termos de superioridade. Isso ocorre em comparação com as alternativas mais complexas, que não apenas apresentam dificuldades de execução, mas também se revelam substancialmente mais dispendiosas e morosas. Assim, no âmbito de uma investigação científica, a opção mais vantajosa continua a ser o método ácido, oferecendo uma abordagem ágil, eficaz e de baixo custo. Esta consideração é suportada pelas informações presentes nas publicações científicas selecionadas pelo estudo, bem como pela literatura em geral, apesar dos aspectos negativos correlacionados à aplicação da técnica, como ocorrência de falsos positivos, perda de material, manuseio de ácidos fortes e, inclusive, proibidos em alguns países, entre outros. [16].

Em contradição a isso, um dos artigos que integram as publicações selecionadas para este estudo, descreve uma comparação entre os métodos de extração ácida e PCR, destacando uma notável eficácia na utilização deste último, inclusive superando o método ácido, em circunstância específica. É importante destacar, que essa consideração fez referência a situações de vítimas encontradas em locais com escassa presença de diatomáceas, o que pode ter dificultado sua detecção através de microscopia. Assim, como descrevem os autores do artigo em questão, em situações extremas, como afogamentos em ambientes com poucas diatomáceas, a técnica de PCR se mostra mais vantajosa, principalmente em relação à sua sensibilidade elevada, o que acaba por suprir a desvantagem relacionada aos custos da técnica em comparação com métodos menos dispendiosos, como a extração ácida. Já em casos comuns, conforme também relatado no artigo que examinou outros 33 casos de afogamentos ocorridos em áreas de rios e lagos, ambos os métodos - extração ácida e PCR - demonstraram 100% de eficácia, sem que houvesse pronunciado destaque entre estes [10].

Neste contexto, merece também destaque a eficácia do método MD-VF-Auto MEV, que se apresenta como uma abordagem inovadora e completamente automatizada que, sem dúvida, oferece resultados satisfatórios na análise de diatomáceas em tecidos humanos. No entanto, é crucial observar que essa técnica requer considerável atenção e implica em custos significativamente mais elevados em comparação com outras alternativas disponíveis [16].

Ressalta-se, no entanto, que a eficácia dos testes de diatomáceas, podendo levar a confirmação de óbitos por afogamentos, possui estreita relação com a dinâmica de acesso das diatomáceas aos tecidos nessas ocorrências. Conforme um estudo realizado por Zhang *et al.* em 2019, a ocorrência de afogamento leva à entrada de diatomáceas no organismo, podendo alcançar os pulmões e outros órgãos, em processo dependente da ação da membrana denominada alvéolo-capilar. Esta atua como uma separação entre o ar presente nos alvéolos pulmonares e o sangue circulante. Localizada após a parede dos alvéolos pulmonares, esta membrana desempenha um papel crucial na troca gasosa. Assim, as diatomáceas atravessam a barreira alvéolo-capilar, adentrando a corrente sanguínea e colonizando órgãos distantes. Contudo, o estudo também mostra que a membrana alvéolo-capilar exibe seletividade em relação ao tamanho das diatomáceas. A abertura

máxima da membrana varia de 200 a 250 micrômetros e, por conseguinte, diatomáceas com dimensões excessivamente grandes não conseguem transpor essa barreira. Neste sentido, o estudo indicou que diatomáceas maiores são encontradas predominantemente em órgãos fechados, como os pulmões, enquanto diatomáceas menores são mais frequentemente localizadas em órgãos distantes, como o fígado e os rins. Esta diferenciação é atribuída à seletividade da membrana alvéolo-capilar [19].

Neste sentido, o estudo constatou a penetração das diatomáceas através da barreira alvéolo-capilar em mais de 100 casos de afogamento analisados. Além disso, a presença de diatomáceas em órgãos distantes, em situações relacionadas a afogamento, está associada à laceração da parede alveolar. Portanto, a afirmação de que diatomáceas menores conseguem atravessar a barreira alvéolo-capilar e atingir órgãos distantes é de grande utilidade, pois contribui para a confirmação efetiva de casos de afogamento, sendo a identificação de diatomáceas menores em órgãos distantes um indicador concreto desse evento [13]. Nas Tabelas 1, 2 e 3 dispostas abaixo, encontram-se apresentados os dados referentes à ocorrência e tamanhos de diatomáceas em diferentes órgãos, provenientes da pesquisa de Zhao *et al.* [11].

**Tabela 1.** Quantidade de diatomáceas encontradas em 100 casos de afogamento analisados. Fonte: Adaptado de Zhang *et al.*, 2019.

Órgãos	Casos	Mínimo Encontrado	Máximo Encontrado	Média ± Desvio Padrão
Fígado	100	1	225	17,01 ± 31,48
Rim	100	1	107	15,12 ± 20,42
Pulmão	100	19	1675	103688,16 ± 251457,30

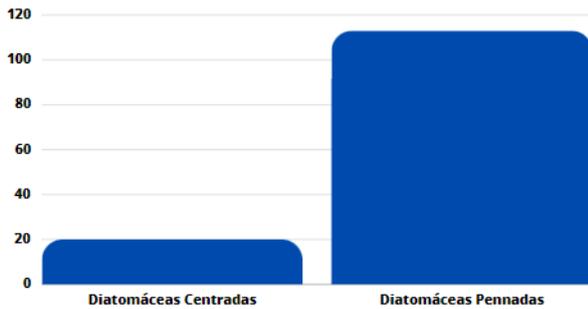
**Tabela 2.** Comprimento (µm) das diatomáceas encontradas nos órgãos analisados. Fonte: Adaptado de Zhang *et al.*, 2019.

Órgãos	Casos	Mínimo Encontrado	Máximo Encontrado	Média ± Desvio Padrão
Fígado	100	2,65	114,95	17,39 ± 10,00
Rim	100	2,25	113,48	16,75 ± 11,26
Pulmão	100	1,98	299,34	19,49 ± 17,21

**Tabela 3.** Largura (µm) das diatomáceas encontradas nos órgãos analisados. Fonte: Adaptado de Zhang *et al.*, 2019.

Órgãos	Casos	Mínimo Encontrado	Máximo Encontrado	Média ± Desvio Padrão
Fígado	100	0,63	47,52	6,06 ± 4,43
Rim	100	1,25	45,16	5,82 ± 4,11
Pulmão	100	0,63	79,53	7,76 ± 5,45

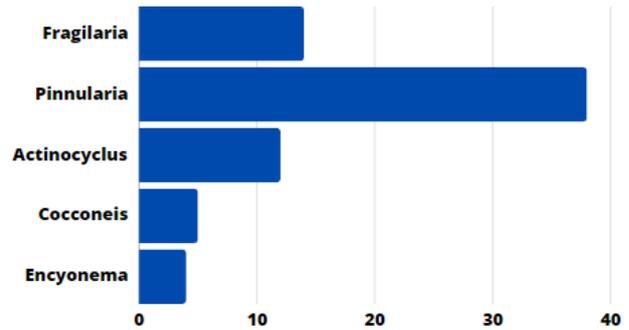
Dentre as publicações selecionadas para discussão neste trabalho, o artigo de Carneiro *et al.* [12], descreve a análise de uma seção do pulmão da vítima, supostamente afogada no lago Guaíba, em Porto Alegre - RS. O objetivo foi verificar a confirmação da morte por afogamento e determinar o local da ocorrência. A confirmação da morte por afogamento foi estabelecida ao detectar 133 diatomáceas no pulmão da vítima, compreendendo 20 diatomáceas de forma central e 113 de forma alongada (Figura 3).



**Figura 3.** Distribuição quantitativa das diatomáceas encontradas no pulmão de vítima de afogamento, de acordo com o formato apresentado. Fonte: adaptado de Carneiro *et al.* [12]

Por sua vez, no estudo desenvolvido por Zhao *et al.* [11], que aborda o método de MD-VF-AUTO MEV para fins de análise da presença de diatomáceas em casos de afogamento, foram examinadas 128 ocorrências. Desses, 115 casos confirmaram afogamento, enquanto os 13 restantes indicaram imersão *post mortem*. Dentre as ocorrências em que houve confirmação de afogamento,

Ainda, a realização do teste de diatomáceas permitiu identificar a presença das espécies de diatomáceas *Fragilaria*, *Pinnularia*, *Actinocyclus*, *Cocconeis* e *Encyonema* nos pulmões da vítima (Figura 4). Essas mesmas espécies foram encontradas no lago da região, reforçando a conclusão de que a causa da morte foi de fato o afogamento e também indicando o local onde a vítima submergiu [12].



**Figura 4.** Distribuição quantitativa das espécies de diatomáceas encontradas no pulmão de vítima de afogamento. Fonte: adaptado de Carneiro *et al.* [12]

111 casos correspondiam a locais onde a presença de diatomáceas era esperada, e outros 4 casos a locais não propícios para a presença de diatomáceas. Na Tabela 4, encontram-se apresentados os dados referentes à ocorrência de diatomáceas nos órgãos de vítimas de afogamento confirmadas, separadas de acordo com o local de afogamento.

**Tabela 4 .** Ocorrências de resultados positivos e negativos em testes de diatomáceas aplicados à órgãos de vítimas de afogamento confirmadas. Fonte: Adaptado de Zhao *et al.*, 2017.

Região	Órgãos	Casos	Positivo	Negativo
<i>Rios e Lagos</i>	Pulmão	111	111	0
	Fígado	111	110	1
	Rim	111	109	2
<i>Locais Exóticos</i>	Pulmão	4	4	0
	Fígado	4	4	0
	Rim	4	4	0
<b>Total</b>	Pulmão, Fígado e Rim	115	115	0

Na **Tabela 5**, encontram-se apresentadas as informações referentes a presença de diatomáceas nos órgãos das vítimas nas 13 situações onde foi confirmada a imersão *post mortem*, bem como na água onde os corpos

foram encontrados. Nestas situações, apesar da vítima ser encontrada dentro de um ambiente com água, concluiu-se que a causa do falecimento difere de afogamento [11].

**Tabela 5.** Ocorrências de diatomáceas em órgãos de vítimas com confirmada imersão *post mortem*, e na água onde os corpos foram encontrados. Fonte: Adaptado de Zhao, *et al.* 2017.

CASOS	CAUSAS DA MORTE	PULMÃO	FÍGADO	RIM	DIATOMÁCEAS NA ÁGUA DO LOCAL DO CORPO
1	Asfixia	15	0	0	56
2	Asfixia	22	0	0	21
3	Asfixia	478	0	0	1385
4	Asfixia	1023	0	0	1537
5	Asfixia	555	0	0	5372
6	Asfixia	231	0	0	184
7	Asfixia	1890	0	0	15763
8	Asfixia	1032	0	0	2872
9	Asfixia	66	0	0	238
10	Asfixia	0	0	0	4
11	Lesão cerebral	0	0	0	66
12	Eletrocutado	17	0	0	1411
13	Eletrocutado	0	0	0	6164

Como pode ser observado em análise aos dados expressos na **Tabela 5**, em todos os casos de imersão *post mortem*, não foram identificadas diatomáceas em órgãos distantes devido à ausência de ruptura da barreira alveolar. Isso reafirma a possibilidade de que a causa da morte possa não ter sido o afogamento, apesar da presença de diatomáceas nos pulmões, representando situação que pode constituir falso-positivos, caso seja avaliado somente este órgão. Além disso, as diatomáceas encontradas nos pulmões das vítimas apresentaram concentrações significativamente menores do que as normalmente encontradas na água na maioria dos casos [11].

Em um outro estudo, desenvolvido por Rácz *et al.* [10], abordando o método de PCR para auxiliar e comparar com o teste de diatomáceas utilizando a extração ácida, foram analisados 4 casos de afogamento. Foi analisada também a água dos locais onde as vítimas foram encontradas, com o intuito de comparar as quantidades e espécies de diatomáceas presentes com aquelas encontradas nos órgãos, visando confirmar o local de afogamento. Os dados referentes a esse estudo encontram-se apresentados na **Tabela 6**.

Nesse estudo, dadas as circunstâncias de utilização de um órgão que não era o pulmão e considerando as mortes ocorridas em locais pouco propícios para a presença de diatomáceas, onde a quantidade delas na água era baixa, a abordagem convencional de extração ácida teria sido uma opção inadequada, segundo os autores. Isso é particularmente verdadeiro quando se trata de utilizar um órgão que não seja o pulmão. Possivelmente, se o pulmão fosse escolhido como órgão de análise, ainda que nos locais desfavoráveis, o método convencional por extração ácida poderia ter indicado resultado positivo para diatomáceas. Contudo, como essa não foi a abordagem adotada, o teste de PCR demonstrou ser mais apropriado nessas circunstâncias [10].

Contudo, conforme já relatado, nesse mesmo artigo foi realizada também a análise do teste de diatomáceas em 33 casos de afogamento ocorridos em rios e lagos – locais considerado propícios ao desenvolvimento de diatomáceas. Notavelmente, o método convencional de teste desenvolvido por meio de extração ácida, demonstrou consonância com os resultados obtidos através do teste de PCR, dadas as situações regulares.

O artigo desenvolvido por Magrey e Raj [14], também selecionado para este estudo, descreve a análise das diatomáceas em ossos, como o fêmur e o esterno, além do pulmão. O estudo avaliou 31 casos de afogamento, dos quais 22 resultaram negativos e os restantes 9 foram

positivos. Esse estudo forneceu informações detalhadas sobre 11 dos casos, com a coleta de água dos locais onde os corpos foram encontrados para comparar as diatomáceas presentes na água com as encontradas nos corpos, a fim de confirmar a localização do afogamento.

**Tabela 6.** Resultado dos testes de diatomáceas conduzidos em amostras de baço de 4 vítimas de afogamento, utilizando dois métodos diferentes. Fonte: Adaptado de Rácz *et al.* [10].

<i>Casos</i>	<i>Órgãos</i>	<i>PCR</i>	<i>Extração Ácida</i>
1	Baço	Negativo	Negativo
2	Baço	Positivo	Negativo
3	Baço	Positivo	Negativo
4	Baço	Positivo	Negativo

Em relação aos locais, em 7 dos 9 casos em que se obteve resultado positivo no teste de diatomáceas, confirmou-se que o afogamento ocorreu no mesmo local em que os corpos foram encontrados, enquanto nos outros 2 casos, os estudos revelaram que os afogamentos aconteceram em locais diferentes da descoberta do corpo.

Determinar o local do afogamento envolve conhecimento sobre as espécies de diatomáceas específicas de cada região de um rio ou corpo d'água e, neste caso, os autores do artigo concentrou-se principalmente nas amostras ósseas dos 9 casos, em vez das amostras pulmonares, possivelmente partindo do pressuposto de que a presença de diatomáceas em locais/órgãos mais distantes, indica afogamento. Em geral, o método de análise de diatomáceas por extração ácida demonstrou ser altamente eficaz para exames envolvendo ossos [14].

No artigo publicado por Zalat *et al.* [15], a abordagem foi distinta. O foco principal foi analisar 10 casos de possíveis afogamentos, com ênfase na determinação exata do local onde ocorreu cada afogamento. O local de ocorrência foi descrito como rio Nilo, na região delta do Egito. Para atingir esse objetivo, o estudo explorou três canais que adentram o delta do rio Nilo. Dois desses canais foram descritos como afluentes de outro canal principal. A água foi coletada de três locais distintos nos canais, Mit-Yazid e Tanbara Haweis. As espécies de diatomáceas presentes nesses canais foram então marcadas e revelaram diferenças entre as várias partes dos canais, confirmando a viabilidade da análise de localização. Dos 10 casos examinados, apenas 7 foram confirmados como afogamentos por meio do teste de diatomáceas. Os outros 3 casos foram relacionados a diferentes tipos de crimes, alheios a situações de afogamento.

Em relação aos locais onde ocorreram os afogamentos, em 5 casos dentre os 7 confirmados, verificou-se que o corpo

da vítima foi deslocado, provavelmente pela correnteza, para locais mais distantes. Isso foi confirmado pela análise das diatomáceas presentes tanto no local quanto na vítima. Nos outros 2 casos, de acordo com o resultado dos testes de diatomáceas aplicados, a localização onde a vítima foi encontrada correspondia ao local real do afogamento. Isso pode indicar que o corpo foi descoberto mais rapidamente ou que estava retido em algum ponto específico [15].

Em um estudo mais recente, desenvolvido por Levkov, *et al.* [16], realizou-se uma revisão meticulosamente estruturada sobre o teste de diatomáceas. Nesse estudo, a ênfase recai sobre a abordagem experimental, na qual uma análise minuciosa de 10 casos de suposto afogamento foi conduzida. Durante essa investigação, diversos órgãos, como pulmão, fígado, rim, coração e cérebro, foram examinados. Dos 10 casos analisados, apenas o caso 8 não foi classificado como afogamento, visto que nenhuma diatomácea foi identificada nos pulmões e no coração. Em contrapartida, nos demais 9 casos, diatomáceas foram detectadas em, no mínimo, dois órgãos, predominantemente no pulmão e em outro órgão distante.

De forma geral, a análise realizada demonstrou resultados satisfatórios. Apesar de algumas críticas que colocam em dúvida a eficácia do teste de diatomáceas devido a falsos positivos, é notável que a maioria dessas objeções se baseia em trabalhos e argumentos passados. Por exemplo, a pesquisa conduzida por Pollanen em 1998 [17], que avaliou 738 casos, revelou uma taxa de assertividade do teste de diatomáceas em apenas 205 casos, correspondendo a aproximadamente 28%. Da mesma forma, Auer e Mottonen, também em 1998 [18], não conseguiram encontrar diatomáceas em uma grande proporção dos casos investigados [16].

Nesse contexto, a evolução científica e o contínuo progresso da compreensão humana não podem ser negligenciados. É plausível que esses resultados anteriores estejam enviesados devido a questões de contaminação e limitações científicas que podem ter sido mais prevalentes naquela época. No âmbito deste estudo em particular, foram examinados 7 artigos que abordaram 317 casos de afogamento. Desses, 313 casos foram identificados de maneira adequada, enquanto apenas 4 apresentaram resultados incorretos, culminando em uma taxa de acerto de aproximadamente 99%. Vale destacar que os casos em que o teste de diatomáceas falhou se referiram a cenários em que o local de óbito era caracterizado por uma baixa presença de diatomáceas, trazendo limitações à eficiência dos testes aplicados.

O método de extração ácida emergiu como o mais eficaz dentro do contexto global, embora outras abordagens, como a técnica de PCR, tenham se mostrado eficazes nos quatro casos em que o teste de diatomáceas por extração ácida não foi bem-sucedido. Além disso, é fundamental enfatizar a importância da minuciosa análise e cautela para evitar perdas de diatomáceas durante o processo de desenvolvimento dos métodos, especialmente de MD-VF-Auto MEV.

É também relevante ressaltar que a presença de diatomáceas nos pulmões e em órgãos distantes confirma a ocorrência de afogamento, validando assim a ruptura da barreira alvéolo-capilar como um indicador em potencial.

Ainda, destaca-se que nos casos em que as diatomáceas foram utilizadas para determinar o local do afogamento, descritos neste estudo, sua relevância foi integral, resultando em um índice de sucesso de 100%.

#### 4. CONCLUSÃO

O teste de diatomáceas envolve a detecção destes micro-organismos, encontrados em ambientes aquáticos, nos tecidos de vítimas de afogamento. Assim, no presente estudo investigou-se aplicações do teste de diatomáceas como método para determinar a ocorrência de afogamento em casos forenses, bem como inferir sobre a identificação de possíveis locais de afogamento, através de uma relação entre o perfil de diatomáceas encontrado no corpo e aquelas presentes no ambiente aquático envolvido. O estudo descreve desafios relacionados à escolha do método de extração e teste a ser aplicado, e à possibilidade de contaminação durante a análise. A contaminação consiste em uma preocupação central que leva à relutância de alguns profissionais em adotar testes de diatomáceas.

De acordo com dados da literatura, foram discutidos e comparados três métodos: Extração ácida, Microscopia

Eletrônica de Varredura Automatizada - Digestão por Micro-ondas - Filtração a Vácuo (MD-VF-Auto MEV) e Reação em cadeia da polimerase (PCR). A extração ácida se destacou pela sua simplicidade, eficácia e baixo custo, com uma taxa de uso de 72% entre as publicações científicas selecionadas para discussão. O método MD-VF-Auto MEV, embora inovador e automatizado, apresenta custos mais elevados. A PCR foi eficaz em casos específicos, superando inclusive a extração ácida em locais com baixa presença de diatomáceas.

A presença de diatomáceas nos pulmões e órgãos distantes foi associada à confirmação de afogamento e à ruptura da barreira alvéolo-capilar. Observou-se, a partir dos estudos discutidos, que diatomáceas menores têm maior probabilidade de atravessar a barreira alvéolo-capilar e serem encontradas em órgãos distantes, enquanto diatomáceas maiores tendem a ser retidas nos pulmões. Estas considerações reafirmam a presença de diatomáceas, como indicativos de ocorrência de afogamentos.

Dentre as publicações científicas sobre o tema trazidas à discussão, verificou-se taxas de acerto próximas a 100%, quanto a eficácia do teste de diatomáceas em situações regulares de afogamento. Em casos de imersão *post mortem* ou afogamento em locais com poucas diatomáceas, a eficácia variou, em virtude das limitações inerentes.

O estudo ressalta a importância da escolha cuidadosa do método de extração e teste de diatomáceas, da prevenção da contaminação e da consideração das circunstâncias do afogamento para uma análise adequada. Embora o teste de diatomáceas tenha sido alvo de questionamentos e críticas, o estudo sugere que, com as devidas precauções, ele pode ser uma ferramenta valiosa na confirmação de afogamentos. Em geral, o artigo destaca a relevância do método de teste de diatomáceas como uma abordagem eficaz e confiável na análise forense de casos de afogamento.

#### AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas pela formação e desenvolvimento desse trabalho.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Piette MH, De Letter E. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis. *Forensic Sci Int.* **163(1-2)**:1-9. (2006).
- [2] Revenstorff V. Der nachweis der aspirierten Etrankungs flussigkeit als Kriterium des Todes durch Etrinken, Vereteljahresschs. *Gerichtl Med.* **28**: 274-279 (1904).
- [3] Lunetta P, Penttila A, Hallfors G. Scanning and transmission electron microscopical evidence of the

- capacity of diatoms to penetrate the alveolo-capillary barrier in drowning. *Int J Legal Med.* **111**: 229–237 (1998).
- [4] Bajanowski T, Brinkmann B, Stefanec AM et al Detection and analysis of tracers in experimental drowning. *Int J Legal Med.* **111**:57–61 (1998).
- [5] Thakar, M. K., Luthra, D., Khattar, J. S. Forensic studies of phytoplankton ecology of two water bodies of Kurukshetra area of Haryana, State in India. *Egy. J. Forensic Sci.* **8(1)**: 1-15 (2018).
- [6] Smol, J.P, Stoermer, E.F. The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences. *Cambridge University Press, Cambridge.* **2<sup>nd</sup> ed** (1999).
- [7] Verma, K. Role of diatoms in the world of forensic science. *J. Forensic Res.* **4(2)**: 1-5 (2013).
- [8] Pollanen MS. The diagnostic value of the diatom test for drowning, II. Validity: analysis of diatoms in bone marrow and drowning medium. *J Forensic Sci.* **42**: 286-290 (1997).
- [9] Ludes, B., Quantin, S., Coste, M., Mangin, P. Application of a simple enzymatic digestion method for diatom detection in the diagnosis of drowning in putrified corpses by diatom analysis. *Int. J. Leg. Med.* **107**: 37-41 (1994).
- [10] Rácz, E., Könczöl, F., Tóth, D., Patonai, Z., Porpáczy, Z., Kozma, Z., Sipos, K. PCR-based identification of drowning: four case reports. *International Journal of Legal Medicine.* **130(5)**: 1303–1307 (2016).
- [11] Zhao, J., Liu, C., Bardeesi, A. S. A., Wu, Y., Ma, Y., Hu, S., Cheng, J. The Diagnostic Value of Quantitative Assessment of Diatom Test for Drowning: An Analysis of 128 Water-related Death Cases using Microwave Digestion-Vacuum Filtration-Automated Scanning Electron Microscopy. *Journal of Forensic Sciences.* **62(6)**: 1638–1642 (2017).
- [12] Carneiro, N.P.M., Torgan, L.C., Vaz, M. and Utz, L.P. Diatoms in lung tissue: first investigation in Brazil in proving death by drowning. *Rev. Bras.Crim.* **6**:13–16 (2017).
- [13] Saukko, P., Knight, B. *Knight's Forensic Pathology, third ed.*, Arnold, London, 395-411 (2004).
- [14] Magrey, A.H., Raj, M. Role of diatoms in forensic diagnosis of drowning cases from Jammu & Kashmir, India. *Biosci. Biotech. Res. Comm.* **7(1)**: 72-77 (2014)
- [15] Zalat, A.A, El-Sheekh, M.M, El-Shenody A.R, El-Hashash, M.S. Role of Diatom Flora in the Forensic Diagnosis of Drowning Cases from some Water Bodies in the Delta Region. *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries.* **27(3)**: 421-442 (2023).
- [16] Levkov, Z., Williams, D. M., Nikolovska, D., Tofilovska, S., Cakar, Z. The use of diatoms in forensic science: advantages and limitations of the diatom test in cases of drowning. *The Geological Society of London.* **7**: 261-277 (2017).
- [17] Pollanen. M. S. Diatoms and homicide. *Forensic Science International.* **91**: 29-34 (1998).
- [18] Auer, A., Möttönen, M. Diatoms and drowning. *Z Rechtsmed.* **101**: 87–98 (1998).
- [19] Zhang, P., Kang, X., Zhang, S. et al. The length and width of diatoms in drowning cases as the evidence of diatoms penetrating the alveoli-capillary barrier. *Int J Legal Med.* **134**: 1037–1042 (2019).

