



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

CURSO DE FARMÁCIA

ELAINE LIMA GOMES

**IDENTIFICAÇÃO DE PRAGUICIDAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS COM
APLICAÇÃO FORENSE: UMA REVISÃO NARRATIVA**

FORTALEZA

2022

ELAINE LIMA GOMES

**IDENTIFICAÇÃO DE PRAGUICIDAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS COM
APLICAÇÃO FORENSE: UMA REVISÃO NARRATIVA**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Ramon Róseo Paula Pessoa
Bezerra de Menezes

FORTALEZA - CE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G613i Gomes, Elaine Lima.

Identificação de Praguicidas em Amostras Biológicas com Aplicação Forense: Uma Revisão Narrativa : Uma Revisão Narrativa / Elaine Lima Gomes. – 2022.
84 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Enfermagem, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.

1. Cromatografia. 2. Inibidores da colinesterase. 3. Rodenticidas. 4. Toxicologia Forense.
I. Título.

CDD 610.73

ELAINE LIMA GOMES

**IDENTIFICAÇÃO DE PRAGUICIDAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS COM
APLICAÇÃO FORENSE: UMA REVISÃO NARRATIVA**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em 24/12/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Janete Eliza Soares de Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ma. Mayane Emanuela Melo Lopes Martins
Perícia Forense do Estado do Ceará (PEFOCE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Maria do Carmo e ao meu irmão Erivânio Gomes por terem segurado as pontas durante todo o período da minha graduação, a realização plena desse curso não seria possível sem vocês.

À Silvia Valentim, Lúcio Correia, Lúcio Correia Filho e Eli Albano por terem sido uma família valiosa e um suporte essencial durante todos esses anos.

Aos meus amigos Carina, Pablo, Eliziane, Anderson e Ellen por serem meus maiores companheiros na UFC. Obrigada por tornarem a caminhada mais leve e por terem me segurado tantas vezes, quando eu quis desistir.

Aos meus amigos Artur e Bianca por caminharem comigo no início da vida acadêmica e por compartilharmos tanta coisa boa ao longo desses anos. A Trindade resiste!

Ao Felipe Bomfim, por ter me acalmado e auxiliado na reta final do curso. Sua atenção e carinho me ajudaram a concluir um trabalho árduo.

Ao meu orientador Prof. Ramon por ter me fisgado para o mundo das Análises Toxicológicas e ter auxiliado a proporcionar uma das maiores experiências da graduação: o estágio na Perícia Forense do Estado do Ceará. Obrigada por ter me acolhido e por ter corrido comigo ao longo do caminho.

Ao Centro de Informação e Assistência Toxicológica do Instituto Dr. José Frota por ter me feito florescer com o conhecimento e atuação na toxicologia clínica. Foi meu primeiro contato com a toxicologia e, depois disso, meu apreço pela área só aumenta exponencialmente.

Ao professor Raimundo Nonato Carlos dos Santos (*in memoriam*) por ter sido um defensor nato do ensino público e por ter alimentado ainda mais meu sonho de estudar na UFC. Sua simplicidade e alegria jamais serão esquecidas por aqueles que tiveram a honra de desfrutar da sua presença.

À banca examinadora, por prontamente aceitar o convite para avaliar o meu trabalho.

Por fim, agradeço à Universidade Federal do Ceará por ser minha residência honorária ao longo desses anos, por proporcionar um ensino de qualidade e por fornecer subsídios para a minha permanência na instituição. Mesmo com todos os cortes orçamentários, a universidade pública resiste e resistirá!

RESUMO

Praguicidas são compostos químicos relevantes em intoxicações, sejam elas de cunho ocupacional, acidental ou intencional. As principais classes envolvidas são os e inseticidas (organoclorados, organofosforados (IOFs), carbamatos, piretróides) e herbicidas. As intoxicações por raticidas ocorrem principalmente por ingestão acidental e em tentativas de autoextermínio. No contexto forense, as análises de praguicidas podem ser realizadas em amostras de sangue, urina, conteúdo gástrico, vísceras, dentre outras. Por serem amostras com matrizes complexas, devem passar por processamento para extrair o analito e diminuir a interferência dos componentes da matriz. As técnicas cromatográficas são o “padrão-ouro” na análise de praguicidas, pois permitem identificar e/ou quantificar analitos de diversas classes simultaneamente. O objetivo deste trabalho foi verificar na literatura as metodologias cromatográficas aplicadas nas análises toxicológicas de IOFs, carbamatos e rodenticidas no contexto forense, bem como identificar os tipos de amostras biológicas e os processamentos mais utilizados. A pesquisa foi realizada nas bases de dados *Embase*, *Pubmed* e LILACS utilizando-se Descritores em Ciências da Saúde, sendo selecionados 26 artigos. Observou-se que as amostras biológicas utilizadas nos estudos foram sangue, urina, vísceras (fígado, estômago, baço, pulmão, rim) humor vítreo e conteúdo gástrico. Para extração dos analitos de interesse, foram utilizadas extração líquido-líquido, extração sólido-líquido e imunoenaios, além do método QuEChERS tradicional e uma versão modificada. A técnica de análise cromatográfica mais utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas *tandem* (CLAE-MS/MS). Os analitos de interesse nos estudos foram os próprios praguicidas, seus metabólitos e biomarcadores, como adutos de IOFs-butirilcolinesterase (BChE) e de IOFs-albumina. A utilização de diversas metodologias é importante para otimizar o processo e oferecer resultados confiáveis, considerando-se que envolvem procedimentos no âmbito penal.

Palavras-chave: cromatografia; inibidores da colinesterase; rodenticidas; toxicologia forense.

ABSTRACT

Pesticides are relevant chemical compounds in poisoning, whether occupational, accidental or intentional. The main classes involved are organochlorines, organophosphates (IOFs), carbamates, pyrethroids and herbicides. Poisonings by rodenticides occur mainly by accidental ingestion and in attempts at self-extermination. In the forensic context, pesticide analyses can be performed on samples of blood, urine, gastric contents, viscera, among others. As these are samples with complex matrices, they must undergo processing to extract the analyte and reduce interference from matrix components. Chromatographic techniques are the "gold standard" in pesticide analysis because they allow the identification and/or quantification of analytes from several classes simultaneously. The objective of this work was to verify in the literature the chromatographic methodologies applied in the toxicological analysis of IOFs, carbamates and rodenticides in the forensic context, as well as to identify the types of biological samples and the most used processing methods. The search was conducted in Embase, Pubmed and LILACS databases using Health Sciences Descriptors, and 26 articles were selected. It was observed that the biological samples used in the studies were blood, urine, viscera (liver, stomach, spleen, lung, kidney), vitreous humor and gastric content. Liquid-liquid extraction, solid-liquid extraction, and immunoassays were used to extract the analytes of interest, as well as the traditional QuEChERS method and a modified version. The most commonly used chromatographic analysis technique was high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The analytes of interest in the studies were the pesticides themselves, their metabolites and biomarkers, such as IOFs-butyrylcholinesterase (BChE) and IOFs-albumin adducts. The use of several methodologies is important to optimize the process and provide reliable results, considering that they involve procedures in the criminal field.

Keywords: chromatography; cholinesterase inhibitors; rodenticides; forensic toxicology

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Anticorpo
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AG	Antígeno
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATS	Análise Toxicológica Sistemática
BChE	Butirilcolinesterase
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIATs	Centros de Informações e Assistência Toxicológica
CIATox	Centro de Informação e Assistência Toxicológica
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
DATATOX	Sistema Brasileiro de Registro de Intoxicações dos Centros de Informação e Assistência Toxicológica
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GM/MS	Gabinete do Ministro/Ministério da Saúde
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPTLC	<i>High-Performance Thin-Layer Chromatography</i>
IMS	Imunoseparação cromatográfica
IOFs	Organofosforados
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
UFLC	<i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i>
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 A Perícia no Código de Processo Penal	13
3.2 Investigação Forense e Perícia Criminal	14
3.2.1 <i>Cadeia de Custódia</i>	15
3.2.2 <i>Amostras Utilizadas no Exame Toxicológico Pericial</i>	17
3.2.3 <i>Processamento de Amostras Biológicas e Procedimentos Analíticos</i>	20
3.2.3.1 <i>Processamento de amostras</i>	21
3.2.3.2 <i>Testes de triagem</i>	25
3.2.3.3 <i>Testes confirmatórios</i>	28
3.3 Praguicidas	31
3.3.1 <i>Classificação dos praguicidas</i>	34
3.3.2 <i>Epidemiologia das intoxicações com praguicidas no Brasil</i>	35
3.3.3 <i>Carbamatos e Organofosforados</i>	36
3.3.4 <i>Rodenticidas/Raticidas</i>	40
3.3.5 <i>Legislação acerca dos praguicidas no Brasil</i>	44
4 METODOLOGIA	46
4.1 Tipo de estudo	46
4.2 Etapas da pesquisa	46
5 RESULTADOS	48
6 DISCUSSÃO	57
6.1 Amostras biológicas	57
6.1.1 <i>Sangue e urina</i>	57

6.1.2 Medula óssea	58
6.1.3 Vísceras e conteúdo gástrico	58
6.2 Processamento de amostras	59
6.2.1 Método QuEChERS	59
6.2.2 Imunoprecipitação e Separação Imunomagnética	62
6.3 Análises Cromatográficas	64
6.3.1 HPTLC	64
6.3.2 HPLC, GC/MS e variações	66
7 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

A intoxicação se caracteriza pelo aparecimento de efeitos tóxicos no organismo do indivíduo após exposição a substâncias químicas exógenas e endógenas, podendo ser identificada também pela realização de exames laboratoriais (OGA; SIQUEIRA, 2008). As intoxicações exógenas possuem grande contribuição para as taxas de morbidade e mortalidade no Brasil e a notificação de casos de intoxicações exógenas é compulsória desde 2011, após publicação da Portaria GM/MS nº 104 de 25 de janeiro de 2011 (HERNANDEZ; RODRIGUES; TORRES, 2017c).

Os praguicidas, dentre eles os agrotóxicos, são produtos químicos utilizados no combate às pragas (ácaros, carrapatos, ervas-daninhas, ratos, insetos, dentre outros). Com a necessidade de proteger os exércitos durante a Segunda Guerra Mundial, foram pesquisados e desenvolvidos praguicidas sintéticos com maior potência que a de praguicidas naturais, que eram utilizados amplamente antes deste período. Todos os praguicidas sintéticos possuem potencial de causar danos ao meio ambiente e aos seres humanos, pois podem afetar organismos que não são alvos da ação tóxica, além da possibilidade de persistência da substância no ambiente e acúmulo no tecido adiposo humano, trazendo prejuízos a longo prazo. As vias de exposição a esses compostos são diversas: oral, dérmica, inalatória, ocular e respiratória (LANARO *et al.*, 2018; PARANÁ, 2021).

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo. Em levantamento realizado em 2013, verificou-se que o país investiu US\$ 10 bilhões em praguicidas, ocupando o primeiro lugar em relação a valores absolutos (GRIGORI, 2019). Dessa forma, a exposição a esses agentes tóxicos é frequente e, conseqüentemente, são substâncias relevantes no âmbito das intoxicações exógenas, sejam elas ocupacionais, acidentais ou intencionais (PARANÁ, 2021).

No contexto da toxicologia forense, os praguicidas figuram principalmente nas análises de casos de intoxicações intencionais (tentativa de homicídio e homicídio, autoextermínio e abortamento). Os inseticidas são os maiores causadores de óbito e são muito utilizados nas tentativas de autoextermínio. Os inseticidas sintéticos dividem-se em organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (OENNING, 2018).

As análises em material biológico podem ocorrer em diferentes tipos de amostra: sangue, urina, cabelo, conteúdo gástrico, vísceras, humor vítreo, dentre outras. Por serem matrizes com diversos componentes, é necessário realizar procedimentos para extrair o analito de interesse de acordo com suas características físico-químicas, além de garantir que não haja interferência de outros agentes e componentes da matriz na análise (LISBOA, 2016). O método de análise mais utilizado na detecção de praguicidas é a cromatografia acoplada à espectrometria de massas, pois pode fornecer resultados quali-quantitativos, além da possibilidade de análise das substâncias químicas e de seus metabólitos (SANTOS NETO; SIQUEIRA, 2005).

As análises em material biológico possuem maior dificuldade de execução pela complexidade dos componentes da matriz biológica, podendo causar interferência nos resultados obtidos. Dessa forma, são necessários o desenvolvimento e a aplicação de diversos métodos de processamento para retirar os interferentes e utilização de equipamentos com alta sensibilidade e especificidade para a obtenção de resultados condizentes com a realidade, tendo em vista que as análises forenses envolvem processos no âmbito penal e podem auxiliar na condenação ou absolvição de um indivíduo, devendo ser garantidos resultados extremamente confiáveis.

O objetivo deste trabalho foi descrever a aplicação de métodos cromatográficos na análise toxicológica de materiais biológicos para detecção de praguicidas das classes dos inseticidas (carbamatos e organofosforados) e dos rodenticidas, bem como identificar as técnicas de processamento das amostras biológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever informações sobre os métodos analíticos cromatográficos empregados no processo de análises toxicológicas forenses dos praguicidas das classes dos inseticidas (carbamatos e organofosforados) e dos rodenticidas, bem como o preparo e processamento das amostras.

2.2 Objetivos específicos

- a) Identificar, na literatura, as amostras biológicas utilizadas na análise toxicológica de carbamatos, organofosforados e rodenticidas;
- b) Identificar os diferentes métodos de processamento das amostras nos trabalhos selecionados;
- c) Identificar os métodos de análise cromatográfica empregados na detecção dos praguicidas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A Perícia no Código de Processo Penal

O exame de corpo de delito e perícias de outra natureza estão descritos no Capítulo II do Código de Processo Penal Brasileiro de 3 de outubro de 1941), artigos 158 a 184. Corpo de delito se refere aos elementos materiais (vestígios) e alterações no ambiente resultantes da infração penal, como em um caso de lesão corporal. O corpo técnico pericial deve definir a natureza do vestígio e estabelecer a relação do mesmo com a ação ou omissão do indivíduo acusado (HERCULES, 2011). Para França (2011), corpo de delito é o somatório das alterações e elementos causadores do prejuízo que possam contribuir para a comprovação da infração penal, no caso de crimes contra a vida e a saúde do ser humano. Consiste em elementos físicos e todos os outros que possuam alguma relação com o delito. Segundo a Lei 11.690, de 9 de junho de 2008, as perícias, no geral, devem ser realizadas por um perito oficial e, no caso de não o haver, os exames devem ser realizados por dois indivíduos idôneos, que possuam diploma de curso superior e que, preferencialmente, sejam habilitados em área similar à do exame. No local do crime, a autoridade deverá preservar o ambiente de modo a evitar a alteração do estado das coisas até que os peritos cheguem. No caso de alteração do ambiente, os peritos devem relatar as mudanças e discutir as consequências dessas alterações no laudo pericial (BRASIL, 1941).

O exame de corpo de delito (direto ou indireto) poderá ser realizado em qualquer dia e a qualquer hora e é indispensável quando a infração deixar algum vestígio e, mesmo com a confissão do acusado, a realização da perícia é imprescindível. No caso de desaparecimento dos vestígios, impossibilitando a realização do exame, a prova testemunhal pode substituí-lo (BRASIL, 1941). Corpo de delito e corpo da vítima são peças distintas. O corpo de delito corresponde aos elementos que são percebidos pelos sentidos, como a visão e o olfato, enquanto o corpo da vítima é um dos elementos que compõem o corpo de delito e peça de exame para a busca de vestígios relacionados à infração penal (FRANÇA, 2011).

Quando as perícias forem realizadas em laboratório, deve-se guardar amostras suficientes para uma nova análise pericial, sendo possível anexar fotografias, microfotografias, desenhos ou esquemas no laudo (BRASIL, 1941).

A elaboração do laudo pericial é de responsabilidade dos peritos e deve ser feita no prazo máximo de dez dias, com possibilidade de prorrogação do prazo por requerimento dos peritos e em situações extraordinárias. O documento deve ter descrição detalhada dos materiais analisados e dos procedimentos realizados, além de responder os quesitos elaborados (BRASIL, 1941). Os quesitos são perguntas técnico-científicas que o perito deverá responder em seu laudo. Esses questionamentos podem ser elaborados pela autoridade policial, pelos juízes e pelas partes envolvidas até o ato da diligência (BRASIL, 1941; MARTINS *et al.*, 2020).

No caso de perícia em cadáver, o corpo sempre deve ser fotografado na posição encontrada e as lesões externas presentes, se possível, podem ser anexadas ao laudo na forma de fotografias, esquemas ou desenhos, com a rubrica do responsável. Fotografias dos vestígios encontrados no local do crime também podem ser anexadas ao laudo pericial (BRASIL, 1941).

A autópsia deve ser feita, no mínimo, seis horas após o óbito. Entretanto, se existirem evidências da morte identificadas pelos peritos, o exame do cadáver pode ser realizado antes do tempo estipulado. Quando houver morte violenta, em que há a possibilidade de identificar a causa do óbito pelos danos externos ou se não houver uma infração para averiguar, apenas o exame cadavérico externo é suficiente (BRASIL, 1941).

Quando existir lesão corporal envolvida no delito, o Código Processual Penal define a possibilidade de realização de exame pericial complementar:

Em caso de lesões corporais, se o primeiro exame pericial for incompleto, proceder-se-á a exame complementar por determinação da autoridade policial ou judiciária, de ofício, ou a requerimento do Ministério Público, do ofendido ou do acusado, ou de seu defensor (BRASIL, 1941).

Quando o exame pericial complementar for realizado, os peritos devem portar o auto de corpo de delito, para acrescentar-lhe o que for pertinente ou corrigi-lo. No caso de não realização do exame complementar, a prova testemunhal pode substituí-la (BRASIL, 1941).

3.2 Investigação Forense e Perícia Criminal

O perito criminal tem como atribuição averiguar o fato, as motivações e as consequências da infração penal. Dessa forma, o profissional não tem como função

defender ou acusar indivíduos, mas utilizar o conhecimento técnico-científico para respaldar suas impressões e conclusões de forma imparcial (HERCULES, 2011).

De acordo com a Associação Brasileira de Peritos em Criminalística (2021), os vestígios são qualquer material, marca ou sinal deixado no local do crime, como pegadas e DNA. O indício corresponde à circunstância conhecida e provada que, ao possuir relação com o fato, induz uma conclusão de que existem outras circunstâncias. A evidência é o vestígio que se mostra diretamente ligado ao caso após a análise pericial.

O laudo pericial é o documento oficial redigido após o término da perícia e apresenta os métodos utilizados, os resultados e as interpretações do perito de forma minuciosa e detalhada, além das respostas aos quesitos. Os quesitos são questionamentos que possuem relevância para o esclarecimento do fato que originou o processo penal e devem ser elaborados de acordo com o caso e com o material a ser analisado, de forma a otimizar a prática pericial e evitar o desperdício de recursos. As respostas aos quesitos devem ser objetivas e compreensíveis e, se existir dúvida por parte do perito, deve-se informar que não existem dados suficientes para elucidar o fato, de forma a não induzir ou causar erro de interpretação pela autoridade. O documento deve ser assinado pelo perito e a data de realização do exame pericial pode estar presente no preâmbulo (introdução com informações sobre a autoridade que solicitou o exame pericial, os peritos designados, a natureza do examinando, local, data e hora onde será realizada a perícia, tipo de exame), na descrição ou antes da assinatura (HERCULES, 2011; YOSHITAKE *et al.*, 2006).

3.2.1 Cadeia de Custódia

A cadeia de custódia refere-se à cronologia do vestígio, ou seja, todo o trajeto percorrido pela amostra ao ser encontrada até o momento de seu descarte adequado. É uma estratégia que possibilita a rastreabilidade e a preservação adequada do vestígio, garantindo que não foi violado, perdido ou falsificado (TRUNCKLE; OKAMOTO, 2022). É um conceito que também se refere aos documentos que permitem que a amostra possa ser rastreada a qualquer momento, já que podem ser utilizadas em juízo para condenar ou inocentar indivíduos acusados de alguma infração penal. O procedimento adequado de documentação da cadeia de custódia evita que questionamentos e alegações posteriores possam afetar e

prejudicar os fundamentos e a argumentação da defesa e da acusação (BONACCORSO; DIAS, 2018).

A cadeia de custódia possui duas fases de execução: a fase externa, que compreende o momento de preservação do local de crime até a chegada do vestígio ao órgão que irá realizar o exame pericial, e a fase interna, que corresponde aos procedimentos de entrada do vestígio no órgão pericial até a devolução à autoridade requisitante, acompanhado de laudo (TRUNCKLE; OKAMOTO, 2022). O Quadro 1 expressa os procedimentos realizados na fase externa e na fase interna da cadeia de custódia.

Quadro 1 - Procedimentos realizados na fase interna e na fase externa da cadeia de custódia

Fase externa	Fase interna
Preservação do local de crime	Recepção e conferência do vestígio
Busca do vestígio	Classificação, guarda e/ou distribuição do vestígio
Reconhecimento do vestígio	Análise pericial propriamente dita
Fixação do vestígio	Guarda e devolução do vestígio de prova
Coleta do vestígio	Guarda de vestígios para contraprova
Acondicionamento do vestígio	Registro da cadeia de custódia

Fonte: Adaptado de TRUNCKLE e OKAMOTO (2022).

Após a análise laboratorial, se possível, deve-se guardar uma parte do material remanescente que foi analisado, no caso de ser solicitado um novo exame pericial. Esse material é denominado contraperícia e não é sinônimo de contraprova. A contraperícia refere-se a um novo exame pericial realizado em amostra restante da análise anterior, enquanto a contraprova refere-se a uma parte do material que foi reservada em local protegido e preservado, que fora separado de outra parte que já foi analisada e que deu origem à prova questionada (BONACCORSO; DIAS, 2018).

Se a cadeia de custódia não for realizada e documentada da forma adequada, a rastreabilidade da prova é perdida e a credibilidade da análise é totalmente prejudicada, pois não é possível determinar com clareza os atores envolvidos no processo, dando margem a questionamentos de seleção unilateral de

provas, quais análises foram realmente realizadas e se houve adulteração dos vestígios (EDINGER, 2016).

3.2.2 Amostras Utilizadas no Exame Toxicológico Pericial

A escolha da amostra e o processamento adequado são essenciais para a obtenção de resultados adequados na análise. Em relação às análises toxicológicas forenses, o exame pericial pode ser realizado em material biológico e não biológico. A análise de material não biológico se refere aos materiais encontrados no local do crime que não sejam provenientes do ser humano e que possam auxiliar na investigação, como alimentos, água, frascos e embalagens de medicamentos ou de pesticidas. Podem ser analisadas maconha, cocaína, ecstasy, que são encontradas na forma de planta seca, pó, na forma pétreo ou de comprimidos (CHASIN, 2014).

As amostras biológicas podem ser classificadas como convencionais (urina e sangue) ou não convencionais (saliva, suor, cabelo, unha, humor vítreo, fígado e conteúdo estomacal) (COSTA, 2014). O Quadro 2 apresenta as principais amostras biológicas utilizadas nas análises toxicológicas forenses.

Quadro 2 - Amostras biológicas utilizadas nas análises toxicológicas forenses

Tipo de análise	Amostra biológica utilizada
Análise em indivíduos vivos	Urina, sangue, saliva, suor, ar exalado, mecônio, conteúdo gástrico, cabelo, unha
Análise <i>postmortem</i>	Sangue, urina, cabelo, unha, conteúdo estomacal, fígado, rins, coração, humor vítreo e estômago

Fonte: Adaptado de PELIÇÃO, PISSINATE e MARTINIS (2018).

A urina é uma amostra muito utilizada por ter uma matriz relativamente simples (principalmente água), o que torna a análise menos suscetível a ação de substâncias interferentes. Além disso, apresenta alta concentração de xenobióticos e seus produtos metabólicos e é a amostra biológica ideal para realização de *screening* toxicológico (COSTA, 2014). O exame toxicológico de urina (*screening*) é capaz de detectar substâncias que o indivíduo entrou em contato até uma semana após seu uso ou aproximação, sendo um exame de curta detecção. As substâncias que podem ser identificadas nesse teste são a maconha e seus derivados, a cocaína e seus

derivados, os opióides e as anfetaminas (CHROMATOX, 2021). Em indivíduos vivos, recomenda-se a utilização de 25 a 100 mL de urina. Em indivíduos mortos, a quantidade de urina não pode ser bem definida pois, muitas vezes, não há urina disponível no cadáver. Dessa forma, a análise é realizada com a quantidade que estiver disponível e deve ser coletada preferencialmente antes da necropsopia ou após incisão mento-pubiana, diretamente da bexiga (PELIÇÃO; PISSINATE; MARTINIS, 2018). Tem como desvantagem a influência de fatores como ingestão excessiva ou escassa de água, pH urinário e taxa de metabolização, sendo difícil correlacionar as concentrações urinárias e sanguíneas. Dessa forma, é interessante uma análise complementar com amostras de tipo diferente (PAIVA *et al.*, 2011).

O sangue é o principal fluido biológico utilizado na toxicologia forense, pois possui vantagens relevantes em relação a outras amostras biológicas: a existência de valores definidos para concentrações terapêuticas, tóxicas e letais para muitas substâncias; a possibilidade de correlação entre concentração e efeitos apresentados; a capacidade de determinar se a intoxicação é aguda ou crônica, a depender da concentração da substância inalterada e de seus metabólitos - concentrações de droga inalterada muito maiores que a de seus metabólitos indicam intoxicação aguda e o contrário indica uma intoxicação crônica. Como desvantagem, a análise de amostras de sangue é mais onerosa e dispendiosa que a análise de urina, pois possui matriz mais complexa e que necessita de processamento mais elaborado para a eliminação de interferentes, como proteínas (COSTA, 2014; PELIÇÃO; PISSINATE; MARTINIS, 2018). Além disso, é um método de coleta invasivo, o que aumenta o risco de contaminação da amostra (BORDIN *et al.*, 2015).

Na análise *postmortem*, fatores como região corporal de onde foi retirada a amostra sanguínea e a redistribuição podem influenciar nos resultados. O sangue adquire uma consistência mais viscosa, podendo estar desnaturado pela putrefação, com formação de coágulos e presença de hemólise. A formação de gases após a morte leva ao aumento da pressão intra-abdominal, causando refluxo sanguíneo da aorta abdominal para a porção da aorta localizada no tórax. Além disso, a putrefação do cadáver pode ter influência na degradação ou formação do etanol. Dessa forma, o sangue do cadáver deve ser coletado, preferencialmente, das veias subclávia e/ou femoral, para evitar contaminação por outros compartimentos corporais. É recomendado o acondicionamento do sangue em tubos com fluoreto de sódio, com

inibidor enzimático, a fim de evitar glicólise e reduzir perda por ação enzimática (COSTA, 2014; FERRARI JÚNIOR, 2018; LISBOA, 2016).

A saliva é uma amostra relevante para detectar fármacos e drogas de abuso. Pode ser utilizada em testes para identificação de drogas em contexto ocupacional (como para motoristas), além de ser uma boa alternativa para a realização de monitorização terapêutica e para o acompanhamento de pacientes em tratamento de dependência de drogas (PELIÇÃO; PISSINATE; MARTINIS, 2018). Tem como vantagens a possibilidade de coleta assistida, dificultando adulterações; é uma amostra de fácil acesso, com método de obtenção não invasivo e permite a detecção de substâncias não metabolizadas, como o delta-9-hidrocanabinol (THC), presente na *Cannabis sativa* e em suas preparações (COSTA, 2014; PELIÇÃO; PISSINATE; MARTINIS, 2018).

O humor vítreo é um gel aquoso, incolor e transparente, encontrado no compartimento ocular e possui matriz relativamente simples (mais de 95% de água) em comparação com outras amostras de sangue e urina. Sua utilização na análise é indicada principalmente em vítimas de politraumatismo, carbonização ou em estado de decomposição, pois encontra-se consideravelmente protegida e estéril na câmara ocular (BORDIN *et al.*, 2015; COSTA, 2014; PELIÇÃO; PISSINATE; MARTINIS, 2018). A matriz não possui esterases, enzimas que metabolizam rapidamente substâncias como a cocaína, a heroína e a 6-acetimorfina. Além disso, a presença da substância original é maior que a de metabólitos (BORDIN *et al.*, 2015).

Cabelos e unhas são amostras úteis na análise de exposição a substâncias químicas a longo prazo. Tem como vantagem a possibilidade de análise de uso progressivo, assumindo-se que aproximadamente 1 cm de cabelo equivale a um mês de uso ou contato anterior com a substância. Além disso, há também a facilidade de coleta, armazenamento e transporte, possibilidade de coleta assistida, estabilidade da matriz e janela de detecção ampla. Como desvantagem, existe a possibilidade de exposição ao sol, tinturas e clima diminuírem a concentração do analito de interesse. Além disso, é uma amostra que não permite avaliação de uso recente, então não é aplicável em casos de intoxicação aguda (PELIÇÃO; PISSINATE; MARTINIS, 2018). A unha também possibilita a análise de substâncias como drogas e metais pesados, mas a ausência de melanina na matriz diminui a incorporação de xenobióticos. Entretanto, é uma boa amostra quando o cabelo não estiver disponível ou a quantidade for insuficiente para análise (LISBOA, 2016).

Órgãos e tecidos são úteis principalmente em análises após longo período *postmortem*. O fígado é o principal órgão de escolha, fornecendo resultados complementares aos obtidos na análise sanguínea. Apresenta como vantagens o fato de ser um metabolizador da maioria dos xenobióticos, além de ser pouco afetado pelos fenômenos de redistribuição *postmortem*. Xenobióticos são encontrados em altas concentrações nos pulmões após intoxicação por via inalatória ou intravenosa. O cérebro, por ser um órgão rico em lipídios, é uma boa amostra para detecção de xenobióticos, além de ser o local de ação de diversos compostos tóxicos. Além disso, é um órgão bem protegido anatomicamente, o que dificulta sua decomposição, além de ser pouco afetado pela redistribuição *postmortem*. O osso e a medula óssea são amostras biológicas muito boas para os casos de cadáveres em estado avançado de decomposição e com fragmentação do corpo, além de a medula estar em um compartimento protegido. Uma desvantagem desse tipo de amostra é a difícil correlação com as concentrações sanguíneas de xenobióticos (LISBOA, 2016).

3.2.3 Processamento de Amostras Biológicas e Procedimentos Analíticos

Linden e Antunes (2018) definem a Análise Toxicológica Sistemática (ATS) como “a busca químico-analítica lógica, em uma dada amostra de teste, por uma substância potencialmente tóxica cuja presença não é suspeitada e cuja identidade é desconhecida”.

Orfila, considerado o “Pai da Toxicologia”, utilizou a ATS para a elucidação de um crime de envenenamento. O toxicologista utilizou material obtido de autópsia e identificou a presença de arsênio na amostra, utilizando-a como prova legal (CHASIN, 2014). Os métodos a serem utilizados nestas análises devem ser previamente validados e a garantia e confiabilidade destes procedimentos podem ser analisadas pela aplicação de testes qualitativos e quantitativos estabelecidos por órgãos e agências reguladoras (SILVA, 2014).

Os procedimentos da ATS podem ser divididos em três etapas. A primeira etapa consiste no preparo da amostra, isolamento e concentração dos analitos. Na segunda fase, os compostos são diferenciados e detectados; na terceira etapa, ocorre a identificação dos compostos de interesse toxicológico (LINDEN; ANTUNES, 2018). Quando houver histórico ou alguma indicação da substância em questão, pode-se

realizar a análise direcionada. Entretanto, a maioria das análises tende a ser realizada utilizando-se a ATS (CHASIN, 2014).

O preparo da amostra consiste nos procedimentos necessários para isolamento do analito de interesse da matriz em que está contido, a fim de diminuir a interferência de substâncias intrínsecas (equipamentos utilizados na ATS possuem elevada sensibilidade) e concentrar a substância (BORDIN *et al.*, 2015).

Em relação à triagem de substâncias, podem ser realizados imunoenaios, como ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), além de métodos colorimétricos e a Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Como testes confirmatórios, podem ser utilizadas a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS), consideradas “padrão-ouro” por fornecerem o *fingerprint* das substâncias e proporcionando especificidade à análise. A técnica de confirmação não deve ser a mesma utilizada na triagem (CHASIN, 2014; LINDEN; ANTUNES, 2018).

3.2.3.1 Processamento de amostras

A desproteinização pode ocorrer por uso de temperaturas elevadas, alteração da força iônica, osmótica ou do pH, agentes orgânicos de precipitação e enzimas proteolíticas. A precipitação de proteínas é uma técnica simples e rápida que consiste na desnaturação de proteínas por adição de agentes precipitantes (ácido tricloroacético, bases fortes, temperatura, solventes orgânicos, como acetonitrila). Após adição do precipitante, a amostra é agitada e centrifugada para a separação das proteínas precipitadas do sobrenadante (utilizado para análise). As substâncias ligadas às proteínas se desligam delas e ficam no sobrenadante, sendo possível realizar a dosagem total do analito. Como desvantagem, pode causar diluição da amostra e interferência em leitura espectrofotométrica causada pelos agentes precipitantes (BORDIN *et al.*, 2015; SIQUEIRA; FIGUEIREDO, 2015).

A hidrólise de conjugados é utilizada para quebrar ligações entre metabólitos e moléculas de conjugação (ácido glicurônico, glutatona). Possibilita análise qualitativa em urina e pode ser do tipo enzimática (mais lenta e seletiva), ou química (processo não específico, rápido e barato) (SIQUEIRA; FIGUEIREDO, 2015).

A derivatização tem como objetivo a alteração química de um analito a fim de modificar suas características físico-químicas como polaridade, volatilidade e

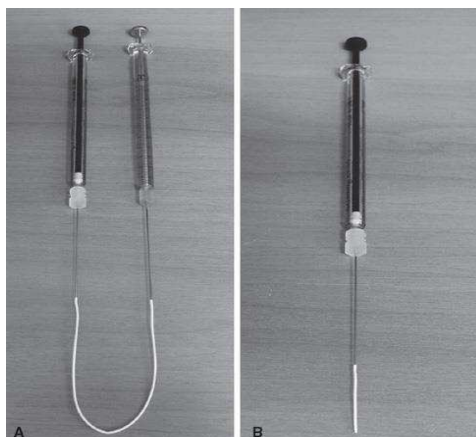
estabilidade térmica para análise em cromatografia gasosa. É uma técnica muito usada para detecção de compostos orgânicos em amostras complexas e consiste geralmente em reações de substituição (alquilação, acilação, sililação) em grupamentos polares da molécula. Quando é realizada a sililação, os hidrogênios mais instáveis da molécula, capazes de formarem ligações de hidrogênio e diminuir a volatilidade, são substituídos por um grupamento trimetilsilil (TMS) (PESSOA *et al.*, 2012).

As técnicas de extração podem ser classificadas em exaustivas, quando o objetivo é a remoção completa dos analitos para a fase extratora, e não-exaustivas, em que capacidade da fase extratora é pequena e pode não ser suficiente para remover a maioria dos analitos da matriz (SIQUEIRA; FIGUEIREDO, 2015). Quando os analitos estão em baixas concentrações, é necessário concentrar durante a extração. Dessa forma, as técnicas utilizadas são a extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME) e extração por *headspace* (CARVALHO; ROCHA, 2020).

A extração líquido-líquido é uma técnica não exaustiva se baseia na partição da amostra em duas fases imiscíveis (aquosa e orgânica). Os analitos vão migrar da fase aquosa para a fase orgânica (extratora), alcançando equilíbrio entre as duas fases. A solução deve ser agitada para garantir melhor migração dos analitos. Apresenta como vantagens a rapidez, simplicidade e ampla gama de solventes extratores. Como desvantagem, são utilizadas grandes quantidades de solventes, gerando resíduos que podem ser mais tóxicos que os próprios solventes (BORDIN *et al.*, 2015; CARVALHO; ROCHA, 2020).

A microextração em fase líquida (LPME) é uma técnica não exaustiva que utiliza pequenos volumes de amostra e aumenta a seletividade da técnica de extração, além de possibilitar a análise de substâncias em traços. Além disso, a quantidade de resíduos gerada é menor. Um dispositivo com solvente extrator envolto por membrana porosa é inserido na amostra, permitindo contato parcial da amostra com o solvente e o analito vai para o interior do dispositivo por solubilização no solvente extrator. Ao entrar, o analito não passa novamente pela membrana (OLIVEIRA, 2015). A Figura 1 mostra o dispositivo utilizado na LPME.

Figura 1 - Dispositivo para LPME



Fonte: OLIVEIRA (2015). Legenda: A = membrana cilíndrica oca em forma de U; B = membrana cilíndrica oca tipo haste.

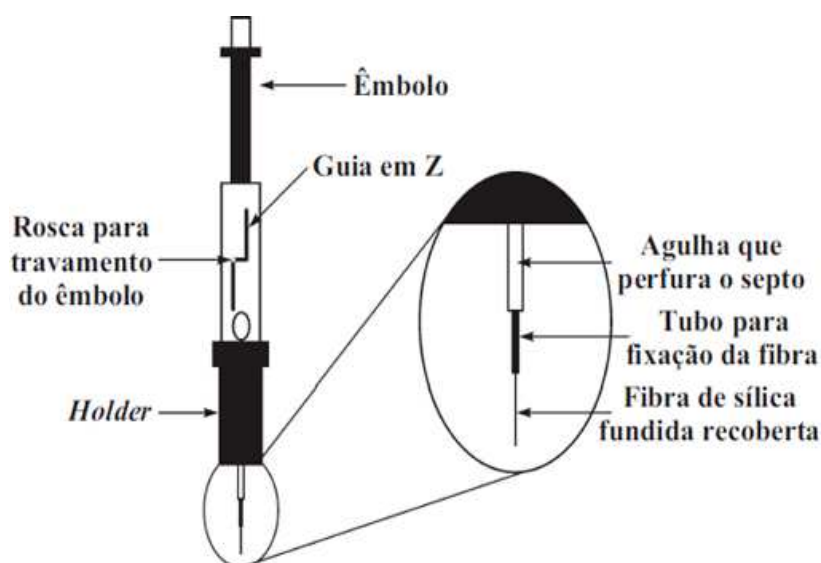
O efeito *salting out* consiste na adição de sais inorgânicos com alto poder de solvatação na amostra, como cloreto de sódio, e um solvente orgânico miscível em água, para formação de um sistema bifásico e auxiliar na melhor separação de fases do solvente orgânico miscível em água, além de melhorar extração em solventes orgânicos apolares (BORDIN *et al.*, 2015).

A extração em fase sólida (SPE) consiste em separação líquido-sólido. São utilizados cartuchos adsorventes com diferentes grupos funcionais que apresentam afinidade pelo analito de interesse. O cartucho deve ser banhado com reagente, tornando-o mais receptivo para a amostra. Em seguida, deve-se eluir a amostra pela matriz adsorvente, que reterá o analito e algumas impurezas. Deve-se lavar o sorvente a fim de remover os interferentes e, em seguida, remover os analitos retidos na matriz com agentes dessorventes. Os adsorventes podem ser de fase normal (solvente é menos polar do que o adsorvente), fase reversa (adsorvente é menos polar do que o solvente) e de troca iônica. Apresenta como vantagens a utilização de pouco solvente, ausência de emulsão e facilidade de automação. Como desvantagens, apresenta maior custo por amostra, várias etapas e maior tempo de processamento (CARVALHO; ROCHA, 2020; COSTA, 2015).

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica não exaustiva utilizada principalmente para extração de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis em amostras aquosas. A instrumentação se baseia em uma seringa modificada, composta por uma fibra de sílica fundida ou aço e recoberta por um filme

fino (fase estacionária). A fibra é fixada a um pequeno tubo de aço inoxidável que passa pelo interior da agulha da seringa. O êmbolo é fixado após exposição da fibra para absorção ou adsorção dos analitos. Em seguida, recolhe-se novamente a fibra para o interior da agulha. A fibra pode ser colocada em instrumentos como o cromatógrafo gasoso, onde a fibra é novamente exposta para dessorção dos analitos (BORDIN *et al.*, 2015; THIESEN, 2015). A Figura 2 mostra um esquema do equipamento utilizado para a SPME.

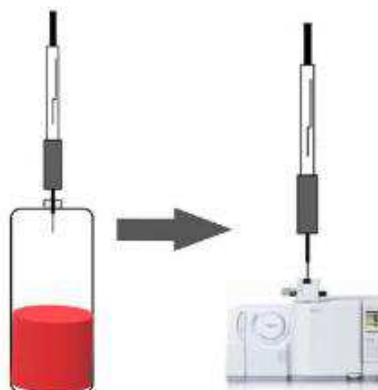
Figura 2 - Equipamento para SPME



Fonte: THIESEN (2015).

A técnica de *headspace* é utilizada na extração de compostos voláteis e consiste na inserção de uma amostra líquida ou sólida em um recipiente fechado sob aquecimento. O aumento da temperatura força o analito a mudança de fase até atingir concentração equilibrada entre as duas fases. O analito passará para a fase de vapor e será transferido para um cromatógrafo gasoso. Pode ser combinada com SPME, em que há uma amostra no reservatório fechado e é inserida a seringa no recipiente (CARVALHO; ROCHA, 2020; BORDIN *et al.*, 2015). A Figura 3 mostra esquema simplificado da combinação entre *headspace* e SPME.

Figura 3 - Esquema de combinação
headspace-SPME



Fonte: CARVALHO, ROCHA (2020).

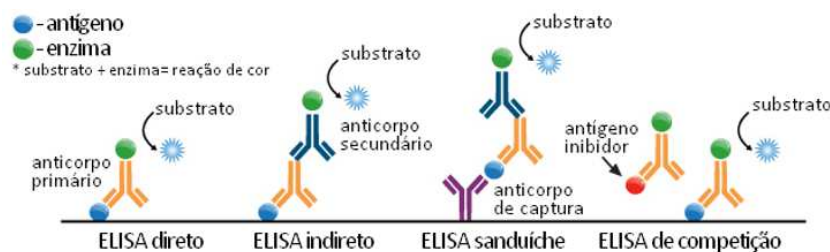
3.2.3.2 Testes de triagem

As reações colorimétricas se baseiam no desenvolvimento de cor para indicar uma substância ou uma classe de substâncias. Geralmente são utilizadas para triagem de drogas de abuso, inclusive para análise presuntiva em campo por serem técnicas de fácil padronização e padronização. Os testes mais utilizados são Duquenois-Levine e Fast Blue para presunção de canabinoides; e teste de Scott, para presunção de cocaína e crack. Como são testes que indicam classes de substâncias, são utilizados apenas para triagem, sendo necessária a realização de testes confirmatórios. Além disso, também podem surgir resultados falso-positivos e até inconclusivos na análise com substâncias diferentes da de interesse, como diluentes de drogas de abuso (CARVALHO; ROCHA, 2020; CONCEIÇÃO *et al.*, 2014; COSTA; BRITO, 2020).

O teste imunoenzimático ELISA baseia-se na interação antígeno-anticorpo (EUROIMMUN BRASIL, c2019). O antígeno (AG) ou anticorpo (AC) é fixado em uma fase sólida, geralmente de poliestireno, e utiliza-se um conjugado antígeno ou anticorpo + enzima. Deve ser realizada uma lavagem após os reagentes serem adicionados, a fim de retirar os conjugados que não se ligaram à fase sólida. A reação deve ser interrompida com a adição de uma solução ácida ou alcalina. A reação entre enzima e substrato forma uma coloração que pode ser analisada visualmente ou por espectrofotometria (BOEHL, 2011).

Existem diversas variações do teste de ELISA. No ELISA direto, o antígeno está ligado à placa e o anticorpo marcado, conjugado com emissor de cor ou fluorescência, é adicionado, enquanto no ELISA indireto, é adicionado um anticorpo secundário marcado que se ligará ao primeiro anticorpo adicionado. No ELISA competitivo, existe um antígeno ligado ao anticorpo, que compete com o antígeno presente na amostra pela ligação no sítio do AC. Após a lavagem, adiciona-se o substrato para que ocorra a reação enzimática e sua seguinte interrupção. O ELISA mais comumente utilizado é o tipo sanduíche, em que o AC está adsorvido na placa e adiciona-se a amostra com o analito de interesse (antígeno), que interage com o anticorpo. Em seguida, adiciona-se outro AC específico para o AG e um anti-anticorpo marcado, que se liga ao AC anteriormente adicionado (BOEHL, 2011; PENSARBIO, 2019). A Figura 4 mostra os diferentes tipos de ELISA.

Figura 4 - Tipos de ELISA



Fonte: PENSARBIO (2019).

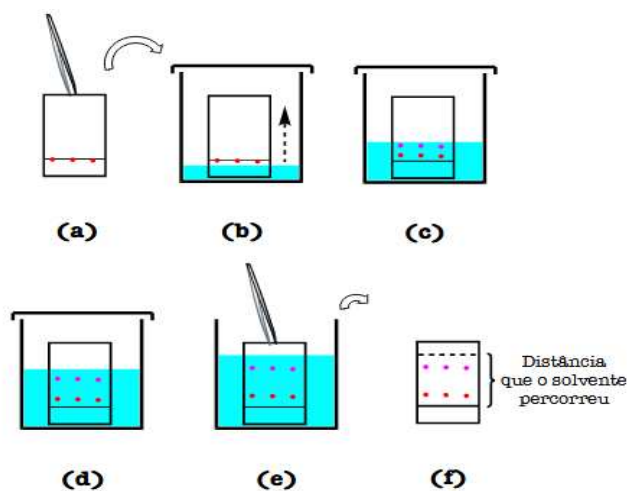
O método de ELISA é rápido, sensível e apresenta possibilidade de diversos níveis de automação, mas pode apresentar resultado falso-positivo por reatividade cruzada com outras drogas, fármacos e interferentes endógenos. Dessa forma, devem ser utilizados outros testes para confirmação (BOEHL, 2011; CARVALHO; ROCHA, 2020).

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é uma técnica simples de triagem que, se aplicada juntamente a um imunoenensaio ou teste colorimétrico, pode ser considerada confirmatória. O fundamento da técnica é a separação de analitos de acordo com a polaridade e consequente afinidade pela fase móvel (FM) ou pela fase estacionária (FE). A fase estacionária é uma camada fina de sólido, geralmente sílica-gel, colocada sobre um suporte inerte, enquanto a fase móvel é composta por um ou mais solventes com polaridade de natureza a ser definida de acordo com o analito de interesse. Se a FE for polar e a FM apolar, a CCD é de fase normal (mais utilizada);

se a FE for apolar e a FM polar, a CCD é de fase reversa (CARVALHO; ROCHA, 2021).

O início da técnica ocorre pela aplicação, com capilares, de solução padrão e de amostra na superfície da placa, com distância aproximada de 1 centímetro da borda inferior da placa, para que não fiquem mergulhadas na fase móvel. A placa é colocada dentro de uma cuba saturada com os vapores da fase móvel, que começa a eluir pela parte inferior da placa e “arrasta” os componentes da amostra em diferentes velocidades pela diferença de afinidade entre o analito e a FM/FE. A placa deve ser retirada da cuba quando a FM estiver a aproximadamente 0,5 cm de distância da borda da placa, que deve ser seca em ar ambiente (BRONDANI, 2019; CARVALHO, ROCHA, 2021). A Figura 5 mostra, de forma simplificada, as etapas de desenvolvimento da CCD.

Figura 5 - Etapas de desenvolvimento da CCD

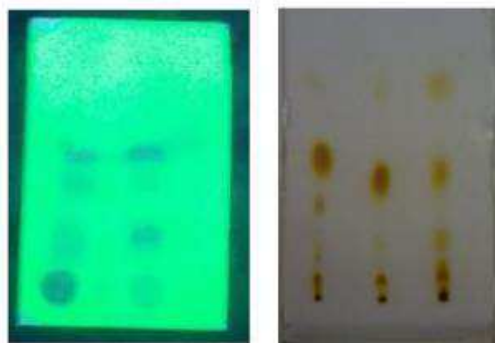


Fonte: BRONDANI (2019). Legenda: a = aplicação do padrão e da amostra; b) = eluição da fase móvel; c), d) = eluição da fase móvel e separação de analitos; e) fim da corrida cromatográfica e retirada da placa; f) verificação da distância que analitos percorreram na placa

Após a secagem, pode ser necessária a aplicação de reagentes cromogênicos para revelação, como vapores de iodo, com a formação de manchas que representam os analitos separados na placa. Para algumas substâncias, suas manchas podem se apresentar visíveis a olho nu ou apenas quando expostas a luz UV, pois se tornam fluorescentes em comprimento de onda de geralmente de 254 nm

e 366nm. Para identificação do analito, pode-se comparar a mancha do padrão com a da amostra, além de calcular o Fator de Retenção (R_f), que corresponde à razão entre a distância percorrida pelo analito e a distância percorrida pelo solvente (BRONDANI, 2019; CARVALHO, ROCHA, 2021). A Figura 6 mostra uma placa de CCD revelada com luz UV.

Figura 6 - Revelação de CCD em luz UV e em vapores de iodo, respectivamente



Fonte: BRONDANI (2019).

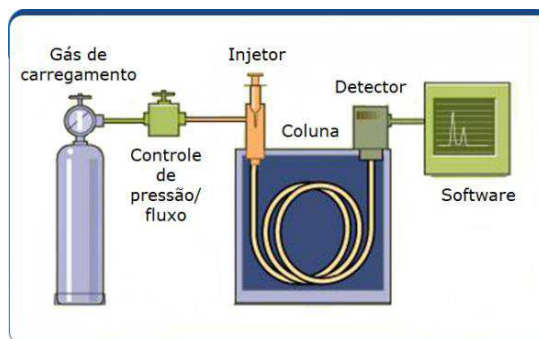
3.2.3.3 Testes confirmatórios

A maioria dos testes confirmatórios utilizam técnicas cromatográficas. Os equipamentos considerados “padrão ouro” nas análises são a Cromatografia Gasosa (CG) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Nos dois equipamentos, a fase estacionária é fixada em uma coluna, enquanto a fase móvel é composta por um gás inerte, como o hélio, no caso da CG, e um líquido inerte para análise em HPLC. Os dois equipamentos devem estar acoplados a um detector, como espectrômetro de massas, e os resultados são expressos em um cromatograma, com picos que representam as substâncias separadas nos cromatógrafos. Os mecanismos de separação dos analitos são por adsorção (interação com as substâncias na interface do sólido, pela presença de grupos ativos nas superfícies) e partição (solubilidade dos compostos em diferentes fases). Se houver o interesse de quantificar o analito, deve-se confeccionar uma curva de calibração com padrão certificado - analito com alto teor de pureza e de concentração conhecida. A curva de calibração é construída a partir de concentrações crescentes das substâncias, plotadas em gráfico com eixo x para as concentrações e eixo y para respostas do sinal. O gráfico gera uma equação de

reta ($y=ax+b$) para ser aplicada na quantificação do analito de interesse (CARVALHO, ROCHA, 2021).

A cromatografia gasosa é utilizada na determinação de compostos voláteis e termoeestáveis. O cromatógrafo gasoso é formado por um sistema de carregamento de gases (cilindros, geradores, filtros de limpeza de gás, controle de vazão manual ou eletrônico); um sistema de injeção (manual ou eletrônico), inerte, embutido em corpo metálico, que permite aquecimento homogêneo para volatilizar os analitos; coluna cromatográfica (coluna capilar, empacotada específica ou com fina camada de polímero), para separação dos componentes da mistura. Quanto menor o diâmetro da coluna, melhor a separação dos analitos. Deve haver fornecimento adequado de gás de arraste e um sistema de forno de coluna para aquecimento/resfriamento; sistema de detecção, para identificar o analito e enviar o sinal para análise no *software* (CARVALHO, ROCHA, 2021; DCTECH, c2015). A Figura 7 mostra um esquema simplificado dos componentes de um cromatógrafo gasoso.

Figura 7 - Componentes de um cromatógrafo gasoso



Fonte: DCTECH (c2015)

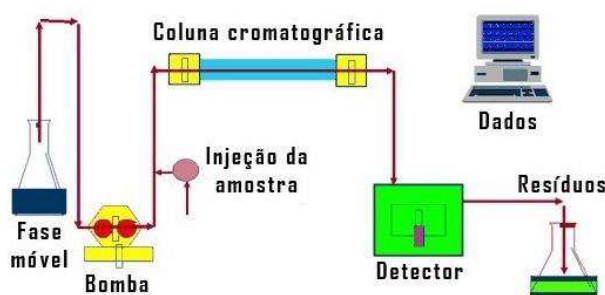
A cromatografia gasosa apresenta como vantagem a eficiência da separação dos analitos e a disponibilidade de uma biblioteca com espectros de massas para comparação. A resolução do método é alta, diminuindo a possibilidade de resultados equivocados. Como desvantagem, há a dificuldade de análise de compostos com alto peso molecular, além da possibilidade de degradação de materiais termolábeis, sendo necessário realizar a derivatização. Quando o equipamento é acoplado a um espectrômetro de massas (CG-MS), ocorre aumento na seletividade e especificidade dos espectros obtidos, pois a informação obtida com

o tempo de retenção é complementada pelo espectro obtido. O mesmo ocorre na CLAE-MS (CARVALHO; ROCHA, 2021; LINDEN; ANTUNES, 2018).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) se fundamenta na separação dos analitos por afinidade com a fase estacionária ou a fase móvel sob pressão. Possui como vantagem a possibilidade de análise de substâncias termolábeis, pouco voláteis e polares, sem necessidade de realizar a derivatização. Possui menor reprodutibilidade em relação à CG, pois pH e viscosidade da fase móvel podem afetar o perfil dos picos cromatográficos. Os mecanismos de separação podem ocorrer por adsorção, partição, troca iônica (fase estacionária ligada com grupos aniônicos ou catiônicos), bioafinidade (interações bioquímicas específicas) e exclusão (fracionamento baseado nos tamanhos das moléculas) (CARVALHO; ROCHA, 2021; LINDEN; ANTUNES, 2018; SILVA, 2017).

A CLAE pode ser classificada como de Fase Normal, com fase estacionária polar (ex. sílica) e fase móvel apolar; ou de Fase Reversa, com fase estacionária apolar (ex. coluna C18) e fase móvel polar. O sistema de eluição da fase móvel pode ser isocrático (constituição do solvente é constante) ou por gradiente (composição da fase móvel varia durante a separação, com aumento gradativo da força cromatográfica). O equipamento de CLAE é composto pelo sistema de bombeamento de fase móvel, sistema de injeção de amostra, coluna cromatográfica e detectores (SILVA, 2017). O detector de arranjo de diodo (DAD) pode ser acoplado à cromatografia líquida para realizar a varredura de absorção dos analitos por espectroscopia na região do visível (VIS) ou do ultravioleta (UV). A Figura 8 mostra um esquema simplificado do equipamento de CLAE.

Figura 8 - Equipamento de CLAE



Fonte: MATRIX LCMS (c2022).

A detecção por espectrometria de massas (MS) possui alta sensibilidade e seletividade. A técnica se baseia na fragmentação de átomos ou moléculas e geração de íons positivos ou negativos, separando-os de acordo com a razão massa/carga. O método de ionização mais utilizado é o impacto de elétrons, em que as moléculas perdem um ou dois elétrons e produzem cátions ao serem atingidas, além da formação de fragmentos. Os íons chegam ao coletor após serem acelerados até o analisador de massas e o sinal é amplificado e detectado (CARVALHO; ROCHA, 2021). Segundo Tose (2018), a ionização por *eletrospray* (ESI) ocorre quando é aplicado um campo elétrico forte (gerado pela diferença de potencial aplicada entre o capilar contra eletrodo) em uma solução que passa por um capilar em fluxo contínuo baixo. A formação de gotas decorre do acúmulo de cargas na superfície do líquido localizada na porção final do capilar. A injeção de um gás, como o nitrogênio, causa a dispersão de gotas (passam por um capilar para retirar o resto de solvente) e formação de *spray*.

A espectrometria de massas *tandem* (MS/MS) envolve pelo menos dois estágios de análise de massa (dois equipamentos). No processo mais utilizado, o primeiro analisador isola um íon precursor, que é fragmentado para produzir íons secundários e fragmentos neutros. O segundo espectrômetro analisa os íons secundários produzidos. O espectro de íons secundários não exibirá picos de isótopos se o precursor m/z contém apenas um isótopo para cada espécie atômica, o que ocorre na maioria dos casos. A utilização de MS/MS diminui resultados falso-positivo e falso-negativo em amostras complexas, diminui o tempo e custo das análises, pois diminui a quantidade de reagentes utilizados no preparo de amostra e apresenta melhor detectabilidade e seletividade, conseguindo distinguir analitos com diferenças físico-químicas mínimas (HOFFMAN; STROOBANT, 2007; OSHITA; JARDIM, 2015).

3.3 Praguicidas

Os praguicidas são agentes químicos utilizados na agricultura, pecuária, veterinária e saúde humana para o controle de pragas como ervas daninhas, insetos, fungos e microrganismos (CEQUINEL; RODRIGO, 2018). Também incluem substâncias que regulam o crescimento de plantas, desfolhantes, e agentes aplicados antes e após o cultivo de vegetais. A legislação brasileira adotou o termo “agrotóxico”, substituindo a denominação “defensivo agrícola” a fim de evidenciar seus efeitos danosos ao meio ambiente e aos seres humanos (ALONZO; CORRÊA, 2008).

A origem do primeiro agrotóxico moderno vem da Primeira Guerra Mundial, que ocorreu entre 1914 e 1918. Em 1939, o entomologista Paul Müller descreveu as propriedades inseticidas DDT (dicloro difenil tricloroetano), agente organoclorado que foi utilizado no combate à malária. Durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), foi usado para prevenção do tifo e combate aos piolhos em seres humanos. Em 1970, o DDT foi banido do primeiro país no mundo: a Suécia (RIBEIRO; PEREIRA, 2016; D'AMATO; TORRES; MALM, 2002).

Os praguicidas mais importantes no âmbito das intoxicações são os inibidores da colinesterase (carbamatos e organofosforados), inseticidas piretróides, inseticidas organoclorados e herbicidas. A exposição pode ocorrer tanto em ambiente rural quanto urbano e, em crianças, as intoxicações geralmente são acidentais. Intoxicações em adultos ocorrem por exposição ocupacional, tentativa de autoextermínio (TAE) e acidentes por uso inadequado das substâncias (HERNANDEZ; RODRIGUES; TORRES, 2017a).

Os organoclorados foram desenvolvidos através de síntese orgânica e foram amplamente utilizados durante os anos 50 a 70 nas plantações de algodão e milho, por serem mais específicos e potentes do que os praguicidas de origem natural. As substâncias usadas eram o DDT, Hexacloroetano, Aldrin, Dieldrin e Clordano. A utilização desses compostos foi banida pelas suas altas persistências no ambiente, além da possibilidade de bioacumulação e biomagnificação (SÃO PAULO, 2022; Santos *et al.*, 2007). Em testes com animais, os organoclorados demonstraram carcinogenicidade e o lindano, o DDT e o clordano são consideradas substâncias promotoras de tumor (RIBEIRO; OTERO, 2013). A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classifica o dieldrin e o aldrin no grupo 2A (provavelmente carcinogênico para humanos). As evidências em humanos são limitadas para câncer de mama ou inadequadas para não-Hodgkin e outros tipos de câncer para seres humanos, mas suficientes para carcinoma hepatocelular em animais experimentais (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2015; SÃO PAULO, 2022).

A ação tóxica dos compostos organoclorados, em intoxicações agudas, se dá principalmente pela alta lipossolubilidade dessas substâncias, que são rapidamente absorvidas pelo trato gastrointestinal (TGI), além das vias dérmica e respiratória. Por serem muito lipofílicos, se acumulam no tecido adiposo e a duração da toxicidade pode ser aumentada. Agem principalmente no SNC, interferindo no fluxo

normal de sódio e potássio na fenda dos axônios, causando hiperexcitação e desencadeando convulsões isoladas, além de cefaleia, náuseas, vômitos, parestesia, tremores musculares, vertigem, e confusão mental. Também podem causar hepatotoxicidade, levando a hepatomegalia (HERNANDEZ; RODRIGUES; TORRES, 2017a; NUNES; TAJARA, 1998). Não existe antídoto para a intoxicação aguda, apenas tratamento sintomático e suportivo. O carvão ativado pode ser administrado a fim de evitar a recirculação entero-hepática, ao adsorver a substância tóxica em sua superfície e evitar a absorção no TGI. As substâncias adsorvidas no carvão são eliminadas nas fezes (FREITAS; BUENO, 2014; HERNANDEZ; RODRIGUES; TORRES, 2017a).

Os piretróides são praguicidas sintéticos derivados das piretrinas naturais provenientes do crisântemo. Atuam pela despolarização de canais de sódio, desencadeando hiperexcitação do sistema nervoso. Os produtos de uso doméstico possuem baixas concentrações, mas produtos agrícolas são mais concentrados. Podem ser ingeridos ou inalados e a toxicidade pulmonar também se dá pelo solvente utilizado como veículo. Os sinais e sintomas de intoxicação aguda envolvem tontura, náuseas, vômitos, dor de cabeça, salivação, pneumonite e broncoespasmo. Não existe antídoto, sendo o tratamento sintomático e suportivo (HERNANDEZ; RODRIGUES; TORRES, 2017a).

Os herbicidas mais conhecidos são o glifosato e o paraquat. O mecanismo tóxico do glifosato não está adequadamente elucidado, mas suas formulações são irritantes e corrosivas do trato gastrointestinal em altas concentrações. Possui ação sistêmica não seletiva e, em geral, é bem tolerada por seres humanos, animais e pelo meio ambiente, além de ser eficiente contra ervas daninhas. A principal forma de intoxicação é pela ingestão, pois não é bem absorvido pela pele. As manifestações clínicas envolvem dor em queimação, náusea, vômitos e diarreia. Intoxicações graves podem evoluir com hipotensão, acidose metabólica, insuficiência respiratória, oligúria e choque. O tratamento se baseia em alívio dos sintomas e suporte à vida. O paraquat é considerado um dos praguicidas mais tóxicos disponíveis, sendo seu índice de mortalidade superior a 70%. É um herbicida de contato, não seletivo. Seu mecanismo de ação se baseia no estresse oxidativo pelo aumento da formação de radicais livres e peroxidação dos ácidos graxos da membrana celular bilipídica, afetando o metabolismo aeróbico. Possui efeito corrosivo

em mucosas e pele podendo causar lesões teciduais em órgãos (pulmão, fígado e rins). As manifestações clínicas são progressivas, apresentando-se inicialmente, logo após ingestão, dor e edema de boca e garganta, com possibilidade de ulcerações, além de náuseas e vômitos com sangue. 24 horas após a ingestão, ocorre necrose hepática e renal, levando a insuficiência renal aguda, oligúria, pancreatite. Também podem ocorrer manifestações tardias, como edema pulmonar e cerebral, arritmias, coma e choque. Pode ser realizado um teste qualitativo de determinação de paraquat com ditonito de sódio em amostra de urina e o tratamento é suportivo. É importante não administrar oxigênio suplementar ao paciente, pois pode acabar aumentando a liberação de radicais livres e desencadear fibrose pulmonar (HERNANDEZ; RODRIGUES; TORRES, 2017a; LANARO *et al.*, 2018; MARTINS, 2013).

3.3.1 Classificação dos praguicidas

Segundo Cequinel e Rodrigo (2018), os praguicidas podem ser classificados de diversas maneiras. Em relação à sua finalidade ou organismo-alvo, podem ser classificados como:

- a) Inseticidas: agem contra insetos;
- b) Herbicidas: controle de ervas daninhas;
- c) Fungicidas: ação contra fungos;
- d) Desfolhantes: induzem a queda precoce das folhas de plantas;
- e) Fumigantes: controle de fauna e flora através de compostos gasosos;
- f) Rodenticidas/raticidas: agem contra roedores;
- g) Moluscicidas: ação em moluscos terrestres e aquáticos;
- h) Nematicidas: ação contra nematódeos;
- i) Acaricidas: ação contra ácaros;
- j) Algicidas: controle de algas.

Já em relação aos grupos químicos existentes na molécula do composto químico, os praguicidas são classificados como:

- a) Organofosforados: derivados de ácidos que possuem fósforo na molécula (ácidos fosfórico, tiosfosfórico e ditiosfosfórico);
- b) Carbamatos: derivados do ácido carbâmico;
- c) Piretróides: compostos sintéticos com estrutura química baseada nas piretrinas naturais.

- d) Glicina substituída - (N-(fosfonometil) glicina): herbicida não seletivo, sistêmico, denominado Glifosato;
- e) Bupiridílicos: produzem radicais livres com o oxigênio;
- f) Ditiocarbamatos: possuem enxofre em sua estrutura química;
- g) Dinitrofenóis: diminuem o aporte energético do organismo pelo desacoplamento das ligações do ATP;
- h) Organoclorados: um ou mais anéis aromáticos ou cíclicos, com elevada acumulação no ambiente;
- i) Organomercuriais: a base de mercúrio.

A extinta Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil, na Portaria 03/92, classificou os agrotóxicos de acordo com seus graus de toxicidade. Na Classe I estão os Produtos Extremamente Tóxicos. Dentre alguns critérios para figurar nesta classe, estão:

- a) Formulações que provocam ulceração ou corrosão na pele dos animais testados;
- b) Formulações que provocam opacidade na córnea reversível ou não em sete dias ou irritação persistente nas mucosas oculares dos animais testados;
- c) produtos em desenvolvimento, a serem pesquisados ou experimentados no Brasil;

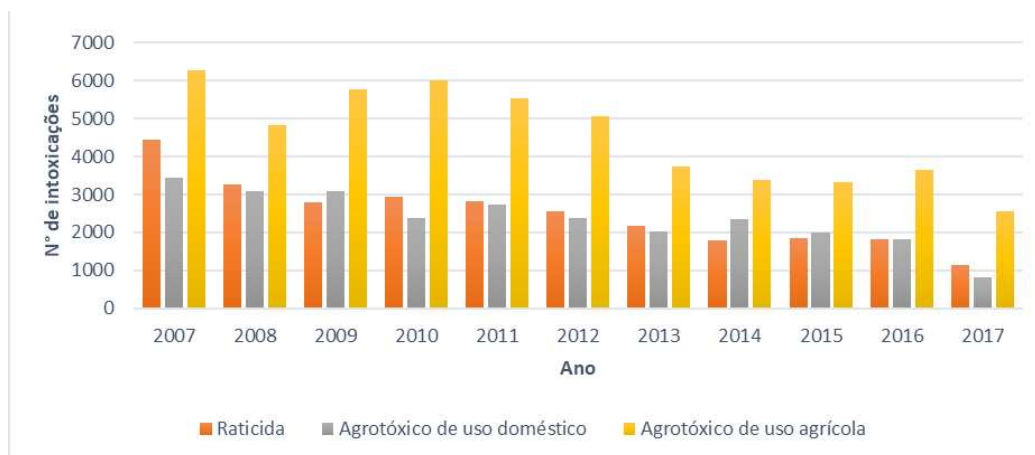
Na Classe II estão os Produtos Altamente Tóxicos, que tem como um dos critérios a não ocorrência de opacidade da córnea dos animais testados ou irritação da mucosa ocular reversível em até 7 dias. Na Classe III figuram os Produtos Medianamente Tóxicos, que não devem causar opacidade na córnea ou apresentar irritação ocular reversível em até 72 horas nos animais testados. A Classe IV abrange os Produtos Pouco Tóxicos, que não devem opacificar a córnea ou causar apenas irritação ocular reversível em até 24 horas nos animais testados (BRASIL, 1992).

3.3.2 Epidemiologia das intoxicações com praguicidas no Brasil

De acordo com dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), foram registrados 79.880 casos de intoxicações humanas, animais e solicitações de informação de agentes tóxicos no Brasil em 2017, sendo 2706 (3,39%) relacionadas aos agrotóxicos de uso agrícola, 971 (1,22%) aos

praguicidas de uso doméstico e 1282 (1,60%) aos raticidas. A menor participação dos Centros de Informações e Assistência Toxicológica (CIATs) nas notificações pode gerar uma subnotificação de casos, o que não significa a diminuição do número de intoxicações no país. O Gráfico 1 mostra os casos de intoxicação humana por praguicidas em humanos registrados no SINITOX entre 2007 e 2017.

Gráfico 1 - Casos de intoxicação humana por praguicidas: 2007-2017



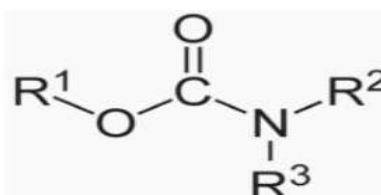
Fonte: adaptado de SINITOX (c2022).

3.3.3 Carbamatos e Organofosforados

Os carbamatos e organofosforados (IOFs) são praguicidas definidos como inibidores da colinesterase. Embora possuam estruturas químicas distintas, atuam pelo mesmo mecanismo tóxico: inibição das enzimas colinesterases (CEQUINEL; RODRIGO, 2018).

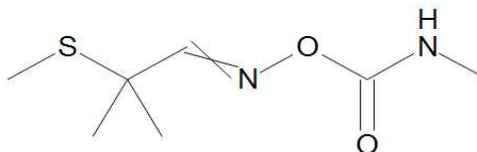
Os carbamatos são ésteres orgânicos derivados do ácido carbâmico. A Figura 9 mostra a estrutura química básica dos carbamatos e a Figura 10 mostra a estrutura química do Aldicarb, um praguicida da classe dos carbamatos.

Figura 9 - Estrutura química básica dos carbamatos



Fonte: NASCIMENTO e MELNYK (2016)

Figura 10 - Estrutura química do Aldicarb



Fonte: LGC STANDARDS (c2022a)

No Brasil, o carbamato Aldicarb (Temik 150®) é vendido de forma clandestina. O praguicida era utilizado como inseticida e nematicida em plantações de algodão, batata, café, cana-de-açúcar, cítricos e feijão. Em 2012, a fabricante da substância pediu o cancelamento da venda do produto, mas ele continua sendo comercializado ilegalmente, na forma popularmente conhecida como “chumbinho”. O aldicarb possui coloração cinza e tem aspecto granuloso, como mostra a Figura 11. Quando há uma tentativa de intoxicação criminosa, pode ser misturado em alimentos com coloração escura, como chocolate e feijão (BRASIL, 2012; DURÃO; MACHADO, 2016).

Figura 11 - Grânulos de chumbinho

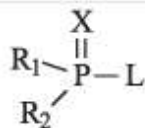


Fonte: DURÃO; MACHADO (2016).

Estima-se que o aparecimento dos organofosforados ocorreu na década de 40. A partir da década de 80, os IOFs se tornaram a alternativa de substituição dos organoclorados e são amplamente utilizados pelo baixo custo e facilidade na síntese, além de maior biodegradação. Em 1999, esses compostos representavam 40% do mercado mundial de praguicidas (SANTOS *et al.*, 2007). São ésteres amido ou tiol-derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico, fosforotióico e fosfonotióico e são bastante

lipofílicos (OENNING, 2018). A Figura 12 mostra a estrutura química básica dos organofosforados.

Figura 12 - Estrutura química básica dos organofosforados



X = O, S e Se

R₁; R₂ = alquil, SR', OR' ou NHR'

L = halogênios; alquil, aril ou heterocíclicos

Fonte: SANTOS *et al.* (2007).

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela degradação do neurotransmissor inibitório acetilcolina, principal agente do Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático (embora esteja presente também no Sistema Nervoso Central). Os precursores da acetilcolina são a acetilcoenzima A e a colina. Após sua produção, o neurotransmissor fica armazenado em vesículas no neurônio pré-sináptico colinérgico e posteriormente é liberado na fenda sináptica, interagindo com receptores pós-sinápticos muscarínicos e nicotínicos. Após o desligamento da interação entre o neurotransmissor e o receptor, a acetilcolinesterase causa a hidrólise da molécula de acetilcolina em ácido acético e colina na fenda sináptica. Estes produtos de degradação serão reutilizados para a formação de novas moléculas de acetilcolina. A inibição da acetilcolinesterase provoca o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica dos neurônios colinérgicos, resultando em uma hiperestimulação colinérgica, o que caracteriza o quadro de intoxicação por carbamatos e organofosforados (CEQUINEL; RODRIGO, 2018; CALDAS, 2000).

Enquanto os carbamatos causam uma inibição reversível da acetilcolinesterase, que é reativada espontaneamente, os organofosforados realizam uma inibição praticamente irreversível, sendo necessária a produção de novas moléculas de acetilcolinesterase posteriormente (HERNANDEZ; RODRIGUES; TORRES, 2017a).

As manifestações clínicas das intoxicações por carbamatos e por organofosforados podem aparecer em poucas horas após a exposição. Os

carbamatos e alguns organofosforados são bastante lipossolúveis e possuem alta taxa de distribuição pelos tecidos. O indivíduo intoxicado apresenta sintomas relacionados à interação da acetilcolina com receptores muscarínicos e nicotínicos: bradicardia, miose, sialorreia, broncorreia, vômitos, diarreia (relacionados aos receptores muscarínicos), fasciculações musculares, taquicardia e hiporreflexia (relacionadas aos receptores nicotínicos) (ALONZO; CORRÊA, 2008; HERNANDEZ; RODRIGUES; TORRES, 2017).

O diagnóstico da intoxicação por carbamatos e organofosforados ocorre pela anamnese do paciente, histórico de exposição ao agente tóxico, além da realização de exames laboratoriais. A determinação da atividade da acetilcolinesterase eritrocitária e plasmática, aliada à sintomatologia, é essencial para detectar a intoxicação. Normalmente utiliza-se a determinação da colinesterase plasmática por ser um método mais prático e sensível, embora a colinesterase eritrocitária seja a mais adequada para os casos de intoxicações (LANZARIN, 2007). Segundo Lemos (2022), o valor de referência da colinesterase pode variar de acordo com o kit de exame utilizado no laboratório, mas os valores normais de referência estão entre 4620 - 11500 U/L para homens e 3930 - 10800 U/L para mulheres. A redução de mais de 50% da atividade da enzima indica que o indivíduo foi exposto a um agente inibidor da colinesterase (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007).

Em relação a testes de determinação da presença de carbamatos/IOFs em amostras biológicas (conteúdo gástrico, sangue), pode-se utilizar a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Gasosa (CG). Entretanto, na maioria dos casos, as manifestações clínicas e a determinação da atividade da colinesterase são suficientes para o fechamento de diagnóstico (LANZARIN, 2007; XAVIER *et al.*, 2007).

O tratamento da intoxicação por carbamatos e organofosforados se baseia em medidas de descontaminação, como a administração de carvão ativado em doses seriadas, terapia de suporte, como garantir oxigenação e hidratação adequada e monitorar sinais vitais. Como tratamento específico para carbamatos e IOFs, utiliza-se a atropina para reverter a exacerbação das manifestações colinérgicas, pois é um antagonista competitivo da acetilcolina (LANZARIN, 2007; HERNANDEZ; RODRIGUES; TORRES, 2017a). As oximas (principalmente a pralidoxima) são os antídotos verdadeiros para intoxicações causadas por organofosforados, não sendo úteis nas intoxicações por carbamatos. Essas substâncias são capazes de reativar a

acetilcolinesterase inibida se forem administradas precocemente, entre 24 e 48 horas após a intoxicação. Se a enzima envelhecer, o antídoto perde seu efeito (VINHAL; SOARES, 2018).

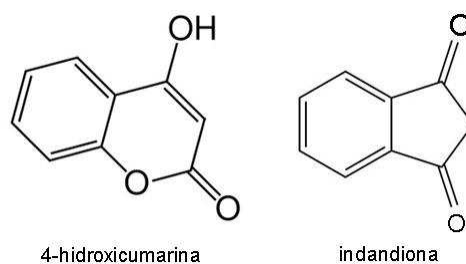
3.3.4 Rodenticidas/Raticidas

Os rodenticidas são substâncias químicas destinadas a matar ratos e outros roedores. Até a década de 1950, eram utilizados os raticidas agudos (estricnina, arsênico, antu (alfa-naftil-til-uréia), sulfato de tálio, fosfeto de zinco, monofluoracetato de sódio e fluoracetamida), que agem pelo bloqueio do Sistema Nervoso Central (SNC) do animal de forma inespecífica e provocam a morte dentro das primeiras 24 horas da ingestão. Quando ocorria uma intoxicação por essas substâncias, o tratamento era difícil pela falta de antídotos, podendo ter um desfecho letal. Dessa forma, estes compostos foram proibidos no Brasil. O aldicarb, popularmente conhecido como “chumbinho”, é um inseticida de uso agrícola vendido clandestinamente como raticida agudo de forma errônea (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; HERNANDEZ; RODRIGUES; TORRES, 2017b).

Os raticidas causam a morte do animal após as primeiras 24h da ingestão e podem ser de dose única ou múltipla. Os representantes dessa classe são os cumarínicos como a varfarina e os indandiônicos. A varfarina é um composto com ação anticoagulante, desenvolvido a partir da casca da árvore cumaru (*Haba tonka*) e é amplamente utilizado atualmente. Os derivados indandiônicos foram desenvolvidos posteriormente. O mecanismo de ação tóxica desses compostos ocorre pela inibição da síntese de protrombina, essencial para a coagulação sanguínea. A morte do animal acontece pelo dano nas paredes dos vasos capilares e consequente surgimento de hemorragias internas (BRASIL, 2002).

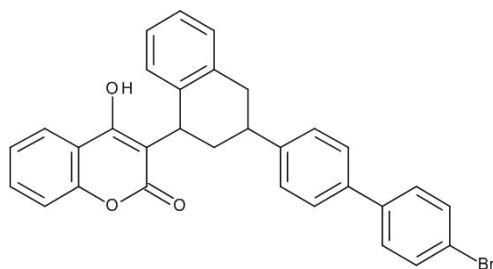
Os cumarínicos fazem parte de um grupo de metabólitos denominados benzopiranos e possuem um anel benzênico fundido com uma lactona (POCHTECA, 2021). A indandiona é classificada como uma β -dicetona e apresenta-se na forma de sólido incolor, verde ou amarelo (PUBCHEM, c2022). A Figura 13 mostra a estrutura química da 4-hidroxycumarina e da indandiona e a Figura 14 mostra a estrutura do brodifacoum, um derivado cumarínico.

Figura 13 - Estrutura química da 4-hidroxicumarina e da indandiona



Fonte: PRADERA (2016).

Figura 14 - Estrutura química do brodifacoum



Fonte: LGC STANDARDS (c2022b).

Os raticidas utilizados hoje são antagonistas da vitamina K, atuando como anticoagulantes, e podem ser de curto tempo de ação (coumatetralil - Racumin®) ou de tempo de ação prolongado (indandionas, 4-hidroxicumarínicos), que podem causar toxicidade por mais tempo (HERNANDEZ; RODRIGUES; TORRES, 2017b). A varfarina e as supervarfarinas inibem a vitamina K epóxido redutase, desencadeando acúmulo de vitamina K epóxido, a forma inativa da vitamina K, além disso, pode ocorrer a diminuição da produção de proteína dependente de vitamina K no retículo endoplasmático. A combinação desses efeitos pode levar a distúrbios da coagulação e hemorragia anormal (WU *et al.*, 2009).

A exposição aos rodenticidas pode ocorrer por absorção dérmica, mas a ingestão é a via mais comum. São comumente encontrados na forma de granulados, iscas, pellets, pó, mas podem ser semelhantes a sementes, de cor rosa ou azul, como mostra a Figura 15 (HERNANDEZ; RODRIGUES; TORRES, 2017b).

Figura 15 - Embalagem de Racumin® (Cumatetrilil)



Fonte: PAIOL (c2022).

As manifestações clínicas da intoxicação aguda por cumarínicos incluem hemorragia (hematoma, epistaxe, hemoptise e hematúria), além de anemia, ataxia, cólica e dispneia. O sangramento pode ser interno, sem sinais externos. Podem ocorrer também vômitos e evacuações sanguinolentas. A alteração na coagulação pode levar ao aumento do tempo de protrombina (TP) e do tempo de coagulação (TC) (ALBUQUERQUE, 2017; RENNÓ; SACCO; BARBOSA, 2007).

As medidas de descontaminação e tratamento do paciente incluem a utilização de carvão ativado e administração de analgésicos e antiespasmódicos. Nos casos de hemorragias evidentes, pode-se administrar o antídoto Vitamina K, um antagonista competitivo dos compostos cumarínicos. Mesmo que o paciente esteja assintomático, o acompanhamento deve ser realizado por quatro dias (ALBUQUERQUE, 2017).

A brometalina é um composto difenilamínico empregado como raticida. Seu desenvolvimento inicial foi idealizado pela observação de resistência de alguns roedores à classe dos raticidas anticoagulantes, como a varfarina. É um rodenticida de dose única e não pode ser distinguido de outros rodenticidas por cor, odor e aparência (PÉREZ-LÓPEZ *et al.*, 2017). A Figura 16 mostra a estrutura química da brometalina e a Figura 17 traz um bloco de brometalina na forma comercializada.

O tratamento baseia-se em medidas de descontaminação (carvão ativado), monitorização e medidas sintomáticas e suportivas (DUNAYER, 2003; PÉREZ-LÓPEZ *et al.*, 2017).

3.3.5 Legislação acerca dos praguicidas no Brasil

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo. A agricultura figura como o maior setor que utiliza esses produtos, sejam herbicidas, nematicidas, pesticidas, dentre outros (CEQUINEL; RODRIGO, 2018). A Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, estabelece o marco regulatório dos agrotóxicos no país. O documento traz os critérios necessários para produção, embalagem e rotulagem, comercialização, utilização, descarte de resíduos e outras atividades com agrotóxicos e afins. A legislação ainda possui, em seus anexos, modelos de certificados de registro, de relatórios técnicos, de registros de componentes, dentre outros documentos necessários à autorização (BRASIL, 1989).

A Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992, da extinta Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, estabelece as diretrizes e exigências para a autorização, renovação de registro e extensão de uso de agrotóxicos e relacionados. O documento traz definições para avaliações toxicológicas, determina quais informações técnicas e científicas devem constar em relatório técnico entregue à Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária pela empresa fabricante do agrotóxico, quais informações devem estar presentes nos rótulos dos produtos, além de parâmetros quantitativos e qualitativos para classificação dos praguicidas e limites aceitáveis de detecção desses ativos nos alimentos (BRASIL, 1992).

Posteriormente, o Decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002, regulamentou a Lei 7.802/89, aumentando o rigor dos critérios para o registro de novos agrotóxicos. Uma das regras estabelecidas é a necessidade de apresentação de relatórios da fabricante comprovando que o novo produto possui toxicidade menor ou igual a de produtos existentes no mercado. Do contrário, a nova formulação não poderá ser comercializada (BRASIL, 2002).

O Ato nº 54/12 publicado no Diário Oficial da União, cancelou a comercialização do Aldicarb (Temik 150®) a pedido da fabricante (BRASIL, 2012).

Em 2017, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio de Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 177, de 21 de setembro de 2017,

proibiu a venda e distribuição de agrotóxicos contendo o ativo Paraquat em todo o território brasileiro devido seu alto grau de toxicidade. O documento estabeleceu o prazo de três anos após sua publicação para a interrupção total da produção, importação, venda e utilização de produtos com a substância, além de determinar medidas a serem adotadas durante o período de transição de legislação, a fim de reduzir danos (BRASIL, 2017).

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

O seguinte trabalho caracteriza-se como uma Revisão da Literatura Narrativa, um estudo qualitativo com temática e questionamentos mais amplos e abertos. Os métodos de seleção dos artigos geralmente não são explicitados e não há fornecimento de dados quantitativos. É uma modalidade de revisão adequada para expor e discutir sobre o desenvolvimento de um tema, possibilitando a obtenção do conhecimento ou atualização sobre o conteúdo em pequeno espaço de tempo (CORDEIRO *et al.*, 2007; ROTHER, 2007).

4.2 Etapas da pesquisa

O estudo foi guiado a partir da determinação de pesquisa em literatura para determinar a pergunta norteadora, elaboração da pergunta norteadora, busca de material em bases de dados, análise dos dados contidos nos estudos, exposição e discussão dos resultados.

Após embasamento teórico, formulou-se a seguinte pergunta norteadora: “quais técnicas cromatográficas são utilizadas para a análise de pesticidas organofosforados, carbamatos e rodenticidas anticoagulantes em amostras biológicas no contexto forense?”

As bases de dados consultadas para a escolha dos artigos foram *PubMED*, *Embase* e Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS). Os descritores controlados utilizados na pesquisa foram definidos de acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), sendo definidos os termos “*Carbamate*”, “*Organophosphate*”, “*Rodenticide*”, “*Forensic Toxicology*” e “*Chromatography*” na língua inglesa e “Carbamato”, “Organofosforado”, “Rodenticida”, “Toxicologia Forense” e “Cromatografia” na língua portuguesa. O Quadro 3 mostra os descritores controlados que foram utilizados na busca de artigos.

Quadro 3 - Descritores utilizados em português e inglês

Idioma	Descritores
Inglês	<i>Carbamate, forensic toxicology, chromatography</i>
	<i>Organophosphate, forensic toxicology, chromatography</i>
	<i>Rodenticide, forensic toxicology, chromatography</i>
Português	Carbamato, toxicologia forense, cromatografia
	Organofosforado, toxicologia forense, cromatografia
	Rodenticida, toxicologia forense, cromatografia

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Foi realizada a leitura dos títulos disponíveis nos bancos de dados para seleção e posterior leitura dos resumos. Após a leitura dos resumos, foram selecionados os artigos para leitura integral. Os artigos deveriam estar disponíveis em português ou inglês, publicados nos últimos cinco anos (2017-2022) e os trabalhos encontrados mais de uma vez nas diferentes bases de dados foram desconsiderados, utilizando-se apenas a primeira versão encontrada. Não foram selecionados artigos que utilizaram amostras não biológicas, método de análise diferente de cromatografia e revisões de literatura.

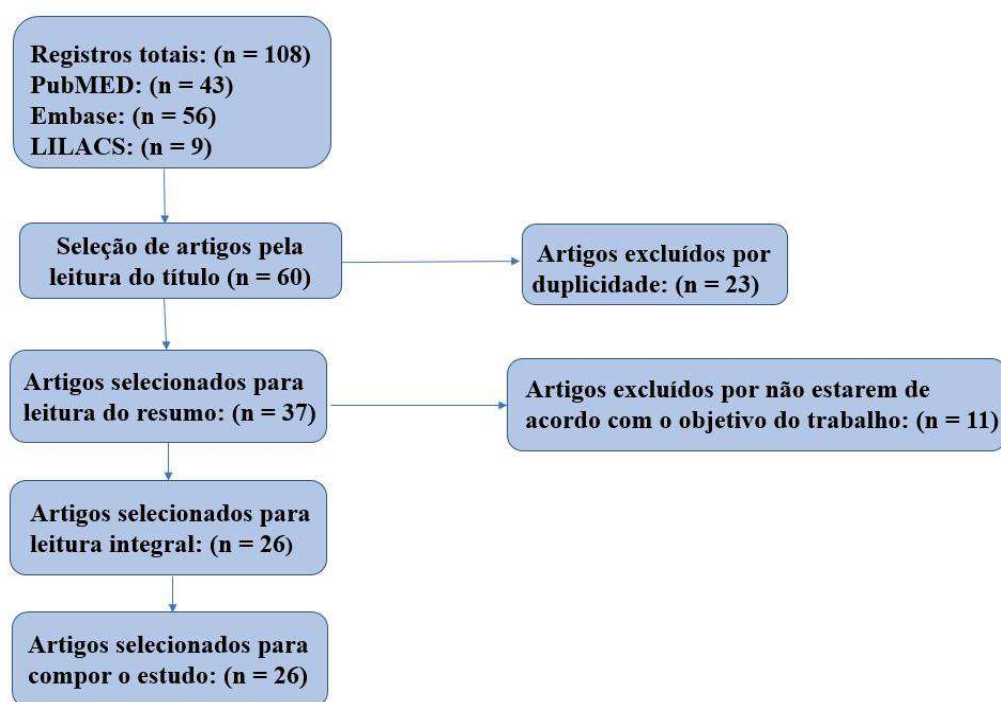
Foi utilizado o acesso institucional da Universidade Federal do Ceará nas bases de dados, a fim de aumentar a disponibilidade de acesso dos artigos.

Os resultados e a discussão foram abordados de forma descritiva, apresentando as técnicas de processamento de amostras biológicas e a análise cromatográfica em diferentes combinações de aparelhos de separação e detecção.

5 RESULTADOS

A busca nas bases de dados e leitura inicial dos títulos resultou na seleção de 60 artigos. Após a exclusão dos artigos duplicados, foram selecionados 37 artigos para a leitura dos resumos. Em seguida, foram selecionados 26 trabalhos para leitura integral e verificou-se que todos contemplavam o tema do presente estudo. A Figura 18 mostra o método de seleção dos artigos em um fluxograma.

Figura 18 - Fluxograma do método de seleção dos artigos



Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Todos os 26 artigos selecionados foram encontrados em língua inglesa. A quantidade de artigos selecionada de cada base de dados foi de 1 artigo na plataforma LILACS, 23 artigos na base *PubMed* e 2 trabalhos na plataforma *Embase*. Em relação ao local de origem dos artigos, Alemanha foi o país com maior quantidade de estudos escolhidos (5 artigos). Brasil, China e Índia, individualmente, tiveram 4 artigos considerados para o presente trabalho. A Tabela 1 apresenta a distribuição completa dos artigos pelo país de origem do estudo.

Tabela 1 - País de origem dos artigos selecionados

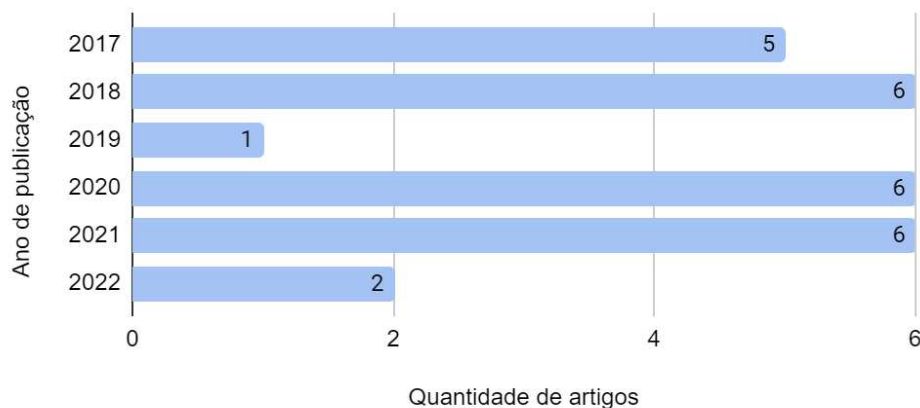
País de origem	Quantidade de artigos
Alemanha	5
Brasil	4
China	4
Colômbia	1
Estados Unidos	2
Grécia	1
Índia	4
Irã	1
Japão	1
Paquistão	1
Polônia	1
Suécia	1

TOTAL = 26

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

No que diz respeito ao ano de publicação dos estudos escolhidos, 2018, 2020 e 2021 contabilizam 12 trabalhos (6 artigos em cada ano), 2017 figura com 5 trabalhos, 2022 com 2 publicações e 2019 com 1 estudo. O Gráfico 2 mostra a distribuição dos artigos escolhidos por ano de publicação e o Quadro 4 apresenta o título, ano de publicação, país de origem e objetivos de cada artigo selecionado.

Gráfico 2 - Distribuição dos artigos selecionados por ano de publicação



Fonte: elaborado pelo autor (2022)

Quadro 4 - Distribuição dos artigos selecionados por título, autoria, nacionalidade e objetivo (continua)

N°	Título do artigo	Autores (Ano)	País de origem	Objetivo
1	<i>A Method for Diagnosing Organophosphate Pesticide Exposure in Humans Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>	Indapurkar et al. (2020)	Estados Unidos	Apresentar novo método de extração e quantificação de pesticidas organofosforados usando colunas de rotação de contas de agarose de proteína G
2	<i>A toolbox for microbore liquid chromatography tandem-high-resolution mass spectrometry analysis of albumin adducts as novel biomarkers of organophosphorus pesticide poisoning</i>	Wellen et al. (2018)	Alemanha	Desenvolvimento de ferramenta para otimizar método de identificação e detecção sistemática de adutos-albumina sérica humana provenientes da interação com organofosforados
3	<i>Antemortem and postmortem rodenticide analysis in forensic toxicology as a part of an LC-MS/MS-based multi-target screening strategy</i>	Arens et al. (2021)	Alemanha	Desenvolvimento de estratégia de screening com múltiplos alvos baseada em preparações simples e rápidas de amostras com rodenticidas relevantes
4	<i>Characterization of Bromethalin and its Degradation Products in Veterinary Toxicology Samples by GC-MS-MS</i>	Lehner et al. (2019)	Estados Unidos	Caracterizar produtos de degradação da brometalina e determinar quais produtos são cruciais para avaliação forense em GC-MS nas exposições à brometalina; otimizar método para máxima detectabilidade em GC-MS ou GC-tandem
5	<i>Clinical utility of validated gas chromatography-ion trap mass spectrometry in patients with anticholinesterase poisoning</i>	Adole et al. (2021)	Índia	Otimizar e validar método GC- IT/MS para quantificar 12 pesticidas anticolinesterásicos no soro de pacientes com intoxicação e correlacionar com atividade da pseudocolinesterase, tempo de estadia no hospital, dosagem total de atropina e desfecho clínico

Quadro 4 - Distribuição dos artigos seleccionados por título, autoria, nacionalidade e objetivo (continuação)

N°	Título do artigo	Autores (Ano)	País de origem	Objetivo
6	<i>Determination of Aldicarb, Carbofuran, and Methamidophos in blood derived from forensic cases through Liquid Chromatography with electrospray ionization and Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS)</i>	Mariño e Patiño (2020)	Colômbia	Desenvolvimento e validação de metodologia com LC-ESI-MS/MS para determinação simultânea de aldicarb, carbofuran e metamidofós em pequeno volume de sangue de indivíduos mortos com presunção de intoxicação aguda com algum desses pesticidas
7	<i>Development and Validation of a Quantitative UHPLC–MS-MS Method for the Determination of Alpha-Chloralose in Feline Blood and Application on Blood Samples Collected from Cats with Symptoms of Alpha-Chloralose Poisoning</i>	Windhal <i>et al.</i> (2022)	Suécia	Investigar se alfa-cloralose pode ser detectada em amostras de 20 gatos (individualmente) com diagnóstico preliminar de intoxicação por rodenticidas anticoagulantes e, se sim, quantificar os níveis e apresentar a variação das concentrações detectadas
8	<i>Development and validation of carbofuran and 3-hydroxycarbofuran analysis by high-pressure liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) for Forensic Veterinary Medicine</i>	Gonçalves Junior <i>et al.</i> (2017)	Brasil	Validar métodos analíticos para HPLC-DAD fase reversa para identificação e quantificação de carbofuran e 3-hidroxicarbofuran em conteúdo gástrico, fígado, humor vítreo e sangue
9	<i>Development method of high-performance thin layer chromatographic detection of synthetic organophosphate insecticide profenofos in visceral samples</i>	Pawar <i>et al.</i> (2019)	Índia	Mostrar novo reagente spray para identificação de profenofós em amostras de vísceras nos casos de intoxicação utilizando método de HTPLC

Quadro 4 - Distribuição dos artigos selecionados por título, autoria, nacionalidade e objetivo (continuação)

N°	Título do artigo	Autores (Ano)	País de origem	Objetivo
10	<i>Development of an Analytical Procedure for the Determination of Multiclass Compounds for Forensic Veterinary Toxicology</i>	Sell <i>et al.</i> (2018)	Polônia	Desenvolver método simples e de baixo custo envolvendo SPE dispersiva (QuEChERS) ao invés de SPE clássica ou LLE e utilizando LC-MS/MS para determinar 61 substâncias potencialmente tóxicas em amostras frescas de fígado
11	<i>Development of HPTLC detection of synthetic pesticide carbosulfan in biological material</i>	Pawar <i>et al.</i> (2021)	Índia	Descrever novo método de determinação de carbosulfan em amostras biológicas por HTPLC
12	<i>Drugs, pesticides and metabolites in forensic post-mortem blood samples</i>	Ferrari Júnior <i>et al.</i> (2020)	Brasil	Aplicar método analítico previamente validado (PTV-LVI-GC/MS) para análise quantitativa de 14 drogas, pesticidas e metabólitos em amostras de sangue <i>postmortem</i> obtidas de casos forenses reais investigados no IML-DF
13	<i>Evidence of exposure to organophosphorus toxicants by detection of the propionylated butyrylcholinesterase-derived nonapeptide-adduct as a novel biomarker</i>	John <i>et al.</i> (2021)	Alemanha	Adequar anidrido propiônico (composto que se incorpora ao aduto de BChE) para derivatização antes da análise por μ LC-MS/MS e aplicar método em casos reais de intoxicação
14	<i>Experimental central composite design-based dispersive liquid-liquid microextraction for HPLC-DAD determination of diazinon in human urine samples: method development and validation</i>	Mohammadzahari <i>et al.</i> (2020)	Irã	Utilizar desenho experimental e desenvolver método de DLLME-HPLC-DAD rápido, simples, barato e específico para determinar diazinon em amostras de urina humana para análise de rotina em laboratórios de toxicologia clínica e forense

Quadro 4 - Distribuição dos artigos selecionados por título, autoria, nacionalidade e objetivo (continuação)

Nº	Título do artigo	Autores (Ano)	País de origem	Objetivo
15	<i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of nine insecticides and fungicides in human postmortem blood and urine</i>	Mouskeftara <i>et al.</i> (2021)	Grécia	Desenvolver método de determinação dos mais tóxicos dentre os pesticidas mais difundidos, com uso legal e ilegal na Grécia, pela seleção das características dos componentes de cada grupo
16	<i>Method Validation for simultaneous determination of atropine, pralidoxime and 12 organophosphorus compounds in blood samples by means of high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)</i>	Marques <i>et al.</i> (2018)	Brasil	Desenvolver método completamente válido de LC-MS/MS para análise combinada em amostras de sangue de 12 compostos organofosforados
17	<i>Modified QuEChERS extraction method followed by simultaneous quantitation of nine multi-class pesticides in human blood and urine by using GC-MS</i>	Iqbal <i>et al.</i> (2020)	Paquistão	Isolamento de nove pesticidas de diferentes classes, baseada na extração QuEChERS modificada em sangue e em urina; Quantificação simultânea em GC/MS com ionização por impacto de elétrons
18	<i>Novel cysteine and albumin-adduct biomarkers to prove human poisoning with the pesticide oxydemeton-S-methyl</i>	John <i>et al.</i> (2018)	Alemanha	Provar incorporação do oxidemeton-S-metil (ODM) nas cadeias proteicas em um caso real de intoxicação suicida
19	<i>Postmortem distribution of chlorpyrifos-methyl, fenitrothion, and their metabolites in body fluids and organ tissues of an intoxication case</i>	Takayasu <i>et al.</i> (2017)	Japão	Apresentar caso de intoxicação aguda com clorpirifós-metil e fenitrothion, com a determinação desses compostos e de seus metabólitos TCPY e 3MNP, respectivamente, com GC-MS

Quadro 4 - Distribuição dos artigos selecionados por título, autoria, nacionalidade e objetivo (continuação)

N°	Título do artigo	Autores (Ano)	País de origem	Objetivo
20	<i>Sensitive and simultaneous determination of nine anticoagulant rodenticides in human blood by UPLC–MS-MS with phospholipid removal pretreatment</i>	Guo <i>et al.</i> (2018)	China	Desenvolver método sensível, rápido e viável para boa recuperação e diminuição do efeito matriz para determinação simultânea de 9 rodenticidas
21	<i>Sensitive determination of nine anticoagulant rodenticides in blood by high resolution mass spectrometry with supported liquid extraction pretreatment</i>	Gao <i>et al.</i> (2018)	China	Desenvolver método sensível e seletivo de determinação de rodenticidas em sangue com SLE e HRMS
22	<i>Simultaneous Determination of 13 Anticoagulant Rodenticides in Human Blood by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry and its Application in Three Poisoning Cases</i>	Qiao <i>et al.</i> (2018)	China	Desenvolver método LC-MS/MS simples, rápido e sensível com extração líquido-líquido para screening e determinação simultânea de 13 rodenticidas anticoagulantes em amostras de sangue total
23	<i>Simultaneous determination of multiclass pesticide residues in human plasma using a mini QuEChERS method</i>	Srivastava <i>et al.</i> (2017)	Índia	Desenvolvimento de método para GC-MS/MS usando método mini QuEChERS para preparo da amostra e quantificação simultânea de resíduos de pesticidas de classes diversas em plasma humano
24	<i>Simultaneous measurement of six biomarkers of dichlorvos in blood by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap mass spectrometry</i>	Li <i>et al.</i> (2022)	China	Estabelecer método com ddHRMS/MS para detecção de seis biomarcadores de diclorvós em metabólitos, adutos de BChE e adutos de albumina em amostras de sangue

Quadro 4 - Distribuição dos artigos selecionados por título, autoria, nacionalidade e objetivo (conclusão)

Nº	Título do artigo	Autores (Ano)	País de origem	Objetivo
25	<i>Use of bone marrow for detection of toxic chemicals for the elucidation of poisoning in forensic veterinary medicine</i>	Marcelino <i>et al.</i> (2020)	Brasil	Investigar a presença de compostos tóxicos na medula óssea de cães e gatos com suspeita de intoxicação exógena
26	<i>Verification of organophosphorus pesticide poisoning: Detection of phosphorylated tyrosines and a cysteine-proline disulfide-adduct from human serum albumin after intoxication with dimethoate/omethoate</i>	Kranawetvogl <i>et al.</i> (2018)	Alemanha	Identificar possíveis adutos dissulfito do grupo tiolato do ometoato e dimetoato com albumina sérica humana, bem como sua avaliação como novos biomarcadores para intoxicação por ometoato e dimetoato

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Em relação à natureza das amostras biológicas utilizadas, 18 artigos (69%) utilizaram fluidos e tecidos humanos, 6 estudos (23%) utilizaram material biológico animal e em 2 artigos (8%) não foi possível determinar a origem da amostra. A amostra predominantemente usada nos estudos foi o sangue (sangue total, plasma e soro). Outras amostras utilizadas foram urina, humor vítreo, medula óssea, vísceras (pulmão, fígado, rim, intestino, baço, estômago) e conteúdo gástrico.

Sobre os compostos praguicidas mais abordados nos estudos, Aldicarb e Carbofuran foram os mais estudados dentre os carbamatos. Entre a classe de organofosforados, as substâncias mais abordadas foram Clorpirifós, Diclorvós, Profenofós, Terbufós, Parathion e Diazinon. Em relação aos rodenticidas, os compostos químicos mais tratados nos artigos foram brodifacoum, varfarina, bromadiolona e cloralose. Quanto à abordagem de biomarcadores nos estudos, foram utilizadas a Butirilcolinesterase (BChE) e alguns metabólitos de IOFs, como 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCPY), metabólito do clorpirifós-metil e 3 metil-4-nitrofenol (3MNP), metabólito do fenitrothion. O Quadro 5 mostra os principais compostos praguicidas e biomarcadores abordados nos estudos, além de outras substâncias apresentadas ao longo dos trabalhos.

Quadro 5 - Principais substâncias químicas abordadas nos estudos selecionados

Classificação da substância	Compostos químicos
Carbamatos	Aldicarb, Carbofuran, Bendiocarb, Carbaryl, Dioxacarb, Propoxur, Carbosulfan, Metiocarb, Pirimicarb, Metomil
Organofosforados	Clorpirifós, Diclorvós, Profenofós, Parathion, Malathion, Terbufós, Diazinon, Dimetoato, Metamidofós, Ometoato, Pirazofós
Rodenticidas	Cloralose, Varfarina, Brodifacoum, Bromadiolone, Coumatetralil, Difenacoum, Brometalina, Clorofacinona, Flocoumafen, Coumaclor, Dicumarol, Pindona, Estricnina
Biomarcadores	Butirilcolinesterase (carbamatos e organofosforados), 3-hidroxicarbofuran, TCPY, 3MNP, alfa-cloralose, desmetilbrometalina
Outros	Permetrina, Trifloxysulfuron, Haloperidol, Diazepam, Fenobarbital, Fenacetina, Cocaína, MDMA, THC, Paracetamol, Lidocaína, Cafeína, Atropina, Pralidoxima

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Em relação ao processamento de amostras biológicas dos estudos selecionados, as extrações relatadas nos artigos ocorreram pelo método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), extração líquido-líquido (LLE), Extração em fase sólida (SPE), Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME), Extração sólido-líquido (SLE), Imunoprecipitação e separação imunomagnética (IMS). Outros procedimentos realizados nos experimentos foram a precipitação de proteínas, a ultrafiltração, a proteólise e a derivatização.

No que tange às técnicas cromatográficas aplicadas, os estudos tratam sobre a utilização de *High-Performance Thin-Layer Chromatography* (HPTLC), ou Cromatografia em Camada Delgada de Alto Desempenho; *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE); *Ultra Fast Liquid Chromatography* (UFLC); *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC); e *Gas chromatography* (GC), ou cromatografia Gasosa (CG). Os detectores utilizados nas técnicas de HPLC, UFLC e CG foram *Mass Spectrometry* (MS), ou Espectrometria de Massas (EM); *Tandem Mass Spectrometry* (MS/MS); e Detector de Arranjo de Diodos (DAD).

6 DISCUSSÃO

6.1 Amostras biológicas

6.1.1 Sangue e urina

As amostras de sangue utilizadas nos estudos foram de plasma, soro ou sangue total. Plasma (sobrenadante obtido por centrifugação do sangue adicionado de anticoagulante) e soro (plasma sem os fatores de coagulação obtido por coagulação sanguínea) foram utilizados quando o paciente estava vivo ou era um indivíduo saudável, enquanto as amostras de sangue total foram empregadas em análises *postmortem*. Lisboa (2016) diz que se o objetivo da análise for a quantificação de xenobióticos, o sangue total é a amostra de escolha para a análise, já que essas substâncias possuem afinidades diversas pelas proteínas e podem estar ligadas a elas no plasma ou no soro, sendo eventualmente descartadas. Além disso, a formação de coágulos após a morte dificulta a análise em plasma ou soro, sendo o sangue total a melhor amostra. As amostras de plasma ou soro foram utilizadas tanto para a determinação direta dos praguicidas quanto de biomarcadores, com intuito de correlacionar com quadro clínico do paciente, doses de antídotos administradas, tempo de estadia no hospital e desfecho clínico. Dessa forma, entende-se que a análise desses dois materiais biológicos é essencial no contexto da toxicologia clínica, enquanto o sangue total se mostra a melhor alternativa no contexto da toxicologia forense.

Em relação à utilização da urina, foram utilizadas tanto amostras de urina de indivíduos vivos quanto de cadáveres para detecção de carbamatos e IOFs, além de alguns metabólitos (TCPY e 3MNP). O artigo 15 traz a aplicação de um método de análise em que amostras de sangue e de urina *postmortem* são processadas da mesma maneira, com diferença apenas de solvente extrator (acetonitrila para sangue e metanol-água 50:50 (v/v) para urina). Os limites de detecção e de quantificação dos carbamatos e IOFs foi semelhante em ambas as amostras, demonstrando que o método pode ser aplicado nos dois tipos de amostra e com pequenas quantidades de material (50 µL).

6.1.2 Medula óssea

O artigo 25 realiza a análise forense utilizando medula óssea como amostra biológica. A utilização dessa amostra é interessante quando se há um intervalo *postmortem* prolongado e um cadáver em avançado estado de decomposição, pois é um tecido altamente vascularizado, bem protegido pelo osso e que possui boa matriz lipídica, possibilitando a deposição de composto químicos. Os pesquisadores utilizaram um *pool* de amostras de ossos longos (fêmur, tibia e úmero), pois o conteúdo de apenas um osso seria insuficiente para a realização dos testes. Além disso, é comentado no artigo que a utilização de vértebras, como ocorre comumente, foi substituída pelos ossos longos por causa do tamanho dos canalículos medulares, pois os ossos longos possuem canais maiores e, conseqüentemente maior quantidade de amostra a ser coletada. A extração dos compostos químicos foi realizada pelo método QuEChERS e a análise foi realizada em LC-MS. O limite de detecção dos compostos químicos (aldicarb, diclorvós, clorpirifós, aldicarb sulfona) foi de 5.0 ppb e o limite de quantificação foi de 10.0 ppb.

6.1.3 Vísceras e conteúdo gástrico

As vísceras (pulmão, fígado, rim, intestino, baço, estômago) utilizadas nos trabalhos foram manipuladas de forma isolada ou em conjunto, como um *pool* de amostra e foram coletadas de indivíduos que foram a óbito com suspeita de intoxicação por IOFs, carbamatos e rodenticidas, mas também foram utilizadas amostras “limpas” em que foram adicionadas concentrações conhecidas de praguicidas, principalmente em trabalhos para desenvolvimento e validação de método.

O artigo 19 traz um caso de intoxicação por organofosforados em que se objetiva verificar a distribuição *postmortem* destes praguicidas e de seus metabólitos. Verificou-se que as maiores concentrações de substâncias foram encontradas em conteúdo gástrico, seguidas pelos pulmões. A Figura 19 traz as concentrações dos compostos químicos encontradas em cada tipo de amostra biológica.

Figura 19 - distribuição *postmortem* de compostos organofosforados e seus metabólitos

Summary of concentrations for chlorpyrifos-methyl (CPFM), 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPY), fenitrothion (MEP), and 3-methyl-4-nitrophenol (3MNP) in the body fluids and organ tissues.

Substance	CPFM	TCPY	MEP	3MNP
Heart blood	27.8	56.2	17.2	2.82
Peripheral blood	6.60	42.9	1.80	2.59
Urine	0.0821	45.9	2.09	102
Urine (G)		55.7		271
Stomach contents	73,500	9750	232,000	1880
Brain (P 1)	21.4	26.6	76.2	3.83
Brain (P 2)	8.10	39.5	38.8	5.64
Brain (P 3)	16.9	39.2	71.9	5.69
Left lung	112	133	263	22.6
Right lung	101	155	275	26.7
Liver	16.1	101	9.67	1.26
Left kidney	6.35	130	17.7	53.1
Right kidney	7.45	101	21.4	26.1

Unit: µg/g; Urine (G), urine concentration after glucuronidase treatment; Brain (P 1-3) are (P1, frontal), (P2, occipital) and (P3, temporal) portion of the cerebrum, respectively.

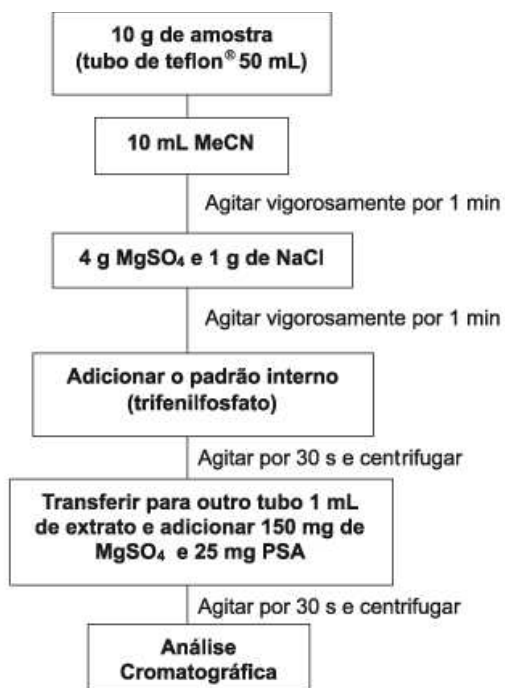
Fonte: TAKAYASU *et al.* (2017)

6.2 Processamento de amostras

6.2.1 Método QuEChERS

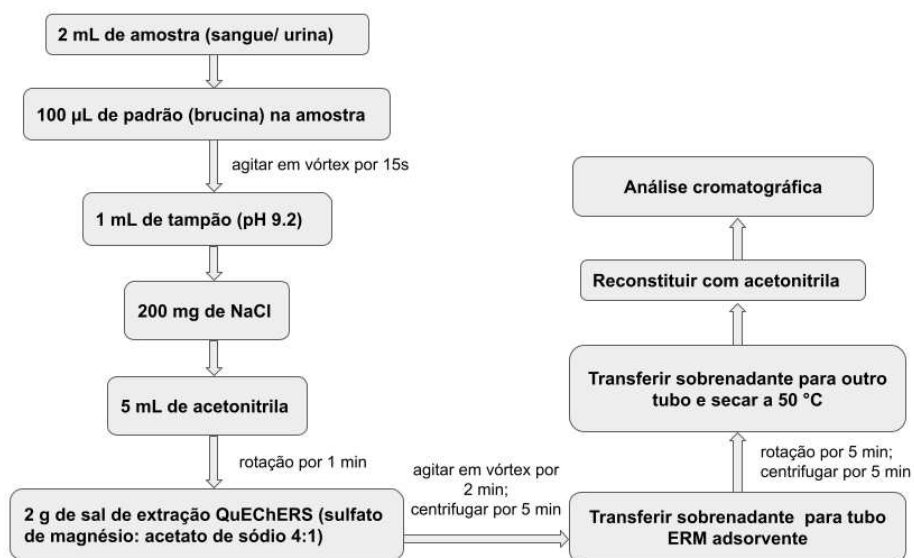
O método QuEChERS foi utilizado nos artigos 2, 10, 17, 23 e 25. É um tipo de extração SPE que busca atingir rendimento máximo utilizando solventes miscíveis em água, como acetonitrila, e sais ou agentes tamponantes em altas concentrações (criar separação de fases pelo efeito *salting-out*, além de ajustar pH e retirar água das amostras) (MERCK, c2022). Esse método combina três etapas, que devem ser feitas em sequência: extração com acetonitrila, partição por *salting-out* e *clean-up* por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) (AMARAL, 2018). Os estudos 17 e 25 realizaram um método QuEChERS modificado, mas apenas o estudo 17 especifica as etapas realizadas. Os outros estudos trazem a extração da forma tradicional. A Figura 20 mostra o esquema de extração QuEChERS tradicional e a Figura 21 mostra o esquema de extração modificado.

Figura 20 - Método QuEChERS original



Fonte: PRESTES *et al.* (2009). Legenda:
MeCN = Acetonitrila; NaCl = Cloreto de
sódio; MgSO₄ = Sulfato de magnésio; PSA =

Figura 21 - Método QuEChERS modificado



Fonte: adaptado de IQBAL *et al.* (2020). Legenda: NaCl = Cloreto de sódio

O solvente utilizado nas duas técnicas foi a acetonitrila, que possui diversas vantagens: solubilidade em água, pois o método foi desenvolvido inicialmente para alimentos, e há maior penetração do solvente na amostra; extração de menos ceras, gorduras e pigmentos; extração de substâncias de diferentes polaridades (AMARAL, 2018). Como desvantagem, é uma substância com certa toxicidade e apresenta aumento no volume de expansão durante a vaporização na análise por CG, mas ainda é compatível com CG-MS (PRESTES *et al.*, 2009).

Para a partição, foi utilizado sulfato de magnésio nos dois métodos, mas também foi utilizado acetato de sódio no QuEChERS modificado. A utilização de NaCl proporciona menor coextração de componentes da matriz quando utilizado com o sulfato de magnésio (AMARAL, 2018). A utilização de diversos sais tem como objetivo potencializar o efeito *salting out*. A adição dessas substâncias promove a diminuição da solubilidade de compostos polares na fase aquosa, aumentando a quantidade recuperada desses analitos. Na extração com acetonitrila, a utilização de sais melhora a separação de fases, além de ser uma etapa rápida, barata e que não causa diluição (PRESTES *et al.*, 2009). Além disso, o QuEChERS modificado necessitou de menor quantidade de reagentes e de amostra para sua realização.

A utilização do vórtex para agitação é importante para melhorar o contato entre o solvente extrator e a amostra, além de diminuir o tempo necessário de agitação.

No método tradicional é utilizado o etilenodiamino-n-propilsilano (PSA) como sorvente para remover coextratos que podem estar presentes na matriz. Essa estratégia é denominada extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) e tem como finalidade realizar a limpeza e secagem simultânea do extrato obtido (AMARAL, 2018). O QuEChERS modificado traz o tubo com uma substância adsorvente que passa por agitação e centrifugação para melhorar o *clean-up*, mas a secagem é realizada em seguida separadamente, adicionando mais uma etapa ao método. O Quadro 6 mostra o limite de detecção e de quantificação nos estudos que realizaram o método QuEChERS.

Quadro 6 - Limite de detecção e de quantificação dos estudos com utilização do método QuEChERS

Nº	QuEChERS	Limite de detecção	Limite de quantificação
2	original	< 0,04mmol/L	-
10	original	entre 0.5 e 27.3 µg/kg	entre 5 e 50 µg/kg
17	modificado	0,01 mg/L	2,0 mg/L
23	original (mini)	0,00012 mg/L	0,01353 mg/L
25	modificado	0,005 mg/L	0,01 mg/L

Fonte: elaborado pelo autor (2022)

Segundo Amaral (2018), o limite de detecção corresponde à menor concentração em que é possível detectar o analito, mas sem garantir precisão e exatidão, enquanto o limite de quantificação corresponde à menor concentração do analito em que é possível determinar o analito, garantindo a precisão e a exatidão. No estudo 23, o limite de detecção e quantificação dos analitos foi menor mesmo utilizando-se o método QuEChERS original. Entretanto, deve-se considerar que o equipamento utilizado é um Cromatógrafo Gasoso com Espectrometria de Massas Tandem, enquanto o estudo 17 utiliza Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas. Além disso, o estudo 23 utiliza menores quantidades de amostra e reagente (mini-QuEChERS). Segundo Stevens (2011), o método QuEChERS miniaturizado é mais sustentável do ponto de vista biológico, por utilizar menores volumes de solventes, além de necessitar de menor quantidade de amostra. Além disso, também proporciona boa extração e recuperação de analitos. Os limites de detecção dos outros estudos estão expressos em unidades diferentes, o que dificulta uma comparação.

6.2.2 Imunoprecipitação e Separação Imunomagnética

A utilização de imunoenaios nos estudos 1 e 13 teve o mesmo propósito: extração da butirilcolinesterase (BChE), enzima inibida por carbamatos e organofosforados. No estudo 1, utilizou-se o método de imunoprecipitação e, no estudo 2, foi utilizada a Separação Imunomagnética (IMS). Os dois trabalhos utilizaram o plasma como amostra biológica, mas a análise cromatográfica foi realizada por equipamentos diferentes: no trabalho 1 utilizou HPLC-MS/MS, enquanto

no estudo 13 utilizou-se LC-MS/MS (foi necessário realizar a derivatização, para não degradar o analito).

A imunoprecipitação é uma técnica utilizada para enriquecer ou purificar uma proteína específica ou um grupo de proteínas (antígenos) de uma mistura com o uso de um anticorpo imobilizado em um suporte sólido, ligados covalentemente ou não a imunoabsorventes como agarose de proteína A e de proteína G. Além disso, permite detectar a presença de alterações em proteínas (PELITZ, 2019; THERMO SCIENTIFIC, c2009). O estudo 1 objetivou mostrar método para detectar a presença e quantificar BChE inalterada ou com adutos de pesticidas organofosforados (parathion e diclorvós) acoplados à estrutura da enzima, analisando uma sequência peptídica específica no HPLC-MS/MS. O método conseguiu detectar tanto BChE com adutos quanto sem a presença desses componentes, sendo possível realizar a comparação entre as estruturas. Dessa forma, mostrou-se que o método poderia ser utilizado para avaliação retrospectiva de exposição a praguicidas IOFs por conseguir detectar inclusive adutos mais antigos BChE-IOFs ao analisar a relação massa carga desses compostos. Os limites de detecção e de quantificação dos compostos são semelhantes e baixos, demonstrando que o método de análise tem uma sensibilidade satisfatória. O Quadro 7 mostra o limite de detecção e de quantificação da BChE e dos adutos na cadeia peptídica.

Quadro 7 - Limite de detecção e de quantificação de BChE e de adutos

Peptídeos	Limite de detecção (ng/mL)	Limite de quantificação (ng/mL)
BChE	0.20	0.22
Dietoxifosfo	0.08	0.11
Etoxifosfo envelhecido	0.04	0.22
Dimetoxifosfo	0.24	0.22
Metoxifosfo envelhecido	0.22	1.57

Fonte: INDAPURKAR *et al.* (2021)

Segundo Sporty e colaboradores (2010), a separação imunomagnética (IMS) utiliza anticorpos altamente específicos para extrair a proteína de interesse. Os grânulos magnéticos são conjugados com proteína G e se realizam ligação cruzada com anticorpos anti-proteína (no caso, BChE). A extração ocorre após incubação e

digestão enzimática para gerar peptídeos que podem ser analisados. O estudo 13 utilizou a IMS para separar a BChE complexada com adutos (resultado de contato com praguicidas organofosforados) para realizar a derivatização e posterior análise em μ LC-MS/MS. O objetivo geral do estudo era desenvolver um método de derivatização com anidrido propiônico ligado aos adutos de BChE como proposta de novo biomarcador e verificou-se que esses compostos tiveram estabilidade garantida por 24h, sendo útil como um biomarcador de exposição.

6.3 Análises Cromatográficas

6.3.1 HPTLC

Os estudos 9 e 11 tratam do desenvolvimento de um reagente spray revelador em análises de HTPLC. O quadro 8 mostra as características de cada método em relação ao agente detectado, à composição do reagente revelador, fase móvel e fase estacionária do sistema cromatográfico.

Quadro 8 - Características do sistema de HTPLC dos artigos selecionados

Nº	Agente detectado	Fase estacionária	Fase móvel	Composição do revelador
9	Profenofós	Sílica gel	Hexano:Acetona (7:3 v/v)	(A1): NaOH 10% (B1): 4 g de $\text{Cu}_2(\text{OAc})_4$ em 100 mL de água destilada
11	Carbosulfan	Sílica gel	Hexano:Acetona (4:1, v/v)	(A2): NaOH 10% (B2): 2g de NaNO_2 + 2g de $\text{Cu}_2(\text{OAc})_4$ em 100 mL de água destilada

Fonte: elaborado pelo autor (2022)

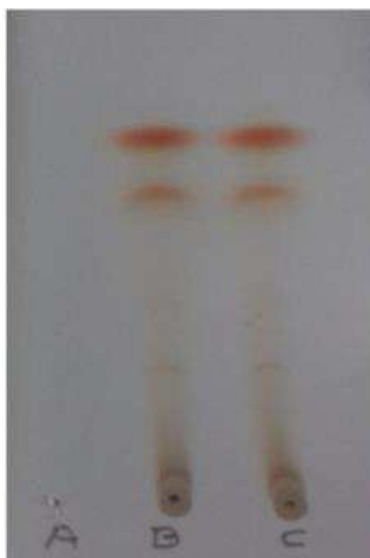
No estudo 9, o reagente A1 deve ser aplicado 15 minutos antes do reagente B1 e deve-se deixar a placa secar a 120 °C por 10 minutos, enquanto no estudo 11, a aplicação do reagente A2 deve ocorrer 10 minutos antes do reagente B2 e a placa deve secar a 100 °C por 15 minutos. As Figuras 22 e 23 mostram as placas cromatográficas dos estudos 9 e 11, respectivamente, após revelação com spray reagente.

Figura 22 - Placa cromatográfica de análise de profenofós



Fonte: PAWAR *et al.* (2020).
Legenda: a) branco (vísceras), b) vísceras com profenofós, c) padrão de profenofós

Figura 23 - Placa cromatográfica de análise de carbosulfan



Fonte: PAWAR *et al.* (2021).
Legenda: a) branco (apenas vísceras), b) vísceras com carbosulfan, c) padrão de carbosulfan

O profenofós (artigo 9) se mostrou com coloração marrom após a revelação e com Rf (fator de retenção) de 0,44, enquanto o carbosulfan (artigo 11) resultou em duas bandas de tom rosado, com Rfs de 0.48. e 0.64.

Os dois métodos possuem limite de detecção de 4 µg e tem como vantagem a ausência de condições críticas reacionais que poderiam atrapalhar a análise. São reveladores específicos para profenofós e carbosulfan, não funcionando para outros compostos químicos, mesmo que pertençam à mesma classe. Além disso, permitem apenas a identificação dos praguicidas referidos, sendo necessária a utilização de outras técnicas para quantificação dessas substâncias químicas.

6.3.2 HPLC, GC/MS e variações

A utilização de cromatografia líquida foi relatada em 18 artigos, enquanto a cromatografia gasosa foi utilizada em 6 trabalhos. O Quadro 9 mostra as principais variações de equipamentos cromatográficos aplicadas nos estudos.

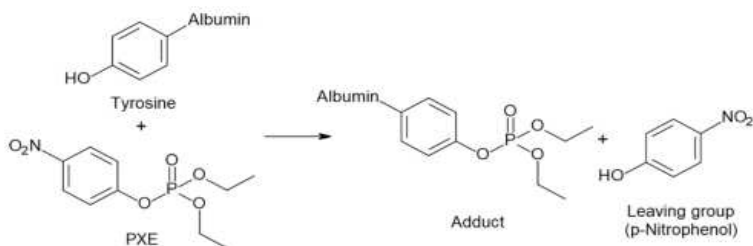
Quadro 9 - Variações de cromatografia líquida e gasosa utilizadas nos estudos

Tipo de cromatografia	Principais variações de equipamento
Cromatografia líquida	UFLC, LC-MS, LC-MS/MS, HPLC-MS/MS, µLC-ESI MS/HRMS, HPLC-DAD, UHPLC-HRMS/MS
Cromatografia gasosa	GC-MS, GC-MS/MS, GC-IT/MS, PTV-LVI-GC/MS

Fonte: elaborado pelo autor (2022)

A µLC foi aplicada na detecção de adutos formados por organofosforados combinados com BChE e algumas proteínas, como a albumina humana. Adutos correspondem à combinação entre duas substâncias químicas, em um processo de adição (International Union of Pure and Applied Chemistry, c2014). A Figura 24 mostra a formação de aduto por combinação de um metabólito de praguicida organofosforado com albumina.

Figura 24 - Formação de aduto



Fonte: WELLEN *et al.* (2018). Legenda: PXE = paraoxon-etil (metabólito de IOF)

Após metabolização pelo fígado, metabólitos reativos de IOFs se ligam covalentemente às proteínas e à BChE, formando os adutos. Essas moléculas possuem tempo de meia-vida mais longo e podem ser detectadas dias ou até semanas após a exposição (WELLEN *et al.*, 2018). Em todos os estudos que utilizaram μ LC, a detecção foi realizada com espectrômetro de massas e, a fim de potencializar a detecção dos adutos, alguns utilizaram MS/MS de alta resolução. A utilização de MS com ionização por *electrospray* (ESI) possibilita a caracterização de substâncias voláteis e não voláteis, com alta ou baixa estabilidade térmica e com altos e baixos pesos moleculares. A ionização ocorre pela dessorção de íons que foram anteriormente produzidos a partir de gotículas de solventes carregadas de uma fonte tradicional de ESI (TOSE, 2018). O Quadro 10 mostra o limite de detecção dos biomarcadores estudados.

Quadro 10 - Limite de detecção em análises de biomarcadores por μ LC

Biomarcador	Tipo de μ LC	Limite de detecção
Aduto de IOF + Pronase/Pepsina/Tripsina	μ LC-ESI MS/HRMS	$\leq 4 \mu\text{M}$
Aduto de IOF + BChE	μ LC-MS/MS	-
Aduto de IOF + Albumina	μ LC-ESI HRMS	0.15 a 120 μM
Aduto de IOF + Albumina	μ LC-ESI MS/HRMS	1.2 a 120 μM

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Os limites de detecção variam pela diferença de massa molecular de cada aduto, pois diferentes metabólitos de IOFS podem conjugar-se às proteínas e enzimas.

Ao comparar-se HPLC e UHPLC, o segundo equipamento possui as vantagens de necessitar de menor volume de amostra, maior rapidez menor consumo de fase móvel, maior qualidade de resolução dos picos cromatográficos, além de aumentar a detectabilidade e diminuir o limite de quantificação (OSHITA; JARDIM, 2015).

O detector utilizado na maioria das análises foi o espectrômetro de massas *tandem*. Apenas um trabalho utilizou detector de arranjos de diodo. Segundo McLafferty (1981), o acoplamento de vários espectrômetros de massa (*tandem*) proporciona maior especificidade e resposta quase instantânea. A ionização e seleção de compostos primários ocorre no primeiro aparelho. O segundo aparelho fragmenta os compostos primários selecionados por colisão e analisa os produtos obtidos. O detector de arranjo de diodos apresenta como vantagens o menor custo, a possibilidade de utilização de gradiente e resistência satisfatória a pequenas mudanças de fluxo e de temperatura. É um aparelho que consegue determinar os espectros das substâncias com diferentes comprimentos de onda durante a cromatografia (SIQUEIRA, 2019).

7 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise cromatográfica de praguicidas em amostras biológicas é uma metodologia amplamente empregada no contexto da toxicologia forense por fornecer resultados sensíveis e específicos em amostras complexas. As técnicas de processamento, como método QuEChERS, são essenciais para melhorar a extração do analito de interesse e otimizar o processo, além de evitar a interferência de componentes da matriz na análise.

Os compostos analisados variam entre a própria substância química, seus metabólitos e biomarcadores, como adutos formados pela combinação de metabólitos de IOFs com a butirilcolinesterase e com proteínas como a albumina. Verificou-se que os estudos abordam majoritariamente o desenvolvimento e a validação de metodologias com cromatografia líquida, além da ampla utilização de espectrômetros de massa acoplados (*tandem*).

A maioria dos métodos foi desenvolvida para aplicação em amostras não convencionais, no contexto de análise *postmortem*, mas também existem trabalhos que trazem métodos passíveis de utilização no contexto da toxicologia clínica de urgência e emergência.

O desenvolvimento de diversos métodos de processamento e análise de amostras biológicas é importante para dinamizar e otimizar o processo, além de obter resultados com boa acurácia, tendo em vista que as análises dessa natureza costumam ter maior custo e necessitam de resultados avaliados rigorosamente, pois podem desencadear um processo no âmbito penal e condenação em casos de homicídio e tentativa de homicídio.

REFERÊNCIAS

ADOLE, P. S. *et al.* Clinical utility of validated gas chromatography–ion trap mass spectrometry in patients with anticholinesterase pesticides poisoning. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 621, p. 114158, maio 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33705722/>. Acesso em: 28 out. 2022.

ALBUQUERQUE, P. L. M. M. (org.) Ficha de Informação Toxicológica: Rodenticidas cumarínicos. In: _____. **Intoxicações Agudas: Guia Prático para o Tratamento**. Fortaleza: Soneto Editora, 2017, p. 111. Disponível em: https://saude.fortaleza.ce.gov.br/images/Manuais_saude/Guia_IJF_Intoxicacoes.pdf. Acesso em: 05 nov. 2022.

ALONZO, H. G. A.; CORRÊA, C. L. Praguicidas. In: OGA, Seizi *et al.* **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 621-642.

AMARAL, B. **Avaliação do Método QuEChERS para extração de contaminantes de preocupação emergente em diferentes matrizes ambientais**. 2018. 173 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/55821/R%20-%20T%20-%20BIANCA%20DO%20AMARAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 nov. 2022.

ARENS, A. *et al.* Antemortem and postmortem rodenticide analysis in forensic toxicology as a part of an LC-MS/MS-based multi-target screening strategy. **Drug Testing and Analysis**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 1149-1154, 17 jan. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34997698/>. Acesso em: 28 out. 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILENSE DE PERITOS EM CRIMINALÍSTICA. Vestígio, Evidência e Indício. **ABPC-DF**, 2021. Disponível em: <https://www.abpc-df.com.br/post/vestigio-evidencia-e-indicio#:~:text=Indícios%3A%20Considera-se%20indicio%20a,mostram%20diretamente%20relacionado%20ao%20caso>. Acesso em: 12 out. 2022.

BOEHL, P. O. **A Utilização de Imunoensaios na Detecção de Substâncias Psicoativas**. 2011. 62 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/70119/000821947.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 05 dez. 2022.

BONACCORSO, N. S.; DIAS, J. R. M. Cadeia de Custódia e Laboratórios de Toxicologia Forense. In: MARTINIS, B. S. de; DORTA, D. J.; COSTA, J. L. **Toxicologia forense**. São Paulo: Editora Blucher, 2018.

BORDIN, D. C. M. *et al.* Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 125-143, set. 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Marcela-Alves-2/publication/282349724_Tecnicas_de_preparo_de_amostras_biologicas_com_interesse_forense/links/56dc4a7508aebe4638c02d5e/Tecnicas-de-preparo-de-amostras-biologicas-com-interesse-forense.pdf. Acesso em: 20 out. 2022.

BRASIL. **Ato nº 54, de 9 de outubro de 2012**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, nº 200, 16 de outubro de 2012, Seção 1, p. 1. Disponível em: http://www.cvs.saude.sp.gov.br/up/U_ATO-MAPA-54_091012.pdf. Acesso em: 04 fev. 2022.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 8 de janeiro de 2002. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em: 05 fev. 2022.

BRASIL. Decreto-Lei nº 3.689, de 3 de outubro de 1941. Código Processual Penal. **Diário Oficial da União**, Rio de Janeiro, 3 de outubro de 1941. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/del3689.htm. Acesso em: 07 set. 2022.

BRASIL. Lei nº 11.690, de 9 de junho de 2008. Altera dispositivos do Decreto-Lei nº 3.689, de 3 de outubro de 1941 – Código de Processo Penal, relativos à prova, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de junho de 2008. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11690.htm. Acesso em: 05 dez. 2022.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 de julho de 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm. Acesso em: 05 fev. 2022.

BRASIL. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992**. Ratifica os termos das “Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 9 de dezembro de 1991”, publicadas no D.O.U. em 13 - 12 -91. Brasília, 1992. Disponível em:

https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1992/prt0003_16_01_1992.html#:~:t=Classe%20I%20%2D%20Produtos%20Extremamente%20T%C3%B3xicos,Classe%20IV%20%2D%20Produtos%20Pouco%20T%C3%B3xicos. Acesso em: 07 fev. 2022.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução - RDC nº 177, de 21 de setembro de 2017**. Dispõe sobre a proibição do ingrediente ativo Paraquate em produtos agrotóxicos no país e sobre as medidas transitórias de mitigação de riscos. Brasília: Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA), 2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19308145/do1-2017-09-22-resolucao-rdc-n-177-de-21-de-setembro-de-2017-19308065. Acesso em: 09 fev. 2022.

BRASIL. Fundação Nacional De Saúde (FUNASA). Metodologia de Controle. *In*: _____ . **Manual de Controle de Roedores**. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2002. p. 67-129. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_roedores1.pdf. Acesso em 21 out. 2022.

BRASIL. Instituto Nacional de Criminalística Departamento de Polícia Federal (DPF). **Manual de Orientação de Quesitos da Perícia Criminal**. 1. ed. Brasília: Diretoria Técnico-Científica, 2012. Disponível em: <http://www.mpce.mp.br/wp-content/uploads/2016/03/Manual-de-orientação-de-quesitos-da-perícia-criminal.pdf>. Acesso em: 16 set. 2022.

BRONDANI, P. Cromatografia de Camada Delgada (CCD). **Universidade Federal de Santa Catarina**. Florianópolis, 2019. Disponível em: <https://patyqmc.paginas.ufsc.br/files/2019/07/Cromatografia-de-Camada-Delgada.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2022.

CALDAS, L. Q. de A. (coord). **Intoxicações Exógenas Agudas por Carbamatos, Organofosforados, Compostos Bipiridílicos e Piretróides**. Niterói: Centro de Controle de Intoxicações, 2000. Disponível em: <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/intoxicacoes%20agudas%20-%20carbamatos%20e%20organoclorados.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2022.

CARVALHO, V.M.; ROCHA, E.D. Toxicologia analítica: da triagem à confirmação. *In*: Peixe, T.S. *et al*. **Toxicologia: tópicos aplicados**. Curitiba: Brazil Publishing, 2020, p.303-347. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/348339124_TOXICOLOGIA_ANALITICA_D_A_TRIAGEM_A_CONFIRMACAO/link/5ff8b18c299bf1408880e0b0/download. Acesso em: 14 nov. 2022.

CEQUINEL, J. C.; RODRIGO, L. C. P. (org.). **Intoxicações Agudas por Agrotóxicos: Atendimento Inicial do Paciente Intoxicado**. [S. L.]: Secretaria da Saúde - Governo do Estado do Paraná, 2018. 116 p. Disponível em: https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-04/intoxicacoesagudasagrototoxicos2018.pdf. Acesso em: 30 jan. 2022.

CHASIN, A. A. da M. Análises Forenses. *In*: MOREAU, R. L. de M.; SIQUEIRA, M. E. P. B de. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

CHROMATOX. Exame toxicológico de urina: como é feito e quais drogas detecta. **Chromatox**, 2021. Disponível em: <https://www.chromatox.com.br/blog/exame-toxicologico/exame-toxicologico-urina/#:~:text=Exame%20toxicológico%20de%20urina%20é,um%20exame%20de%20larga%20detecção>. Acesso em: 12 out. 2022.

CONCEIÇÃO, V. N. *et al.* Study of Scott Test Using Spectroscopic Techniques: An Alternative Method for detecting Cocaine Hydrochloride and its Adulterants in Street drugs. **Química Nova**, [S.L.], v. 9, n. 37, n.p., 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/kW8FYM457KHsRGmHSptqPzx/?lang=pt>. Acesso em: 14 nov. 2022.

CORDEIRO, A. M. *et al.* Revisão sistemática: uma revisão narrativa. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 428-431, dez. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rcbc/a/CC6NRNtP3dKLgLPwcmV6Gf/?lang=pt>. Acesso em: 29 out. 2022.

COSTA, J. L. de. Características das Amostras Convencionais e Não-Convencionais. *In*: MOREAU, R. L. de M.; SIQUEIRA, M. E. P. B de. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

COSTA, J. L. de. Extração em fase sólida. *In*: MOREAU, R. L. de M.; SIQUEIRA, M. E. P. B de. **Toxicologia Analítica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

COSTA, M. A. F.; BRITO, N. M. Requisições de rotina e testes colorimétricos empregados em Química Forense: do preparo das soluções à descrição dos fenômenos químicos. **Revista Brasileira de Criminalística**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 105-112, 8 jul. 2020. Disponível em: <https://revista.rbc.org.br/index.php/rbc/article/view/336>. Acesso em: 14 nov. 2022.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Química Nova**, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 995-1002, nov. 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/BzwjybybkzCgvjX6tpykf9gf/?lang=pt>. Acesso em: 03 fev. 2022.

DCTECH. Entendendo o sistema de um Cromatógrafo Gasoso (CG). **DCtech Laboratory Technologies**. Itupeva, c2015. Disponível em: <https://www.dctech.com.br/entendendo-um-sistema-de-cromatografia-gasosa-cg/>. Acesso em: 18 nov. 2022.

DUNAYER, E. Bromethalin: The other rodenticide. **Veterinary Medicine**. Edwardsville, 2003, v. 98, n. 9, p. 732-736. Disponível em: https://www.aspcapro.org/sites/default/files/0903toxbrief_0.pdf. Acesso em: 09 nov. 2022.

DURÃO, C.; MACHADO, M. P. Death by *chumbinho*: aldicarb intoxication - regarding a corpse in decomposition. **International Journal Of Legal Medicine**, [S.L.], v. 130, n. 4, p. 981-983, 25 fev. 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00414-016-1336-1>. Acesso em: 21 out. 2022.

EDINGER, C. Cadeia de custódia, rastreabilidade probatória. **Revista Brasileira de Ciências Criminais**. São Paulo, v. 120, n. 0, p. 237-257, maio/jun., 2016. Disponível em: https://www.academia.edu/32968479/Cadeia_de_Custódia_Rastreabilidade_Probatória. Acesso em: 23 set. 2022.

EUROIMMUN BRASIL. Técnicas: ELISA. **Euroimmun Brasil**. [S.I.], c2019. Disponível em: <https://www.euroimmun.com.br/tecnicas/2/elisa#conteudo>. Acesso em: 28 out. 2022.

FERRARI JÚNIOR, E. **Pesticidas e drogas em sangue postmortem - validação de método por dSPE-PTV-LVI/GC-MS e análise de casos reais**. 2018. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/34748?locale=es>. Acesso em: 06 nov. 2022.

FERRARI JÚNIOR, E. *et al.* Drugs, pesticides and metabolites in forensic post-mortem blood samples. **Medicine, Science and The Law**, [S.L.], v. 61, n. 2, p. 97-104, 21 out. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33081562/>. Acesso em: 28 out. 2022.

FRANÇA, G. V. de. Perícia Médico-Legal. *In*: _____. **Medicina Legal**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

FREITAS, L. C; BUENO, L.C.S. **Carvão Ativo: Breve Histórico e Estudo de Sua Eficiência na Retenção de Fármacos**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - União das Faculdades dos Grandes Lagos, São José do Rio Preto, 2014. Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjB8IOKI4P7AhVkppUCHWbtB8YQFnoECA8QAw&url=http%3A%2F%2Fwww.unilago.edu.br%2Frevista%2Feducacaoatual%2FSumario%2F2014%2Fdownloads%2F6.pdf&usg=AOvVaw27FAuyYx96069vElnpnzlc>. Acesso em: 28 out. 2022.

GAO, X. *et al.* Sensitive determination of nine anticoagulant rodenticides in blood by high resolution mass spectrometry with supported liquid extraction pretreatment. **Forensic Science International**, [S.L.], v. 292, p. 39-44, nov. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30269045/>. Acesso em: 28 out. 2022.

GONÇALVES, V. *et al.* Development and validation of carbofuran and 3-hydroxycarbofuran analysis by high-pressure liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) for forensic Veterinary Medicine. **Journal Of Chromatography B**, [S.L.], v. 1065-1066, p. 8-13, out. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28938132/>. Acesso em: 28 out. 2022.

GRIGORI, P. Afinal, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxico do mundo? **Fiocruz**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://cee.fiocruz.br/?q=node/1002>. Acesso em: 16 nov. 2022.

GUO, H. *et al.* Sensitive and simultaneous determination of nine anticoagulant rodenticides in human blood by UPLC–MS-MS with phospholipid removal pretreatment. **Journal Of Analytical Toxicology**, [S.L.], v. 42, n. 7, p. 459-466, 5 abr. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29659875/>. Acesso em: 28 out. 2022.

HERCULES, H. de C. Perícia e Peritos. Documentos Médico-Legais. *In*: _____. **Medicina Legal - Texto e Atlas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

HERNANDEZ, E. M. M.; RODRIGUES, R. M. R.; TORRES, T. (org.). Intoxicação por praguicidas. *In*: _____. **Manual de Toxicologia Clínica**: orientações para assistência e vigilância das intoxicações agudas. São Paulo: Secretaria Municipal da Saúde, 2017. p. 343-370, 2017a. Disponível em: <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/up/MANUAL%20DE%20TOXICOLOGIA%20CL%C3%84DNICA%20-%20COVISA%202017.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2022.

HERNANDEZ, E. M. M.; RODRIGUES, R. M. R.; TORRES, T. (org.). Intoxicação por rodenticidas. *In*: _____. **Manual de Toxicologia Clínica**: orientações para assistência e vigilância das intoxicações agudas. São Paulo: Secretaria Municipal da Saúde, 2017. p. 371-380, 2017b. Disponível em: <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/up/MANUAL%20DE%20TOXICOLOGIA%20CL%C3%84DNICA%20-%20COVISA%202017.pdf>. Acesso em: 21 out. 2022.

HERNANDEZ, E. M. M.; RODRIGUES, R. M. R.; TORRES, T. (org.). Introdução. *In*: _____. **Manual de Toxicologia Clínica**: orientações para assistência e vigilância das intoxicações agudas. São Paulo: Secretaria Municipal da Saúde, 2017. p. 5-20, 2017c. Disponível em: <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/up/MANUAL%20DE%20TOXICOLOGIA%20CL%C3%84DNICA%20-%20COVISA%202017.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2022.

HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. Tandem Mass Spectrometry. *In*: _____. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. Chichester: Wiley, 3 ed., 2007. p. 189-216. Disponível em: <http://www.usp.br/massa/2014/qfl2144/pdf/MassSpectrometry.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2022.

INDAPURKAR, A. S. *et al.* A Method for Diagnosing Organophosphate Pesticide Exposure in Humans Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. **Journal Of Analytical Toxicology**, [S.L.], v. 46, n. 2, p. 176-186, 26 dez. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33367644/>. Acesso em: 28 out. 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC Monographs Volume 112**: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. World Health Organization. [S.L.], 2015. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/MonographVolume112-1.pdf>. Acesso em: 28 out. 2022.

IQBAL, S. *et al.* Modified QuEChERS extraction method followed by simultaneous quantitation of nine multi-class pesticides in human blood and urine by using GC-MS. **Journal of Chromatography B**, [S.L.], v. 1152, p. 122227, set. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32603923/>. Acesso em: 28 out. 2022.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Adduct definition. **Compendium of Chemical Terminology**. [S.L.], 2 ed. c2014. Disponível em: <https://goldbook.iupac.org/terms/view/A00138>. Acesso em: 15 nov. 2022.

JOHN, H. *et al.* Evidence of exposure to organophosphorus toxicants by detection of the propionylated butyrylcholinesterase-derived nonapeptide-adduct as a novel biomarker. **Forensic Science International**, [S.L.], v. 323, p. 110818, jun. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33990018/>. Acesso em: 28 out. 2022.

JOHN, H. *et al.* Novel cysteine- and albumin-adduct biomarkers to prove human poisoning with the pesticide oxydemeton-S-methyl. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 294, p. 122-134, set. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29777832/>. Acesso em: 28 out. 2022.

KRANAWETVOGL, A. *et al.* Verification of organophosphorus pesticide poisoning: detection of phosphorylated tyrosines and a cysteine-proline disulfide-adduct from human serum albumin after intoxication with dimethoate/omethoate. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 299, p. 11-20, dez. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30165092/>. Acesso em: 28 out. 2022.

LANARO, R. *et al.* Intoxicações intencionais por praguicidas. *In*: MARTINIS, B. S. de; DORTA, D. J.; COSTA, J. L. **Toxicologia forense**. São Paulo: Editora Blucher, 2018.

LANZARIN, L. D. **Intoxicações por Agrotóxicos Anticolinesterásicos – Popular “Chumbinho”**: estudo dos registros do CIT/SC. 2007. 42 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/119068/244944.pdf?sequence=1>. Acesso em: 05 fev. 2022.

LEHNER, Andreas *et al.* Characterization of Bromethalin and its Degradation Products in Veterinary Toxicology Samples by GC–MS-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 112-125, 15 out. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30307505/>. Acesso em: 28 out. 2022.

LEMOS, M. Exame de colinesterase: o que é, para que serve e o que significa o resultado. **Tua Saúde**. [S. l.], jan. 2022. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/teste-de-colinesterase/>. Acesso em: 21 out. 2022.

LGC Standards. Aldicarb. **LGC Standards**. c2022a. Disponível em: <https://www.lgcstandards.com/BR/pt/Aldicarb/p/DRE-C10070000>. Acesso em: 29 out. 2022.

LGC Standards. Brodifacoum. **LGC Standards**. c2022b. Disponível em: <https://www.lgcstandards.com/BR/pt/Brodifacoum/p/DRE-C10667500>. Acesso em: 21 out. 2022.

LI, P. *et al.* Simultaneous measurement of six biomarkers of dichlorvos in blood by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap mass spectrometry. **Journal Of Chromatography B**, [S.L.], v. 1208, p. 123381, out. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35932694/>. Acesso em: 28 out. 2022.

LINDEN, R.; ANTUNES, M. V. Análise Toxicológica Sistemática. *In*: MARTINIS, B. S. de; DORTA, D. J.; COSTA, J. L. **Toxicologia forense**. São Paulo: Editora Blucher, 2018.

LISBOA, M. P. **Matrizes Biológicas de Interesse Forense**. 2016. 45 f. Monografia (Estágio Curricular de Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Estágio Curricular de Mestrado, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016. Disponível em: https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/48554/1/M_Marcia%20Lisboa.pdf. Acesso em: 07 nov. 2022

MARCELINO, S. A.C. *et al.* Use of bone marrow for detection of toxic chemicals for the elucidation of poisoning in forensic veterinary medicine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 40, n. 10, p. 798-803, out. 2020. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1143405>. Acesso em: 28 out. 2022.

MARIÑO, D.; PATIÑO, N. Determination of Aldicarb, Carbofuran and Methamidophos in Blood Derived from Forensic Cases through Liquid Chromatography with Electrospray Ionization and Tandem Mass Spectrometry (LC--ESI-MS-MS). **Journal Of Analytical Toxicology**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 37-46, 1 dez. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33258956/>. Acesso em: 28 out. 2022.

MARQUES, G. L.M. *et al.* Method validation for simultaneous determination of atropine, pralidoxime and 12 organophosphorus compounds in blood samples by means of high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Journal Of Chromatography B**, [S.L.], v. 1097-1098, p. 44-53, out. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30199749/>. Acesso em: 28 out. 2022.

MARTINS, G. M. *et al.* **A Elaboração e Respostas de Quesitos**. [S.I.]: Hect Consultoria, 2020. Disponível em: <https://www.hect.com.br/a-elaboracao-e-respostas-de-quesitos/>. Acesso em: 16 set. 2022.

MARTINS, T. Herbicida Paraquat: conceitos, modo de ação e doenças relacionadas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 175-186, 21 dez. 2013. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/tecnologia/luciamariacararetoalves/efeito-paraquat-2013.pdf>. Acesso em: 06 dez. 2022.

MATRIX LCMS. A história da cromatografia – parte 2. **Matrix LCMS**. [S.I.], c2022. Disponível em: <https://matrixlcms.com.br/a-historia-da-cromatografia-parte-2/>. Acesso em: 06 dez. 2022.

MCLAFFERTY, F. W. Tandem Mass Spectrometry. **Science**, [S.L.], v. 214, n. 4518, p. 280-287, 16 out. 1981. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.7280693>. Acesso em: 15 nov. 2022.

MERCK. Método de preparo de amostras por QuEChERS. **Merck**. c.2022. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/applications/analytical-chemistry/sample-preparation/quechers#SampleExtraction>. Acesso em: 10 nov. 2022.

MOHAMMADZAHERI, R. *et al.* Experimental central composite design-based dispersive liquid-liquid microextraction for HPLC-DAD determination of diazinon in human urine samples: method development and validation. **Archives Of Industrial Hygiene and Toxicology**, [S.L.], v. 71, n. 1, p. 48-55, 1 mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32597136/>. Acesso em: 28 out. 2022.

MOUSKEFTARA, T. *et al.* Liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of nine insecticides and fungicides in human postmortem blood and urine. **Journal Of Chromatography B**, [S.L.], v. 1179, p. 122824, ago. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34218092/>. Acesso em: 28 out. 2022.

NASCIMENTO, L.; MELNIK, A. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde. **Revista Mangaio Acadêmico**, [S.I.], v. 1, n. 1, p. 54-61, jan/jun. 2016. Disponível em: https://aedmoodle.ufpa.br/pluginfile.php/416613/mod_resource/content/1/A%20qu%20C3%ADmica%20dos%20pesticidas%20no%20meio.pdf. Acesso em: 09 nov. 2022.

NUNES, M. V.; TAJARA, E. H. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Revista de Saúde Pública**, [S.l.], v. 32, n. 4, p. 372-382, ago. 1998.

Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rsp/a/G4NNJQNF7Xw43hH4pfCMZqd/?lang=pt>. Acesso em: 4 out. 2022.

OENNING, A. L. **Desenvolvimento de metodologia para análises toxicológicas forenses na determinação de praguicidas em urina humana empregando a técnica de extração em ponteiras descartáveis e GC-MS**. 2018. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018. Disponível em:

<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/192810/PQMC0875-D.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>. Acesso em: 16 nov. 2022.

OGA, S.; SIQUEIRA, M. E. P. B. de. Introdução à Toxicologia. *In*: OGA, Seizi *et al.* **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, A. R. M. Microextração em fase líquida. *In*: MOREAU, R. L. de M.; SIQUEIRA, M. E. P. B de. **Toxicologia Analítica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Comparison of methods by liquid chromatography for the determination of pesticide multiresidues in strawberries. **Química Nova**, [S.L.], p. 1273-1281, set. 2015. Disponível em:

http://quimicanova.s bq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=6319. Acesso em: 15 nov. 2022

PAIOL. Raticida. **Paiol Produtos Agropecuários**. [S.l.], c2022. Disponível em: <<https://www.vitrinesdocomercio.com/paiol-produtos-agropecuarios-raticida.html>>. Acesso em: 25 out. 2022

PAIVA, M. A. R. *et al.* Toxicologia Forense. *In*: COUTO, R. C. **Perícias em Medicina e Odontologia Legal**. Rio de Janeiro: Medbook Editora, 2011.

PARANÁ. Secretaria da Saúde. Intoxicação Aguda por Agrotóxicos. **Secretaria da Saúde do Estado do Paraná**. Curitiba, 2021. Disponível em:

<https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Intoxicacao-Aguda-por-Agrotoxicos>. Acesso em: 16 nov. 2022.

PAWAR, U. D. *et al.* Development method of high-performance thin-layer chromatographic detection of synthetic organophosphate insecticide profenofos in visceral samples. **Jpc – Journal of Planar Chromatography – Modern Tlc**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 203-206, 23 mar. 2020. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00764-020-00015-2>. Acesso em: 28 out. 2022.

PAWAR, U. D. *et al.* Development of HPTLC detection of synthetic pesticide carbosulfan in biological material. **Jpc – Journal Of Planar Chromatography – Modern Tlc**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 183-186, abr. 2021. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00764-021-00096-7>. Acesso em: 28 out. 2022.

PELIÇÃO, F. S.; PISSINATE, J. F.; MARTINIS, B. S. de. Amostras Biológicas em Análises Forenses: Matrizes Usuais (Urina e Sangue). *In*: MARTINIS, B. S. de; DORTA, D. J.; COSTA, J. L. **Toxicologia forense**. São Paulo: Editora Blucher, 2018.

PELITZ, B. R. C. **A Imunoprecipitação como Método de Purificação de Nitrotirosinas**. 2019. 54 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2019. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/bitstream/handle/11600/61764/TCC%20Bianca%20Pelitz%20%281%29.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Acesso em: 11 nov. 2022.

PENSARBIO. Conheça os diferentes tipos de ELISA. **Pensarbio**. São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.pensarbio.com.br/post/2019/03/21/conheca-os-diferentes-tipos-de-elisa>. Acesso em 05 dez. 2022.

PÉREZ-LÓPEZ, M *et al.* Presente y Futuro de un Nuevo Rodenticida dentro de la Unión Europea: La Brometalina. **Anales de Veterinaria de Murcia**, Murcia, v. 33, s.n., p. 49-54, 2017. Disponível em: <https://revistas.um.es/analesvet/article/view/369461/260461>. Acesso em 09 nov. 2022.

PESSOA, G. P. *et al.* Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. **Química Nova**, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 968-973, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/rpdgxRpnBfq78J4JpYSnjSD/?lang=pt>. Acesso em: 17 nov. 2022

POCHTECA BRASIL. Cumarina: o que é e para que serve. **Grupo Pochteca**. [S.l.]: c2010. Disponível em: <https://brasil.pochteca.net/cumarina/#:~:text=As%20cumarinas%20fazem%20parte%20dos,%2D%20benzopiran%2D2%2Dona>. Acesso em: 05 nov. 2022.

PRADERA, C. Hidroxicumarina-Indandiona-Formula. **El desinsectador y desratizador**. Barcelona: 2016. Disponível em: <https://desinsectador.com/biocidas-por-grupos/hidroxicumarina-indandiona-formula/>. Acesso em: 05 nov. 2022.

PRESTES, O. D. *et al.* QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multiresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, [S.L.], v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/BJq59mTbNC6HhzTcSW5vpTp/?lang=pt#>. Acesso em: 10 nov. 2022.

PUBCHEM. 1,3-Indandione. **National Library of Medicine**. Bethesda: c2022. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11815#section=Information-Sources>. Acesso em 05 out. 2022.

QIAO, Z. *et al.* Simultaneous Determination of 13 Anticoagulant Rodenticides in Human Blood by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and its Application in Three Poisoning Cases. **Journal Of Forensic Sciences**, [S.L.], v. 63, n. 3, p. 784-792, maio 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29723420/>. Acesso em: 28 out. 2022.

RENNÓ, P. P.; SACCO, S. R.; BARBOSA, S. P. Intoxicação por Cumarínicos em Cães: Relato de Caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, ano 4, n. 8, n. p., jan. 2007. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/BlfpCXNla5mWWjf_2013-5-21-16-45-41.pdf. Acesso em: 05 nov. 2022.

RIBEIRO, D. S.; PEREIRA, T. S. O agrotóxico nosso de cada dia. **Vittalle – Revista de Ciências da Saúde**, [S.L.], v. 28, p. 14-26, nov. 2016. Disponível em: <https://periodicos.furg.br/vittalle/article/download/6187/4229/18660https://periodicos.furg.br/vittalle/article/download/6187/4229/18660>. Acesso em: 02 fev. 2022.

RIBEIRO, F. S. N.; OTERO, U. B. (org). O câncer e a exposição ocupacional. *In*: _____. **Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado ao trabalho**. 2013. 2 ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: INCA, 2013. 192 p. Disponível em: https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_vigilancia_cancer_relacionado_2ed.pdf. Acesso em: 28 out. 2022.

ROTHER, Edna Terezinha. Revisão sistemática X revisão narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 5-6, jun. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ape/a/z7zZ4Z4GwYV6FR7S9FHTByr/#>. Acesso em: 29 out. 2022.

SANTOS, V. M. R. *et al.* Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 159-170, fev. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/bdm98jCvGnrqdt5dfqG6P3J/?lang=pt#>. Acesso em: 24 out. 2022.

SANTOS NETO, A. J.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração em fase sólida (SPE) utilizando discos C18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de furnas (mg-brasil). **Química Nova**, [S.L.], v. 28, n. 5, p. 747-750, out. 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/gxN8xFrZpKrmvNkQRTqBSVB/?lang=pt>. Acesso em: 16 nov. 2022.

SÃO PAULO. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). **Ficha de Informação Toxicológica: Aldrin e Dieldrin**. São Paulo (SP), 2022. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2022/02/Aldrin-e-Dieldrin.pdf>. Acesso em: 24 out. 2022.

SELL, B. *et al.* Development of an Analytical Procedure for the Determination of Multiclass Compounds for Forensic Veterinary Toxicology. **Journal Of Analytical Toxicology**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 183-191, 29 nov. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29194519/>. Acesso em: 28 out. 2022.

SILVA, J. G. C. Métodos de Separação: Parte 3. **Universidade Federal de Juiz de Fora**. Juiz de Fora, 2017. Disponível em: https://www.ufjf.br/baccan/files/2010/10/Aula-8-Separa%C3%A7%C3%B5es-parte-3_20-06-17.pdf. Acesso em 18 nov. 2022.

SILVA, M. A. A. **Análise toxicológica por técnicas de triagem aplicada em amostras biológicas post-mortem de casos suspeitos de intoxicação provenientes de Instituto de Criminalística**. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/4449/5/Dissertação%20-%20Maria%20Augusta%20Alves%20Silva%20-%202014.pdf>. Acesso em: 19 out. 2022.

SIQUEIRA, G. Princípios de cromatografia a líquido (HPLC). **A3 Analítica**. [S.l.], 2019. Disponível em: <https://a3analitica.com.br/bloga3pharma/2019/01/08/principios-de-cromatografia-a-liquido-hplc/>. Acesso em: 15 nov. 2022.

SIQUEIRA, M. E. P. B; FIGUEIREDO, E. C. Fundamentos do Preparo de Amostras. *In*: MOREAU, R. L. de M.; SIQUEIRA, M. E. P. B de. **Toxicologia Analítica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SPORTY, J. L. S. *et al.* Immunomagnetic Separation and Quantification of Butyrylcholinesterase Nerve Agent Adducts in Human Serum. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 82, n. 15, p. 6593-6600, 9 jul. 2010. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac101024z>. Acesso em: 13 nov. 2022.

SRIVASTAVA, A. *et al.* Simultaneous determination of multiclass pesticide residues in human plasma using a mini QuEChERS method. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 409, n. 15, p. 3757-3765, 17 abr. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28417172/>. Acesso em: 28 out. 2022.

STEVENS, J. The QuEChERS Approach to Determine Pharmaceuticals and Toxins in Whole Blood. **Agilent Technologies**. [S.l.], 2011. Disponível em: <https://www.agilent.com/Library/posters/Public/Mini-QuEChERS.pdf>. Acesso em 11 nov. 2022.

TAKAYASU, T. *et al.* Postmortem distribution of chlorpyrifos-methyl, fenitrothion, and their metabolites in body fluids and organ tissues of an intoxication case. **Legal Medicine**, [S.L.], v. 29, p. 44-50, nov. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29054069/>. Acesso em: 28 out. 2022.

THERMO SCIENTIFIC. Immunoprecipitation (IP): technical guide and protocols. **Thermo Scientific**, Rockford: c2009.

THIESEN, F. V. Microextração em fase sólida. *In*: MOREAU, R. L. de M.; SIQUEIRA, M. E. P. B de. **Toxicologia Analítica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

TOSE, L. V. **Espectrometria de Massas de Alta Resolução acoplada a Espectrometria Mobilidade Iônica para análise de matrizes complexas**. 2018. 120 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018. Disponível em: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwinz-e3tLH7AhXprJUCHY9yCggQFnoECAoQAQ&url=https%3A%2F%2Frepositorio.ufes.br%2Fbitstream%2F10%2F10789%2F1%2Ftese_12350_Lilian%2520Valadares%2520Tose.pdf&usg=AOvVaw3nFTBWxvBpu8IEI04N_Pff. Acesso em: 15 nov. 2022.

TRUNCKLE, Y. F.; OKAMOTO, C. A. Criminalística. *In*: TRUNCKLE, Y. F.; OKAMOTO, C. A. **Medicina Legal e Perícias Médicas. (Coleção Método Essencial)**. São Paulo: Grupo Gen, 2022.

VINHAL, D. C.; SOARES, V. H. C. Intoxicação Por Organofosforados: Uma Revisão da Literatura. **Revista Científica FacMais**, [S. L.], v. 1, n. 3., p. 61-75, out. 2018. Disponível em: https://revistacientifica.facmais.com.br/wp-content/uploads/2018/12/6.-Intoxicacao_por_organofosforados-VERS%C3%83O-PARA-PUBLICA%C3%87%C3%83O.pdf. Acesso em: 07 fev. 2022.

WELLEN, J. V. D. *et al.* A toolbox for microbore liquid chromatography tandem-high-resolution mass spectrometry analysis of albumin-adducts as novel biomarkers of organophosphorus pesticide poisoning. **Toxicology Letters**, [S.L.], n. 292, p. 46-54, ago. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29702198/>. Acesso em: 28 out. 2022.

WINDAHL, U. *et al.* Development and Validation of a Quantitative UHPLC–MS-MS Method for the Determination of Alpha-Chloralose in Feline Blood and Application on Blood Samples Collected from Cats with Symptoms of Alpha-Chloralose Poisoning. **Journal Of Analytical Toxicology**, [S.L.], v. 46, n. 6, p. 651-657, 27 jul. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34313718/>. Acesso em: 28 out. 2022.

WU, YF. *et al.* Superwarfarin intoxication: hematuria is a major clinical manifestation. **International Journal of Hematology**, [S.L.], v. 90, n. 2, p. 170-173, 9 jul. 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12185-009-0374-6>. Acesso em: 21 out. 2022.

XAVIER, F.G. *et al.* Cromatografia em camada delgada para o diagnóstico da intoxicação por aldicarb (“chumbinho”) em cães e gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.L.], v. 59, n. 5, p. 1231-1235, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/FqPZxgFZsvd73mNWSkmbvVb/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 03 fev. 2022.

XAVIER, F.; RIGHI, D. A.; SPINOSA, H. de S. Toxicologia do praguicida aldicarb: aspectos gerais, clínicos e terapêuticos em cães e gatos. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 37, n. 4, p. 1206-1211, ago. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/GyGxpsm3qdfq6gwvzq56FXB/?lang=pt>. Acesso em: 02 fev. 2022.

YOSHITAKE *et al.* A Metodologia de Elaboração de um Laudo Pericial. **Revista Pensar Contábil**. Rio de Janeiro, v. 8, n. 31, n. p., fev./mar., 2006. Disponível em: https://www.peritoscontabeis.com.br/trabalhos/elab_laudo_crcrj.pdf. Acesso em: 25 set. 2022.