

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

VITOR HUGO MARQUES LUIZ

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS E MÉTODOS
ANALÍTICOS NO CAMPO FORENSE APLICANDO OS
PRINCÍPIOS DA QUÍMICA VERDE**

**Araraquara
2016**

Vitor Hugo Marques Luiz

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS E MÉTODOS
ANALÍTICOS NO CAMPO FORENSE APLICANDO OS
PRINCÍPIOS DA QUÍMICA VERDE**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Helena Redigolo Pezza
Co-Orientador: Dr. Hernane da Silva Barud

**Araraquara
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

L952d Luiz, Vitor Hugo Marques
Desenvolvimento de procedimentos e métodos analíticos
no campo forense aplicando os princípios da química verde /
Vitor Hugo Marques Luiz – Araraquara : [s.n], 2016
147 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Helena Redigolo Pezza
Coorientador: Hernane da Silva Barud

1. Química analítica. 2. Química legal. 3. Dopagem em
esportes. 4. Balística. 5. Datiloscopia. I. Título.


Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação


VITOR HUGO MARQUES LUIZ

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

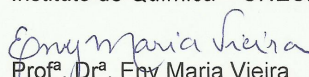
Araraquara, 25 de fevereiro de 2016.

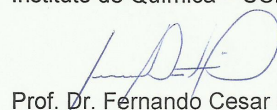
BANCA EXAMINADORA


Prof^ª. Dr^ª. Helena Redigolo Pezza (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof^ª. Dr^ª. Maria Valnice Boldrin
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof^ª. Dr^ª. Raquel Fernandes Pupo Nogueira
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof^ª. Dr^ª. Eny Maria Vieira
Instituto de Química – USP, São Carlos


Prof. Dr. Fernando Cesar Crnkovic
Instituto de Criminalista – ICSC, São Carlos

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

NOME: Vitor Hugo Marques Luiz

DATA DE NASCIMENTO: 08/04/1988

NATURALIDADE: Araraquara – SP

NACIONALIDADE: Brasileiro

ESTADO CIVIL: Solteiro

FILIAÇÃO: Pai – Adalberto Marques Luiz

Mãe – Elisabete Rosa Marques

ENDEREÇO: Rua Bahia, 151 – Vila Xavier – CEP: 14.810-060 – Araraquara – SP – Brasil.

E-MAIL: vitorhmluiz@hotmail.com

2. FORMAÇÃO

Graduação Superior:

Bacharel em Química pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil, no período de 2006 a 2009.

Trabalho de Conclusão de Curso orientado pela Prof^a Dr^a Helena Redigolo Pezza com o título “Desenvolvimento de Métodos Analíticos por Espectroscopia de Reflectância Difusa”.

Bolsista (Iniciação Científica e Mestrado) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. CNPq.

Mestre em Química Analítica pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil, no período de 2010 a 2011.

Dissertação orientada pela pela Prof^a Dr^a Helena Redigolo Pezza com o título “Desenvolvimento de Métodos Analíticos Limpos para determinações forenses: chumbo em resíduos de disparo e furosemida em doping”.

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
CNPq.

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA REFERENTE A ESTE PERÍODO

- Artigo a ser publicado na JBCS referente à análise de adulteração de tinturas de cabelo;
- Artigo submetido (segundo autor) à revista Eclética referente à análise de nitrito em alimentos cárneos;
- Artigo a ser enviado para a revista Cellulose referente à análise de resíduos de disparo de armas de fogo;
- Artigo a ser enviado para periódico especializado referente à quantificação de furosemida em doping esportivo utilizando detecção espectrofotométrica e por imagem por scanner com detecção utilizando padrão RGB;
- Artigo a ser enviado para periódico especializado referente à quantificação de bumetanida em doping esportivo utilizando detecção por imagem por scanner com detecção utilizando padrão RGB.

DEDICATÓRIA

Dedico todo o esforço deste trabalho à minha família e, principalmente, aos meus pais, Elisabete e Adalberto, que mostraram que não importa o tamanho da nuvem negra que paira sobre nós em alguns momentos de nossas vidas, o importante é não desistirmos. Respirar e sentir o vento é privilégio de poucos e, se formos capazes disso, devemos aproveitar os dons a nós dados.

Aos meus amigos, cada um me oferecendo uma aventura nova, pronta a ser percorrida, onde constantemente são aprendidos os valores da verdadeira existência, onde o “sobreviver” torna-se apenas mero reflexo passivo do “viver”.

A todos os meus professores e orientadores, que constroem seus tempos nos ensinando, abrindo novas portas e construindo novas pontes entre o mundo do conhecimento, o mundo da idoneidade e o mundo da realidade.

A todos os tipos de forças que regem este mundo, grande e misterioso demais para ser apenas nosso. Forças que navegam em nossas vidas e a essência de tudo aquilo que existe e que nos ensinam. Forças incontestáveis em seus significados amplos, cuja existência de várias vidas não seria capaz de explicar a verdadeira essência que percorre o multiverso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, meus criadores, meus professores, meus pilares. Meus pais, as pessoas que nunca deixaram de estar ali presentes, de diferentes formas, em cada momento de minha vida, ora mostrando a frieza e a dureza do mundo de lá de fora, ora mostrando a ternura e a compaixão dos mundos vividos aqui dentro. Vocês, que me mostraram o caminho do certo e do bem, com sorrisos e lágrimas de convicção, alegria e orgulho, a quem devo praticamente tudo o que sou hoje.

À Prof^a. Dr^a. Helena Redigolo Pezza, ao Prof. Dr. Leonardo Pezza e ao Dr. Hernane da Silva Barud pela orientação, ajuda e dedicação. Pelas conversas “extra-curriculares”, pelas idéias, sugestões e conselhos, sempre prontos a estender seus braços, independente do motivo ou para o que. Pelo acolhimento paterno, dando dicas e conselhos que englobavam não apenas o profissional, mas o meu próprio futuro como pessoa.

Ao Albert, pelos anos de amizade, desde os tempos do Shopping Lupo onde não conseguíamos nem olhar direito para a cara um do outro, até o surgimento de uma grande amizade que evoluiu para uma irmandade e um companheirismo maior que muita coisa imortal. Às nossas noites conversando sobre estrelas, teorias e suposições... às nossas conversas absurdas e idéias mais impressionantes ainda sobre um mundo inexistente.

A todos aqueles que fazem ou fizeram parte do Grupo de Pesquisa Fritz Feigl (GPFF) durante minha estadia neste lugar maravilhoso: pelas gargalhadas, abraços, companheirismo, amizades, confissões e segredos, tudo contribuindo para a formação de um grupo forte e inquebrantável, onde não apenas o profissional estava presente, mas a união e a força. Agradeço a todos vocês que participaram do meu dia-a-dia no laboratório e fora dele, mesmo aqueles que não mais dividem este espaço com a gente. Obrigado pela amizade e pelos momentos eternos.

Aos professores e funcionários do IQ (bibliotecárias, xerox, Seção de Pós-Graduação, Seção Técnica, cantina, etc...) pela dedicação durante toda a minha formação.

Ao Rafael Romano, que me acompanhou e explicou sobre o processo de fabricação das membranas de celulose bacteriana.

A todos aqueles que me ajudaram a fazer as coletas dos resíduos de disparo e me forneceram materiais para análise, sócios do Clube do Tiro MAAT, principalmente ao Paulo Roberto Magri e Nilton Roberto Bigotte. Ao meu pai, Adalberto e à Ângela Pinheiro Martins pela ajuda durante a coleta. Ao Dr. Hernane Barud do Grupo de Materiais Fotônicos do IQ-UNESP pelo fornecimento das membranas celulósicas.

À CAPES pela bolsa concedida.

A todos os meus amigos. Àqueles que ainda estão presentes e àqueles que, por um motivo ou outro, não estão mais por aqui pois, afinal, o que importa, é que estamos todos conectados por uma longa história sem fim, onde o final da jornada, ninguém ainda escreveu.

Dentre todos, um agradecimento especial...

À Carol Falvo, minha eterna amiga e professora.

À Catarina (*in memoriam*), minha estrelinha mais brilhante no céu.

Ao Flávio, à Ana e ao Doug, meu grupinho de aventuras reais e das noites de RPG.

À Vanessa e à Bruna Novelli, pessoas especiais que aprendi a amar.

À Isabela Sanches, pelas conversas, conselhos e loucuras.

Ao Júlio e à Lizza Valente, que mostraram que a vida não é tão complicada quando se trata ela com sorrisos e amor.

A todos do grupinho do Whatsapp: Fran, Carlos, Frois, Duds, Tha, Biel e à Mônica. Pessoas que, mesmo longe, mostram que a amizade, desde que verdadeira, pode transpor os obstáculos da vida e que, por mais que nunca tenhamos nos encontrado, sempre há um espaço reservado em nossos corações para aqueles que nos fazem bem.

***“O essencial é invisível aos olhos.
Só se pode ver bem com o coração”***

(Antoine de Saint-Exupéry – O Pequeno Príncipe)

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação quantitativa de furosemida e bumetanida em amostras de urina utilizando espectroscopia por reflectância difusa (para a furosemida) e por imagem por scanner com quantificação através do histograma de cores utilizando o padrão RGB (para ambas). Envolve também o desenvolvimento de um método quantitativo para a detecção de chumbo em resíduos de armas de fogo (GSR) nas mãos de atiradores utilizando membranas de celulose bacteriana como substrato de coleta, visando o descobrimento do tempo de disparo. Também foi realizada a quantificação de chumbo em amostras de tintura para cabelos utilizando método previamente desenvolvido, visando detecção da adulteração destes produtos e controle de qualidade. Estuda também a potencialidade do uso das membranas de celulose bacteriana para a coleta de impressões digitais.

Os métodos desenvolvidos consistem na reação da furosemida (FUR) com o reagente cromogênico paradimetilaminocinamaldeído (p-DAC) 0,70% e ácido clorídrico (HCl) $1,72 \text{ mol L}^{-1}$ em papel de filtro qualitativo com barreiras hidrofóbicas, com detecção espectrofotométrica e por histograma de cores; na reação do íon chumbo(II) (Pb^{2+}) com rodizonato de sódio (ROD) 0,16% em meio micelar de dodecil sulfato de sódio (SDS) 5 mmol L^{-1} em membranas de celulose bacterianas, com detecção espectrofotométrica e por microscopia eletrônica de varredura (MEV); na reação de bumetanida (BMT) com o reagente p-DAC 0,6% e HCl $0,26 \text{ mol L}^{-1}$ em papel de filtro qualitativo com barreiras hidrofóbicas, com detecção por histograma de cores e na coleta de impressões digitais utilizando membrana de celulose bacteriana impregnadas com ninidrina, nitrato de prata ou óxido de zinco, dos quais o nitrato de prata e a ninidrina atuaram como agentes de coleta razoáveis. Todas as concentrações foram otimizadas por planejamentos quimiométricos.

As reações foram realizadas na forma de *spot test*, envolvendo a formação de um produto colorido em 545 nm para o chumbo, em 585 nm para a furosemida e 520 nm para a bumetanida. As curvas analíticas foram contruídas a partir de soluções padrões dos respectivos analitos.

Os métodos desenvolvidos para a bumetanida e para a furosemida foram aplicados em amostras de urina sintética e natural fortificadas e os resultados obtidos foram comparados estatisticamente com métodos comparativos. A validação dos métodos foi realizada por adição de padrão e recuperação e por comparação de métodos, no caso da FUR e da BMT, obtendo-se recuperações entre 98,0 e 115,3% para os métodos de quantificação da furosemida e entre 93,0 e 102,0% para o método de quantificação da bumetanida.

O método de coleta de GSR é baseado na utilização de membranas finas de celulose bacteriana desenvolvidas pelo Grupo de Materiais Fotônicos do IQ-UNESP. Para os GSR foram realizadas 40 coletas totais em tempos de coleta após o disparo (diferentes e conhecidos), sendo sua comparação realizada através das curvas analíticas, mostrando ser possível a detecção do tempo de disparo com uma margem de erro de aproximadamente 5 minutos. Os resultados foram comparados estatisticamente e os valores obtidos a partir de testes estatísticos mostraram que os métodos podem ser usados para análises de rotina em laboratórios forenses.

Palavras-chave: Espectroscopia de reflectância difusa. Scanner. Padrão RGB. Forense. Furosemida. Bumetanida. Doping. Chumbo. Resíduos de armas de fogo.

ABSTRACT

This work describes the development of analytical methods for the quantitative determination of furosemide and bumetanide in urine samples using diffuse reflectance spectroscopy (for furosemide) and scanning imaging with quantification by color histogram using RGB color pattern (for both). It involves also the development of a quantitative method for the detection of lead in gunshot residues (GSR) in the hands of the shooters using bacterial cellulose membranes as substrate collection, aiming the discovery of shooting time. It is also done the quantification of lead in progressive hair lotions samples using a previously developed method, aiming the detection of products adulterations and quality control. It also studies the potentiality of the usage of bacterial cellulose membranes for the collection of fingerprints.

The developed methods are consisted in the reaction of furosemide (FUR) with the cromogenic reagent p-dimethylamino cinnamaldehyde (p-DAC) 0.70% and hydrochloric acid (HCl) 1.72 mol L⁻¹ in qualitative filter papers with hydrophobic barrier, with spectrophotometric detection and by color histogram; in the reaction of lead(II) ion (Pb²⁺) with sodium rhodizonate (ROD) 0.16% in micellar medium of sodium dodecyl sulfate (SDS) 5 mmol L⁻¹ in bacterial cellulose membranes with spectrophotometric detection and by scanning electron microscopy; in the reaction of bumetanide (BMT) with the reagent p-dimethylamino cinnamaldehyde (p-DAC) 0.6% and hydrochloric acid (HCl) 0.27 mol L⁻¹ in qualitative filter papers with hydrophobic barrier with color histogram detection an in the collect of fingerprints using bacterial cellulose membranes impregnated with ninhydrine, silver nitrate or zinc oxide, of which the silver nitrate and ninhydrin acted as reasonable collection agents. All concentrations were optimized through chemometrics designs.

The reactions were carried out as spot test, involving the formation of a colored product at 545 nm for lead, in 585 nm for furosemide and in 520 nm for bumetanide. Analytical curves were built from standard solutions of the respective analytes.

The methods developed for furosemide and bumetanide were applied in fortified synthetic and natural urine samples and the results obtained were compared statistically with comparative methods. The validation of the methods were performed by standard addition and recovery and by comparison of methods, for FUR and BMT, yielding recoveries between 98.0 and 115.3% for furosemide quantification methods and between 93.0 and 102.0% for the quantification method for bumetanide.

GSR collection method is based on the use of thin membranes of bacterial cellulose developed by Photonic Materials Group IQ-UNESP. For GSR, 40 total collections were carried out in known and different times of collection after shooting times and their comparison through analytical curves were done, showing the possibility of the detection of the shooting time with an error of 5 minutes, approximately. The results were statistically compared and the values obtained from statistical tests showed that the methods can be used for routine analysis in forensic laboratories.

Keywords: Diffuse reflectance spectroscopy. Scanner. RGB color pattern. Forensics. Furosemide. Bumetanide. Doping. Lead. Gunshot Residues.

LISTA DE FIGURAS, ESQUEMAS E REAÇÕES

Figura 1 -	Processo do disparo de uma arma de fogo	26
Figura 2 -	Exemplos de pontos identificadores de impressões digitais	31
Figura 3 -	Tipos fundamentais de impressões digitais, de acordo com o sistema de Vucetich	32
Figura 4 -	Exemplo de ficha para seqüenciar impressões digitais	33
Figura 5 -	Fórmula estrutural da furosemida	39
Figura 6 -	Fórmula estrutural da bumetanida	47
Figura 7 -	Procedimento e suporte para a realização da reação de <i>spot test</i>	66
Figura 8 -	Exemplo de <i>spot test</i> em papel de filtro qualitativo com área delimitada realizado em papel de filtro.	67
Figura 9 -	Espectrômetro portátil e fibra óptica utilizados	71
Figura 10 -	Coleta de impressão digital realizada diretamente do dedo do indivíduo utilizando celulose bacteriana	73
Figura 11 -	Imagens originais e seus posteriores tratamentos com o software ImageJ.	74
Figura 12 -	Membranas úmidas de celulose bacteriana utilizadas no teste com a ninidrina	75
Figura 13 -	Revelação de impressões dígito-papilares em membrana seca utilizando ninidrina e seu tratamento utilizando o software ImageJ.	76
Figura 14 -	Micrografias da membrana de celulose bacteriana tratada com Acetato de Zinco 5 mmol L ⁻¹	77
Figura 15 -	Micrografias da membrana de celulose bacteriana tratada com Acetato de Zinco 25 mmol L ⁻¹	78
Figura 16 -	Micrografias da membrana de celulose bacteriana tratada com Acetato de Zinco 50 mmol L ⁻¹	79
Figura 17 -	Coleta direta de impressão dígito-papilar utilizando celulose bacteriana impregnada com nitrato de prata	80
Figura 18 -	Influência do tempo de espera de revelação utilizando AgNO ₃ para uma mesma coleta	81
Figura 19 -	Membrana úmida fina impregnada com AgNO ₃ 0,1 mol L ⁻¹	82
Figura 20 -	Imagens do estudo da concentração para revelação com Nitrato de Prata	82
Figura 21 -	Imagens do estudo do tempo para revelação com Nitrato de Prata	83
Figura 22 -	Gráfico da superfície de resposta para a matriz da Tabela 6	84
Figura 23 -	Imagens de impressões dígito-papilares coletadas utilizando-se cola branca	87

lavável

Figura 24 -	Isoterma de % de absorção em função do tempo de impregnação	88
Figura 25 -	Principais regiões de coleta de resíduos de disparo	90
Figura 26 -	Membranas de celulose bacteriana após reação com rodizonato em meio tamponado	92
Figura 27 -	Micrografias de elétrons secundários da celulose vegetal	94
Figura 28 -	Micrografias de elétrons secundários com magnificação de 10.000x da celulose vegetal e de elétrons retroespalhados da mesma região com a representação do espectro de EDS da região.	95
Figura 29 -	Micrografias de elétrons secundários da celulose bacteriana mostrando as partículas esféricas dos GSR	97
Figura 30 -	Espectro de EDS para uma região da membrana de celulose bacteriana com magnificação de 10.000x onde pode-se detectar chumbo.	98
Figura 31 -	Micrografias de elétrons secundários da celulose bacteriana e de elétrons retroespalhados da mesma região com sua respectiva análise por EDS onde pode-se detectar o elemento bário na região destacada.	99
Figura 32 -	Micrografias de elétrons secundários e de elétrons retroespalhados da celulose bacteriana com EDS de diferentes regiões de uma mesma membrana com suas respectivas análises por EDS	101
Figura 33 -	Gráfico de Pareto mostrando as influências das variáveis concentração de ROD, concentração de SDS e tempo de impregnação	103
Figura 34 -	Superfície de resposta gerada para as medidas de reflectância em 545 nm em função da [ROD] e tempo de impregnação	104
Figura 35 -	Curva analítica para a quantificação de chumbo provindo de resíduos de disparo de armas de fogo utilizando membrana de celulose bacteriana	105
Figura 36 -	Estabilidade da membrana impregnada com o rodizonato de sódio em função dos dias	107
Figura 37 -	Estabilidade da membrana após a reação do rodizonato de sódio com o chumbo em função dos dias	107
Figura 38 -	Curvas analíticas para ambas as coletas	109
Figura 39 -	Superfície de resposta gerada para as medidas de reflectância em 585 nm e por imagem digital no canal verde em função da [p-DAC] (%) e [HCl] (mol L ⁻¹) para a quantificação de furosemida	117
Figura 40 -	Estabilidade do produto da reação da furosemida em spot test entre 0 e 60 minutos	119
Figura 41 -	Curvas analíticas para a determinação de furosemida por medidas da reflectância difusa no espectrofotômetro e imagens escaneadas.	120
Figura 42 -	Superfície de resposta gerada para a medida do histograma de cores no canal verde para a imagem digital em função da [p-DAC] (%) e [HCl] (mol L ⁻¹)	127

	para a quantificação de bumetanida	
Figura 43 -	Estabilidade do produto da reação da bumetanida em spot test entre 0 e 60 minutos.	128
Figura 44 -	Curva analítica para a determinação de bumetanida por histograma de cores	129
Esquema 1 -	Publicações com o tema “ <i>Green Chemistry</i> ” com o passar dos anos	62
Esquema 2 -	Representação da impregnação do reagente cromogênico na membrana de celulose bacteriana e a subsequente coleta dos resíduos de disparo através da esfregação do substrato sólido nas mãos do atirador, havendo a revelação durante o processo	65
Esquema 3 -	Exemplo de conversão das medidas realizadas pelo histograma de cores a A_R	67
Reação 1 -	Representação da reação do íon rodizonato com o íon chumbo	65
Reação 2 -	Representação da obtenção do púrpura de Hunemann, produto da reação entre a ninidrina e os aminoácidos presentes na mão	72
Reação 3 -	Representação da reação da furosemida com p-DAC em meio ácido	115
Reação 4 -	Representação da reação da bumetanida com p-DAC em meio ácido	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Métodos analíticos envolvendo detecção espectrométrica e fluorimétrica para determinação e quantificação de furosemida.	40
Tabela 2 -	Métodos analíticos com detecção eletroanalítica para determinação e quantificação de furosemida	42
Tabela 3 -	Métodos analíticos cromatográficos para determinação e quantificação de furosemida	44
Tabela 4 -	Métodos analíticos para determinação e quantificação de bumetanida	48
Tabela 5 -	Métodos analíticos para determinação e quantificação de chumbo	53
Tabela 6 -	Matriz do Planejamento Composto Central para o AgNO_3	84
Tabela 7 -	Matriz do Planejamento Composto Central para o AgNO_3 utilizando cola lavável branca	86
Tabela 8 -	Concentração de AgNO_3 absorvido em função da concentração da solução inicial de nitrato de prata	87
Tabela 9 -	Concentração de nitrato de prata absorvido em função do tempo de impregnação.	88
Tabela 10 -	Matriz utilizada para o Gráfico de Pareto para a coleta de chumbo	102
Tabela 11 -	Matriz obtida para as coordenadas do planejamento composto central para a coleta de chumbo	104
Tabela 12 -	Coletas realizadas e suas respectivas quantificações através do método proposto para a pólvora com maior quantidade de chumbo.	110
Tabela 13 -	Coletas realizadas e suas respectivas quantificações através do método proposto para a pólvora com menor quantidade de chumbo.	111
Tabela 14 -	Resumo das figuras de mérito para o método de quantificação de chumbo previamente desenvolvido.	112
Tabela 15 -	Resultados para a determinação de chumbo(II) em loções progressivas para cabelos.	114
Tabela 16 -	Matriz do Planejamento Composto Central para a determinação de furosemida	116
Tabela 17 -	Desvios Padrões Relativos para as medidas Intradia e Interdia para a quantificação de furosemida	120
Tabela 18 -	Limites de detecção e quantificação para a furosemida	121
Tabela 19 -	Principais sais componentes da urina e suas interferências.	121
Tabela 20 -	Adição de padrão e recuperação para a quantificação de furosemida em amostras de urina natural.	122

Tabela 21 -	Validação do método proposto para a quantificação de furosemida em Amostras de urina natural.	123
Tabela 22 -	Matriz do planejamento composto central para a determinação de bumetanida.	126
Tabela 23 -	Desvios padrões relativos para as medidas Intradia e Interdia para a quantificação de bumetanida	129
Tabela 24 -	Limites de detecção e quantificação para a bumetanida	129
Tabela 25 -	Adição de padrão e recuperação para a quantificação de bumetanida em amostras de urina natural.	130
Tabela 26 -	Validação do método proposto para a quantificação de bumetanida em amostras de urina natural e sintética.	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BMT	Bumetanida
CB	Celulose bacteriana
DTAB	brometo de dodeciltrimetilamônio
EDS	Energy dispersive spectroscopy (X-Ray detector)
FDA	Food and Drug Administration
FUR	Furosemida
GC (ou CG)	Cromatografia gasosa
GSR	Gunshot Residues
HDL	High-Density Lipoprotein (colesterol “bom”)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICP	Inductively coupled-plasma
IQ	Instituto de Química
LD	Limite de Detecção
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
NIR	Near-infrared
NAA	Neutron activation analysis
LDL	Low-Density Lipoprotein (colesterol “mau”)
LQ	Limite de Quantificação
MS	Mass spectrometry
nm	nanômetros
NND	Ninidrina
p-DAC	Paradimetilaminocinamaldeído
pH	Potencial hidrogeniônico
RGB	Red/Green/Blue
ROD	Rodizonato de sódio
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio padrão relativo
SDS	Dodecil sulfato de sódio (surfactante)
UV	Ultra-violeta
WADA	World Anti-Doping Agency

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	A Química nas investigações criminais	21
1.1.1	<i>Um breve histórico</i>	22
1.1.2	<i>As técnicas instrumentais</i>	23
1.1.2.1	Técnicas espectrométricas	23
1.1.2.2	Técnicas cromatográficas	24
1.1.2.3	Técnicas de microscopia	24
1.2	Uma visão geral sobre a balística forense	25
1.2.1	<i>A balística interna, externa e terminal e a formação de resíduos</i>	26
1.2.2	<i>Efeitos de choque no corpo humano e a deposição dos resíduos</i>	28
1.2.3	<i>A coleta e os exames residuográficos</i>	29
1.3	Uma visão geral sobre os exames dígito-papilares	30
1.3.1	<i>O sistema de identificação de Vucetich</i>	31
1.3.2	<i>Coleta e revelação de impressões dígito-papilares</i>	33
1.4	Uma visão geral sobre o doping	34
1.4.1	<i>A lista proibida</i>	35
1.4.2	<i>Os métodos proibidos</i>	36
1.4.3	<i>A detecção do doping</i>	37
1.5	Aspectos gerais dos analitos estudados	38
1.5.1	<i>Furosemida</i>	38
1.5.2	<i>Bumetanida</i>	47
1.5.3	<i>Chumbo</i>	52
1.6	Espectroscopia de reflectância difusa associada à utilização de spot tests com papel de filtro qualitativo e membranas de celulose bacteriana.	57
1.7	Química Verde: conceitos básicos	61
2	OBJETIVOS	63
3	PARTE EXPERIMENTAL	63
3.1	Metodologias	64
3.1.1	<i>Metodologia para a coleta de impressões digitais utilizando membrana de celulose bacteriana</i>	64
3.1.2	<i>Metodologia para a coleta e análise de resíduos de disparo de armas de fogo utilizando membrana de celulose bacteriana</i>	64
3.1.3	<i>Metodologia para a análise de chumbo em loções progressivas para cabelo utilizando papel de filtro qualitativo</i>	66
3.1.4	<i>Metodologia para a análise de furosemida e bumetanida em urina utilizando papel de filtro qualitativo com área delimitada</i>	66
3.2	Equipamentos	68
3.3	Reagentes e Soluções	68
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72

4.1	Utilização de membranas de celulose bacterianas para a coleta de impressões dígito-papilares	72
4.1.1	<i>Coleta de impressões digitais utilizando ninidrina</i>	72
4.1.2	<i>Coleta de impressões digitais utilizando óxido de zinco</i>	76
4.1.3	<i>Coleta de impressões digitais utilizando nitrato de prata</i>	80
4.2	Coleta de resíduos de disparo de armas de fogo utilizando membranas de celulose bacteriana	90
4.2.1	<i>Testes com celulose vegetal</i>	93
4.2.2	<i>Coletas utilizando membranas de celulose bacteriana</i>	96
4.2.3	<i>Quantificação de chumbo proveniente de GSR</i>	102
4.2.3.1	Otimização das variáveis para a coleta de chumbo	102
4.2.3.2	Curva analítica, repetibilidade e limites de detecção e quantificação para a coleta de chumbo	105
4.2.3.3	Estudos de estabilidade da membrana de celulose bacteriana para a coleta de chumbo	106
4.2.3.4	Identificação do tempo de disparo	108
4.3	Controle de qualidade: loções progressivas para cabelo	112
4.4	Doping Esportivo	114
4.4.1	<i>Doping por furosemida</i>	114
4.4.1.1	Planejamento composto central para a quantificação de furosemida	115
4.4.1.2	Estabilidade óptica do produto da reação entre furosemida e p-DAC	118
4.4.1.3	Linearidade, repetibilidade e curva analítica para a quantificação de furosemida	119
4.4.1.4	Limites de detecção e quantificação para o método de quantificação de furosemida	121
4.4.1.5	Estudo de Interferentes da matriz para a quantificação de furosemida	121
4.4.1.6	Adição de padrão e recuperação para quantificação de furosemida em amostras de urina natural	123
4.4.1.7	Aplicação dos métodos propostos para a quantificação de furosemida em amostras de urina natural	123
4.4.2	<i>Doping por bumetanida</i>	124
4.4.2.1	Planejamento composto central para a quantificação de bumetanida	126
4.4.2.2	Estabilidade óptica do produto da reação entre bumetanida e p-DAC	128
4.4.2.3	Linearidade, repetibilidade e curva analítica para a quantificação de bumetanida	128
4.4.2.4	Limites de detecção e quantificação para o método de quantificação de bumetanida	128
4.4.2.5	Adição de padrão e recuperação para a quantificação de bumetanida em urina natural	130
4.4.2.6	Aplicação do método proposto para a quantificação de bumetanida em amostras de urina naturais e sintética	130
	CONCLUSÃO	132
	REFERÊNCIAS	134

1 INTRODUÇÃO

Kenneth E. Melson, da American Academy of Forensic Sciences já havia dito que não importa o sistema de justiça, se esta for legítima, a verdade é quem deve desempenhar um papel fundamental e proeminente, já que esta é a responsável pela sobrevivência da lei. Porém, para isso, é necessário haver mais pesquisas em ciências e nas técnicas em uso, em especial nas ciências forenses¹.

Um dos grandes problemas da atualidade consiste no fato de não haver profissionais devidamente treinados para exercerem a função requerida, seja no quesito de conhecimentos ou até mesmo no preparo psicológico necessário para a correta metodologia a ser aplicada².

Ainda que atualmente a maioria esmagadora dos profissionais envolvidos em investigações criminais esteja restrita a uma ou duas áreas de atuação que dependem da instituição ou do curso realizado antes ou durante o trabalho como criminalista. É sempre necessária a atuação de várias áreas do conhecimento como química, física, medicina, biologia, história, psicologia, antropologia, dentre várias outras. Por esses e outros motivos, a ciência forense, num geral, está crescendo e se expandindo, pois sempre são necessárias validações nas diversas áreas da investigação criminal^{1,3}. Para tanto, sempre são necessários novos protocolos para substituir os anteriormente usados, menos confiáveis, bem como novos métodos de análise que se adéquem à atual linha de pensamento científica e realidade mundial, como a utilização de equipamentos e métodos menos custosos e ambientalmente mais amigáveis, sem deixar de lado a precisão, exatidão e eficiência dos anteriormente usados, por vezes até melhorando-os.

1.1 A Química nas investigações criminais

A química aplicada à área forense se ocupa da investigação forense em campos especializados, encarregando-se da análise, classificação e determinação de elementos ou substâncias encontradas nos locais de averiguação ou ocorrência de um delito ou que podem estar relacionadas a este, a fim de atender aspectos de interesse judiciário, atendendo basicamente as áreas de estudos da criminalística e da medicina legal⁴. Dentro do ramo da química forense, são encontradas as análises empregadas em disparos de armas de fogo⁴, na identificação de adulterações em veículos⁵, na identificação de

numeração serial em armas de fogo⁶, revelação de impressões digitais⁷, identificação de sangue em locais de crimes ou peças a este relacionadas⁸ e na constatação de entorpecentes, dentre outros.

Logo, um químico forense deve trabalhar na identificação, determinação, composição, natureza e proveniência de materiais de modo a estabelecer uma possível correspondência entre as amostras coletadas, o crime e eventuais suspeitos. Um químico da área forense deve possuir uma boa base em química analítica e ter conhecimentos de farmacologia e análises clínicas, pois, muitas vezes, deverá trabalhar com baixas concentrações de analitos em matrizes complexas como sangue e urina⁹.

1.1.1 Um breve histórico

De acordo com Farias¹⁰, a utilização dos conhecimentos científicos para a análise de provas de crime iniciou-se com o surgimento da civilização. Um exemplo é a antiga Roma, onde era comum os casos de envenenamento. Mas foi por volta do século XVII que o emprego dos conhecimentos científicos na elucidação de crimes teve seu início.

Farias cita a obra de Bernardino Ramazzini¹¹, intitulada “As doenças dos trabalhadores”, de 1700, obra esta que reúne os conhecimentos sobre as ações de substâncias químicas na fisiologia humana e que foi de grande valia para a química forense como é hoje conhecida. Cita também Orfila, reconhecido atualmente por muitos historiadores como o pai da toxicologia forense que, em 1840, foi convidado para atuar como perito no caso de uma suspeita de envenenamento. Orfila contribuiu com o seu “Tratado de Medicina Legal” para a ciência forense na área toxicológica.

Foi Ruhemann, em 1910, que verificou que a ninidrina formava compostos coloridos ao reagir com peptídios, proteínas e alfa-aminoácidos¹², ainda que só a partir de 1950 que a sua utilização em química forense tornou-se difundido após o trabalho de Oden e Von Hoffsten, em 1954, que descreveram a utilização de ninidrina como reagente para a revelação de impressões digitais por reagir com os aminoácidos secretados pelas glândulas sudoríparas¹³. Em geral, ao se falar de papiloscopia, mesmo esta já tendo sido utilizada pelos japoneses no século VII e pelos chineses no século XII, foi a obra “Finger Prints”, de Sir Francis Galton, que se tornou a obra de referência quanto a identificação por impressões digitais¹⁰.

Farias cita também que Hans Gross (1847-1915) é conhecido como o fundador da criminologia e da criminalística. Gross, que estudou química, física, botânica, zoologia, microscopia e fotografia, foi um dos primeiros a perceber a importância e aplicabilidade que os conhecimentos científicos poderiam ter na resolução de crimes e, assim, publicou sua obra “Manual para Juízes de Instrução”, em 1893.

Além destas descobertas e obras importantes para as ciências forenses, pode-se citar a utilização de outras substâncias e técnicas que alavancaram e estabilizaram a química aplicada à ciência forense, como a utilização de luminol para a detecção de manchas de sangue, as técnicas de DNA para a identificação de suspeitos nos mais diversos tipos de crime e as técnicas de instrumentação utilizadas largamente em laboratórios.

1.1.2 *As técnicas instrumentais*

Desde o início e, em especial, meados do século XX, houve uma substituição gradual dos métodos clássicos de análise pelos métodos instrumentais, que têm as vantagens de maior exatidão e a possibilidade de análise com uma porção menor de amostra ainda que os métodos clássicos possuam um custo mais baixo¹⁰.

Dentre as várias técnicas e instrumentação laboratorial pode-se encontrar, frequentemente, a espectroscopia, a cromatografia e a microscopia¹⁰.

1.1.2.1 *Técnicas espectrométricas*

Estas técnicas estão dentre as mais utilizadas atualmente, ainda que seja necessário um espectrofotômetro a fim de se medir a intensidade da radiação resultante¹⁴.

São capazes de gerar resultados visíveis a olho nu, como a detecção de sangue por luminol, de resíduos de armas de fogo por rodizonato e a de coleta de impressões digitais utilizando reagentes como a ninidrina e o nitrato de prata.

Nestes casos, pode-se citar, por exemplo, a utilização de reações dos componentes dos resíduos de disparo e suas posteriores quantificações utilizando, principalmente, ICP¹⁵,¹⁶ e Raman^{17, 18}, que pode ser apenas para análises a fim de pesquisas futuras, para predição de número de disparos efetuados ou a distância destes.

Além disso, para análises orgânicas, pode ser utilizado também o infravermelho próximo (NIR). Neste caso, temos exemplos onde esta técnica foi utilizada para a

determinação da idade de manchas de sangue¹⁹ e, conseqüentemente, descobrir há quanto tempo um crime foi cometido baseado no princípio da transformação da desoxihemoglobina em metahemoglobina. Pode ser utilizado também na análise de tintas, fitas, adesivos e propelentes de armas de fogo²⁰, na identificação de pigmentos orgânicos em revestimentos²¹ e até na análise de fibras de tecidos.

A espectroscopia de absorção atômica pode ser utilizada, por exemplo, na análise de resíduos de disparo de armas de fogo^{22, 23}, envenenamento por metais^{24, 25} e presença de metais em drogas de abuso²⁶.

1.1.2.2 Técnicas cromatográficas

As técnicas cromatográficas vêm sendo amplamente empregadas, principalmente, na identificação e detecção de drogas de abuso e venenos²⁷⁻³³. As técnicas cromatográficas são importantes para estes dois tipos de análises hoje em dia porque além de identificar as drogas em si, também são capazes de identificar os demais compostos presentes nestas, uma vez que atualmente há a adulteração das drogas com outros produtos, como talco e amido, para aumentar o seu volume. Assim, dependendo do tipo e da quantidade de adulterante empregado, pode-se até mesmo inferir de qual grupo criminoso a droga teve procedência¹⁰. Além disso, sua utilização para a identificação de carbamatos³⁴⁻³⁷, que são os princípios ativos de diversos inseticidas comerciais, utilizados frequentemente para tentativas de homicídio e suicídio no Brasil, assim como os formicidas.

A cromatografia também é amplamente utilizada para análise de doping³⁸⁻⁴² esportivo a fim de se evitar concorrência desleal e para se zelar pela saúde dos esportistas que desconhecem ou ignoram os graves efeitos colaterais que algumas formas de dopagem podem causar. De acordo com Young⁴³, o uso de drogas para aumentar a performance no esporte é tão velho quanto a própria prática esportiva ainda que a proibição de seus usos seja relativamente recente. Cita ainda que o controle do uso de substâncias proibidas só foi possível após a aparição da cromatografia gasosa, em torno de 1960.

1.1.2.3 Técnicas de microscopia

Atualmente, o MEV vem sendo o equipamento de microscopia mais utilizado para as investigações forenses porque além de permitir a visualização microscópica das

amostras, também permite a análise quantitativa e qualitativa dos elementos químicos que a compõem através da utilização de uma sonda para a realização de uma análise EDS¹⁰.

A técnica de microscopia é mais amplamente utilizada para a análise de resíduos de disparo de armas de fogo onde se pode fazer, por exemplo, uma comparação entre os resíduos presentes nas mãos do atirador com aqueles encontrados nos cartuchos⁴⁴. Num trabalho similar⁴⁵ foi estudada a possibilidade de diferenciar através da utilização do MEV-EDS diferentes amostras de munições.

Além de sua utilização em balística forense, também pode ser empregado para análises da potencialidade inflamável de líquidos⁴⁶, para classificação de vidros⁴⁷ e no estudo de ossos queimados⁴⁸.

Em suma, todas as técnicas aqui apresentas além de muitas outras que existem e não foram citadas como a análise por ativação neutrônica (NAA), a análise térmica, a espectrometria de massas, dentre outros, podem ser utilizadas nos mais diversos centros forenses a fim de se chegar na verdade desejada dentro dos mais variados casos onde a química pode ser aplicada: toxicologia, balística, doping, papiloscopia, DNA, análise de sangue, explosivos, incêndios, etc.

Dentre esses, a partir de agora, daremos um enfoque à papiloscopia, à balística e ao doping, os principais objetivos deste trabalho.

1.2 Uma visão geral sobre a balística forense

A balística é uma disciplina da criminalística que estuda as armas de fogo, suas munições e os efeitos dos disparos por ela provocados na perspectiva relacionada com infrações penais, tendo em vista esclarecer e provar a sua ocorrência. Pode ser dividida em 3 partes⁴⁹⁻⁵¹, apresentadas a seguir.

1.2.1 A balística interna, externa e terminal e a formação de resíduos.

Balística interna: estuda a estrutura, mecanismos, funcionamento das armas de fogo, a técnica do tiro e os efeitos da detonação do fulminante e deflagração da carga propulsora das munições no seu interior até o momento da projeção do projétil pelo cano da arma. A Figura 1 mostra um desenho simplificado do disparo de um projétil, que ocorre quando o cão, ao ser acionado pelo gatilho do revólver (a) acerta a parte de trás do

cartucho, a espoleta, onde fica a mistura iniciadora, ou fulminante (b), que dará início ao processo de combustão para a ejeção do projétil através da formação dos gases resultantes da reação (c)⁵².

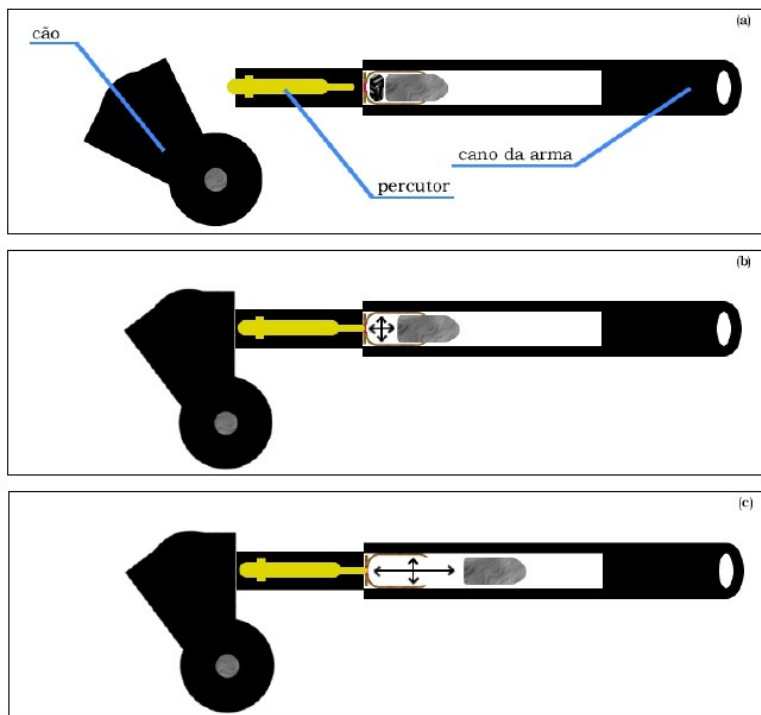


Figura 1. Processo do disparo de uma arma de fogo.
Fonte: Chemello⁵².

Balística externa: estuda a trajetória do projétil desde a sua saída da boca do cano da arma até a sua imobilização final, analisando as condições de movimento, sua velocidade inicial sua forma, massa, superfície, resistência ao ar, ação da gravidade e os seus movimentos, influenciados ou não pelo próprio ambiente. O estudo desta parte da balística é fundamental para se obter uma boa coleta dos resíduos uma vez que as condições da arma, do disparo e do ambiente influenciam nesta.

Balística terminal: estuda os efeitos ao se atingir o alvo, incluindo possíveis ricochetes, impactos, perfurações e lesões internas ou externas nos corpos atingidos. Esta parte da balística é estudada quando se deseja, por exemplo, determinar a distância aproximada do tiro.

Os exames realizados hoje na área de balística envolvem, em sua maioria, além dos exames residuográficos feitos na hora, microscópios eletrônicos de varredura e microscópios de comparação e compreendem exames de veículos baleados, reconstituições de ocorrências envolvendo armas de fogo, determinação de trajetórias de projéteis e exames de superfícies que apresentam impactos ou perfurações resultantes de impactos de projéteis de armas de fogo^{49, 51, 53}.

Sunlin Hu apresentou em seu artigo⁵³ o relato de um caso real onde, durante um acidente de carro envolvendo duas pessoas que acabaram entrando numa discussão, foi necessária intervenção policial. Porém, como a discussão tomara proporções violentas, um dos policiais foi obrigado a sacar sua arma e efetuar dois disparos de advertência, tendo o segundo disparo acertado a cabeça de um jovem que estava no local. Uma vez que uma testemunha afirmou que ele disparara diretamente contra o indivíduo, a perícia foi decisiva. Investigando o local do crime, foi encontrado em um poste de concreto uma marca semelhante a um ricochete. Quando amostras deste possível lugar de ricochete, da pólvora utilizada pelo policial e do crânio da vítima foram levadas ao laboratório para análise através de microscopia eletrônica de varredura, foi possível verificar que o projétil acertou primeiramente o poste, deixando resíduos deste no lugar do ricochete e depois o crânio da vítima, deixando nele resíduos tanto do projétil quanto do poste. Assim, pode-se verificar que, numa análise forense, é indispensável a utilização dos conhecimentos da balística interna, externa e terminal para que uma análise laboratorial química ou física forneça informações juridicamente relevantes.

Ainda que nem todas as armas de fogo ejetem os estojos que continham os projéteis, todas expõem os resíduos de disparo para a atmosfera, que contém porções de chumbo, bário e antimônio. Quando estes três compostos são encontrados em suspeitos, pode-se inferir que o indivíduo ou disparou uma arma de fogo, ou esteve presente quando ocorreu o disparo ou que manuseou uma arma de fogo recém-disparada⁵⁴.

Uma parte destes resíduos permanece dentro do cano, outra parte ao redor do tambor e da câmara de percussão da arma e o restante é projetado para fora, atingindo as mãos, os braços, os cabelos e as roupas do atirador, além de se espalharem pela própria cena⁵². Após a deposição dos resíduos sobre as mãos, a perda dessas partículas ocorre de forma contínua e ininterrupta. Por esse motivo, a coleta, sempre que possível, deve ser realizada rapidamente. Porém, a utilização de diferentes tipos de armas resultará em diferentes tipos de deposições. Um revólver, por exemplo, depositará o material

particulado nas mãos do atirador, preferencialmente. O mesmo acontece com as pistolas, ainda que estas depositem menos material uma vez que a região onde os cartuchos ficam inseridos é bem mais protegida que a de um revólver. Se a suspeita é de que o disparo fora realizado com uma arma e cano longo, deve-se procurar o material particulado nas roupas e no cabelo.

1.2.2 *Efeitos de choque no corpo humano e a deposição dos resíduos*

O tipo de lesão provocado por um projétil de arma de fogo é conhecida como *pérfuro-contusa*, caracterizada pela pressão inicial em um ponto juntamente com a grande pressão em pequena área. Assim que há a penetração do projétil no corpo, a pele se invagina, criando o “dedo de luva”. Uma vez que a elasticidade da pele é diferente na derme e na epiderme, estas se rompem, formando um degrau com orla escoriada, conhecida como “*orla de contusão*”^{8, 51}.

Uma vez que o projétil possui um movimento de rotação em torno de seu próprio eixo (ocasionado pelos raiamentos das armas de alma raiada, o que aumenta a sua estabilidade ao longo da trajetória), este acaba por carregar consigo resíduos da própria arma ou do projétil em si e, ao penetrar o tecido, acaba por depositar tais resíduos, criando a “*orla de enxugo*”⁵⁵.

Nas áreas onde houve a retirada de mais epiderme do que de derme, ocorre a “*orla de escoriação*”.

Deste modo, como explicado por Francisco Sílvio Maia⁵⁵ e por Eraldo Rabello⁵⁶ e, como mostrado nos parágrafos acima, em relação à balística terminal, os projéteis disparados por armas de fogo provocarão diferentes tipos de efeitos no corpo humano e, de modo geral, estes efeitos podem ser divididos em efeitos primários e efeitos secundários.

Os efeitos primários incluem as orlas de contusão, de enxugo e de escoriação e são ocasionados pela ação direta do impacto do projétil no tecido do corpo e pela ação indireta que dependerá de fatores físicos ou fisiológicos da pessoa atingida⁵⁶.

Os efeitos secundários englobam os efeitos permanentes, orlas, zonas e lesões típicos de disparo à curta distância onde podem ser encontradas 3 principais zonas: a “*zona de chamuscamento*”, que se forma apenas nos tiros encostados, onde parte do tecido foi incendiada pela queima dos gases superaquecidos provenientes da combustão do explosivo propelente; a “*zona de esfumaçamento*”, que se forma através da deposição de fuligem

resultantes da combustão em torno do orifício de entrada do projétil e a “zona de tatuagem”, que decorre da deposição de grãos de pólvora ao redor do orifício de entrada do projétil⁵⁵.

Nos tiros de longa distância formam-se apenas as orlas e o orifício é simétrico e menor que o projétil. Nos tiros próximos são formadas todas as zonas e orlas e nos tiros encostados formam-se apenas as orlas, sendo o orifício irregular e maior que o projétil.

Deste modo, os resíduos depositados principalmente na orla de enxugo e nas zonas de esfumaçamento, onde as partículas não estão fortemente aderidas à pele podem ser coletados e através de uma análise destas partículas, seja morfológica ou composicional, é possível estabelecer relações comparativas entre os resíduos encontrados no corpo com aqueles deixados nas armas ou mãos dos atiradores. Os elementos assim analisados são derivados, principalmente, do estífnato de chumbo, nitrato de bário, trissulfeto de antimônio, alumínio e na composição da liga de projéteis não jaquetados de chumbo/antimônio⁵⁵

1.2.3 *A coleta e os exames residuográficos*

Como visto anteriormente, assim que há o disparo de um projétil há também a propulsão de partículas macro e microscópicas originadas dos explosivos contidos no cartucho de munição. Os exames residuográficos são aqueles utilizados no diagnóstico de disparo de uma arma de fogo a fim de se pesquisar partículas de interesse como bário, chumbo e antimônio, principalmente no material colhido do lugar de interesse (mãos, roupas, cabelos, muco nasal do suposto atirador) ou do anteparo de impacto (desde um corpo até uma parede, carro, cerca, dentre outros)⁵⁷.

Como citado por Farias¹⁰, os componentes de interesse de coleta nos exames residuográficos são originados principalmente da mistura iniciadora, cuja principal composição é a citada no último parágrafo do tópico 1.3.2., sendo também gerados CO, CO₂, H₂O e os óxidos dos metais citados. Cita também que, embora exista no mercado os cartuchos *Clean Range*^{®58}, cuja mistura iniciadora na espoleta esteja livre de chumbo, bário e antimônio mas cerca de 23% de óxido de estrôncio são formados. Outros metais que podem aparecer incluem zinco, silício, cobre e titânio.

A coleta de resíduos de disparo é feita atualmente através de *stubs* (para a análise por microscopia eletrônica de varredura), fita adesiva, esparadrapo (sendo posteriormente colado em papel de filtro), resina, papel de filtro e cotonetes⁵⁷.

1.3 Uma visão geral sobre os exames dígito-papilares

De acordo com Chemello⁵⁹, em 2000 a.C. os babilônios usavam padrões de impressões digitais em barro para acompanhar documentos de modo a prevenir falsificações. Mais adiante, no período Antigo, era freqüente práticas como a marcação com ferro em brasa e mutilações que geravam padrões de identificações em indivíduos que praticassem crimes ou escravos fugitivos. Nos EUA, o código de 1700 autorizava o emprego de mesma técnica para crimes de seqüestro ou roubo e, finalmente, no século XX, a papiloscopia, de um modo geral, se consagrou como método de identificação humana.

Ainda que a prática da utilização das impressões digitais fosse utilizada há tempos para diversas finalidades, foi apenas recentemente que seu uso foi mais difundido. Em 1858, um oficial administrativo britânico utilizou a gravação de impressões digitais como forma de contrato com nativos da Índia, tentando, posteriormente, em 1877, obter autorização para utilizar as impressões digitais como forma de identificar seus prisioneiros⁵⁹. Porém, foi apenas em meados do século XX que a aplicação da análise das impressões digitais em larga escala ocorreu. Mark Twain, por exemplo, escreveu sobre a identificação de um homicida por seu polegar, em 1883 e, em 1880, Faulds, um médico escocês, escreveu vários artigos, publicados na *Nature*, sobre suas observações a respeito das impressões digitais⁵⁹.

O contato de uma parte do corpo que possa deixar certa quantidade de resíduos (como os dedos das mãos e dos pés, as palmas das mãos e as solas do pés) pode gerar uma impressão, onde em torno de 0,1 mg de resíduos é deixado para trás. Dentre estes resíduos, em torno de 98 a 99% é composto de água que logo evapora, deixando uma pequena quantidade de material sólido composto de sais inorgânicos, gorduras, aminoácidos, vitaminas, uréia, dentre outros⁶⁰.

1.3.1 O sistema de identificação de Vucetich

Em 1883, Arthur Kollman, um anatomista holandês postulou que os desenhos papiloscópicos em cada ser humano já estão formados desde o ventre materno a partir do sexto mês de gestação e que tal desenho não se altera com o passar dos anos, não incluindo alterações devido a agentes externos. Tais impressões também variam de pessoa para pessoa assim como entre os dedos, palmas ou solas diferentes em um mesmo indivíduo, sendo jamais encontradas duas impressões idênticas, podendo, portanto, ser utilizadas na identificação humana⁵⁹.

Tomando-se uma impressão digital, a leitura das cristas papilares se dá no sentido horário, sendo iniciada na posição 12 horas, tomando-se como base a parte mais central do desenho. Isto é feito para evitar confusões na hora da nomenclatura das linhas que formam a impressão digital. Geralmente são requeridos 12 pontos identificadores para se considerar que há elementos suficientes para uma identificação precisa (referência verbal)^a. Tais pontos identificadores são espécies de marcas entre as cristas papilares utilizadas para identificar as impressões através de suas coincidências com um banco de dados ou uma coleta direta de um suspeito^{61, 62}. A figura 2 mostra alguns pontos identificadores utilizados no processo de identificação por impressões digitais onde, em ordem, de “a” a “f”, temos: ponto, ilha, extremidade de linha, bifurcação, confluência e haste.

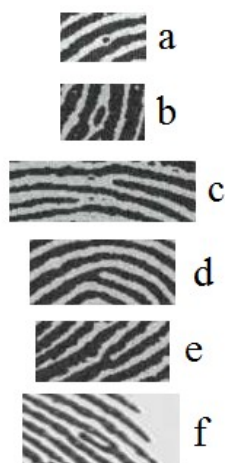


Figura 2. Exemplos de pontos identificadores de impressões digitais.
Fonte: adaptado de Papiloscopia⁶¹.

^a Citado por Caroline Cássia Silva Brito no III Simpósio Forense no mini-curso Papiloscopia, Necropapiloscopia e Fotografia Forense, Ribeirão Preto, 30 de setembro de 2011.

Na Figura 2 pode-se ver claramente a necessidade de uma normatização para a leitura da impressão digital que, como já dito, se dá a partir da posição 12 horas, em sentido horário, a partir do ponto central. Como pode-se perceber, a bifurcação e a confluência, respectivamente “d” e “e” são similares, sendo diferenciadas apenas pelo modo de leitura.

Atualmente, o Brasil utiliza o sistema de classificação de Vucetich. Tal sistema é baseado em quatro tipos fundamentais de impressões digitais: arco (A1), presilha interna (I2), presilha externa (E3) e verticilo (V4), cujos exemplos estão demonstrados na figura 3.

As letras A, I, E e V são utilizadas para representar os polegares enquanto os números de 1 a 4 são utilizados para representar os demais dedos⁶¹.

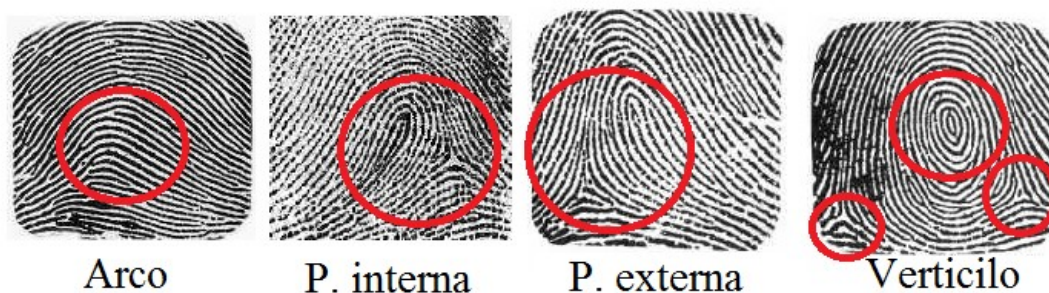


Figura 3. Tipos fundamentais de impressões digitais, de acordo com o sistema de Vucetich.
Fonte: adaptado de Papiloscopia⁶¹.

Como é possível verificar na imagem, no tipo arco não é encontrado nenhum delta, apenas linhas de formas relativamente paralelas; no tipo presilha interna são encontradas linhas que partem da esquerda e um delta à direita do observador; no tipo presilha externa são encontradas linhas que partem da direita e um delta à esquerda do observador e no tipo verticilo são encontrados dois deltas, um à direita e um à esquerda do observador, sendo o meio da impressão caracterizado por linhas circulares.

O arquivamento das impressões digitais se dá em ficha específica com 10 campos para seqüenciar as impressões digitais, sendo cinco destes localizados na parte superior destinados para a mão direita e cinco na parte inferior, destinados para a mão esquerda. A ordem de arquivamento para as impressões digitais começa sempre no polegar e termina no mínimo e cada um recebe a classificação de acordo com o seu tipo fundamental, sendo, como já citado, o polegar descrito por letras (A, I, E, V) e os demais dedos por números (1, 2, 3, 4), como mostrado na Figura 4⁶¹, onde pode-se perceber que a seqüência dos tipos fundamentais para os dedos da mão direita do indivíduo é, a partir do polegar, verticilo,

arco, presilha externa, verticilo e presilha externa e, para a mão esquerda, verticilo, presilha interna, arco, presilha interna e presilha interna.



Figura 4. Exemplo de ficha para seqüenciar impressões digitais.
Fonte: adaptado de Papiloscopia⁶¹.

1.3.2 Coleta e revelação de impressões dígito-papilares

A visualização de impressões digitais latentes envolve, na maioria dos casos, reações com os componentes orgânicos, sendo que os primeiros métodos utilizados envolviam espalhamento de pó, vapor de iodo e nitrato de prata, sendo os dois primeiros processos físicos e o último, um processo químico através da reação com os ânions cloretos presentes nos resíduos. Foi em torno de 1960 que a ninidrina começou a ser utilizada uma vez que esta reagia com os aminoácidos presentes através da reação do Violeta de Ruhemann^{60, 63, 64}. A partir de 1976 a fotoluminescência começou a ser explorada como uma metodologia para a detecção de impressões digitais⁶⁵.

Entre as técnicas físico-químicas utilizadas atualmente, existe a por deposição de filmes metálicos a vácuo, de éster de cianoacrilato, de pós metálicos, de pós de corantes e a técnica de laser de argônio com emissões de 470 nm a 550 nm, de reagentes químicos fluorogênicos, que reagem com proteínas, o de vapor de iodo e o nitrato de prata⁵⁵.

A técnica do pó, por exemplo, atua através da aderência mecânica entre as partículas do pó utilizado e os diversos compostos da impressão digital⁷. Para impressões digitais recentes, o pó se adere à água. Porém, mesmo se esta já tiver sido depositada há mais tempo, onde a água já terá sido evaporada, deixando no lugar apenas os sais inorgânicos e os compostos orgânicos sebáceos, os pós ainda conseguem ser utilizados⁶⁴.

Além disso, com o avanço da ciência, hoje é possível coletar as impressões digitais até de superfícies que outrora ofereciam grandes dificuldades para os peritos. Nanopartículas de óxido de zinco, por exemplo, são utilizadas em um pó que interage com a gordura das impressões digitais⁶⁶ mesmo na presença de grande quantidade de água, sendo a região posteriormente iluminada com luz ultravioleta. Para coletar impressões digitais de pele humana, foi desenvolvido um equipamento portátil que utiliza a técnica de espectroscopia de superfície aumentada, baseada na ampliação da dispersão RAMAN por absorção de moléculas sobre superfícies, sendo o instrumento feito com nanofios revestidos de prata⁶⁷.

1.4 Uma visão geral sobre o doping

O Código Mundial Antidopagem define o *doping* como sendo a ocorrência de violação de uma ou mais regras previstas que incluem a presença de substâncias proibidas ou seus metabólitos nos fluidos do corpo do atleta, a presença de um composto quimicamente ou farmacologicamente relacionado a uma substância proibida ou a utilização de outros métodos de *doping* que incluem manipulação química ou física, *doping* genético e aumento da transferência de oxigênio^{39, 68-70}. Para cuidar destes problemas nos esportes organizados foi criada, em 1999, a WADA (*World Anti-Doping Agency*), uma iniciativa compartilhada do esporte e de governos para promover a coordenar a luta contra o *doping* internacional e nacional através da educação, advocacia e pesquisa³⁹. A WADA é a responsável pela publicação e revisão da lista proibida⁶⁸, onde todas as substâncias e métodos de *doping* são listados. Porém é o Comitê Olímpico Internacional que controla a dopagem e credencia os laboratórios para realizarem as análises com o objetivo de evitar a vantagem desleal e a vigilância pela saúde do atleta⁷¹.

O Comitê Olímpico Brasileiro⁷² registrou, em 2005, num levantamento com 139.836 atletas, que 2958 tiveram resultados positivos para *doping*, dos quais 43,4% usaram anabolizantes (potencializam as funções hormonais), 14,2% beta-2 agonistas (relaxam e abrem as vias aéreas para os pulmões), 11,8% estimulantes (aumentam a estimulação do sistema cardíaco e metabólico), 11,7% canabinóides (derivados da *Cannabis sativa*, drogas alucinógenas e depressoras), 7,6% glucocorticosteróides (inibem o processo de inflamação), 5,7% diuréticos e outros agentes mascarantes, 3,8% hormônios e 1,8% outras substâncias.

Porém, a utilização de tais substâncias não é um problema apenas nos esportes. Estima-se que em torno de 18-25% dos jovens de 12 a 21 anos relatam o uso de medicamentos vendidos diretamente ao consumidor sem a devida prescrição de um profissional da saúde, sendo o seu uso maior entre os adolescentes da América do Norte. Muitos destes adolescentes, bem como a maioria dos atletas, preferem admitir o uso de cocaína a ter que admitir o uso de esteróides⁷³. Só nos Estados Unidos acredita-se que cerca de 1 a 3 milhões de pessoas utilizam esteróides, cerca de 1% da sua população⁷⁴.

1.4.1 A lista proibida⁶⁸

De acordo com a lista proibida publicada pela WADA, em 2015, as substâncias estão divididas entre (1) aquelas que são proibidas dentro e fora das competições, (2) as substâncias proibidas apenas durante as competições e (3) aquelas proibidas apenas em determinados esportes⁶⁸.

Dentre as proibidas dentro e fora das competições podemos encontrar os anabolizantes, que promovem o crescimento celular e a sua divisão, o que resulta no desenvolvimento de diversos tipos de tecidos, sendo o muscular e o ósseo os mais desejados. Quando tomados em doses altas, aumentam o número de hemácias e a capacidade respiratória, reduzindo a taxa de gordura corporal, resultando no ganho de força, potência e tolerância física corporal, sendo preferencialmente utilizados para *doping* em esportes que envolvam força explosiva. Porém, os anabolizantes podem causar problemas relacionados com infarto em jovens, atrofiamento dos testículos, ginecomastia, esterilidade, redução do HDL e aumento do LDL⁷⁵.

Dentre os esteróides anabólicos pode-se encontrar a desoximetiltestosterona, norboletona, drostanolona, nandrolona, clenbuterol, oximetolona, prostanazol, 1-testosterona e o androstenediol⁶⁸.

Dentre os diuréticos e agentes mascarantes estão proibidos, por exemplo, a amilorida, bumetanida, furosemida, espirolactona, tiazidas, clorotiazidas, hidroclorotiazidas e o triantereno.

Os diuréticos estão na lista proibida porque, ao aumentar a quantidade de urina produzida e, conseqüentemente, a excretada, acaba por diminuir a concentração das substâncias ilegais (por diluição) que podem estar presentes na urina que, de outra forma, seriam detectadas em concentrações altas. Além disso, também atuam na perda rápida de

massa corporal. Por estes motivos, são largamente empregados em esportes envolvendo categorias de pesos. Podem causar desidratação, câibras, doenças renais, perda acentuada de sais minerais e alterações no volume do sangue e no ritmo cardíaco.

Dentre as substâncias proibidas durante as competições podemos encontrar os estimulantes e todos os seus isômeros ópticos como a mefedrona, efedrina, epinefrina, anfetaminas e a cocaína.

Os estimulantes aumentam os níveis de atividades motoras e cognitivas ao estimular o funcionamento do cérebro, aumentando a capacidade física momentânea como diminuição de fadiga e aumento da percepção dos demais sentidos. Em doses elevadas pode causar aumento de sensibilidade, da temperatura corporal e convulsões e o uso crônico de alguns estimulantes específicos, como as anfetaminas, podem causar destruição dos neurônios, agressividade, paranóia, esquizofrenia, alucinações, tremores e respiração rápida.

Dentre os analgésicos narcóticos proibidos durante as competições encontramos hidromorfona, metadona, morfina e a oxicodona.

Os analgésicos narcóticos são utilizados para alívio da dor de certas lesões ou atividades, o que permite que os atletas agüentem a competição durante mais tempo. Porém, tal fato pode agravar uma lesão devido a não percepção desta ou da gravidade desta. Além disso, pode causar perda de coordenação, náuseas, insônia, depressão, diminuição da frequência cardíaca e ritmo respiratório. Seu uso crônico pode causar síndromes de abstinência. São utilizadas principalmente em esportes que exigem esforço contínuo e repetitivo.

Dentre as substâncias proibidas em determinados esportes podemos encontrar o etanol em esportes aéreos, arquearia, automobilísticos, motociclísticos e aquáticos. Os beta-bloqueadores, que combatem o nervosismo, stress e ansiedade são proibidos em esportes como arquearia, automobilísticos, arremesso de dardos, sinuca, golfe, tiro, esqui e aquáticos.

1.4.2 Os métodos proibidos⁶⁸

Além das substâncias proibidas, a WADA também prevê outros 3 métodos de *doping* considerados ilegais para competições esportivas. Entre eles encontramos o aumento da transferência de oxigênio, a manipulação química e física e o *doping* genético.

O aumento da transferência de oxigênio, também conhecido como manipulação do sangue ou de seus componentes envolve a administração ou reintrodução de sangue autólogo, homólogo ou heterólogo ou os produtos de células vermelhas sanguíneas de qualquer origem no sistema circulatório⁷⁶. Inclui também o melhoramento artificial da coleta, transporte e fornecimento de oxigênio e qualquer forma de manipulação intravascular do sangue ou de seus componentes através de meios químicos ou físicos⁷⁴ de modo a aumentar a distribuição destes nos músculos.

A manipulação química ou física envolve a alteração ou a tentativa de alteração de modo a alterar a integridade e a validade de amostras coletadas durante o controle de *doping*, como a substituição da urina pela de outra pessoa ou a adulteração química destas. Inclui também infusões intravenosas de mais de 50 mL nas últimas 6 horas, exceto as administradas por ocasiões hospitalares ou investigações clínicas.

O *doping* genético envolve a transferência de polímeros de ácidos nucleicos ou análogos destes e o uso de células normais ou geneticamente modificadas de modo a melhorar o desempenho atlético. Nesta espécie de *doping*, os genes modificados são implantados em vetores que são injetados no corpo do atleta, levando o respectivo gene para o destino desejado nas células, que passam a produzir quantidades maiores de substâncias que melhoram o desempenho esportivo⁷⁶.

1.4.3 A detecção do doping

Atualmente a urina é a matriz preferencial para a realização de exames de *doping* devido ao seu grande volume e por não ser um método invasivo, sendo a principal técnica de identificação a cromatografia, geralmente acoplada a um espectrômetro de massas⁷⁷. Estas amostras devem ser enviadas o mais rápido possível para a análise em um laboratório credenciado que fará a análise das substâncias proibidas.

Porém, tanto as análises na urina quanto as no sangue fornecem informações a curto prazo do uso de drogas por um indivíduo. Para tal, estudos já foram feitos e publicados em 2007⁷⁸ sobre a possível detecção das substâncias de *doping* nos cabelos uma vez que tais compostos possuem um maior tempo de permanência neles, dependendo do comprimento da haste capilar. Tal análise fornece informações de longo prazo do histórico de uso.

A cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (LC-MS) e a cromatografia gasosa são amplamente utilizadas com o intuito de análise de *doping* nas

competições esportivas uma vez que estas são capazes de detectar a grande maioria dos analitos de interesse. Ainda que a cromatografia gasosa seja bastante utilizada na detecção de algumas substâncias de *doping*, a cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas possui vantagens em relação a tratamento de amostras⁷⁹⁻⁸².

De acordo com Dominguez-Romero³⁹, em artigo publicado no ano de 2015, na última década houve um grande avanço na instrumentação analítica, tanto no quesito sensibilidade quanto em velocidade e resolução, o que levou ao surgimento de novos métodos de screening e que, para este propósito, há diferentes tecnologias LC-MS(MS) baseadas no que se deseja: ou em uma lista predefinida de analitos em condições otimizadas ou em condições e massas não-predefinidas.

Além disso, há também relatos de trabalhos onde 182 agentes de *doping* foram analisados usando extração em fase sólida usando coluna de troca catiônica⁸³ e trabalhos onde o tratamento da amostra foi eliminado para fins de screening⁸⁴ que, apesar de não ser para todos os analitos de interesse, ainda cobre uma vasta gama destes, tornando-se um meio extremamente útil considerando-se que atualmente o preparo das amostras envolve extração em fase sólida⁸⁵, extração líquido-líquido⁸⁶ ou clean-up na pré-coluna⁸⁷, todos tendo a desvantagem da baixa-seletividade.

1.5 Aspectos gerais dos analitos estudados

A seguir, serão apresentados os principais aspectos e trabalhos publicados dos analitos estudados neste trabalho: furosemida, bumetanida e chumbo.

1.5.1 Furosemida

A furosemida, um derivado do ácido antranílico e um dos diuréticos mais utilizados, pertence à classe dos diuréticos de alça, que possuem como principal sítio de ação a alça de Henle, onde inibe o sistema de transporte $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$, com conseqüente diminuição do volume sangüíneo e do débito cardíaco. É amplamente utilizada no tratamento de insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal crônica, cirrose do fígado, edemas e hipertensão⁸⁸⁻⁹⁰ desde a sua aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) como especialidade farmacêutica em 1979 devido à sua alta efetividade, baixo custo e poucos efeitos colaterais⁹¹.

Sua atividade farmacológica produz um aumento na excreção urinária, que pode aumentar em até 30 vezes comparada com a excreção normal de urina. Isto se dá devido à sua ação de bloquear a absorção de sais e líquidos na alça de Henle, resultando em uma menor perda de água por osmose e, conseqüentemente, no acúmulo de água nos rins, contribuindo para a perda de peso⁸⁹⁻⁹³ além de, em competições esportivas, atuar como agente mascarante para outros compostos de *doping*, diminuindo a concentração destes na urina ao aumentar o volume excretado desta⁹³, motivo pelo o qual esta é proibida durante as competições.

Sua atividade diurética provém, boa parte, dos substituintes cloreto e sulfonamida presentes em suas moléculas (figura 5), característicos em outras classes de diuréticos⁹⁴.

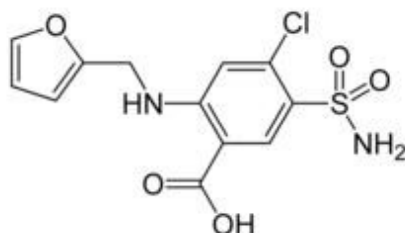


Figura 5. Fórmula estrutural da furosemida.
Fonte: elaborado pelo autor

A furosemida é rapidamente absorvida depois de sua administração oral e em torno de 60-90% é excretada na urina, sendo a outra parte na forma de glucoronida^{88, 92}. Esta grande diferença na excreção é, provavelmente, devido ao seu comportamento farmacocinético atribuído às diferenças de administração, de funções dos órgãos e dos tipos de pacientes tratados⁹⁵. A meia-vida da furosemida em indivíduos saudáveis varia de 30 a 120 minutos, podendo este valor ser influenciado por doenças como insuficiência cardíaca congestiva, quando a meia-vida poderá variar de 50 a 327 minutos⁹⁵.

O seu efeito de excreção de íons chega a ser de 8 a 10 vezes maior que os diuréticos tiazídicos, ainda que de ação mais curta e a excreção de íons sódio, cloreto, potássio, cálcio, magnésio e bicarbonato pode levar a desequilíbrios eletrolíticos além de poder também causar distúrbios gastrintestinais. A sua dosagem, de 10 a 80 mg por dia, deve ser administrada em doses divididas devido à sua curta duração de ação, podendo ser aumentada cuidadosamente até o máximo de 600 mg por dia⁹⁴, podendo ser encontrada no mercado em comprimidos de 20, 40 e 80 mg, em suspensão de 10 mg mL⁻¹, em gotas de 1 mg mL⁻¹ e solução injetável de 10 mg mL⁻¹⁹¹.

É praticamente insolúvel em água, escassamente insolúvel em álcool, bem solúvel em acetona e bastante solúvel em soluções alcalinas diluídas⁹¹.

Vários métodos são realizados para detectar furosemida na urina, como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e cromatografia em camada delgada além da espectrofotometria na região do UV e alguns métodos de confirmação baseados em cromatografia gasosa. Para a análise de furosemida em fármacos também são muito utilizados os métodos potenciométricos com eletrodos íon-seletivos⁹⁶ e muitos dos métodos colorimétricos na região do visível envolvem reações não-estáveis ou requerem aquecimento por um longo tempo. As tabelas 1, 2 e 3, nas páginas a seguir resumem alguns dos métodos publicados na literatura para a quantificação de furosemida em matrizes diversas.

Tabela 1. Métodos analíticos envolvendo detecção espectrométrica e fluorimétricas para determinação e quantificação de furosemida.

Ref.	Matrizes	Observações	LD/LQ
89	Urina natural e sintética	<ul style="list-style-type: none"> Utilização de extração em fase sólida para pré-concentração de 20x do analito. 	$4,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (LD)
91	Formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> Método baseado na fluorescência que a molécula apresenta em meio ácido; Meio tamponado de ácido clorídrico/cloreto de potássio a pH 2,0; Solvente: acetonitrila 	$4,84 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (LD)
97	Formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> Utilização de tampão acetato de sódio/ácido acético pH 4.5 e monohidrogenofosfato de sódio dodecahidratado e ácido fosfórico a pHs diferentes; Envolve aquecimento a 70°C por 30 minutos; Utilização de álcool isoamílico e clorofórmio como extrator. 	Não informado
98	Formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> Utilização de Pd(II) como reagente cromogênico e reação a 55°C. 	$5,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (LD)
99	Formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> Presença de metais como Mg(II) e Ca(II) são interferentes; Espera de 20 minutos a 37°C após adição dos reagentes para poder realizar a leitura. 	$0,03 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (LD)
100	Formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> Aquecimento por 5 minutos a 80°C 	$2,49 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (LD)
101	Urina humana	<ul style="list-style-type: none"> Centrifugação por 10 minutos a 3.500 rpm. 	$3,5 \times 10^{-4} \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (LD)
102	Urina sintética e formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> Frequência analítica de 95 medidas por hora; Utilização de análise por injeção em fluxo; Preparação fácil de amostra. 	$3,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (LD)
103	Urina humana	<ul style="list-style-type: none"> Amostras são centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm; Ajuste de pH a 2,0 ou 4,0 com ácido clorídrico. 	$6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (LD)
104	Urina e formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> 2 métodos: com ácido cromotrópico e naftil-etilenodiamina; Preparo fácil das amostras 	0,11 e 0,28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (LD) respectivamente

Os trabalhos anteriormente descritos foram alguns dos selecionados entre os atualmente existentes na literatura para a quantificação de furosemida em matrizes diversas utilizando detecção espectrofotométrica.

O trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa durante o meu período de mestrado⁸⁹ descreve a quantificação de furosemida em amostras de urina utilizando *spot tests* em papéis de filtro qualitativos e espectroscopia de reflectância difusa após reação do analito com Fe(III) e brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB) em solução aquosa, originando um complexo avermelhado, instantaneamente, com máximo sinal em 477 nm. A quantificação de furosemida era realizada após pré-concentração em cartucho de C₁₈, procedimento utilizado também para a eliminação de interferentes.

O trabalho descrito por BUITRAGO⁹¹, baseado na fluorescência que a furosemida apresenta em meio ácido ($\lambda_{exc}=280$ nm e $\lambda_{emi}=480$ nm) possui uma sensibilidade muito maior, como se pode perceber pelo seu limite de detecção. Porém, as soluções de furosemida são preparadas em acetonitrila, um solvente tóxico, sendo necessário também um meio tamponado a pH ácido. Já o trabalho descrito por SEVILLANO-CABEZA⁹⁷, baseado na reação da furosemida com a 1,2-naftoquinona-4-sulfonato, resultando num produto colorido com máximo sinal em 498 nm, envolvia aquecimento a 70°C por 30 minutos além de um procedimento de extração do produto utilizando álcool isoamílico como solvente extrator.

Foi descrito também por GARCIA⁹⁸, a quantificação de furosemida utilizando o reagente Pd(II), de custo de compra elevado. Neste método, a reação ocorria a 55°C, resultando em um composto cuja absorbância era lida em 410 nm.

Além do método descrito por GARCIA e SEVILLANO-CABEZA, outros descritos por LIU⁹⁹ e GOTARDO¹⁰⁰ também envolviam aquecimento, desta vez, aliado a um tempo de espera até a obtenção da cor desejada sendo o método de LIU espectrofluorimétrico, cujo espectro de emissão era obtido de 280 a 500 nm com excitação em 268 nm. O método de Gotardo é baseado na reação da furosemida com p-DAC em meio ácido com leitura em 585 nm.

Outros envolviam a utilização de centrifugação, como os métodos descritos por PERALTA¹⁰¹ e TSURULNEVA¹⁰³. O primeiro método é baseado na detecção fluorimétrica da furosemida ($\lambda_{exc}=237$ nm e $\lambda_{emi}=415$ nm) enquanto o segundo foi desenvolvido utilizando um espectrômetro de fluorescência onde a furosemida podia ser

detectada na presença de bumetanida apenas acidificando a amostra de urina até pH 2 ($\lambda_{exc}=270$ nm e $\lambda_{emi}=410$ nm).

O método descrito por SEMAAN¹⁰² envolve um procedimento de injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica após a reação da furosemida com Fe(III) em meio etanólico, cujo produto da reação era lido em 513 nm. Ainda que o método não tenha sido aplicado para amostras de urina naturais, este apresentou uma ótima frequência analítica e bons limites de detecção e alcance dinâmico linear da curva analítica.

THARPA¹⁰⁴ descreveu a quantificação de furosemida através de dois métodos utilizando dois diazo-reagentes: naftil-etilenodiamina e ácido cromotrópico com detecção espectrofotométrica em 520 e 500 nm, respectivamente, ambos com sensibilidade semelhante. Neste trabalho foi estudada também a estequiometria da reação, encontrando-se 1:1 para ambos os métodos. A análise de furosemida em urina envolveu a extração com éter dietílico e subseqüentes decantações e evaporações para ambos os métodos.

Tabela 2. Métodos analíticos com detecção eletroanalítica para determinação e quantificação de furosemida.

Ref.	Matrizes	Observações	LD/LQ
88	Urina e formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizado solvente metanol-água 1:9; • Eletrodo de carbono vítreo; • Métodos baseados em voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada. • Uso de acetato de etila, vórtex por 20 minutos e centrifugação por 5 minutos 	$1,51 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ (LD)
105	Urina e formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia líquida com detecção amperométrica; • Eletrodo de carbono vítreo; • Uso de acetato de etila, vórtex por 20 minutos e centrifugação por 5 minutos 	15 µg L ⁻¹ (LD)
106	formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> • Utilização de eletrodo polimérico (membrana de PVC) incorporado com o par iônico furosemida-cloreto; • pH não influencia na resposta do eletrodo no limite de 7-10; • Temperatura deve estar entre 20-35°C; • Tratamento de amostra simples. 	$1,19 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ (LD)
107	Urina e plasma sanguíneo	<ul style="list-style-type: none"> • Baseado na redução do complexo Zn(II)-furosemida em eletrodo de carbono vítreo modificado; • Preparo fácil das amostras. 	0,007 µg mL ⁻¹ (LD)
108	Urina e formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> • Acoplamento de voltametria de onda quadrada com BPPG ou BDD ou a-CN_x como eletrodos de trabalho; • Preparo fácil das amostras. 	0,30 µmol L ⁻¹ (o menor LD)
109	Urina, formulações farmacêuticas, plasma sanguíneo e leite bovino	<ul style="list-style-type: none"> • Sensor Pt Hg Hg₂(Fur)₂ Grafite; • Eletrodo com rápido tempo de resposta, 6 meses de vida útil e boa seletividade; • Tratamento das amostras de urina envolvem centrifugação, vórtex e extração com acetato de etila. 	$3,8 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ (LD)

É necessário, para os métodos eletroanalíticos envolvendo eletrodos, realizar o pré-tratamento destes, baseado no polimento para melhorar a sensibilidade e resolução e a sua lavagem (rinsamento) com água deionizada, preferencialmente.

Os trabalhos acima foram alguns dos selecionados entre os atualmente existentes na literatura para a quantificação de furosemida em matrizes diversas utilizando detecção eletroanalítica. Estes métodos representam a grande minoria daqueles publicados para a quantificação de furosemida e quase todos são baseados na utilização de eletrodo de carbono vítreo^{88, 106, 108}.

Ambos os métodos desenvolvidos por BARROSO^{88, 105} envolvem o mesmo tratamento de amostra (uso de acetato de etila como agente extrator, vórtex por 20 minutos e centrifugação por 5 minutos) ainda que os métodos sejam diferentes, sendo o de 1995 baseado na oxidação da furosemida dissolvida em metanol-água 1:9 utilizando voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada e o de 1996 baseado em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção amperométrica.

No trabalho de 1995 os autores fizeram um estudo utilizando diferentes sais como meio iônico, sendo escolhido o KCl por apresentar maior pico de corrente, sendo a influência da concentração do íon cloreto posteriormente estudada também. Um estudo de pH indicou que a melhor corrente é obtida em meio ácido.

No trabalho de 1996 os autores utilizaram a detecção desenvolvida em seu trabalho anterior. Como o trabalho visou a determinação de piretanida e furosemida, os autores trabalharam em cima dos valores de pK_a de ambos os diuréticos que, por serem diferentes, apresentam comportamento cromatográfico diferentes dependendo do pH da fase móvel.

No trabalho de DIAS¹⁰⁶, onde foi utilizado um eletrodo de membrana de PVC, os autores descrevem a construção do eletrodo de íon seletivo desde a mistura das alíquotas de furosemida preparadas em NaOH 0,1 mol L⁻¹ com cloreto de tricaprilmetilamônio até o corte das membranas formadas e a sua fixação no suporte condutor de grafite. Neste trabalho o efeito da temperatura foi estudado de 15 a 45°C e o pH de 3 a 10.

O trabalho de HEIDARIMOGHADAM¹⁰⁷ envolveu o estudo de algumas soluções-tampão em diferentes pH, o de MEDEIROS¹⁰⁸ estudou a detecção de furosemida usando 3 diferentes eletrodos: de diamante dopado com boro (BDD), de grafite pirolítico de plano basal (BPPG) e os de nitreto de carbono amorfo (a-CN_x), todos com resultados estatisticamente iguais na determinação de furosemida em formulações farmacêuticas, mudando apenas os seus limites de detecção: 0,30, 0,47 e 0,38, respectivamente.

O método desenvolvido por SANTINI¹⁰⁹ envolveu um estudo sobre a quantidade de grafite, a faixa de pH ótimo para a detecção e a seletividade para vários ânions, apresentando um eletrodo fácil de ser preparado, com uma boa seletividade e um ótimo limite de detecção. Neste trabalho foram também estudados o efeito do pH no sinal obtido e a seletividade do eletrodo, onde descobriu-se que os íons cloreto atuam como interferentes nestas condições mas que, por estes estarem raramente presentes nas matrizes estudadas (como informado pelo autor), o eletrodo pode ser usado com êxito sem preocupações quanto aos interferentes.

Tabela 3. Métodos analíticos cromatográficos para determinação e quantificação de furosemida.

Ref.	Matrizes	Observações	LD/LQ
95	Plasma sanguíneo e urina	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa e detecção por fluorescência; • Coluna μBondapak C₁₈; • Utilização de éter dietílico. 	5 ng mL ⁻¹ (LQ)
110	-	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa e detecção UV. • Determinação conjunta com topotecan, atenolol, antipiridina e propranolol; • Detecção de todos em 22 minutos. 	0,1 μ mol L ⁻¹ (LD)
111	Urina	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia líquida e detecção UV; • Extração micelar com SDS; • Coluna C₁₈ de fase-reversa; • Etanol como solvente. 	0,15 μ g mL ⁻¹ (LQ)
112	Urina	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia líquida e detecção UV; • Extração micelar com Triton X-100; • Coluna C₁₈; • Solvente: solução micelar. 	3 mg L ⁻¹ (LD)
113	Plasma humano	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia líquida e detecção por fluorescência; • Utilização de acetonitrila, heptanossulfonato de sódio e trietilamina; • Preparo da amostra envolve vórtex e centrifugação; 	27 ng mL ⁻¹ (LQ)
114	Plasma animal	<ul style="list-style-type: none"> • Utilização de LC-MS QQQ; • Utilização de éter dietílico, hexanos e diclorometano 1:1:1 como extratores; • Uso de centrifugação e vórtex e Coluna C₁₈. 	10 ng mL ⁻¹ (LD)
115	Urina	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatógrafo de eletroforese capilar; • Capilares de sílica fundida; • Utilização de clorofórmio e agitação manual por 2 minutos. 	25 ng mL ⁻¹ (LQ)
116	Plasma e urina	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia líquida de alta eficiência usando coluna de sílica monolítica; • Extração com éter dietílico; • Detecção por fluorescência. 	3 ng mL ⁻¹ (LD)
117	Várias	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia líquida de fase-reversa/ coluna C₁₈; • Detecção UV; • Estudo de vários parâmetros. 	5,2 ng mL ⁻¹ (LD)

Os métodos cromatográficos utilizam uma grande quantidade de solvente orgânico como acetonitrila, colunas C_{18} e é um método relativamente caro devido à instrumentação. Além disso, as análises podem demorar mais do que outros métodos convencionais como potenciometria e espectrofotometria, dependendo do tempo de retenção. Porém, estão entre aqueles que oferecem melhores limites de detecção e quantificação.

O método descrito por ABOU-AUDA⁹⁵ envolve a detecção por fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão de 225 e 389 nm, respectivamente. A fase móvel é constituída de dihidrogenofosfato de potássio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (62:38, v/v) ajustado a pH 3 com ácido fosfórico (1:3, v/v). A mistura foi filtrada em membranas de filtro $0,22 \mu\text{M}$ e o fluxo de injeção ajustado em $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Para a análise em urina, esta foi tratada com ácido clorídrico e varfarina, como padrão interno, seguido da adição de éter dietílico, agitação em vórtex e extração por evaporação a 45°C em banho-maria.

O método descrito por BANSAL¹¹⁰ utilizou cromatografia líquida de fase reversa com detecção UV, sendo determinados 5 analitos conjuntos, como descrito na tabela, sendo o tempo de retenção total de 22 minutos. A coluna foi mantida em 35°C e a fase móvel é composta 100% de acetonitrila (fase móvel A) e água Milli-Q ajustada a pH 3 com ácido ortofosfórico 20% (fase móvel B). O fluxo de injeção foi ajustado a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e a calibração da coluna foi feita com variações entre as fases móveis. O tempo de retenção para a furosemida foi de aproximadamente 17 minutos.

O método descrito por CARDA-BROCH¹¹¹ envolve a detecção UV em 274 nm com uma fase móvel em meio micelar de dodecil sulfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e 6% v/v propanolol e tampão fosfato em pH 3. As amostras de urina passaram por tratamento simples: diluição destas em meio micelar e posterior filtração. O tempo de retenção foi menor que 2 minutos.

No método de DOROSHCHUK¹¹², com detecção UV em 228 nm e fase móvel composta de acetonitrila e água, a furosemida teve um tempo de retenção de 7,09 minutos. A furosemida foi extraída por meio micelar de Triton e sua distribuição entre as fases aquosa e micelar era controlada por cromatografia com fase reversa. Neste trabalho também foi estudado a influência da furosemida no ponto-nuvem das soluções de Triton X-100.

Além destes, o método descrito por GALAON¹¹³, que envolvia um método por cromatografia líquida com detecção por fluorescência ($\lambda_{\text{exc}}=235 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emi}}=402 \text{ nm}$), tinha um preparo de amostra relativamente simples, onde esta era extraída com acetonitrila,

agitação por vórtex e centrifugação. Neste trabalho, foi estudada a dependência do tempo de retenção da furosemida em função da natureza do agente íon-pareante.

HEFFRON¹¹⁴ descreveu um método de quantificação de furosemida em plasma animal (cavalos) com a utilização de um LC acoplado a um espectrômetro de massas com triplo quadrupolo. A fase móvel era constituída de ácido fórmico e acetonitrila em água.

Dentre os trabalhos mais recentes, YOUM¹¹⁷ através de cálculos diferenciáveis dos outros métodos, da análise de eficiência da coluna, da determinação da absorvidade molar da furosemida por HPLC e por Espectrometria-UV e da robustez, desenvolve um método utilizando cromatografia líquida de fase reversa.

1.5.2 Bumetanida

A bumetanida (Figura 6) é um potente diurético com uma estrutura não tão similar aos demais diuréticos. Enquanto a furosemida e as tiazidas são derivadas da sulfanilamida, a bumetanida é um derivado da metanilamida¹¹⁸. A bumetanida, um diurético de alça, é de 40 a 60 vezes mais potente que a furosemida levando-se em consideração o efeito por massa de diurético, sendo sua dose terapêutica de 0,5 a 2,0 mg por dia em dose única¹¹⁹. Seu tempo de meia vida pode ir de 18 a 90 minutos e é eliminada do organismo 65% por via renal e 35% por via metabólica¹²⁰.

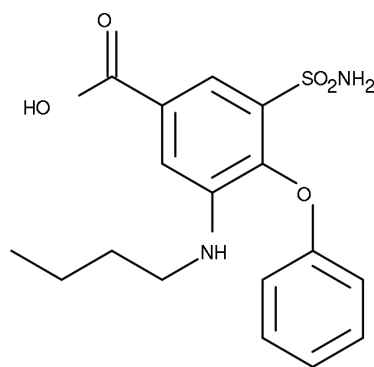


Figura 6. Fórmula estrutural da bumetanida.
Fonte: elaborado pelo autor

Além de ser um potente diurético, é também utilizada no tratamento de edema associado a falhas no coração e problemas renais hepáticos¹²¹. Como diurético, age ao inibir a reabsorção de sódio e água nos rins. Como anti-hipertensivo, reduz o volume de líquidos e o débito cardíaco, baixando a pressão¹²².

Sua absorção gastrointestinal ocorre quase que completamente e sua biotransformação ocorre nos fígados, formando metabólitos inativos. Sua ação ocorre após 30~60 minutos se ingerida por via oral e em minutos se por via intravenosa e seu efeito é de aproximadamente 4 horas¹²².

A bumetanida possui massa molecular de 364,45 g mol⁻¹ e é apresentada como um pó branco, sendo pouco solúvel em água, clorofórmio e éter, possuindo maior solubilidade em acetona, álcool e soluções alcalinas.

A Tabela 4 mostra alguns dos métodos publicados na literatura para a sua quantificação.

Tabela 4. Métodos analíticos para determinação e quantificação de bumetanida.

Ref.	Matrizes	Observações	LD/LQ
MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS			
119	Urina	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detecção por fluorescência; • Extração com acetato de etila. 	Não informado
123	Urina	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas de quadrupolo híbrido; • 103 agentes de <i>doping</i> analisados; • Coluna C₁₈ de fase reversa. 	10 ng mL ⁻¹ (LD para bumetanida)
124	Urina e formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia líquida de alta com detecção amperométrica e coluna C₁₈; • Realizada extração líquido-líquido ou sólido-líquido para evitar interferências; 	0,25 ng mL ⁻¹ (LD)
125	Urina	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas; • Análise de 16 diuréticos e 1 agente mascarante; • Metodologia se baseia em 3 passos analíticos; 	1,3 ng mL ⁻¹ (LD para bumetanida)
126	Plasma	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia líquida com coluna C₁₈ acoplada a espectrômetro de massas; • Extração em fase sólida; 	0,03 ng mL ⁻¹
127	Plasma e urina	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia líquida de alta eficiência com coluna C₁₈ e detecção por fluorescência; • Precipitação de proteínas feita com acetonitrila; 	5 ng mL ⁻¹
128	Urina	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografia líquida de alta eficiência com coluna C₁₈ e detecção UV; • Determinação dos diuréticos: furosemida, bumetanida e triantereno; • Estudo de vários fatores para microextração líquido-líquido com fibra. 	1,2 ng mL ⁻¹
MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS			
103	Urina	<ul style="list-style-type: none"> • Detecção por luminescência; • Análise de 7 diuréticos; • Utilização de soluções aquosas. 	30 µg L ⁻¹ (LD)
129	Formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> • Método fluorimétrico; • Utilização de Triton X-100 para aumento de sensibilidade; • Boa faixa linear. 	2.0 x 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹ (LD)
130	Formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> • Titulação com íons cloreto gerados eletroquimicamente; • Utilização de alaranjado de metila como indicador. 	Não informado
131	Formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> • Análise automatizada por injeção em fluxo com determinação fluorimétrica; • Utilização de meio alcalino para a fluorescência; 	0,01 µg mL ⁻¹ (LD)
132	Urina	<ul style="list-style-type: none"> • Fosforimetria; • Baseada na inibição da formação de um complexo de ferro; • Discussão do mecanismo da reação. 	1,2 x 10 ⁻¹⁴ g mL ⁻¹
133	Formulações farmacêuticas	<ul style="list-style-type: none"> • Reação com Fe(III) a pH próximo de 2; • Utilizado para concentrações de 60 a 100 µg mL⁻¹ • Utilização de NH₄SCN, havendo a formação de complexo violeta 	Não informado

MÉTODOS POTENCIOMÉTRICOS E ELETROFORÉTICOS			
134	Urina	<ul style="list-style-type: none"> • Utilização de sensor biométrico baseado numa pasta de carbono modificado; • Utilização de voltametria cíclica para avaliação do sensor e voltametria de onda quadrada para caracterização eletroquímica e quantificação. 	2,7 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ (LD)
135	Albumina bovina	<ul style="list-style-type: none"> • Eletroforese capilar com detecção amperométrica; • Estuda a interação entre diuréticos e a albumina bovina. 	Não informado
136	Urina	<ul style="list-style-type: none"> • Eletroforese capilar com detecção amperométrica; 	5 ng mL ⁻¹ (LD)

Como pode-se perceber, pela tabela apresentada anteriormente, os métodos cromatográficos, num geral, são bem mais sensíveis que os demais métodos, salvo aquele desenvolvido por ZENG¹³² e representam a maioria dos métodos utilizados para detecção e quantificação de bumetanida em formulações farmacêuticas e urina, principalmente.

A detecção cromatográfica de bumetanida vem descrita com diferentes tipos de detectores como os de fluorescência, um espectrômetro de massas, amperométrico e UV e a matriz utilizada é, principalmente, a urina^{119, 123-128}.

Dentre estes, o método desenvolvido por GRADEEN¹¹⁹ utiliza detecção por fluorescência ($\lambda_{exc}=231$ nm e $\lambda_{emi}=426$ nm). A extração foi realizada com acetato de etila e posterior centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos, sendo o produto extraído seco em corrente de nitrogênio a 40°C. O tempo de retenção da bumetanida foi de 6,2 minutos. Similarmente, WELLS¹⁴⁸ descreve um outro método por fluorescência ($\lambda_{exc}=228$ nm e $\lambda_{emi}=418$ nm) onde a acetonitrila foi utilizada para precipitar as proteínas do plasma sanguíneo.

BADOUD¹²³ descreve um método que detecta e analisa 103 agentes de *doping* com classes distintas utilizando HPLC acoplado a um espectrômetro de massas de quadrupolo híbrido. Este método destaca-se também pela fácil manipulação da amostra, onde um alíquota era coletada de um material já centrifugado e diluído em água ultra-pura.

No trabalho desenvolvido por LEGORBURU¹²⁴, o analito era tratado por extração em fase sólida e por extração líquido-líquido, onde o autor descobriu que a extração em fase sólida resulta em maiores valores de recuperação. Neste método, o tempo de retenção foi de aproximadamente 8,3 minutos.

MORRA¹²⁵ desenvolveu um método de screening rápido de 16 diuréticos e 1 agente mascarante. Em seu trabalho, é descrito 3 passos analíticos: extração líquido-líquido dos analitos da matriz, reação destes com iodeto de metila a 70°C por 2 horas e análise da

mistura resultante pelo método proposto. Descreve também a comparação de 3 métodos de extração. O tempo de retenção para a bumetanida foi de 2,89 minutos.

Mais recentemente, PATEL¹²⁶ descreve um método de análise diretamente em plasma sanguíneo que requer menor quantidade de amostra e de tempo de análise (apenas 3,5 minutos de tempo de corrida) quando comparado a outros métodos utilizados até então.

ZHANG¹²⁷, em seu trabalho, descreve o preparo de um tampão fosfato sólido. A detecção foi realizada em 214 nm e seu trabalho também discute a otimização de uma microextração líquido-líquido com fibra oca.

Entre os métodos espectrofotométricos encontramos, principalmente, detecção fluorimétrica.

MA¹²⁹ descreve um método fluorimétrico onde o Triton X-100 foi utilizado como surfactante para aumentar a sensibilidade. A faixa linear da curva analítica vai de $2,2 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ até 1,5 mol L⁻¹.

NIKOLIC¹³⁰, em seu trabalho publicado em 1989, descreve a quantificação de bumetanida e furosemida através da titulação de ambas com íons cloreto gerados em um meio eletrólito composto de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ e cloreto de sódio 0,2 mol L⁻¹, onde o alaranjado de metila foi utilizado como indicador uma vez que a sua cloração é bem mais devagar que a cloração dos dois diuréticos.

SOLICH¹³¹ descreve um método de análise por injeção em fluxo com determinação fluorimétrica após adição da bumetanida em meio alcalino e ZENG¹³², um método de análise por fosforimetria baseado na inibição da formação de um complexo de ferro, onde os autores sugerem haver a oxidação da bumetanida pelo Fe(III) que reduz a Fe(II), inibindo a reação do complexo com o ferro e, conseqüentemente, havendo um *quenching*. Ambos os métodos são os mais sensíveis, dentre os espectrofotométricos, apresentados aqui.

Também baseada numa reação com Fe(III), temos o método apresentado por ZIVANOVIC¹³³, cujo pH deve ser ajustado entre 1,83 e 1,92, na presença de NH₄SCN para a formação de um complexo de coloração violeta com máxima absorção em 514 nm.

Dentre os demais métodos, temos o recentemente apresentado por RUY¹³⁴, que criou um sensor biométrico e utilizou de voltametria de onda quadrada para quantificação. A pasta de carbono utilizada no sensor foi feita a partir da homogeneização de 15 partes de ftalocianina de cobre(II) com 85 partes de pó de carbono grafite em tampão fosfato a pH 7,

formando um material que foi seco à temperatura ambiente e misturado com óleo mineral a fim de se obter a pasta.

ZHENG, L.¹³⁵ e ZHENG, X.¹³⁶ desenvolveram, ambos, um método de eletroforese capilar com detecção amperométrica.

1.5.3 Chumbo

Dentre os vários íons de metais encontrados no meio-ambiente, o chumbo é considerado o de maior impacto ambiental e pode produzir efeitos tóxicos em plantas e animais devido à sua não-degradação e persistência no ambiente¹³⁷.

A exposição constante ao chumbo pode causar uma doença conhecida como saturnismo, que pode causar disfunção renal, alteração no comportamento, retardo mental, dores, constipações e úlceras orais. Além disso, é conhecida também sua toxicidade ao sistema reprodutor, ao fígado e ao sistema imunológico. Testes foram feitos em animais como ratos e camundongos, descobrindo-se que sais inorgânicos de chumbo (em cuja ligação entre o metal e o ligante é iônica) têm propriedades químicas e toxicológicas diferentes dos compostos organometálicos de chumbo, onde as ligações entre o metal e o ligante é covalente, sendo o rim o principal órgão-alvo dos sais de chumbo, independente da rota de administração^{138, 139}.

Estima-se que a quantidade natural de exposição dos seres humanos antes da era tecnológica era de duas ou três ordens de magnitude menor do que nos dias presentes¹⁴⁰, podendo esta diferença ser maior em algumas regiões de maior contaminação.

Pessoas que vivem em um ambiente urbano são expostas ao chumbo através do ar que elas respiram, a água (ou outras bebidas) que elas bebem ou à comida (ou outras substâncias não-alimentícias) que estas ingerem¹⁴⁰. Além disso, certas atividades ocupacionais também podem se transformar num importante meio de contaminação¹⁴¹.

Em áreas industriais o chumbo pode estar presente até na poeira que entra nas casas, principalmente nos países mais desenvolvidos¹⁴².

Já a poluição ambiental por chumbo pode ser causada pela soma de vários fatores como mineração, fundição de minérios não-ferrosos, à extensiva fabricação de baterias, como constituinte de bronzes, azulejos para revestimento de cerâmica, algumas borrachas e materiais plásticos, dentre outros¹⁴³.

O chumbo também pode ser encontrado em tinturas para cabelos.

O uso de cosméticos não é uma prática tão recente. Desde os antigos egípcios ou da antiga Roma, tinturas para cabelo e outros tipos de cosméticos são utilizados pelas pessoas¹⁴⁴. Hoje em dia, com o desenvolvimento de novos produtos mais acessíveis, a utilização de cosméticos está em alta e, uma vez que estes produtos entram em contato

direto com o cabelo, pele, boca e outras partes do corpo e, sabendo que a pele não é uma barreira impenetrável para algumas substâncias¹⁴⁵, é importante determinar a máxima concentração dos compostos dos produtos de uma forma que eles não causem nenhum malefício aos seus usuários.

Por estes motivos e, sabendo-se a classe química dos compostos que fazem parte dos ingredientes das tinturas de cabelo e do tamanho da população que as utilizam, tais cosméticos estão entre os mais estudados e sujeitos a normas de regulamentação, sendo o seu uso incluindo dentro de numerosos estudos epidemiológicos¹⁴⁵.

Nestes tipos de cosméticos, o chumbo está presente na forma de acetato, utilizado como um ingrediente aditivo de coloração. A *Food and Drug Administration*¹⁴⁶ (FDA) e a Agência nacional de Vigilância Sanitária¹⁴⁷ (ANVISA) aprovam a utilização de acetato de chumbo como um aditivo nas tinturas para cabelo desde que não estejam em concentrações maiores que 0,6% m/v, calculado como chumbo metálico.

O íon chumbo pode ser quantificado em diversos tipos de matrizes. Inúmeros são os trabalhos nas fontes de pesquisa que estudam esse potencial agente de risco e muitos são os trabalhos recentes em cima dele, como se pode perceber pela Tabela 5.

Tabela 5. Métodos analíticos para determinação e quantificação de chumbo.

Ref. (método)	Matrizes	Observações	LD/LQ
137 (espectroscopia de dicroísmo circular)	Água de torneira	<ul style="list-style-type: none"> • Descrição da construção de um sensor de DNA; • Utilização de nanopartículas de prata. 	0,02 ng mL ⁻¹ (LD)
143 (voltametria de onda quadrada)	Água de chuva	<ul style="list-style-type: none"> • Utilização de eletrodos de ouro; • Presença de cloreto é essencial para a deposição de chumbo; • Sem remoção do oxigênio dissolvido. 	80 ng L ⁻¹ (LD)
144 (Absorção atômica em forno grafite)	Tinturas para cabelo	<ul style="list-style-type: none"> • Amostras foram analisadas sem digestão posterior, sendo estas diluídas em solução de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio; • Análise de tinturas em creme, em pó e líquidas; • Utilização de quimiometria para atingir as condições ótimas de reação. 	0,33 µg L ⁻¹ (LD)
148 (LA-ICP-MS)	Dentes humanos arqueológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Chumbo utilizado como biomarcador; • Detecção de chumbo na escala de micrômetros; • Discussão de possíveis hábitos das pessoas. 	Não informado
149 (Absorção atômica eletrotermal)	Sangue	<ul style="list-style-type: none"> • 4 temperaturas utilizadas: secagem (95°C e 110°C), pirólise (700°C), atomização (1200°C) e limpeza (2.500°C); • Estudo visando mostrar o procedimento de 	10 µg L ⁻¹ (LD)

		validação para o meio médico.	
150 (espectroscopia de fluorescência)	Sangue	<ul style="list-style-type: none"> • Detecção com nanopartículas de ouro modificadas com oligonucleotídeos; • Tratamento simples se comparado com a amostra complexa. 	0,05 nmol L ⁻¹ (LD)
151 (Espectrometria de massas)	Fluidos biológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Produção de membranas de nitrocelulose modificadas com nanopartículas de ouro; • Utilização das membranas para coleta de chumbo em matrizes de coleta difícil. 	0,5 x 10 ⁻⁹ mol L ⁻¹ (LD)
152 (Voltametria)	Água	<ul style="list-style-type: none"> • Preparação de papéis ambientalmente amigáveis como novo suporte de detecção; • Estes papéis servem também como sistema de pré-tratamento. 	7 µg L ⁻¹
153 (Voltametria de pulso anódica)	Águas naturais	<ul style="list-style-type: none"> • Chumbo é depositado num eletrodo de quimicamente modificado; • Eletrodo transferido para célula eletroquímica. 	16,7 ng mL ⁻¹ (LD)
154 (absorção atômica eletroquímica)	Fluido folicular e seminal	<ul style="list-style-type: none"> • Paládio e magnésio utilizados como modificadores químicos; • Mínimo tratamento da amostra; • Condições ótimas estudadas. 	0,06 µg L ⁻¹ (LD)
155 (voltametria de onda quadrada)	Água mineral	<ul style="list-style-type: none"> • Estudo da utilização de configuração “back-to-back” dos eletrodos; • Obtenção de sensibilidade 5x maior do que a utilização da configuração de microbanda. 	3,7 µg L ⁻¹ (LD)
156 (LIBS)	Monumentos históricos	<ul style="list-style-type: none"> • Escopo do trabalho é a identificação, a partir da quantificação de chumbo, estipular o período de tempo da construção. 	Não informado
157 (cromatografia de exclusão por tamanho e detecção por ICP-MS)	Vinho	<ul style="list-style-type: none"> • Estudo da especiação do chumbo em vinho; • Preparação fácil da amostra; • Quantificação do chumbo ligado à biomoléculas. 	Não informado
158 (voltametria de onda quadrada)	Músculo e fígado de galinha	<ul style="list-style-type: none"> • Análise concomitante de chumbo e cádmio após digestão ácida; • Linearidade da curva depende da matriz estudada (músculo ou fígado). 	< 10 ng g ⁻¹ (LQ)

Voltametria e absorção atômica são os métodos mais utilizados nos últimos trabalhos publicados para a detecção e quantificação de chumbo, podendo-se encontrar também, com relativa frequência, a utilização de ICP-MS e espectroscopia de fluorescência.

Dentre as matrizes de estudo encontramos tinturas para cabelo, fluidos biológicos, alimentos, água e até mesmo objetos, principalmente aqueles antigos, quando as tintas tinham base de chumbo.

Além disso, muitos foram os trabalhos que apresentaram, também, algum diferencial em relação à sua pesquisa em cima deste analito, seja estudos além da simples

quantificação ou construções de novos meios para este fim. Neste âmbito, por exemplo, podemos citar o trabalho de KUANG¹³⁷ e o de LIU¹⁵¹, que envolvem a utilização de nanopartículas na detecção de chumbo, sendo que o primeiro utiliza um sensor à base de DNA, aliando a propriedade de catálise desta com as propriedades ópticas dos nanomateriais e o segundo emprega uma modificação das membranas de nitrocelulose com nanopartículas de ouro e a coleta de chumbo com estas, que são posteriormente utilizadas também para a quantificação.

Além destes, pode-se encontrar a detecção e quantificação de chumbo para motivos bem mais distintos como, por exemplo, o apresentado por BELLIS¹⁴⁸ e por SYVILAY¹⁵⁶. O primeiro autor nos descreve em seu trabalho um método de quantificação de chumbo em diferentes partes de dentes humanos arqueológicos, descobrindo que a localização de altos teores de chumbo ocorriam em regiões específicas dos dentes e assim, sabendo-se que cada região é formada ou re-trabalhada em diferentes partes do crescimento, podiam estipular a fase da vida em que os indivíduos se expunham mais ao analito. No segundo trabalho, a quantificação de chumbo foi feita em telhas de monumentos históricos com o intuito de identificar os diferentes períodos de construção ou restauração do monumento uma vez que a quantidade de chumbo nestas matrizes pode ser uma assinatura dos processos metalúrgicos de um período em específico para a produção do chumbo utilizado para construir as telhas.

Para a análise de águas, temos os trabalhos de RICHTER¹⁴³, em água de chuva, de MEDINA-SÁNCHEZ¹⁵², em água filtrada, de MOLINA-HOLGADO¹⁵³, em águas naturais e o de SOUZA¹⁵⁵, em água mineral, todos utilizando voltametria.

RICHTER nos descreve a quantificação de chumbo utilizando eletrodos de ouro e a utilização de células especiais feitas para trabalhar com pequenos volumes de amostra, sendo o efeito do oxigênio dissolvido (que não foi eliminado) eliminado por subtração do branco. MEDINA-SÁNCHEZ descreve a utilização de um papel baseado em um dispositivo de fluxo de reagentes para a detecção de metal pesado (chumbo e cádmio). Tais papéis também podem ser utilizados como um pré-tratamento de amostra devido às suas propriedades filtrantes. MOLINA-HOLGADO descreve a modificação química de um eletrodo de pasta de carbono com ditizona, onde o chumbo era depositado quimicamente no eletrodo por complexação com o agente modificante, sendo levado depois para uma

célula eletroquímica para fins quantitativos. SOUZA descreve o estudo da configuração dos eletrodos para a quantificação de chumbo de modo a aumentar a sensibilidade.

Para a análise de fluidos biológicos, temos os trabalhos de HEJL¹⁴⁹ e LI¹⁵⁰ para amostras de sangue e o de MOREIRA para fluido folicular e seminal.

HEJL nos descreve um trabalho voltado para a área médica que demonstra a validação de métodos analíticos para a detecção de chumbo utilizando espectrometria de absorção atômica eletrotermal. LI foca o seu trabalho na utilização de nanopartículas de ouro modificadas com oligonucleotídeos para detecção fluorimétrica. Para isso, descreve a produção tanto das nanopartículas quanto das modificadas, descrevendo o processo de fluorescência por oxidação com peróxido de hidrogênio. MOREIRA descreve um trabalho para a identificação de fluido folicular e seminal de casais através de fertilização *in vitro* de modo a determinar chumbo e cádmio com o mínimo tratamento possível da amostra, descrevendo também a utilização de modificadores químicos (nitrito de paládio e de magnésio) para tal determinação para fins toxicológicos.

Além destes trabalhos, aquele descrito por SOARES¹⁴⁴ oferece um método simples, rápido e sensível para a determinação de chumbo em amostras de tintura para cabelo em que cada variável foi estudada a partir de quimiometria e as amostras eram tratadas sem digestão prévia, necessitando de adição de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio para diluição, utilizando paládio como modificador químico e ródio como modificador permanente.

SZPUNAR¹⁵⁷ realiza um estudo de especiação para complexos biomoleculares de chumbo. Com 30 minutos de tempo de análise consegue mostrar a distribuição de chumbo entre os compostos biomoleculares, sendo que a quantificação deste com as biomoléculas foi realizada ao comparar a área do pico cromatográfico com o sinal obtido através de uma análise de injeção em fluxo.

TREVISANI¹⁵⁸ descreve um método de quantificação de chumbo e cádmio em carne de galinha e de pombo após digestão ácida, fazendo, no final, uma comparação entre as quantidades encontradas em cada um.

1.6 Espectroscopia de reflectância difusa^{159, 160} associada à utilização de spot tests com papel de filtro qualitativo e membranas de celulose bacteriana.

Diferentemente da espectroscopia de absorção, a espectroscopia de reflectância havia sido pouco estudada por ser considerada inviável para análises quantitativas já que, a partir de *spot tests* convencionais, a precisão não era considerada boa¹⁶¹. Tal fato foi reconsiderado após haver o desenvolvimento de instrumentos analíticos (fibras ópticas e esferas de reflectância melhores), sendo possível então a análise quantitativa por reflectância acopladas a *spot tests*, apresentando resultados muito melhores¹⁶².

A espectroscopia de reflectância é um processo que ocorre quando um feixe de radiação atinge a superfície de uma amostra. Caso a amostra seja sólida, ocorrerá reflexão especular em cada superfície plana, porém, como há muitas destas superfícies orientadas aleatoriamente, a radiação é refletida em todas as direções. Geralmente a intensidade da radiação refletida é independente do ângulo de observação.

Diferentemente da reflexão especular, a reflexão difusa ocorre em superfícies foscas ou opacas devido à reflexões múltiplas a partir das superfícies das partículas que constituem o meio. Este tipo de reflexão compreende um processo que acontece devido à penetração da radiação em um substrato sólido (como um pó finamente dividido), sendo que parte desta radiação retorna para a superfície do substrato, ocorrendo também dispersão múltipla e absorção parcial da radiação pelas partículas ou fibras que constituem o substrato sólido¹⁶²⁻¹⁶⁵. Como há muitas superfícies orientadas aleatoriamente, a radiação é refletida em todas as direções, sendo a intensidade independente do ângulo de observação.

A reflexão especular, que não é de importância analítica no campo da colorimetria, pode ser eliminada ou minimizada através de engenharia óptica através do uso de um sistema de iluminação esférico ou a 45°.

Vários modelos foram desenvolvidos de modo a descrever a intensidade da radiação refletida difusamente de um modo quantitativo. Dentre estes, está o modelo de Kubelka e Munk, relacionando a concentração da amostra com a reflectância através da relação entre o coeficiente de absorção molar do analito (k), coeficiente de dispersão ou de espalhamento (s) e poder de reflectância em um meio semi-infinito (infinitamente fino):

$$f(R'_{\infty}) = \frac{(1 - R'_{\infty})^2}{2R'_{\infty}} = \frac{k}{s} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde R'_{∞} é a razão entre a intensidade refletida pela amostra e a de um padrão não-absorvente, como o cloreto de potássio finamente moído.

Para uma amostra diluída, k está relacionado à absorvidade molar ϵ e à concentração de analito c pela equação:

$$k = 2,303 \epsilon c \quad (\text{Equação 2})$$

A aplicação da Equação 2 fornece uma relação linear entre a concentração da amostra e a função $f(R'_{\infty})$ para concentrações médias e altas, enquanto que para concentrações mais baixas pode haver um desvio da linearidade¹⁶³.

Nas medidas de reflectância, são lidos os sinais da radiação transmitida refletida (reflectância, T_R), análoga à transmitância e, conseqüentemente, descrita analogamente à absorbância: $A_R = -\log(T_R)$.

T_R é dado por $T_R = I \times I_0^{-1}$, sendo I_0 a intensidade da radiação incidida e I a intensidade da radiação refletida pelo meio. Deste modo, T_R é um número entre 0 e 1. Deste modo, o tratamento dos dados obtidos se dá semelhantemente ao tratamento dos dados quando se trabalha com absorbância, sendo a os gráficos de A_R construídos principalmente em função da concentração direta ou do logaritmo desta¹⁶⁴.

As medidas de reflectância difusa podem ser realizadas *in situ* utilizando um reflectômetro simples¹⁶⁶ e caseiro ou um espectrofotômetro de reflectância difusa portátil⁸⁹. Alternativamente, o analito de interesse pode ser coletado no papel de filtro e levado ao laboratório sob condições apropriadas de estocagem para análise subsequente. É possível também fotografar o resultado da reação *in situ* e enviar a imagem para um analista através de e-mail ou celular¹⁶⁷.

Os papéis de filtro qualitativos também podem ter a área delimitada em diversos formatos, dependendo o que se deseja realizar no trabalho em questão. Tal área pode, por exemplo, ter um formato circular ou ser um papel com propriedades microfluídicas, cujas vantagens são: aumento da sensibilidade da reação (uma vez que a área delimitada controla o sítio de reação, deixando os reagentes em maior contato um com o outro), facilidade de confecção (necessita apenas uma impressora de cera), controle do meio reacional e pequenos volumes de amostra e reagentes^{168, 169}. Tal análise é possível se não for utilizado

nenhum tipo de surfactante na reação, o que ocasiona a passagem das soluções pelas bordas da cera.

Tais papéis podem também ser analisados, posteriormente, utilizando-se dispositivos eletrônicos de captura de imagens como scanners, câmeras fotográficas e celulares, facilmente encontrados em qualquer lugar, de baixo custo e adaptáveis a qualquer tipo de situação^{169, 170}. Tais aparatos estão ficando cada vez melhores e com um custo mais baixo, tornando a união da fotografia digital com os testes colorimétricos uma opção interessante para a aquisição de dados qualitativos e quantitativos para determinações analíticas. Dentre vários modelos, a maioria dos métodos analíticos baseados no uso de imagens digitais emprega o padrão RGB e o conceito fundamental de que todas as demais cores são baseadas nas várias combinações destas¹⁶⁹.

Além dos papéis de filtro qualitativos, as membranas de celulose bacteriana (CB) também podem ser utilizadas para a produção de reações *in situ*. Tais membranas podem ser obtidas em culturas de laboratório usando meios líquidos ou sólidos, estáticos ou sob agitação, para propósitos biotecnológicos. A composição do meio de cultura varia de acordo com a cepa utilizada no sistema e o meio é basicamente composto de uma fonte de carboidrato e um extrato de levedura como fonte de nitrogênio¹⁷⁰.

A razão pela qual os organismos produzem celulose tem sido questionada por pesquisadores durante anos. Alguns sugerem que a CB atua como um mecanismo de flutuação, permitindo que o microorganismo fique na interface ar/líquido pra obter oxigênio facilmente para o seu crescimento. Outros assumem que a bactéria produz celulose para proteger a si mesma de radiação ultravioleta. Há uma outra vertente que assume que a bactéria constrói para si casulos para se confinarem e protegerem-se de inimigos externos uma vez que os nutrientes podem ser facilmente conseguidos por difusão. Outro aspecto relevante é que as CB aumenta a capacidade de colonizar substratos e sua natureza higroscópica permite retenção de umidade, prevenindo a desidratação.¹⁷¹

As membranas CB, no ponto de vista químico, têm fórmula molecular idêntica à celulose vegetal. Porém, é obtida quimicamente pura, é sintetizada sem a presença de lignina, hemicelulose e pectina, que aparecem juntamente com a celulose nas plantas e que requerem tratamento para a remoção. Além disso, suas propriedades físicas são muito superiores devido ao tamanho da fibra e ao alto teor de polimerização¹⁷²⁻¹⁷⁵.

A membrana CB tem cristalinidade maior que a celulose vegetal (entre 60-80%). Quando está *in natura*, é altamente hidratada com teor de água acima de 90% e pode ser facilmente moldada durante o processo de cultivo¹⁷⁶.

Resumidamente, as membranas CB não são pirogênicas, são biocompatíveis, biodegradáveis e tem uma estrutura de rede nanométrica que gera um sistema 3D com excelentes propriedades mecânicas. Possuem baixo coeficiente termal de expansão (semelhante ao vidro) e resistência à tensão¹⁷⁶.

As membranas de celulose bacteriana são produzidas por especialistas do grupo de pesquisa de Materiais Fotônicos para uso em projetos de pesquisa desenvolvidos no Instituto de Química da UNESP de Araraquara. Durante a fase dos experimentos apresentados aqui neste trabalho, o seu processo de produção foi acompanhado através da explicação de técnico especializado na produção das referidas membranas.

Inicialmente, uma cepa da bactéria *Acetobacter* é retirada do meio de cultura (composto de glicose, extrato de levedura, sulfato de magnésio e fosfato de potássio) e deixada em temperatura controlada no extrato de levedura.

Após algum tempo, uma alíquota é tomada e transferida para uma bandeja de, aproximadamente, 18x30 centímetros pelo tempo necessário, que dependerá da utilização para a qual esta será utilizada (quanto mais tempo for deixada na bandeja, mais compactada será a rede de celulose). Após a retirada da celulose, esta é lavada com água de torneira até retirada do extrato de levedura (que a deixa com aspecto amarelado) e da glicose. Este processo pode demorar vários dias até obter-se uma celulose bacteriana branca, uma vez que esta é deixada de molho em água, sendo esta trocada frequentemente.

Em seguida, é realizada lavagem com hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ para completar o processo de branqueamento e uma posterior lavagem com mais água.

É importante frisar que, durante este processo, é importante a pureza da bactéria para não haver competições, o que pode comprometer a qualidade da celulose.

Uma bandeja de 18x30 cm possui produz, aproximadamente, entre 1,5 e 2,0g de celulose seca.

Devido a estes fatores, a membrana de celulose bacteriana é um atrativo para a química verde uma vez que esta gera menos derrubada de árvores além de requererem tratamento bem menos custoso, uma vez que elimina os processos de remoção dos compostos presentes na celulose vegetal durante a sua retirada para a fabricação dos produtos celulósicos. Além disso, pode ser utilizada para fins envolvendo coletas na pele

humana por ser biocompatível e possuir uma boa aderência a esta, carregando consigo resíduos que possivelmente estão presentes na epiderme.

1.7 Química Verde: conceitos básicos

A química verde, também conhecida como “química sustentável” é uma filosofia cuja principal função é o encorajamento de produtos e processos que reduzam ou eliminem o uso de substância e métodos perigosos¹⁷⁷. A química verde em si pode ser aplicada às diversas áreas da química: orgânica, inorgânica, bioquímica, analítica e físico-química, com ênfase em aplicações industriais e pesquisa.

É importante ressaltar que a química verde é distinta da química ambiental. Enquanto a química verde procura a redução e a prevenção da poluição, a ambiental é a química do meio-ambiente e dos poluentes químicos na natureza.

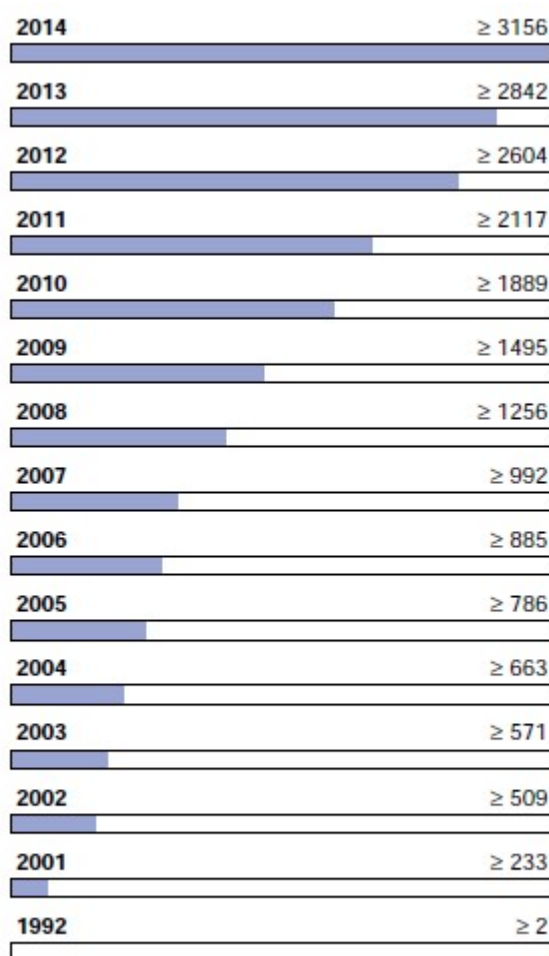
A filosofia verde é baseada em 12 princípios¹⁷⁸, envolvendo a prevenção, síntese e utilização de produtos menos perigosos bem como a utilização de solventes menos tóxicos, uso racional de energia, utilização de matéria-prima renovável, dentre outros.

Apesar de haver certas discordâncias (uma vez que a química verde não considera, num primeiro momento, a parte econômica), a conscientização sobre a redução, prevenção e eliminação dos perigos através desta filosofia rebatem este problema. Infelizmente, muitas micro-empresas e indústrias não têm o capital suficiente para, no começo de seu desenvolvimento, aderir completamente (ou mesmo parcialmente a esta filosofia). Mesmo as grandes empresas, via de regra, apresentam uma certa relutância, uma vez que os investimentos, muitas vezes, são maiores ao se adotar a filosofia verde.

A Espectroscopia de Reflectância Difusa associada ao *spot test* é uma metodologia extremamente simples, rápida, econômica e menos poluente que promove baixo ou nenhum risco ao operador e ao meio ambiente. Dessa forma, ela é considerada uma metodologia limpa ou verde ou ainda ambientalmente benigna, tornando-se atrativa e promissora em análise quantitativa por estar em total consonância com os princípios da química verde.

As publicações, com o passar dos anos, que englobam o termo Química Verde tiveram um crescente aumento, como pode-se ver no Esquema 1, logo acima. Antes de 2000 praticamente não se via nenhuma publicação dentro da química que envolvia o

conceito “verde”, fato este que começou a mudar a partir de 2001. Desde então, a conscientização dos laboratórios e grupos de pesquisa começaram a olhar com outros olhos a necessidade de processos, pesquisas e tecnologias que minimizassem o processo de degradação do meio-ambiente. Hoje em dia, a tendência do número de publicações é aumentar cada vez mais, incentivando os diversos profissionais das diversas áreas a trabalhar dentro deste escopo.



Esquema 1. Publicações com o tema “*Green Chemistry*” com o passar dos anos.
Fonte: *Scifinder*¹⁷⁹.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

2.1 Estudo da utilização de membranas de celulose bacterianas para fins de coleta de impressão dígito-papilar (visando uma metodologia simples e rápida para a sua coleta e revelação) e resíduos de disparo de armas de fogo (visando o desenvolvimento de uma metodologia posterior para a quantificação do chumbo coletado e sua correspondência com o tempo de disparo).

2.2 Desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas limpas, simples, rápidas, baratas e sensíveis para as análises forenses de furosemida e bumetanida em urina para *doping* esportivo utilizando papéis de filtro qualitativo com área delimitada e quantificação por espectroscopia de reflectância difusa e por histograma de cores via padrão RGB em imagem digital.

3 PARTE EXPERIMENTAL

A seguir, serão descritas a metodologia, os equipamentos, os reagentes e as principais soluções utilizadas no presente trabalho.

3.1 Metodologias

O trabalho foi dividido em 3 partes: desenvolvimento de método de coleta de impressões digitais utilizando membrana de celulose bacteriana, desenvolvimento de método de coleta de resíduos de disparo de armas de fogo utilizando membrana de celulose bacteriana e a análise do chumbo presente nesta matriz e o desenvolvimento de método de análise para furosemida e bumetanida em amostras de urina utilizando reflectância difusa acoplada a spot tests utilizando papel de filtro qualitativo com barreiras hidrofóbicas.

3.1.1 Metodologia para a coleta de impressões digitais utilizando membrana de celulose bacteriana

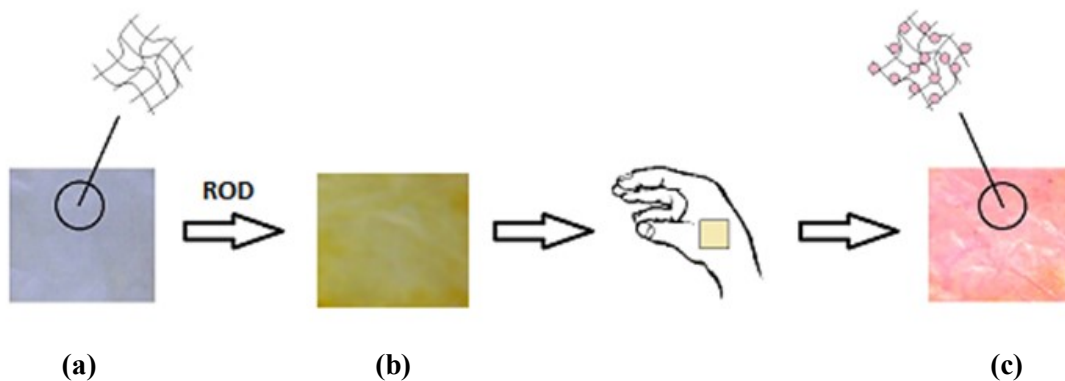
Para os procedimentos de coleta de impressões digitais, foi adotado o modo de coleta por pressão, onde a membrana de celulose bacteriana é colocada em contato com a superfície de interesse durante certo tempo a fim de haver a coleta, podendo a revelação ser realizada durante este procedimento, com o reagente já impregnado na membrana ou com a impregnação do reagente cromogênico após a coleta.

Em seguida, as imagens eram tratadas no software gratuito ImageJ a fim de uma melhor separação e contraste das linhas da impressão digital.

3.1.2 Metodologia para a coleta e análise de resíduos de disparo de armas de fogo utilizando membrana de celulose bacteriana

Semelhantemente ao tópico 3.1.1, a coleta dos resíduos de disparo de armas de fogo foram efetuadas nos locais de interesse através da pressão e leve esfregação das membranas de celulose bacteriana impregnadas com o reagente cromogênico (rodizonato de sódio em meio tamponado a pH 2,8), como demonstrado no Esquema 2 onde, em (a) temos a membrana de celulose bacteriana pura que, ao ser colocada em contato com o Rodizonato de Sódio em meio tamponado, adquire uma coloração amarelada (b) que, ao

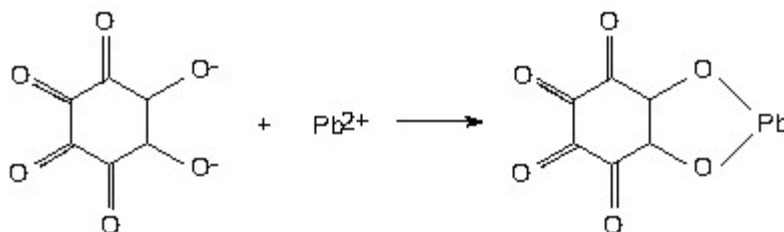
entrar em contato com o chumbo, durante a coleta, adquire coloração rósea/avermelhada (c).



Esquema 2. Representação da impregnação do reagente cromogênico na membrana de celulose bacteriana e a subsequente coleta dos resíduos de disparo através da esfregação do substrato sólido nas mãos do atirador, havendo a revelação durante o processo.

Fonte: elaborado pelo autor

A reação do reagente químico rodizonato de sódio com os íons chumbos segue a reação apresentada em Reação 1.



Reação 1. Representação da reação do íon rodizonato com o íon chumbo.

Fonte: elaborado pelo autor

A análise da membrana de celulose bacteriana, impregnada com o analito de interesse, baseia-se na utilização de um microscópio eletrônico de varredura (a fim de se estudar a dispersão dos resíduos na membrana e a confirmação da formação de partículas esféricas, características de um processo de rápido esfriamento) e a posterior medida de reflectância difusa do produto colorido formado na reação entre o chumbo e o rodizonato de sódio no comprimento de onda de máximo sinal.

3.1.3 Metodologia para a análise de chumbo em loções progressivas para cabelo utilizando papel de filtro qualitativo

A quantificação de chumbo em loções progressivas para cabelo (loções que restauram a coloração do cabelo uma vez que o chumbo combina-se com o enxofre disperso e com o enxofre das proteínas do cabelo, formando o sulfeto de chumbo, de cor preta¹⁸⁰) foi feita utilizando método já desenvolvido previamente, de mesma autoria¹⁸¹, baseada na reação de spot test entre o analito e solução cromogênica de rodizonato de sódio em meio de SDS e tampão ácido tartárico/tartarato de sódio e potássio em pH 2,8 e leitura por reflectância difusa em 545 nm, correspondendo ao comprimento de onda de máximo sinal.

O *spot test* é um procedimento químico utilizado para identificação ou quantificação de diversos tipos de substâncias através da reação entre o analito de interesse e um reagente de identificação em um suporte sólido (papel de filtro, placa de toque, entre outros). Esta reação deve ser mensurável por algum método, seja mudança de cor, evolução de gás ou precipitação.

Na Figura 7 encontra-se representado o procedimento para a realização do spot test.



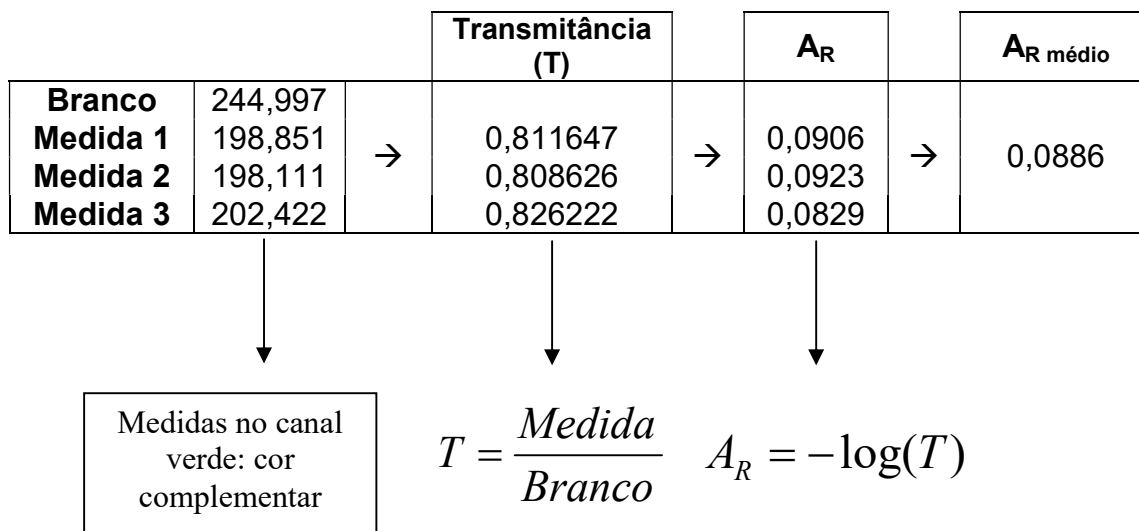
Figura 7. Procedimento e suporte para a realização da reação de *spot test*.
Fonte: adaptado de Tubino¹⁶⁴

3.1.4 Metodologia para a análise de furosemida e bumetanida em urina utilizando papel de filtro qualitativo com área delimitada

Os métodos desenvolvidos para a análise de furosemida foram baseado em reflectância e imagens por scanner e leitura destas através do histograma de cores utilizando padrão RGB, onde o sinal deve ser lido na cor complementar mais próxima

(verde, vermelho ou azul) da coloração apresentada pelo produto, neste caso, a verde. Tal sinal deve ser convertido para absorvância a fim de se construir as curvas analíticas. Todos os resultados mostrados já estão convertidos de acordo com o procedimento mostrado no Esquema 1.

O método desenvolvido para a análise de bumetanida segue o mesmo padrão, sendo desenvolvido apenas um único método: utilizando o padrão RGB.



Esquema 3. Exemplo de conversão das medidas realizadas pelo histograma de cores a A_R .

Todos os spot tests foram feitos como mencionado no tópico 3.1.3 em papéis de filtro qualitativos com área delimitada, como demonstrado na figura 8, demonstrando uma aplicação obtida experimentalmente usando as barreiras hidrofóbicas (no caso, da reação da BMT).

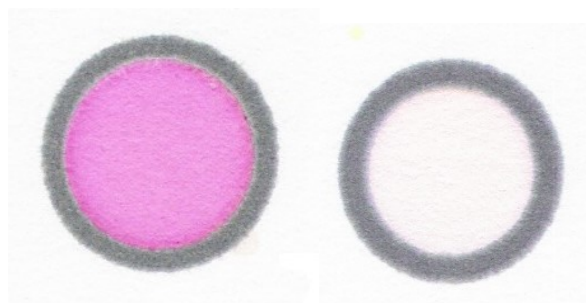


Figura 8. Exemplo de *spot test* em papel de filtro qualitativo com área delimitada realizado em papel de filtro e o seu respectivo branco.

3.2 Equipamentos

As medidas de reflectância foram efetuadas em um equipamento portátil composto de uma esfera integradora e fibra óptica da marca *Ocean Optics*, acoplado a um espectrofotômetro *USB2000* com o software *OOIBase32* (Figura 9). As medidas de pH foram efetuadas em pHmetro *Tecnal* modelo *Tec-2*, com eletrodo de vidro. As imagens foram escaneadas usando uma impressora multifuncional HP PSC 1315 all-in-one e as imagens foram tratadas usando o software gratuito ImageJ.

O microscópio eletrônico de varredura é da marca JEOL, modelo 7500F.

Todos os equipamentos encontravam-se instalados em salas devidamente equipadas com energia estabilizada e ar condicionado.

As medidas de volume foram efetuadas com buretas classe A e micropipetas “Brand” (1000 µL) e “Eppendorf” (10-100 µL). A vidraria utilizada no preparo das soluções foi de grau A e as pesagens foram realizadas em balança analítica *Mettler Toledo* modelo *AG204*.

Como suporte sólido foram utilizados papel de filtro qualitativo *Whatman 1* e membranas de celulose bacteriana secas e úmidas projetadas pelo Grupo de Materiais Fotônicos do IQ-UNESP, Araraquara.

Nos papéis de filtro qualitativos, as barreiras hidrofóbicas foram feitas através de impressão utilizando-se resina polimérica e uma impressora de cera ColorQube 8580.

3.3 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados durante os experimentos foram todos de grau p.a.:

- Nitrato de chumbo >99,99%, *Sigma-Aldrich*;
- Rodizonato de sódio 97%, *Sigma-Aldrich*;
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) 99%, *Sigma*.
- Furosemida >99,99%, *Purifarma*;
- Bumetanida 100, 72%, *Deg*;
- Nitrato de prata >99,0%, *Sigma-Aldrich*;
- Ninidrina >95,0%, *Purifarma*;
- Acetato de zinco 98,0 – 101,0%, *Mallinckrodt*;
- Hidróxido de sódio 98,5%, *Mallinckrodt*;

- Metanol grau HPLC, *Tedia*;
- Acetona p.a., *Chemis*;
- Cloreto de ferro (III) 99%, *Merck*;
- Brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB) 99%, *Sigma*;
- 4-Dimetilaminocinamaldeído (p-DAC) 98%, *Aldrich*;
- Tartarato de sódio e potássio 99,0%, *Synth*;
- Ácido L(+) tartárico 99,0%, *Synth*;
- Cartuchos C₁₈, Bond Elut, *Varian*, 500 mg;
- Água deionizada *Milli-Q*;
- Uréia, p.a., *Sigma*;
- Fosfato de potássio dibásico, 98,0%, *Vetec*;
- Cloreto de amônio, p.a., *Mallinckrodt*;
- Cloreto de sódio, 100,0%, *Mallinckrodt*;
- Cloreto de cálcio, 75%, *Reagen*.

O preparo das principais soluções se deu como mostrado a seguir:

Para o desenvolvimento do método para a detecção e quantificação de chumbo, foi selecionado o reagente rodizonato de sódio em meio de SDS e tampão (pH 2,8) de ácido tartárico/tartarato de sódio por já ser amplamente utilizado em perícias criminais e, portanto, tornando o método mais acessível para este tipo de análise.

Para este trabalho foram utilizadas as seguintes soluções principais:

- **Solução Estoque de chumbo 5000 ppm:** a solução foi preparada por meio de dissolução de 0,7982g de nitrato de chumbo em 100mL de água deionizada. As demais soluções de chumbo utilizadas neste trabalho foram preparadas através de diluições adequadas desta solução.

- **Solução tampão ácido tartárico/tartarato de sódio (pH 2,8):** o ácido tartárico 0,2 mol L⁻¹ foi preparado pela dissolução de 3,000g do ácido em 100mL de água deionizada e o tartarato de sódio 0,2 mol L⁻¹ foi preparado pela dissolução de 5,642g do sal em água deionizada. Em seguida, o tartarato de sódio foi sendo adicionado no ácido tartárico até a solução atingir pH 2,8, medido por um pHmetro. Se houvesse a precipitação, a solução

tampão era filtrada e o pH era medido novamente, sem que tenha sido observada alteração significativa.

- **Reagente cromogênico:** a solução foi preparada através da solubilização de 0,0160g de rodizonato de sódio (ROD) e 0,0144g de SDS em 10mL de solução tampão.

Para o desenvolvimento do método para a detecção e quantificação de furosemida, foi selecionado o reagente p-DAC e HCl.

Para este trabalho foram utilizadas as seguintes soluções principais:

- **Solução estoque de furosemida 6,22 mmol L⁻¹:** a solução foi preparada diariamente através da solubilização de 0,2057g de furosemida em 100mL de acetona destilada. As demais soluções de furosemida utilizadas neste trabalho foram preparadas através da devida diluição desta solução também em acetona.

- **Reagentes cromogênicos:** a solução foi preparada através da solubilização de 0,0700g de p-DAC em 10 mL de metanol e da diluição de 1,40 mL de HCl 37% em 10mL de metanol, separadamente.

Para o desenvolvimento do método para a detecção e quantificação de bumetanida, foi selecionado também o reagente p-DAC e HCl.

Para este trabalho foram utilizadas as seguintes soluções principais:

- **Solução Estoque de bumetanida 6,22 mmol L⁻¹:** a solução foi preparada diariamente através da solubilização de 0,2267g de bumetanida em 100mL de metanol destilado. As demais soluções de bumetanida utilizadas neste trabalho foram preparadas através da devida diluição desta solução também em metanol.

- **Reagentes cromogênicos:** a solução foi preparada através da solubilização de 0,0600g de p-DAC em 10 mL de metanol e da diluição de 0,217 mL de HCl 37% em 10mL de metanol, separadamente.

Para os testes de coleta de impressões digitais foram preparadas as seguintes soluções:

- **Ninidrina 5%:** a solução foi preparada diariamente através da solubilização de 0,5000g de ninidrina em 10mL de etanol.

- **Nitrato de prata 0,1 mol L⁻¹:** a solução estoque foi preparada através da solubilização de 4,2468g de nitrato de prata em 250mL de água deionizada.

O preparo das nanopartículas de óxido de zinco e sua impregnação na membrana foram feitas de forma diferente, seguindo os conceitos apresentados por CHOI⁷² e modificado a fim de se introduzir tais partículas nas membranas, como descrito a seguir:

Iguais volumes de acetato de zinco (em concentrações de 5, 25 e 50 mmol L⁻¹) e hidróxido de sódio (0,2 mol L⁻¹) foram preparados. As membranas foram imersas na solução de acetato de zinco e deixadas em repouso por 24 horas de modo a permitir que a solução penetrasse de forma uniforme nos poros da membrana, saturando-a. Após este tempo, a solução de NaOH foi aquecida até 70°C em uma placa com agitador magnético, sendo a temperatura controlada constantemente e, após atingir a temperatura desejada, a membrana foi colocada em um Erlenmeyer contendo a solução básica. A solução de acetato de zinco em uma das 3 concentrações já citadas anteriormente foi então adicionada lentamente, gota a gota, durante 30 minutos sob agitação, de modo à reação ocorrer mais homogeneamente.

A temperatura foi mantida a 70°C e, depois de duas horas, a membrana foi retirada da solução, lavada várias vezes com água deionizada de modo a retirar o excesso de ZnO formado em sua superfície e deixada em repouso dentro de uma placa de Petri, submersa em água deionizada. Após 24 horas, a membrana foi retirada e deixada entre 2 placas de vidro, prensadas de modo que a membrana não enrugasse.

A Figura 9 representa o espectrômetro portátil utilizada para as medidas de reflectância difusa utilizando as membranas de celulose bacteriana e os papéis de filtro (com ou sem a área delimitada).



Figura 9. Espectrômetro portátil e fibra óptica utilizados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

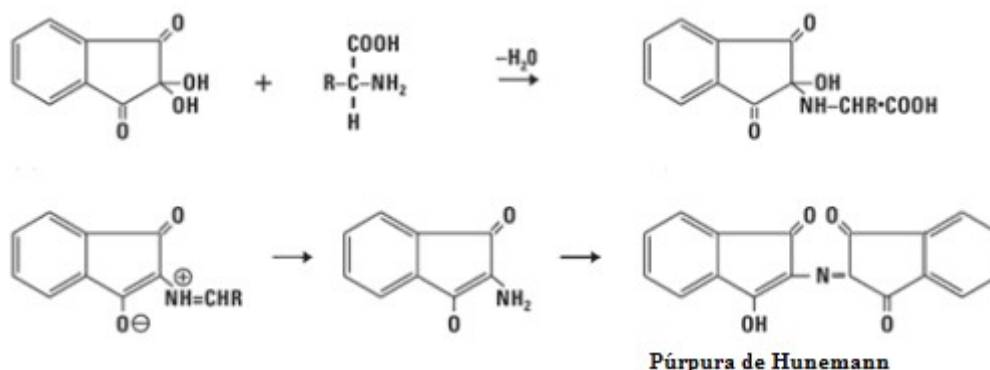
Tendo em conta a natureza distinta dos métodos desenvolvidos, os mesmos serão apresentados e discutidos individualmente, a seguir: (1) utilização da membrana de celulose bacteriana para coleta de impressões digitais e de resíduos de disparo, (2) quantificação de chumbo em resíduos de disparo e (3) utilização de papéis de filtro qualitativos com área delimitada para a quantificação de bumetanida e furosemida em urina humana para fins de doping esportivo.

4.1 Utilização de membranas de celulose bacterianas para a coleta de impressões dígito-papilares

Nesta etapa serão descritos os métodos utilizados para a potencialidade de detecção de impressões digitais utilizando membranas de celulose bacterianas impregnadas com três reagentes de detecção já usados ou que ainda estão sendo usados nas perícias em algumas partes do Brasil: ninidrina, nitrato de prata e óxido de zinco.

4.1.1. Coleta de impressões dígito-papilares utilizando ninidrina

A ninidrina foi utilizada como reagente de revelação por reagir com os aminoácidos (que são um dos principais compostos liberados pela epiderme), produzindo uma coloração intensa em comprimento de onda de máxima absorção em 570 nm¹⁶, como na Reação 2.



Reação 2. Representação da obtenção do púrpura de Hunemann, produto da reação entre a ninidrina e os aminoácidos presentes na mão.

Fonte: adaptado de Universidade Estadual do Maranhão¹⁸³.

Para os testes iniciais, a coleta utilizando a solução de ninidrina 5% em etanol foi efetuada de duas maneiras: no primeiro procedimento houve, inicialmente, uma coleta

direta das impressões do dedo do indivíduo na membrana de celulose bacteriana seca e posterior revelação por imersão desta na solução de ninidrina por 3 minutos. Após este tempo, a membrana foi retirada da solução e deixada até completa secagem à temperatura ambiente. No segundo procedimento houve primeiramente a imersão da membrana seca na solução da ninidrina por 3 minutos a fim de haver impregnação do reagente nesta. Esta também foi mantida à temperatura ambiente até a completa secura, sendo a coleta realizada posteriormente, diretamente do indivíduo. Em ambos os procedimentos, a coloração começa a aparecer após 15 minutos.

Como pode ser observado nas imagens da figura 10, as revelações ficam bem mais definidas, se a coleta for realizada após a membrana ter sido embebida na solução de ninidrina por 3 minutos (ambas as imagens já foram tratadas no programa ImageJ utilizando-se a opção *Sharpen*, na aba *Process* para uma melhor separação e afinamento das impressões das cristas papilares e a opção *Brightness/Contrast*, em *Adjust*, na aba *Image* para um melhor contraste desta). As imagens apresentadas na figura 11 mostram que a utilização do software melhora consideravelmente a qualidade das impressões digitais reveladas.

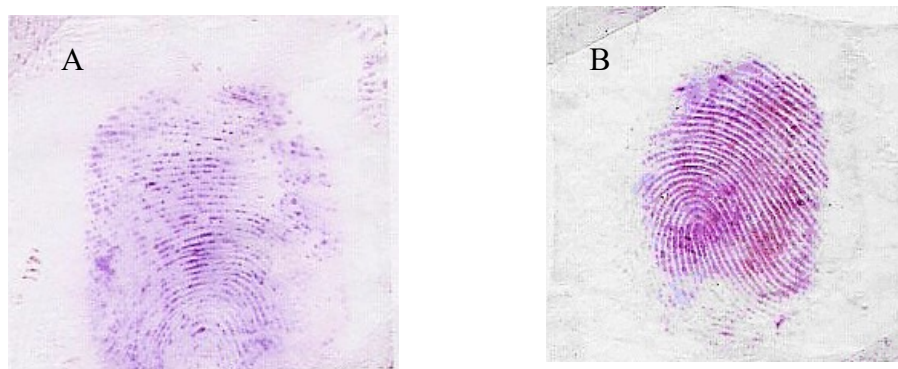


Figura 10. Coleta de impressão dígito-papilar realizada diretamente do dedo do indivíduo utilizando celulose bacteriana. (A) coleta e posterior revelação e (B) impregnação do reagente cromogênico e posterior coleta.

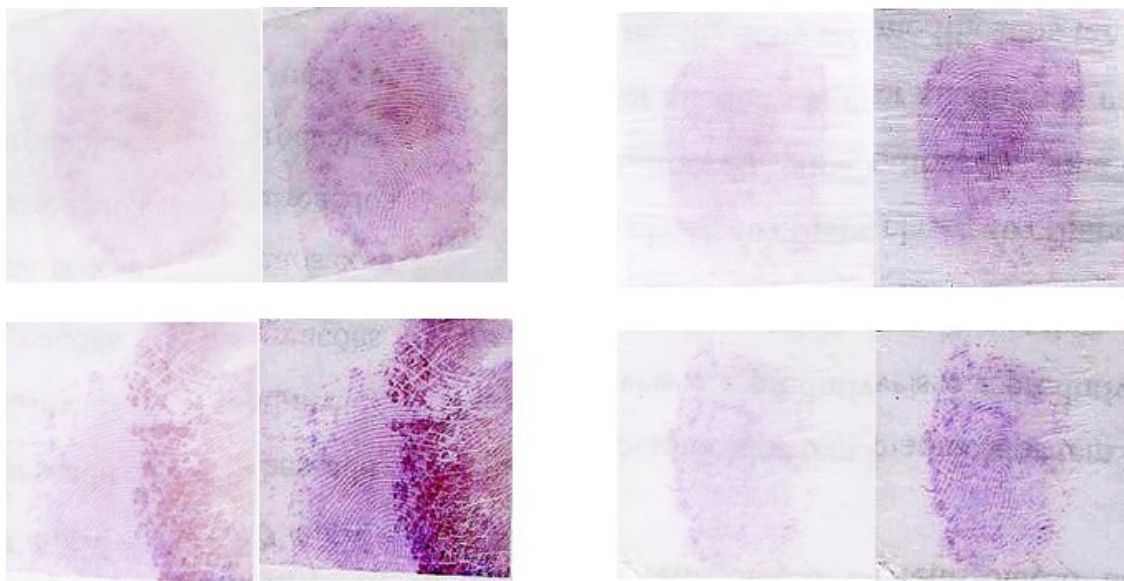


Figura 11. Imagens originais (à esquerda) e seus posteriores tratamentos com o software ImageJ (à direita).

O mesmo teste foi realizado também na membrana de celulose bacteriana úmida. Porém, como se pode reparar nas imagens da Figura 12, a utilização desta não foi viável uma vez que, após a secagem, a ninidrina começava a se depositar na membrana, inviabilizando-a para o fim desejado. Para a realização deste teste, a membrana úmida foi cortada no tamanho desejado e submergida na solução de ninidrina 5% antes e após a coleta das digitais, como realizado posteriormente para a membrana seca. Após 3 minutos, foi mantida à temperatura ambiente para completa secagem, protegida em uma placa de Petri tampada.

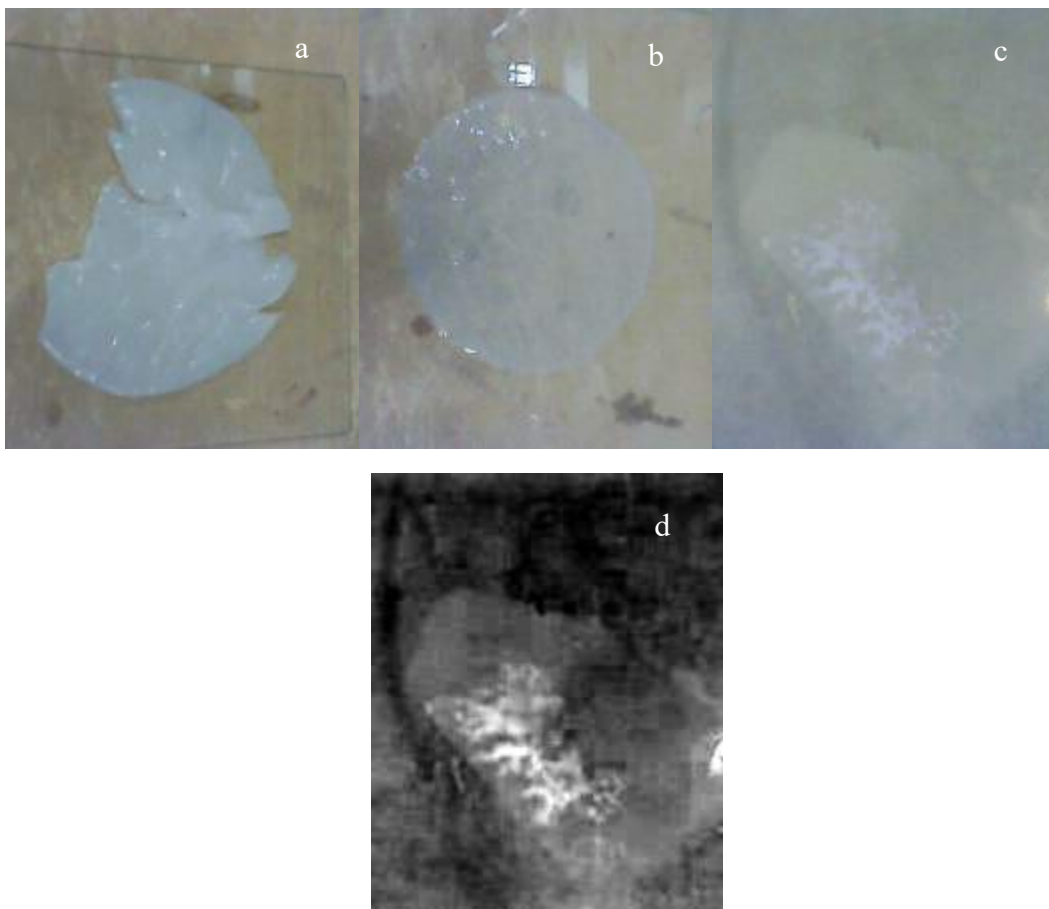


Figura 12. Membranas úmidas de celulose bacteriana utilizadas no teste com a ninidrina. Em (a) está representada a membrana úmida, em (b) membrana úmida afinada por pressão, em (c) membrana úmida fina impregnada com NND 5%, em (d) membrana úmida fina impregnada com NND 5%.

Tendo-se estipulado que a concentração de ninidrina e o tempo de impregnação desta nas membranas de celulose bacteriana são os melhores parâmetros para a coleta, foram realizados testes para estipular a melhor combinação destes, sendo a concentração estudada entre 1 e 5% e o tempo de impregnação da solução de ninidrina na membrana entre 3 e 60 minutos. Porém, foi observado ao longo deste que a ninidrina não apresentava uma coleta reprodutível dentro de um mesmo procedimento com concentração e tempo de impregnação iguais na maioria dos parâmetros desejados como: intensidade de coloração, presença de borrões, visibilidade e definição das cristas papilares impressas, definição dos pontos de identificação e falhas visuais. As impressões digitais reveladas ficavam muito borradas, muito apagadas ou sem continuidade das linhas, como mostrado na Figura 13.



Figura 13. Revelação de impressões dígito-papilares em membrana seca utilizando ninidrina e seu tratamento utilizando o software ImageJ.

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que, utilizando a ninidrina, é melhor haver a impregnação da membrana seca antes da coleta e que a utilização da membrana úmida não é viável uma vez que, enquanto esta secava, a ninidrina se depositava, inviabilizando a coleta ou revelação.

A utilização do programa ImageJ melhora consideravelmente a separação e visualização das linhas, mesmo que estas estejam um pouco apagadas, fracas ou borradas.

Ainda que a obtenção das impressões digitais não fosse tão eficaz, foi possível perceber que quanto maior era o tempo de impregnação do reagente na membrana, piores eram os resultados finais, ficando estes melhores com um tempo entre 3 e 10 minutos de impregnação com posterior secagem ao ar livre.

4.1.2. Coleta de impressões dígito-papilares utilizando óxido de zinco

O pó de óxido de zinco vem sendo muito usado na identificação de impressões digitais latentes em superfícies porosas e secas, envolvendo a aderência das partículas do pó nos resíduos de impressões digitais, havendo um contraste entre a impressão e a superfície. Além disso, foi estudada a propriedade da luminescência dos materiais de ZnO como forma de contraste para a revelação de impressões digitais⁷².

O ZnO é um semicondutor que apresenta um banda proibida larga e as suas partículas tipicamente exibem fotoluminescência na forma de emissão de banda UV. Também pode ser observada uma larga emissão na região do visível do espectro, decorrente de defeitos intrínsecos ou extrínsecos no material⁷².

Os testes de impregnação de ZnO foram realizados com reação diretamente na membrana úmida segundo procedimento já descrito na literatura⁷², modificado de modo a ser realizado *in situ*, como descrito no tópico 3.3.

Após a preparação, foram feitas imagens e caracterizações no MEV, como apresentadas nas Figuras 14, 15 e 16.

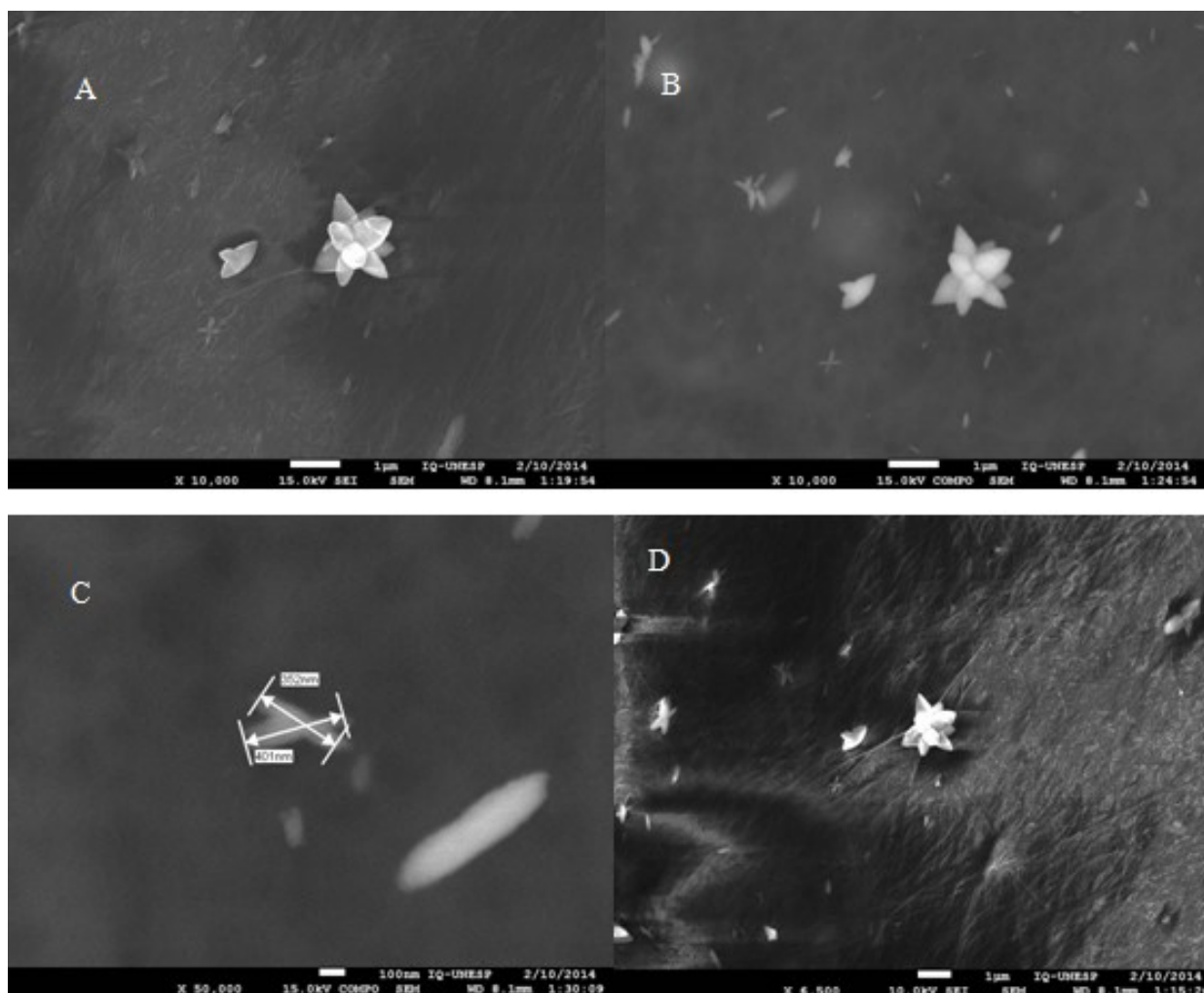


Figura 14. Micrografias da membrana de celulose bacteriana tratada com Acetato de Zinco 5 mmol L^{-1} . (A) imagem de elétrons secundários (topografia); (B) imagem de elétrons retroespalhados da mesma região; (C) tamanho das partículas formadas (entre 350 e 400 nm); (D) dispersão acentuada das partículas formadas.

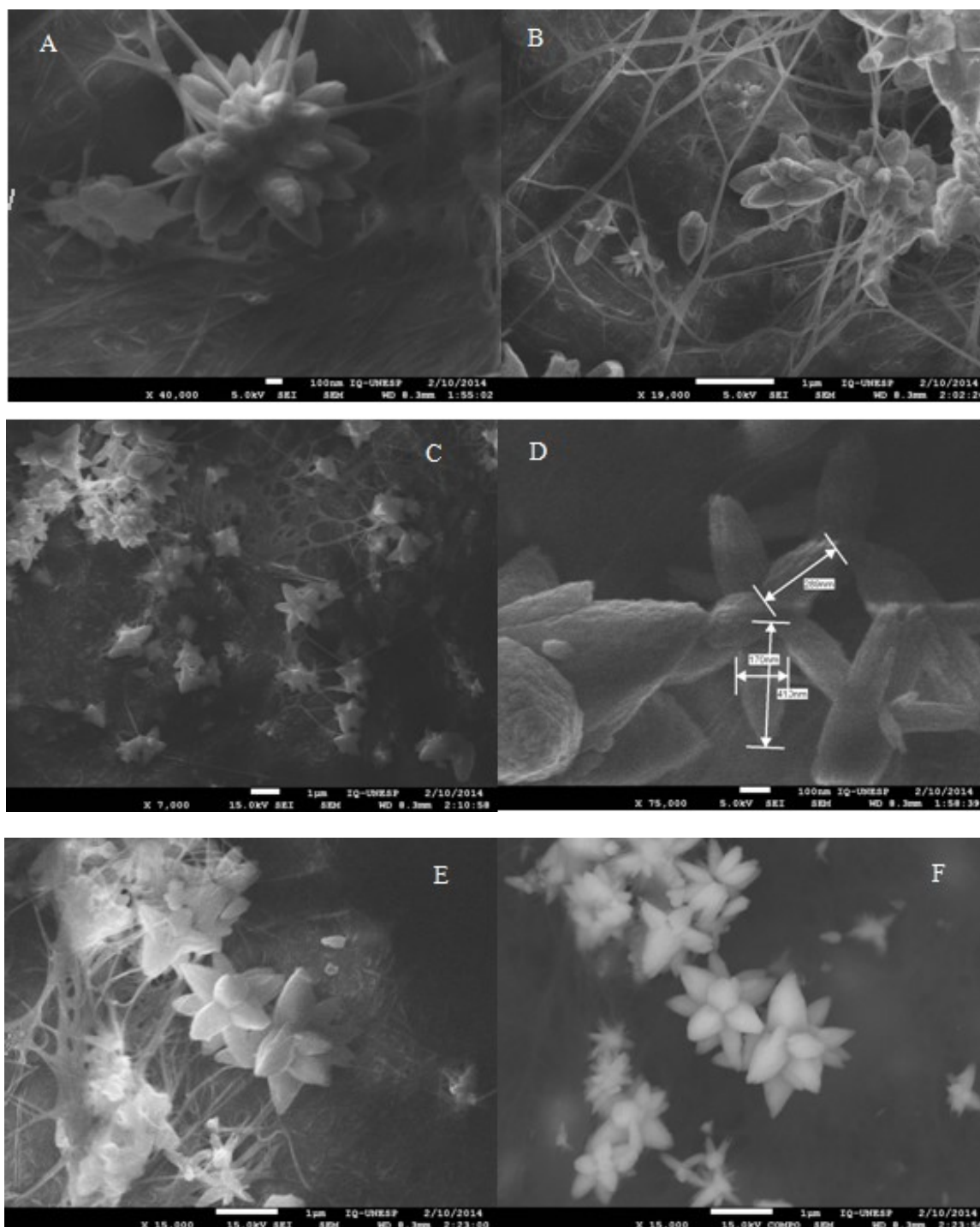


Figura 15. Micrografias da membrana de celulose bacteriana tratada com Acetato de Zinco 25 mmol L⁻¹. (A), (B) e (C) imagem de elétrons secundários (topografia). Em (D), tamanho das partículas formadas (entre 170 e 410 nm). Em (E), região com várias partículas de óxido de zinco enredadas e em (F), a mesma região através da imagem de elétrons retroespalhados.

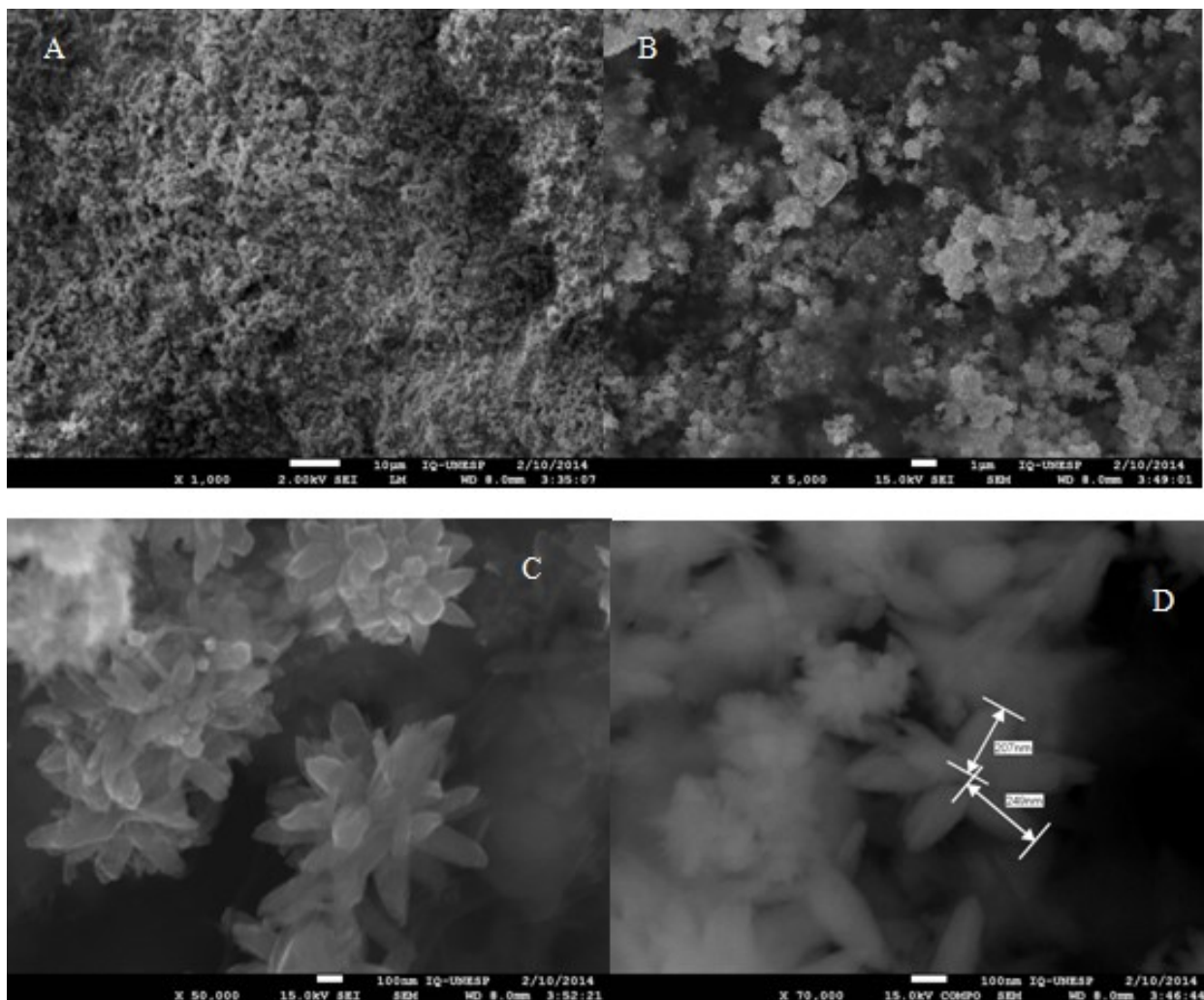


Figura 16. Micrografias da membrana de celulose bacteriana tratada com Acetato de Zinco 50 mmol L⁻¹.

Em (A) e (B) membrana repleta de partículas de ZnO em sua estrutura. Em (C) imagem de elétrons secundários e em (D), imagem de elétrons retroespalhados e tamanho das partículas formadas (entre 200 e 250 nm).

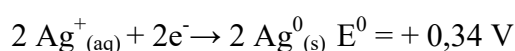
As imagens apresentadas nos permitem verificar que as partículas formadas (em formato de flor) estão de acordo com as apresentadas na literatura quando formadas sob outras condições e outros substratos além de mostrar que estas realmente se formaram dentro da estrutura fibrosa da celulose bacteriana, que atua como sítio de controle de tamanho.

Em seguida, testes de coleta foram feitos com as membranas impregnadas com óxido de zinco. Porém, não foi possível a obtenção de uma boa coleta da impressão digital, que deveria aparecer fluorescente ao ser iluminada com uma lâmpada UV de 388 nm com emissão da amostra em aproximadamente 587 nm, na região da luz verde⁷². Nenhuma das impressões coletadas foi identificada, nem durante a coleta direta dos dedos do indivíduo e

nem das coletas realizadas em superfícies, o que nos mostra que a utilização das membranas de celulose bacteriana impregnadas com ZnO é inviável para a coleta de impressões digitais.

4.1.3. Coleta de impressões dígito-papilares utilizando nitrato de prata

A técnica de revelação de impressões digitais utilizando nitrato de prata baseia-se na reação deste com os cloretos presentes nas impressões digitais, formando o cloreto de prata que, após alguns minutos, adquirem coloração escura (devido à formação de prata metálica) nas áreas de contato com as impressões latentes¹⁶, conforme a reação:



Os testes iniciais com AgNO_3 foram feitos com uma concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e, assim como feito para a ninidrina de duas maneiras: (1) com a coleta e posterior revelação e (2) com impregnação em tempos variáveis (de 3 a 60 minutos) na membrana e posterior coleta. Em ambos os métodos, as imagens começam a aparecer após 15 minutos.

Observou-se também, nestes testes iniciais, que assim como para a ninidrina, as revelações ficam bem mais resolvidas, com as cristas muito melhor definidas, se a coleta for realizada após a membrana ter sido embebida na solução de nitrato de prata (Figura 17).



Figura 17. Coleta direta de impressão dígito-papilar utilizando celulose bacteriana impregnada com nitrato de prata. Em (A), impregnação por 3 minutos. Em (B) impregnação por 1 hora.

As coletas realizadas durante esta etapa mostraram que havia uma melhor reprodutibilidade na coleta de impressões digitais utilizando-se o nitrato de prata. Portanto, realizou-se um teste para verificar, de maneira qualitativa, a influência do tempo de espera de reação na resolução e definição das cristas papilares em 3 diferentes tempos: 20

minutos, 90 minutos e 18 horas após a coleta e revelação. Todos estes testes envolvem antes a impregnação do reagente e todas as imagens apresentadas já estão tratadas no software ImageJ, como mostrado em 4.1.1.

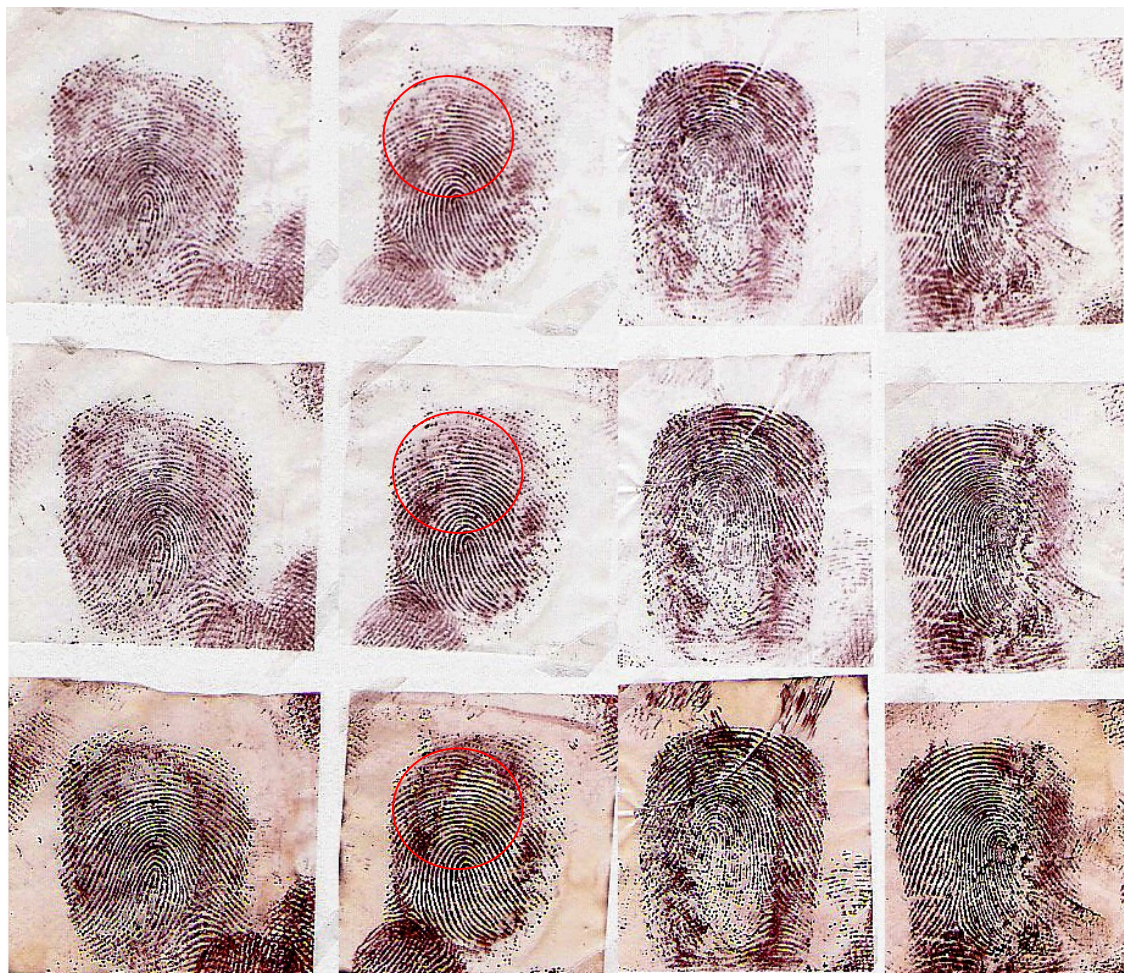


Figura 18. Influência do tempo de espera de revelação utilizando AgNO_3 para uma mesma coleta. A primeira linha representa o tempo de 20 minutos; a segunda, o de 90 e a terceira, o de 18 horas.

Nas regiões destacadas na Figura 18, observou-se que, no tempo de 90 minutos, há uma melhor separação das linhas e desaparecimento de algumas regiões de borrão quando comparada com o tempo de 20 minutos e que, no tempo de 18 horas, esta mesma região começa a apresentar mais borrões e um maior saturamento.

Também foi realizado o teste na membrana de celulose bacteriana úmida. Porém, como mostrado na Figura 19, a utilização desta não foi viável uma vez que o nitrato de prata foi reduzido, escurecendo a membrana. Para este teste, a membrana úmida foi cortada nos tamanhos desejados e submergidas na solução de nitrato de prata antes da coleta das digitais.



Figura 19. Membrana úmida fina impregnada com AgNO_3 $0,1\text{ mol L}^{-1}$.

Em seguida, foi feita uma bateria de testes para estipular a melhor concentração de nitrato de prata e o tempo de impregnação. Tais testes foram feitos através de planejamento univariado.

A solução de impregnação foi estudada nas concentrações $0,1$; $0,08$; $0,06$; $0,04$ e $0,02\text{ mol L}^{-1}$, com tempo de impregnação fixo em 1 hora. A Figura 20 representa os resultados obtidos.

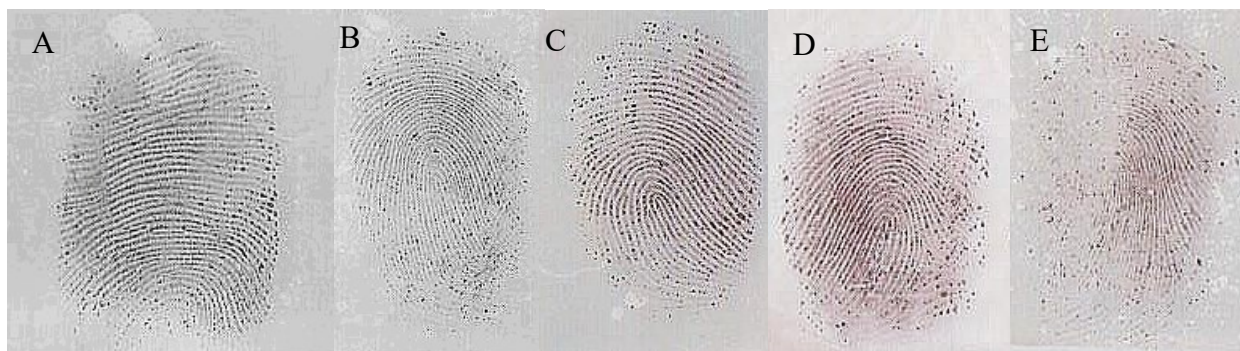


Figura 20. Imagens do estudo da concentração para revelação com Nitrato de Prata.
A: $0,1\text{ mol L}^{-1}$; B: $0,08\text{ mol L}^{-1}$; C: $0,06\text{ mol L}^{-1}$; D: $0,04\text{ mol L}^{-1}$; E: $0,02\text{ mol L}^{-1}$.

O tempo de impregnação foi estudado em 10, 30, 50, 70 e 90 minutos, com concentração fixa em $0,1\text{ mol L}^{-1}$. A Figura 21 representa os resultados obtidos.

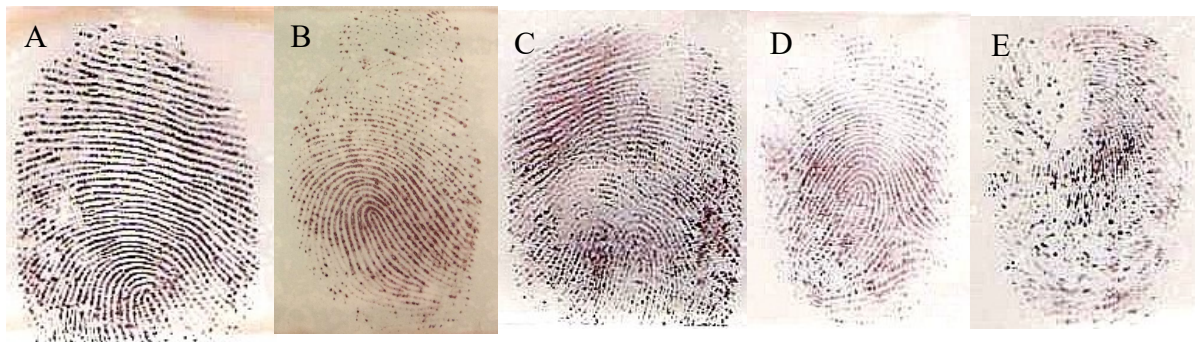


Figura 21. Imagens do estudo do tempo para revelação com nitrato de prata.
A: 10 min.; B: 30 min.; C: 50 min.; D: 70 min.; E: 90 min.

Para as imagens apresentadas, percebe-se que o fator concentração afeta de um modo menos significativo a resolução da impressão digital do que o fator tempo de impregnação e que estas ficam melhores utilizando-se concentrações mais altas e em tempos de impregnação mais baixos.

Em seguida, foi feito um planejamento composto central com estas mesmas variáveis a fim de se estudar como elas se relacionam consigo mesmas. As variáveis concentração de nitrato de prata e tempo de impregnação foram analisadas em cinco níveis (-1,41; -1; 0; +1; +1,41), sendo a concentração analisada de 0,02 a 0,10 mol L⁻¹ de nitrato de prata e o tempo de impregnação de 10 a 90 minutos. As imagens obtidas foram analisadas segundo 7 critérios medidos visualmente: intensidade de coloração, presença de borrões, visibilidade e definição das cristas papilares impressas, definição dos pontos de identificação, falhas visuais e intensidade das linhas. Para cada um destes critérios foi dada uma nota de 0 a 1, sendo que 0 representa o pior resultado para determinado fator e 1 o melhor possível segundo critérios visuais criados e estabelecidos pelo observador. Tais critérios foram criados a fim de que os melhores parâmetros escolhidos para os próximos testes resultassem na melhor coleta possível a fim de não se perder nenhum tipo de informação.

As variáveis estudadas em seus respectivos níveis, a matriz utilizada e a média da somatória de cada uma das notas dadas estão apresentados na Tabela 6 e a superfície de resposta correspondente está representada na Figura 22.

Tabela 6. do Planejamento Composto Central para o AgNO_3 .

N ^o	Variáveis não codificadas		Variáveis codificadas		Média Total ^b
	[AgNO_3] (mol L^{-1})	Tempo (min)	[AgNO_3] (mol L^{-1})	Tempo (min)	
1	0,03	22	-1	-1	1,75
2	0,09	22	+1	-1	4,17
3	0,03	78	-1	+1	1,58
4	0,09	78	+1	+1	2,92
5 ^a	0,06	50	0	0	2,17
6 ^a	0,06	50	0	0	2,92
7 ^a	0,06	50	0	0	3,25
8 ^a	0,06	50	0	0	4,00
9 ^a	0,06	50	0	0	4,00
10	0,02	50	-1,41	0	0,75
11	0,10	50	+1,41	0	3,00
12	0,06	10	0	-1,41	3,50
13	0,06	90	0	+1,41	4,50

a: ponto central.

b: representa a somatória das médias para cada uma das triplicatas de cada experimento.

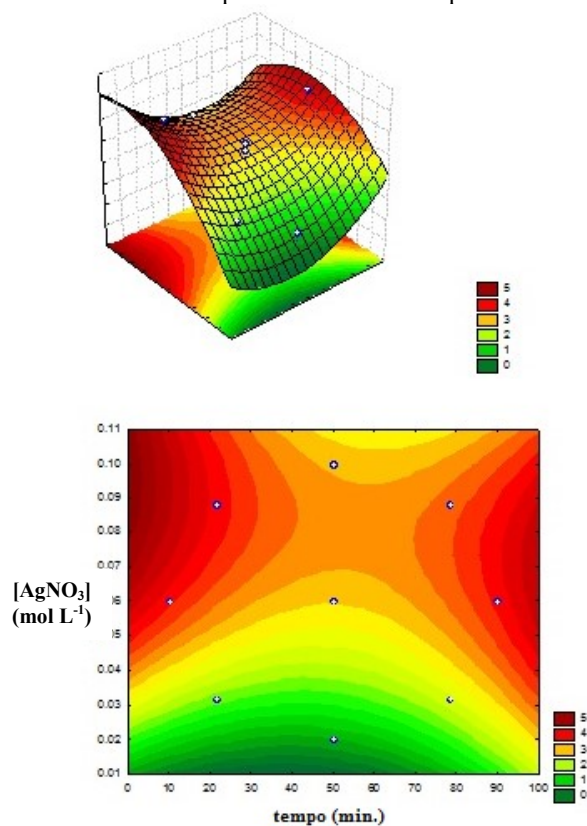


Figura 22. Gráfico da superfície de resposta para a matriz da Tabela 6.

A superfície de resposta nos mostra que a análise de impressões digitais pode-se dar de duas maneiras diferentes: ou com uma maior concentração de nitrato de prata (entre 0,09 e 0,10 mol L⁻¹) e um menor tempo de impregnação (até 10 minutos) ou com uma utilização de uma menor concentração de nitrato de prata (em torno de 0,07 mol L⁻¹) mas com um maior tempo de impregnação (acima de 90 minutos). Deste modo, para fins de praticidade, com a concentração não variou muito de um ponto ótimo ao outro, é preferível utilizar uma impregnação de 10 minutos com uma concentração de 0,1 mol L⁻¹.

Ao realizar a coleta das impressões digitais de superfícies, são detectadas linhas não muito fortes e descontínuas.

Visto isso, durante a coleta direta em superfícies, cogitou-se a hipótese de impregnar o nitrato de prata na membrana junto com a cola. Para tal teste, quatro tipos de cola foram testadas: cola lavável branca (composta de acetato de polivinila), cola bastão, cola de silicone e cola caseira de amido, todas utilizando solução aquosa de nitrato de prata 0,1 mol L⁻¹.

A utilização da cola caseira de amido e da cola de silicone não foi viável. Enquanto a cola caseira gerava uma grande deposição não-homogênea ao longo da superfície, a cola de silicone aderiu à superfície membrana muito fortemente, sendo impossível a sua retirada após a coleta sem afetar ou a superfície da coleta ou a integridade da membrana.

Os testes com a cola bastão foram realizados de duas maneiras: mergulhando por 3 minutos a membrana na solução de nitrato de prata após a impregnação da cola nesta ou ao mergulhá-la antes da impregnação com a cola. Os testes com a cola lavável branca foram realizadas ao mergulhar as membranas por 3 minutos na cola dissolvida em solução aquosa de nitrato de prata. Uma vez que a utilização da cola bastão para ajudar na coleta das impressões digitais não foi tão eficiente, pois gerava imagens pouco definidas, decidiu-se utilizar a cola lavável branca para prosseguir os estudos.

A seguir, um planejamento composto central foi feito utilizando as variáveis: massa de cola (g) e concentração de nitrato de prata (mol L⁻¹), analisadas em cinco níveis (-1,41; -1; 0; +1; +1,41). As variáveis estudadas em seus respectivos níveis e a matriz utilizada estão apresentadas na Tabela 7 e o método de escolha dos melhores experimentos foi visual, sem utilização de superfície de resposta, seguindo os mesmos 7 critérios apresentados anteriormente.

Tabela 7. Matriz do Planejamento Composto Central para o AgNO_3 utilizando cola lavável branca.

N°	Variáveis não codificadas		Variáveis codificadas	
	[AgNO_3] (mol L^{-1})	m_{cola} (g)	[AgNO_3] (mol L^{-1})	m_{cola} (g)
1	0,040	1,29	-1	-1
2	0,090	1,29	+1	-1
3	0,040	2,71	-1	+1
4	0,090	2,71	+1	+1
5	0,065	2,00	0	0
6	0,030	2,00	-1,41	0
7	0,100	2,00	+1,41	0
8	0,065	1,00	0	-1,41
9	0,065	3,00	0	+1,41

Este teste, cujo critério de seleção foi visual e sem a necessidade de atribuição de notas, mostrou que o melhor experimento a ser utilizado para a coleta foi o de número 7, utilizando nitrato de prata na concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e $2,0\text{g}$ de cola solubilizada. Neste experimento, as imagens das impressões digitais ficaram muito melhor definidas, com as cristas papilares mais visíveis e detectáveis.

Em seguida, foram feitas coletas de superfícies vítreas utilizando estes parâmetros otimizados. Para tais coletas, a membrana era aderida levemente úmida à superfície desejada e deixada até completa seca, o que não demora mais do que 2 minutos. Após a secagem, a membrana poderia ou não ser retirada da superfície. A figura 23 mostra que a permanência da membrana na superfície após a coleta gera resultados muito mais definidos, sendo que as imagens da linha A foram obtidas ao se colocar a membrana em contato com a superfície por 10 segundos, utilizando pressão no lado oposto, havendo a posterior retirada da membrana da superfície. As imagens da linha (B) foram obtidas ao se colar a membrana na superfície, sem haver a sua posterior retirada.

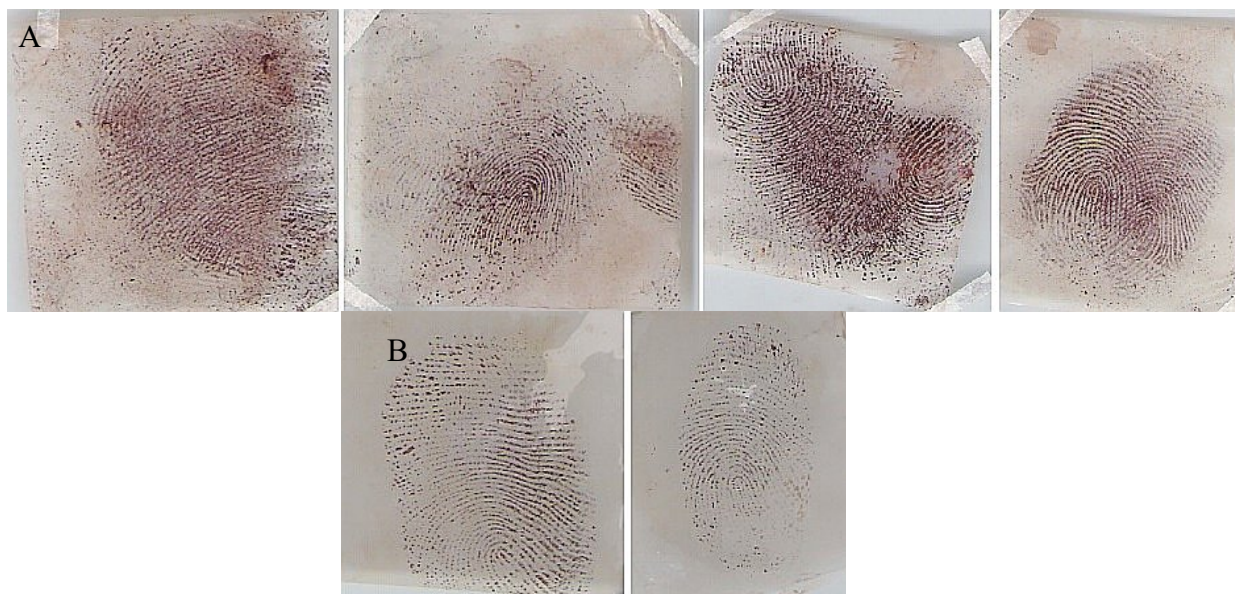


Figura 23. Imagens de impressões dígito-papilares coletadas utilizando-se cola branca lavável.

Em seguida, foram feitas duas isotermas de absorção de prata na membrana: uma impregnando as membranas com uma solução de concentração variada de nitrato de prata, sob um mesmo tempo de impregnação e a segunda, mantendo-se fixa uma concentração e variando-se o tempo de impregnação na solução.

Para a realização da primeira isoterma, foram selecionadas 5 concentrações da solução de nitrato de prata: 0,03; 0,04; 0,065; 0,09 e 0,10 mol L⁻¹. Após a impregnação das membranas em Placa de Petri, totalizando uma área superficial total de aproximadamente 9 cm², por 3 minutos em 10 mL, cada uma dessas soluções de impregnação foi diluída a 25 mL com água deionizada, sendo utilizada então para a titulação de uma solução de NaCl cuja concentração variava dependendo da concentração de nitrato de prata utilizada para a impregnação. À solução de NaCl foi adicionado 1mL de solução indicadora de cromato de potássio 0,25 mol L⁻¹, segundo método de Mohr.

A Tabela 8, obtida para a confecção deste experimento, está representada a seguir.

Tabela 8. Concentração de AgNO₃ absorvido em função da concentração da solução inicial de nitrato de prata.

[AgNO ₃] inicial (mol L ⁻¹)	[AgNO ₃] absorvido (mol L ⁻¹)	% absorvida
0,030	0,0194	65
0,040	0,0252	63
0,065	0,0406	62
0,090	0,0562	62
0,100	0,0617	62

Pode-se verificar, na da Tabela 8, que a porcentagem de absorção da solução de nitrato de prata pela membrana é independente da concentração inicial da mesma ao se considerar o intervalo de concentrações estudado. Portanto, a impregnação deve ser feita na membrana segundo critério da quantidade de nitrato de prata que se deseja que seja absorvido pela membrana e levando-se em conta que aproximadamente 62% desta concentração irá ser absorvida ao se considerar a impregnação em uma membrana de 9cm² utilizando-se 10mL de solução. Desta forma, é possível controlar a quantidade da solução que será impregnada, podendo-se variar esta dependendo do caso que se deseja, não somente para os fins forenses desejados.

Para a realização da segunda isoterma, foi selecionada uma concentração de 0,10 mol L⁻¹ de nitrato de prata nos seguintes tempos: 3, 7, 15, 30 e 60 minutos. A quantificação de nitrato de prata restante na solução deu-se do mesmo modo como apresentado para a primeira isoterma, segundo método de Mohr.

A Tabela 9, obtida para a confecção do gráfico e a respectiva isoterma (figura 24) estão representadas abaixo.

Tabela 9. Concentração de nitrato de prata absorvido em função do tempo de impregnação.

Tempo de impregnação (min)	[AgNO ₃] absorvido (mol L ⁻¹)	% absorvida
3	0,061	61
7	0,068	68
15	0,074	74
30	0,074	74
60	0,075	75

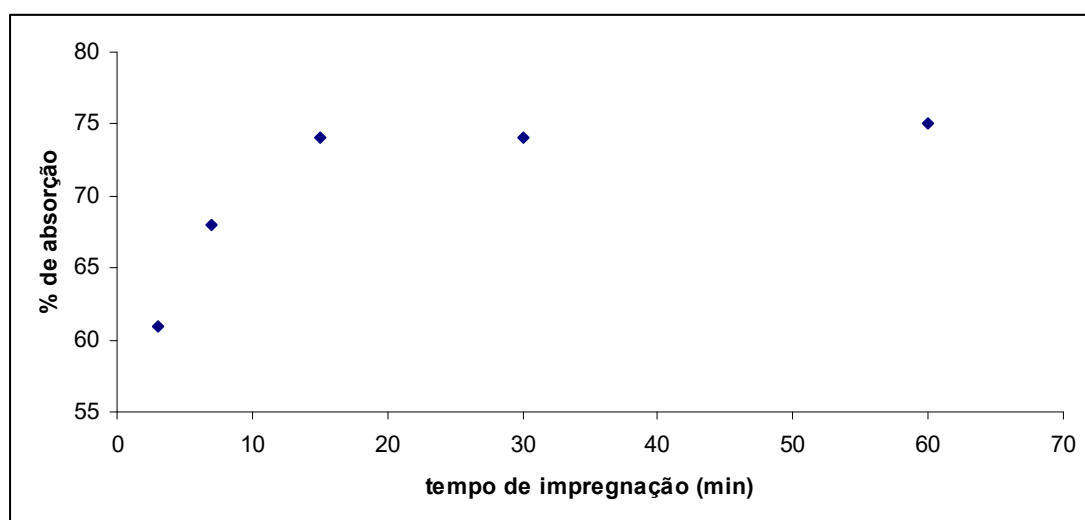


Figura 24. Isoterma de % de absorção em função do tempo de impregnação.

Pode-se perceber, através da tabela, que 3 minutos já são suficientes para haver uma impregnação de mais de 60% de todo o nitrato de prata presente na solução, sendo que em aproximadamente 15 minutos obtém-se um equilíbrio entre a membrana e a solução, onde praticamente não há mais absorção. Devido a este resultado, todas as impregnações do nitrato de prata para as futuras coletas utilizando-se cola lavável branca foram realizadas com uma solução $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com 15 minutos de tempo de impregnação.

Várias coletas em superfícies lisas e porosas foram realizadas desde então, mas em nenhuma delas houve uma boa repetibilidade dos resultados, o que mostra que a utilização destas membranas para a coleta de impressões digitais em superfícies lisas ou porosas não é viável. Ainda assim, este método pode ser usado para coleta direta das impressões digitais dos dedos do indivíduo (neste caso, sem a utilização de cola para a coleta), possuindo uma boa definição, praticamente isenta de borrões ou outros artificios que pudessem dificultar a detecção dos pontos de interesse. Tal método ainda é otimizado ao utilizar programas básicos de tratamento de imagens, como o software ImageJ, melhorando ainda mais a definição das linhas de impressão.

4.2 Coleta de resíduos de disparo de armas de fogo utilizando membranas de celulose bacteriana

Estudos iniciais para a coleta e quantificação de resíduos de disparo de armas de fogo já haviam sido realizados no grupo¹⁸⁰, onde o reagente cromogênico rodizonato de sódio em meio tamponado de ácido tartárico/tartarato de sódio e potássio a pH 2,8 foi selecionado.

O método é baseado na leitura de reflectância difusa do produto colorido formado quando o analito e o reagente cromogênico entram em contato em um suporte sólido.

Foram testados alguns suportes sólidos para a coleta dos resíduos (algodão em bolas, cotonetes de algodão, celulose vegetal e membranas de celulose bacteriana) e alguns agentes extratores (coleta a seco, utilizando EDTA, com água deionizada e com solução tampão ácido tartárico/tartarato de sódio e potássio), onde se descobriu que, para fins quantitativos, um suporte sólido como papel de filtro ou as membranas de celulose bacteriana, onde as partículas de chumbo penetrassem menos durante a coleta era melhor e, para o agente extrator, água deionizada pode ser utilizada sem grandes perdas, desde que não em excesso.

Para estes estudos preliminares e os referentes ao doutorado, as coletas foram realizadas no Clube de Tiro MAAT (Magri Associação Araraquarense de Tiro), na cidade de Araraquara, Estado de São Paulo, localizada na Rodovia Vicinal Abílio Augusto Corrêa, Km 2,3, Bairro dos Machados. Todos os disparos foram realizados no período da manhã com dia ensolarado, tempo seco, velocidade do vento leve e temperaturas em torno de 26 a 28°C. Os disparos foram realizados por profissionais munidos com revólveres calibre .38 utilizando-se pólvoras de fabricação própria e as coletas foram realizadas pelo método da esfregação¹⁸⁹ nas regiões do dorso e da pinça-dorsal, de acordo com a figura 25.

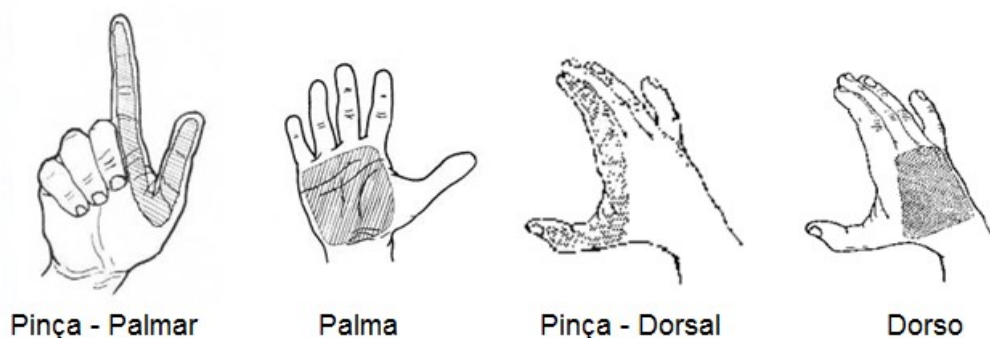


Figura 25. Principais regiões de coleta de resíduos de disparo.
Fonte: Martiny¹⁸⁴.

Também foi testado se havia alguma diferença entre a coleta nas mãos dos atiradores, nos locais de impacto dos projéteis e no material particulado dentro do cartucho deflagrado utilizando membranas secas e úmidas.

A coleta com a membrana seca foi realizada pela aderência desta, levemente umedecida com água deionizada. Esperou-se então a secagem (1 a 2 minutos). Em seguida, a membrana foi friccionada no local de coleta através de pressão com os dedos do coletor (utilizando luvas) e então armazenadas em tubos de centrífuga lacrado com *parafilm*.

A coleta com as membranas úmidas foi realizada do mesmo modo como feita com as secas, sem haver a necessidade da utilização de água deionizada. A aderência foi realizada diretamente no local da coleta e, após 1 minuto, a membrana foi retirada e armazenada do mesmo modo.

Descobriu-se assim, que a coleta com a membrana úmida não era completamente viável uma vez que esta desprendia muita água, o que acabava por diluir naturalmente o analito durante a sua coleta e armazenamento, havendo perda de resíduos.

Durante os experimentos anteriores, referente ao trabalho já desenvolvido em período anterior, descobriu-se também que o método colorimétrico, utilizado como a base da pesquisa aqui desenvolvida, mostrou-se bastante efetivo para a revelação dos resíduos coletados, ainda que a visualização daqueles coletados diretamente das mãos dos atiradores fosse mais difícil, devido à menor quantidade dos GSR presentes.

Na fase da pesquisa referente ao período deste trabalho, almejou-se a quantificação dos resíduos a fim de se estabelecer uma possível relação entre sinal de leitura no espectrofotômetro e tempo de disparo. Além disso, teve enfoque em estudar a coleta dos GSR utilizando membrana de celulose bacteriana utilizando para isso, microscopia eletrônica de varredura e a possibilidade de aliar esta à espectrofotometria a fim de diminuir os tempos de procura de partículas de GSR pelos laboratórios de criminalística atualmente.

Os testes de coleta utilizando as membranas de celulose bacteriana apresentaram número suficiente de partículas de chumbo, identificadas pela reação com o reagente cromogênico rodizonato de sódio em meio tamponado. Pode-se identificar também a presença de partículas de bário, também presentes em GSR. O bário pode ser identificado também utilizando-se o mesmo reagente cromogênico, mas em pH 7,0. A figura 26 mostra as membranas após revelação.

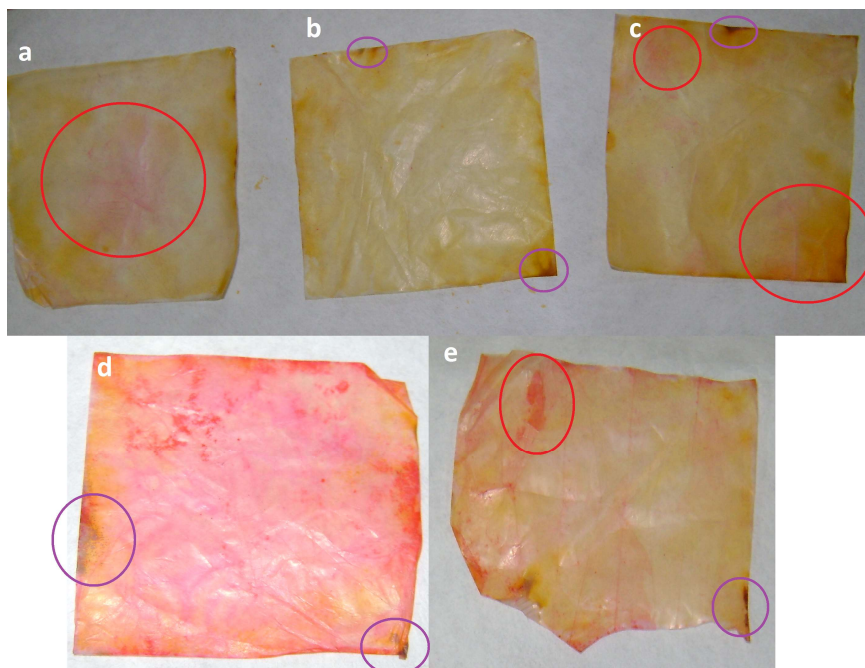


Figura 26. Membranas de celulose bacteriana após reação com Rodizonato em meio tamponado. As principais regiões de identificação visual dos íons chumbo (vermelho) e bário (roxo) estão destacadas.

A reação do chumbo e do bário com o rodizonato geram produtos de cores diferentes a pHs diferentes, como já citado anteriormente. O complexo Pb-ROD, a pH tamponado com ácido tartárico e tartarato de sódio e potássio em 2,8 resulta em uma coloração rósea, como pode-se ver na Figura 26, enquanto que o complexo Ba-ROD possui uma coloração violácea.

Cogita-se que o motivo de haver tênue aparecimento da coloração violácea se deve ao fato de a solução de ROD estar tamponada a pH 2,8 já que a detecção de chumbo foi o objetivo inicial do presente trabalho enquanto que a detecção do complexo de bário se dá a meio neutro. Mais adiante, nas micrografias, perceber-se-á que, mesmo que o bário não aparecendo tão frequentemente no método colorimétrico, este está presente em grande quantidade nas bordas das estruturas fibrosas da celulose bacteriana, podendo servir também como um método de confirmação da presença do bário, enquanto o chumbo se apresenta em uma distribuição mais homogênea

Discute-se a hipótese de, através de algum mecanismo desconhecido, estar havendo a difusão ou do íon bário ou do complexo Ba-ROD uma vez que se fosse problema do reagente cromogênico em si, o bário deveria ter sido detectado ao menos por EDS nas regiões centrais da membrana, o que não foi possível.

Com o intuito de verificar se havia alguma diferença na coleta realizada com a celulose de base vegetal e a celulose bacteriana, foram realizadas coletas com ambas.

4.2.1 *Testes com celulose vegetal*

Os testes utilizando a celulose vegetal foram feitos através do método de aderência e fricção, como já explicado anteriormente.

O material coletado foi levado para o laboratório e analisado diretamente em um microscópio eletrônico MEV TOPCON – modelo SM 300 após reação com o reagente cromogênico a fim de detectar primeiramente as regiões da membrana onde as partículas de GSR estão impregnadas. As micrografias foram feitas utilizando-se imagem por elétrons secundários que, por serem gerados bem próximos da superfície da amostra, fornecem uma imagem tridimensional da região analisada, sendo que as bordas e as áreas mais altas aparecerão mais claras por não sofrerem obstruções em seu caminho para o detector; e a imagem por elétrons retroespalhados, que fornece uma imagem não-tridimensional, mas nos dá informações sobre a diferença dos números atômicos dos elementos da região analisada uma vez que elementos com maior número atômico espalharão mais os elétrons do feixe de elétrons do microscópio, o que os farão aparecerem mais claros na micrografia. Foram feitas também análises por energia dispersiva de Raio-X (EDS).

Nas Figuras 27 e 28 estão representadas as fibras da celulose de base vegetal, todas emaranhadas e achatadas e a deposição dos resíduos entre estas, mostrando que houve uma boa coleta dos resíduos de GSR. Estão mostrados também as micrografias de uma região de interesse utilizando-se imagens por elétrons secundários e por elétrons retroespalhados, onde foi analisada, por EDS (espectroscopia por energia dispersiva de Raios-X), a composição do material incrustado nas fibras da celulose a fim de se verificar se estas correspondiam aos GSRs provenientes do disparo.

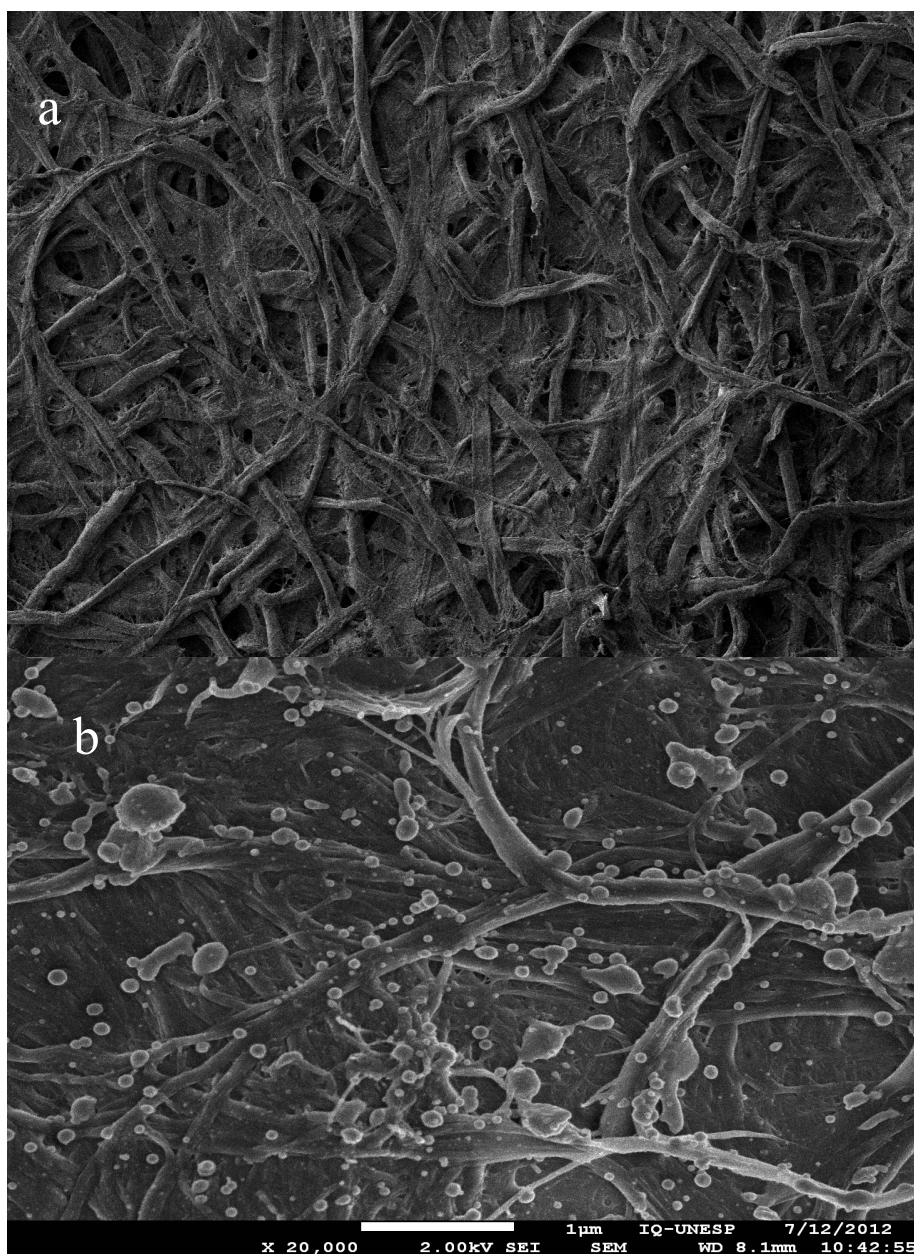
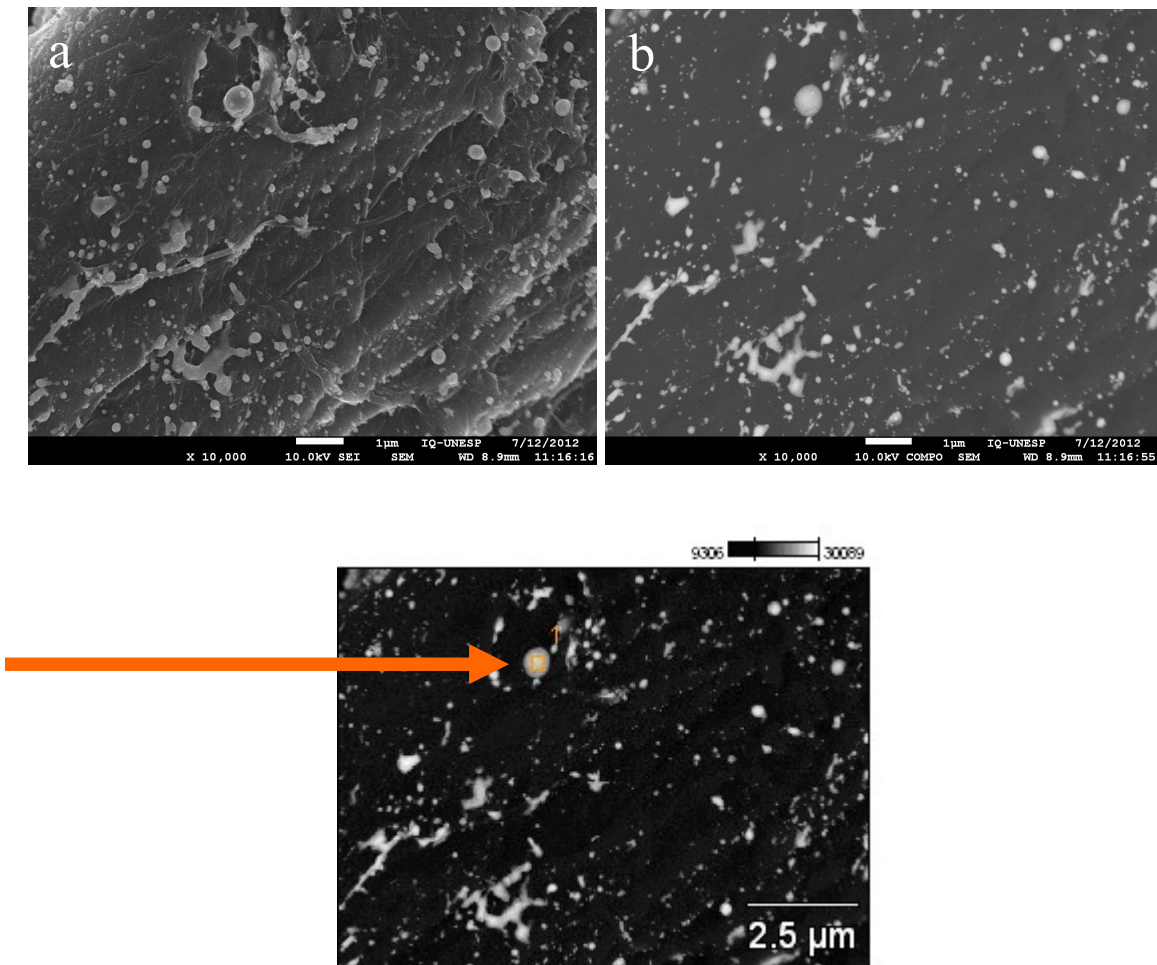


Figura 27. Micrografias de elétrons secundários da celulose vegetal. (a) aumento de 100x e mostra a estrutura achatada e compactada. Em (b), aumento de 20.000x e partículas agregadas na estrutura reticular.



Full scale counts: 244

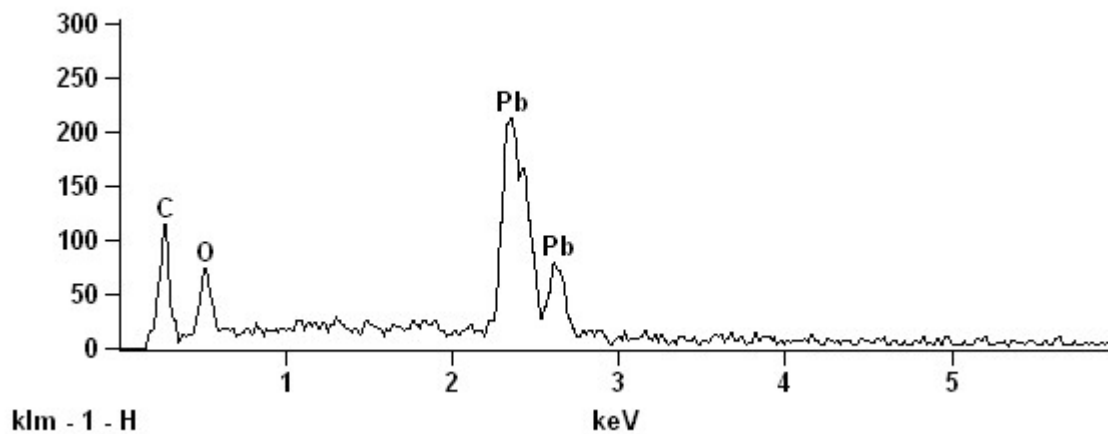


Figura 28. Micrografias de elétrons secundários com magnificação de 10.000x (a) da celulose vegetal e de elétrons retroespalhados (b) da mesma região com a representação do espectro de EDS.

Analisando-se as micrografias, percebe-se que as partículas e os aglomerados esféricos que aparecem na estrutura fibrosa na Figura 28(a), em terceira dimensão, são os

mesmos que aparecem na Figura 28(b), diferenciando-se apenas no método de imagem utilizado. Enquanto na primeira foi utilizada imagem por elétrons secundários, mostrando claramente as partículas agregadas nas várias fibras da celulose vegetal, na segunda foi utilizada imagem por elétrons retroespalhados. Considerando-se que a estrutura da celulose é composta de carbono, elemento de baixo número atômico, estas aparecem completamente escuras na imagem, destacando com maior eficiência do que na imagem por elétrons secundários as partículas esféricas dos resíduos de disparo de armas de fogo (metais) de elevado número atômico por processo já explicado anteriormente.

De acordo com o EDS apresentado para a região em destaque com o número 1, encontram-se os elementos carbono e oxigênio (provenientes da celulose) e o chumbo, proveniente da pólvora utilizada durante o disparo.

Outras micrografias e espectros de EDS semelhantes foram feitos para regiões diferentes da celulose vegetal com todas apresentando as mesmas características.

Em nenhuma delas pode ser encontrado o elemento bário.

4.2.2. *Coletas utilizando membranas de celulose bacteriana*

Os testes aqui apresentados foram realizados através da coleta dos resíduos imediatamente após o disparo, utilizando somente as membranas secas, nas mãos do atirador, nas regiões do dorso e da pinça-dorsal. O material foi levado ao laboratório, onde foi reagido com o reagente cromogênico e, em seguida, levado ao microscópio eletrônico de varredura. Na Figura 29 pode-se ver imagens feitas através de elétrons secundários da celulose bacteriana.

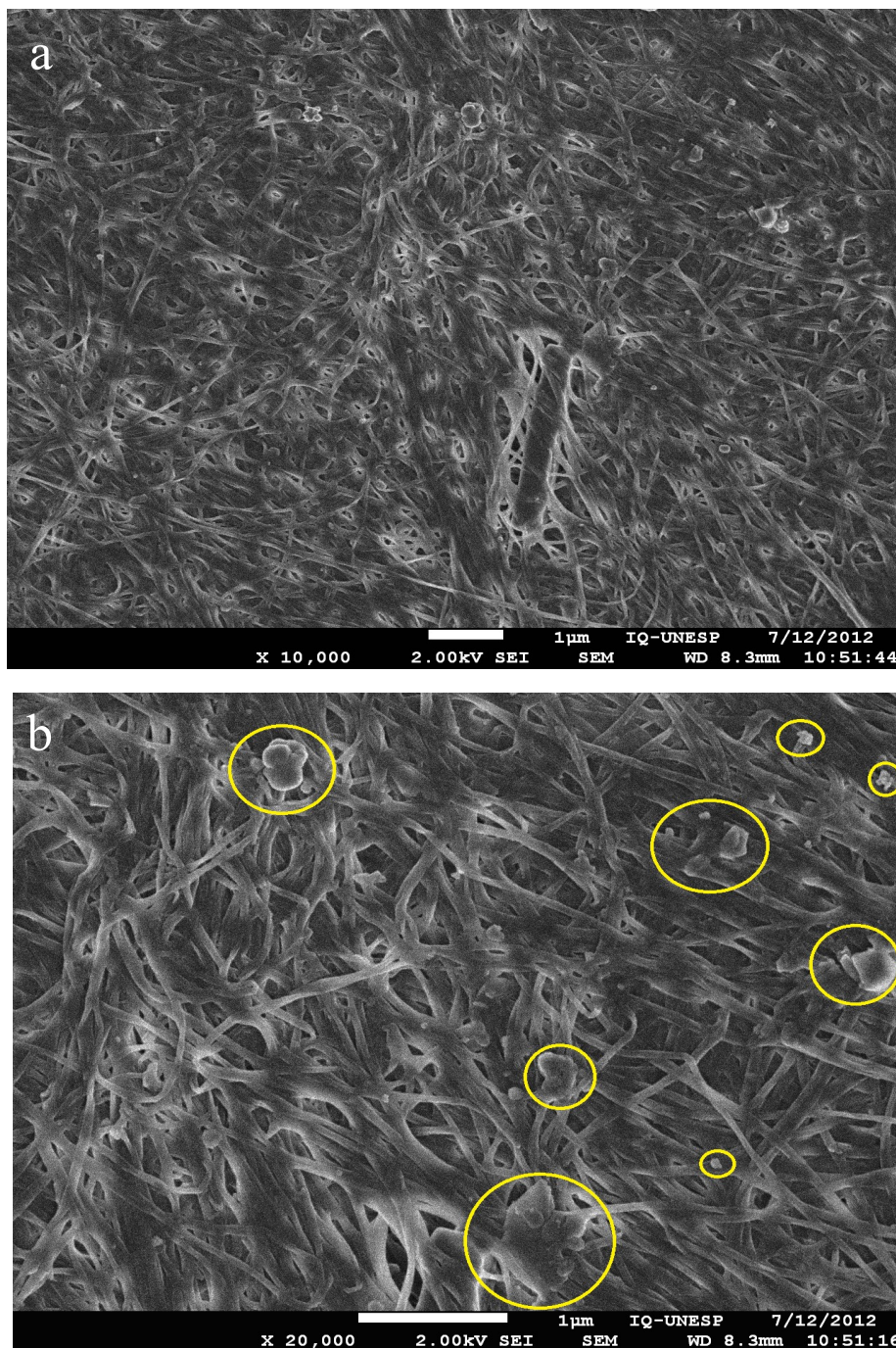
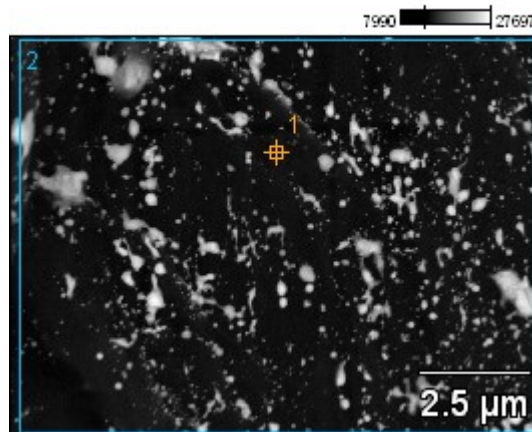


Figura 29. Micrografias de elétrons secundários da celulose bacteriana mostrando as partículas esféricas dos GSR. Em (a), aumento de 10.000x e, em (b), aumento de 20.000x com destaque nas partículas esféricas

Através destas imagens, podemos perceber ao compará-las com a figura 27 do tópico 4.2.1. e verificar que a estrutura da celulose bacteriana é bem mais organizada e possui sítios menores entre uma fibra e outra, servido como um melhor captor de resíduos.

Assim como realizado para a celulose vegetal, micrografias foram feitas utilizando-se imagens por elétrons secundário e retroespalhados, bem como o espectro de EDS para a confirmação qualitativa das partículas.

Os resultados estão mostrados nas figuras 30, onde detectou-se uma região rica em chumbo e na Figura 31, uma região rica em bário.



Full scale counts: 220

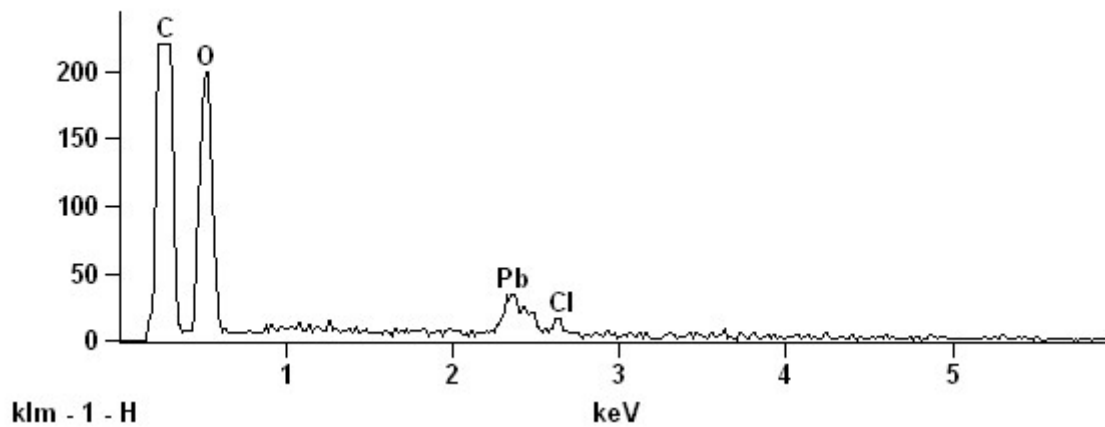
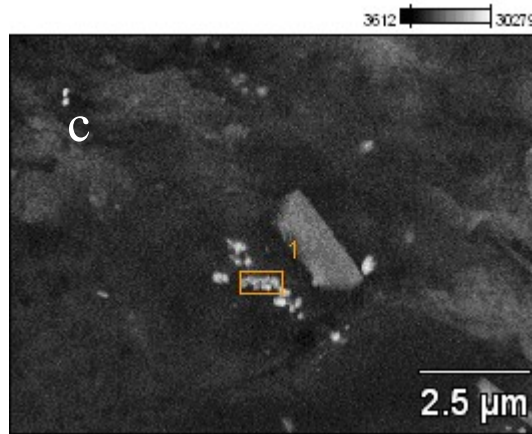
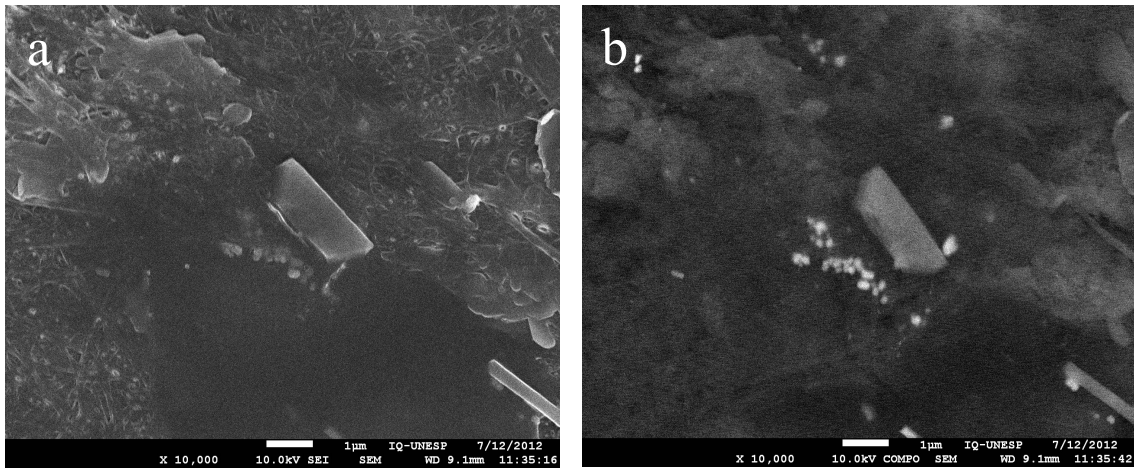


Figura 30. Espectro de EDS para uma região da membrana de celulose bacteriana com magnificação de 10.000x onde pode-se detectar chumbo.



Full scale counts: 161

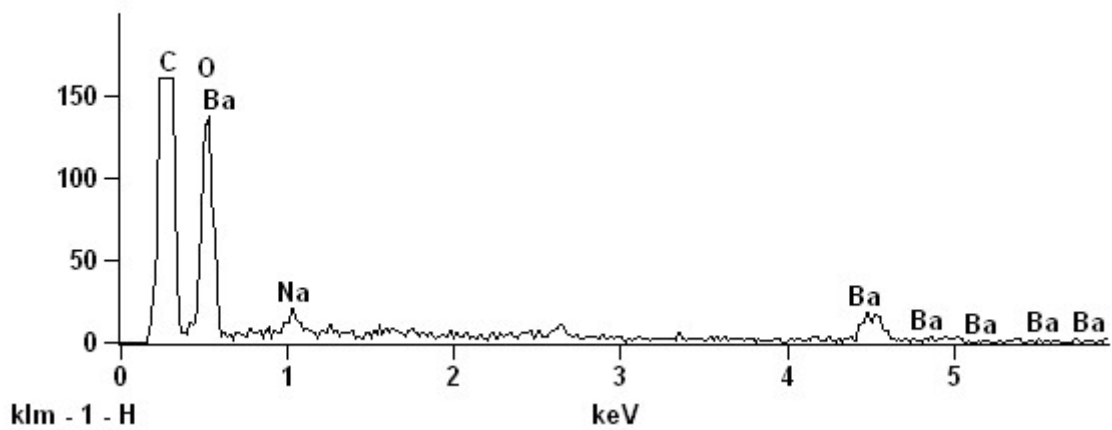
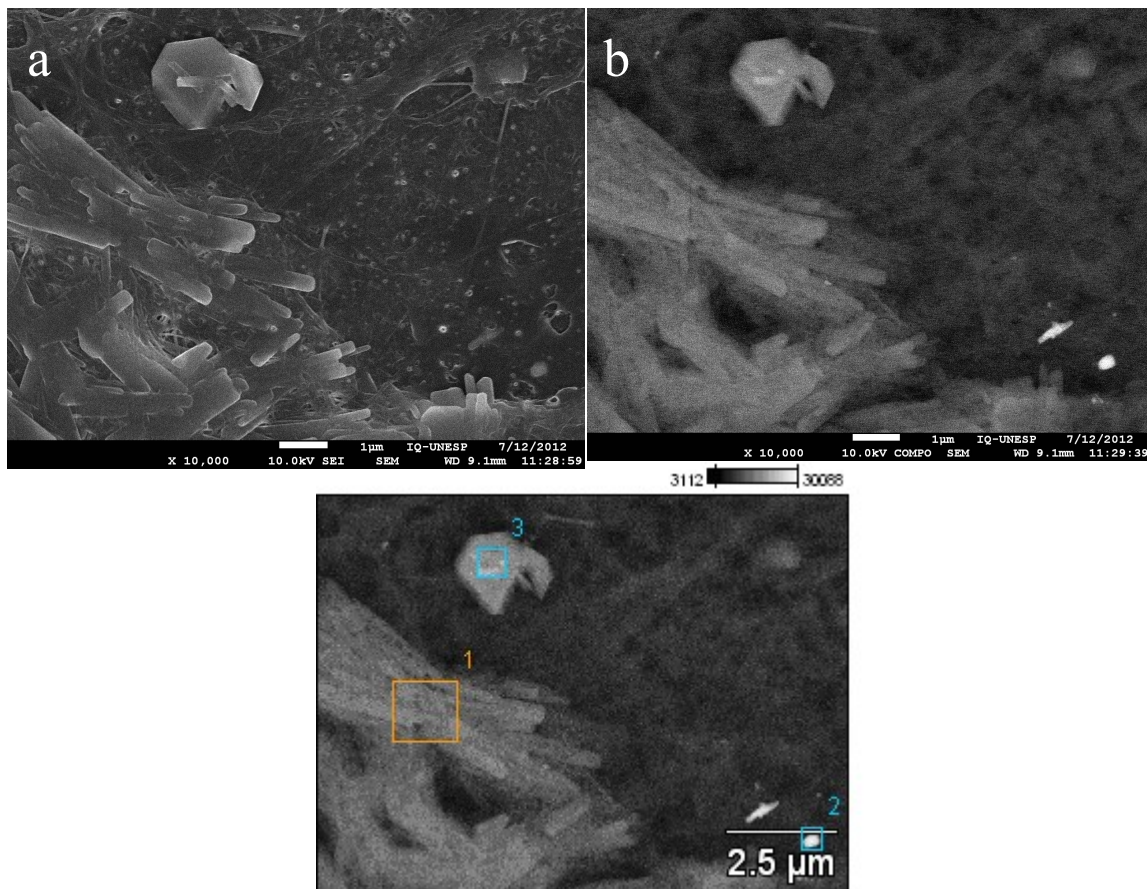


Figura 31. Micrografias de (a) elétrons secundários da celulose bacteriana e (b) de elétrons retroespalhados da mesma região com sua respectiva análise por EDS onde pode-se detectar o elemento bário na região destacada em (c). A magnificação das imagens foi de 10.000x.

A região de maior brilho nas imagens refere-se às partículas de maior número atômico. O espectro de EDS feito nessas regiões evidenciou que estas são originárias dos resíduos de armas de fogo por serem, em sua grande maioria, bário e chumbo.

Tendo-se em vista o sucesso dos testes realizados até então para a celulose bacteriana e o fato de que todos estes envolveram a estocagem da membrana após a coleta dos resíduos da mão do atirador e sua reação com o reagente cromogênico antes de ser levada ao MEV (a fim de se tornar mais fácil a detecção da região da membrana a ser lida pelo equipamento), optou-se por mudar a ordem deste procedimento, desta vez embebendo a membrana por 1 hora na solução do reagente cromogênico antes da coleta dos resíduos (deve-se esperar a sua completa secura antes do procedimento de coleta).

Após a coleta, foram feitas as micrografias. Nota-se a presença de partículas de características cristalinas, não-esféricas, como mostradas na Figura 32, onde estão também os espectros de EDS de três diferentes regiões.



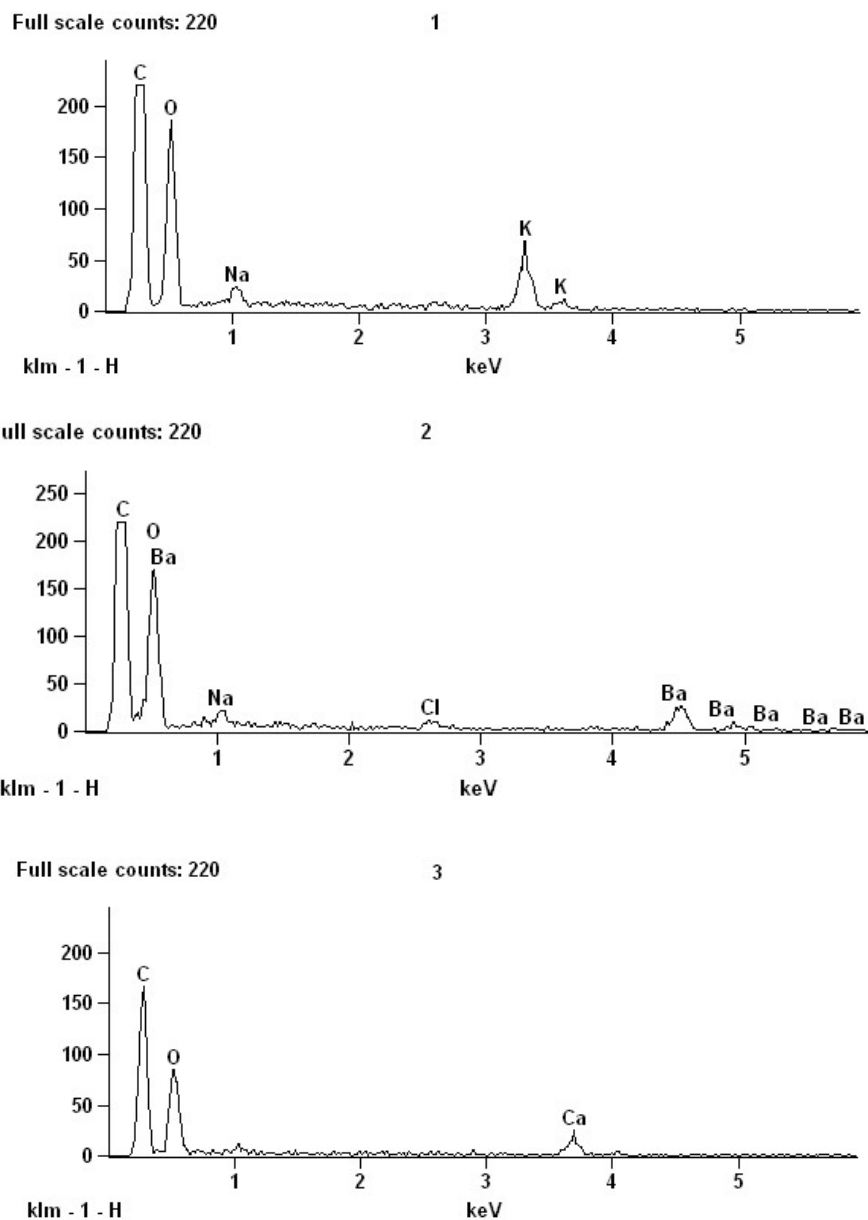


Figura 32. Micrografias de (a) elétrons secundários e (b) de elétrons retroespalhados da celulose bacteriana com EDS de diferentes regiões (1,2 e 3) de uma mesma membrana com suas respectivas análises por EDS. A magnificação das imagens foi de 10.000x.

Estes espectros mostram a presença de partículas provenientes do reagente cromogênico (cristalinas), bem como a de GSR que, como evidenciado acima, no EDS da região 2 é composto de bário. Deste modo, os bastonetes presentes na região 1 são de sódio e potássio, formados a partir do rodizonato de sódio e do tampão contendo tartarato de sódio e potássio. As partículas de cálcio encontradas podem ser devido a impurezas dos reagentes ou da própria coleta.

Evidencia-se, então, que a membrana de celulose bacteriana é um promissor substrato de coleta de resíduos de disparo, podendo esta já ser impregnada com o reagente

cromogênico antes de ser realizada a coleta para um resultado instantâneo, uma vez que o reagente cromogênico, como evidenciado pelas micrografias, fica também retido na estrutura da celulose. Além disso, a revelação da membrana antes de sua leitura no MEV propicia um tempo menor de análise destas quando comparadas à realizada atualmente pelos institutos de criminalística (4 horas, aproximadamente, para os métodos atuais e 1 hora para este método), uma vez que a detecção é assistida pela reação colorimétrica com o ROD, facilitando a detecção dos resíduos na membrana.

4.2.3. Quantificação de chumbo proveniente de GSR

Em seguida, visto o sucesso dos testes de coleta, foi desenvolvido um método de quantificação do chumbo proveniente dos resíduos de disparo na membrana de celulose bacteriana a fim de se estudar a possibilidade da determinação do tempo de disparo através da coleta dos GSR nas mãos do atirador e sua posterior quantificação utilizando espectroscopia de reflectância difusa (em 545 nm) baseado no fato de que tais resíduos vão se perdendo com o passar do tempo.

4.2.3.1 Otimização das variáveis para a coleta de chumbo

A fim de se otimizar as variáveis envolvidas na reação para a coleta por Planejamento Composto Central, era necessário saber, dentre as três variáveis presentes (concentração de ROD, concentração de SDS e tempo de impregnação do reagente cromogênico na membrana) quais destas influenciavam mais no método proposto. Para tanto, essas variáveis foram estudadas através do gráfico de Pareto, como demonstrado na Tabela 10, originada pelo programa Minitab 15, e na Figura 33.

Tabela 10. Matriz utilizada para o Gráfico de Pareto para a coleta de chumbo

Experimento	Fatores		
	[ROD] (mol L ⁻¹)	[SDS] (mmol L ⁻¹)	Tempo de impregnação (min.)
1	0,10	5	15
2	0,50	5	15
3	0,10	10	15
4	0,50	10	15
5	0,10	5	60
6	0,50	5	60
7	0,10	10	60
8	0,50	10	60

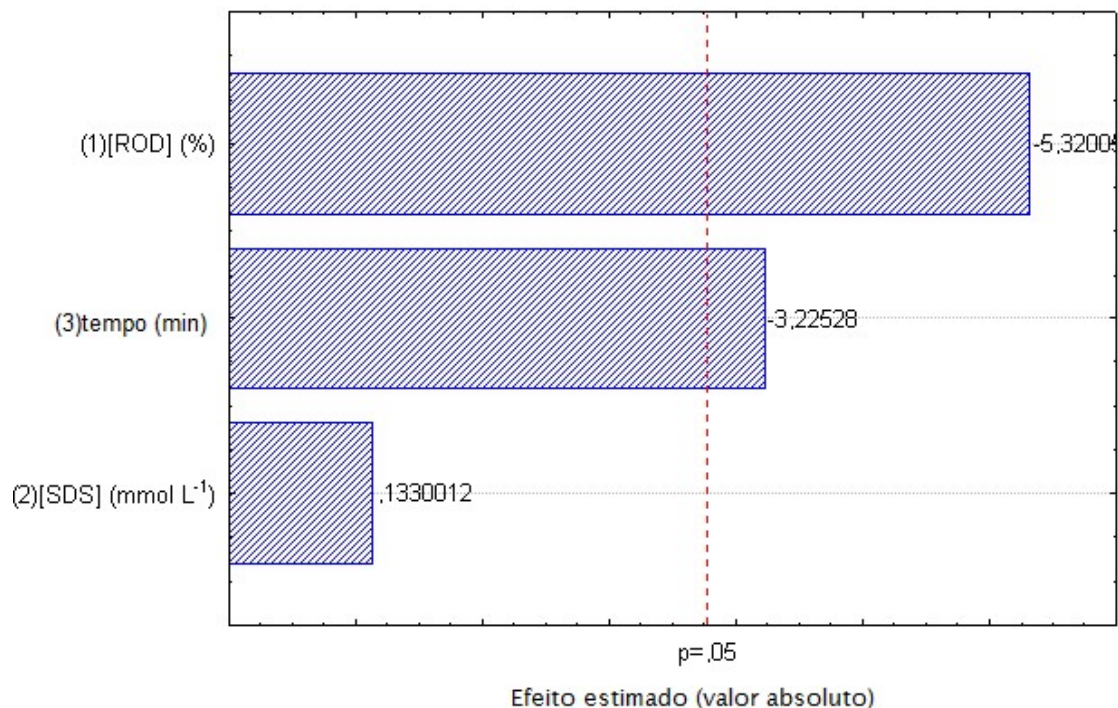


Figura 33. Gráfico de Pareto mostrando as influências das variáveis concentração de ROD, concentração de SDS e tempo de impregnação.

O gráfico mostra que as duas variáveis que são mais significativas para o experimento são: concentração de ROD e tempo de impregnação do reagente cromogênico na membrana e, para isso, a influência de ambos foi estudada então por Planejamento Composto Central a fim de se encontrar a melhor interação entre estes dois fatores que dá a resposta com maior sinal, aumentando assim os limites de detecção e de quantificação do método e, conseqüentemente, a sensibilidade de detecção de chumbo em GSR.

A terceira variável, concentração de SDS, por ter uma influência muito baixa no sinal da reação, foi mantida na menor concentração estudada, como mostrada na tabela: 5mmol L⁻¹.

Alguns experimentos foram feitos a fim de se identificar as concentrações de ROD e os tempos de impregnação a serem usados para a realização do Planejamento Composto Central. Encontrou-se que a concentração de ROD deveria estar entre 0,1 e 0,3% e o tempo de impregnação entre 3 e 30 minutos. Estes fatores foram, então, estudados nestes intervalos como mostrado na Tabela 11 e na Figura 34, representando o gráfico tridimensional do experimento.

Tabela 11. Matriz obtida para as coordenadas do planejamento composto central para a coleta de chumbo.

Experimento	Fatores		Média dos Sinais ^b (A _R)
	[ROD] (mol L ⁻¹) ^a	Tempo de impregnação (min.) ^a	
1	0,05 (-)	7 (-)	0,181
2	0,25 (+)	7 (-)	0,225
3	0,05 (-)	26 (+)	0,109
4	0,25 (+)	26 (+)	0,226
5	0,01 (-√2)	16 (0)	0
6	0,30 (+√2)	16 (0)	0,291
7	0,16 (0)	3 (-√2)	0,272
8	0,16 (0)	30 (+√2)	0,404
9	0,16 (0)	16 (0)	0,303
10	0,16 (0)	16 (0)	0,320
11	0,16 (0)	16 (0)	0,309
12	0,16 (0)	16 (0)	0,317
13	0,16 (0)	16 (0)	0,319

^a: os valores codificados são mostrados entre parênteses.

^b: média de três determinações

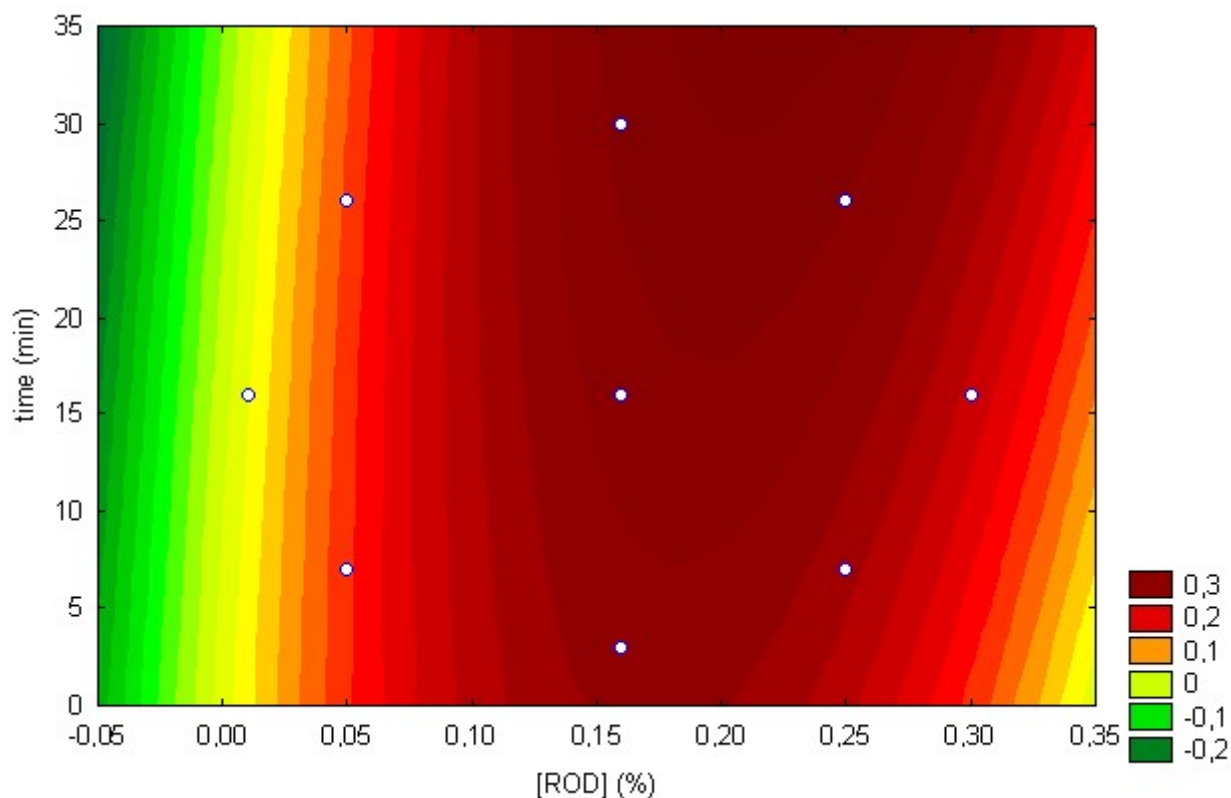


Figura 34. Superfície de resposta gerada para as medidas de reflectância em 545 nm em função da [ROD] e tempo de impregnação.

A equação da curva é representada por: $z = -0,002x - 9,339x^2 - 0,0007y - 0,00002y^2 + 0,0186xy$.

A análise estatística da superfície gerada, feita através do programa STATISTICA 7.0 mostrou que a melhor condição para este experimento pode ser alcançada usando uma

concentração de ROD de 0,28% e um tempo de impregnação de 110 minutos, que é muito maior que o valor mais alto usado no experimento. Para verificar se eram necessários outros planejamentos, foi feito um experimento nas condições dadas, obtendo-se uma média no sinal de reflectância igual a 0,418, que não é significativamente diferente do valor obtido no experimento 8 da Tabela 11, que teve uma média de 0,404. Portanto, decidiu-se usar as condições de concentração deste experimento: [ROD] = 0,16% e tempo de impregnação de 30 minutos.

4.2.3.2 Curva analítica, repetibilidade e limites de detecção e quantificação para a coleta de chumbo

A membrana de celulose bacteriana impregnada com o reagente cromogênico tem uma coloração amarelo pálido e, após a reação ocorrer, a cor muda para rosa avermelhado, dependendo da quantidade de chumbo coletada. Baseado nesse princípio, curvas analíticas foram feitas usando as condições anteriormente estudadas acima usando concentrações de chumbo de 4,70 a 93,7 ppm, como mostrado na figura 35. As curvas apresentaram boa linearidade e repetibilidade, que variaram de 2,37 a 6,53% (Interdia) usando diferentes concentrações de chumbo e de 2,51 a 6,63% (Intradia).

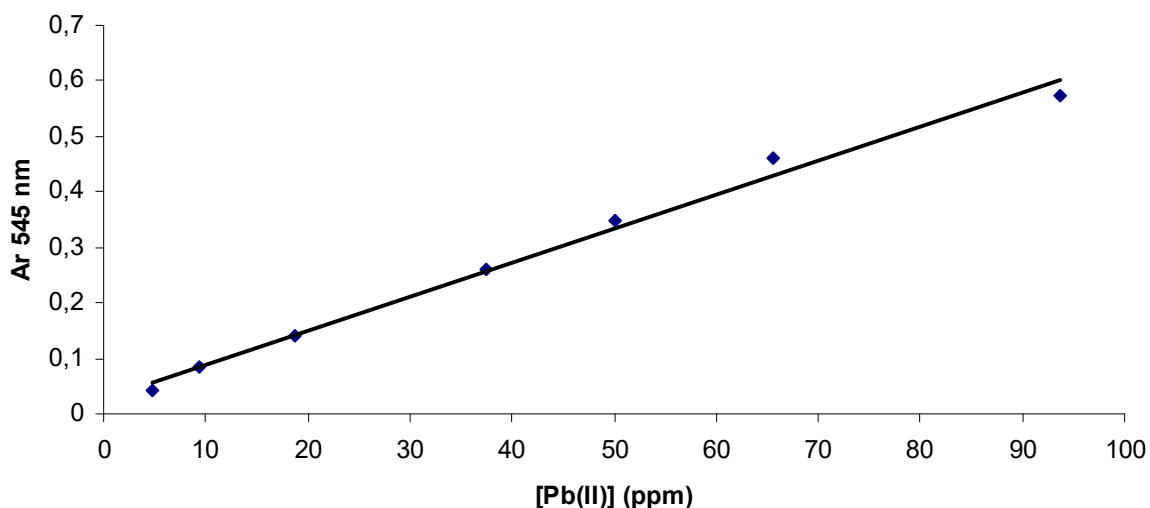


Figura 35. Curva analítica para a quantificação de chumbo provindo de resíduos de disparo de armas de fogo utilizando membrana de celulose bacteriana. A equação da curva é representada por

$$A_R = 0,02758 + 0,00613[\text{Pb(II)}] \text{ com } R = 0,9916.$$

Com o objetivo de determinar os Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ), foram preparados 10 brancos, segundo a IUPAC¹⁸⁵, do mesmo modo descritos nos procedimentos acima realizando-se a leitura dos *spot tests* em 585 nm.

Para determinar o Limite de Detecção (LD), partiu-se da seguinte fórmula:

$$LD = \frac{3\sigma}{B},$$

onde σ é o desvio e B é o coeficiente angular da curva analítica.

Para determinar o Limite de Quantificação (LQ), partiu-se da seguinte fórmula:

$$LQ = \frac{10\sigma}{B}.$$

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram 3,31 e 11,06 ppm, respectivamente.

4.2.3.3 Estudos de estabilidade da membrana de celulose bacteriana para a coleta de chumbo

Após a otimização do método, foi verificada a estabilidade da membrana com o reagente cromogênico e o da membrana com o produto da reação já formado. Estes experimentos foram feitos de 4 maneiras: duas membranas guardadas no refrigerador em duas Placas de Petri sobrepostas, protegendo-as, sendo uma destas coberta com papel alumínio e a outra mantida sem a proteção e duas outras fora da geladeira, com as mesmas duas condições descritas acima.

Foi verificado, como mostrado na figura 36, que a membrana com o reagente não é estável de um dia para o outro, independente do método de estocagem, apenas diferenciando a taxa de perda de estabilidade. Verificou-se que ambas as membranas deixadas fora do refrigerador tiveram uma perda de estabilidade de aproximadamente 65% enquanto as outras, mantidas guardadas no refrigerador, tiveram uma perda de sinal de, aproximadamente, 13% para a coberta com papel alumínio e de 23% para a mantida descoberta após 2 dias de realizada a impregnação. Portanto, é muito importante que a membrana impregnada com o reagente cromogênico seja preparada no dia do uso para máxima eficiência na coleta dos GSR.

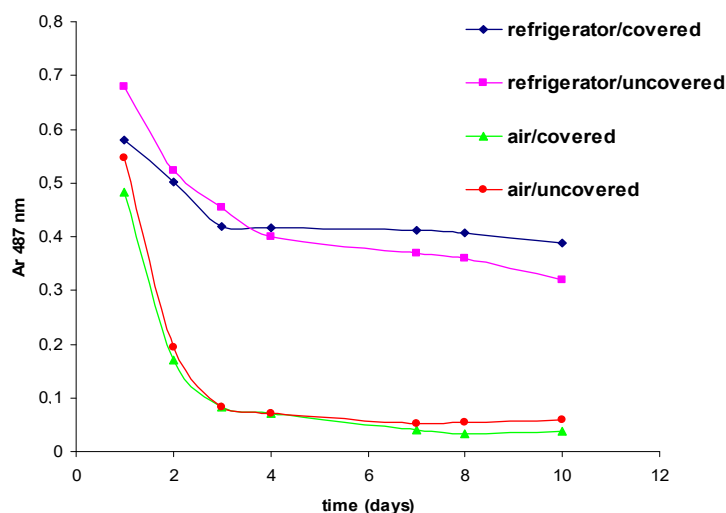


Figura 36. Estabilidade da membrana impregnada com o rodizonato de sódio em função dos dias.

O mesmo estudo foi realizado com a membrana já tendo sido usada para a reação com o chumbo, como mostrado na Figura 37. Verificou-se que a membrana mantida sem proteção e descoberta teve uma crescente perda de estabilidade do composto colorido formado e que as demais tiveram uma perda de estabilidade no segundo, no terceiro e no quarto dias, principalmente. Após este período, a estabilidade foi mantida praticamente igual para a resposta obtida no primeiro dia de coleta. Como mostrado na figura, a membrana que ficou mais próxima da leitura feita no primeiro dia foi a mantida coberta dentro do refrigerador. Esta membrana pode ser estocada por até 6 meses sem perda significativa da estabilidade do produto formado.

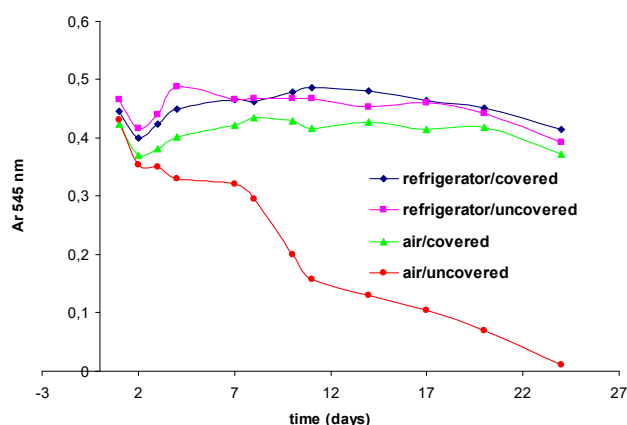


Figura 37. Estabilidade da membrana após a reação do rodizonato de sódio com chumbo em função dos dias.

4.2.3.4 Identificação do tempo de disparo

Este experimento foi realizado em dois dias diferentes, ambos com tempo ensolarado e com baixa velocidade do vento, envolvendo dois tipos de pólvora feitas previamente pelos próprios atiradores, uma contendo baixas quantidades de chumbo (cuja coleta começou em 5 minutos após efetuado o disparo) e a outra contendo altas quantidades (cuja coleta começou 10 minutos após efetuado o disparo). Foram utilizadas membranas com 1,5x1,5 para a coleta, feita através da aderência nas partes desejadas e as medidas de reflectância foram feitas em 545 nm em 5 diferentes parte da membrana, sendo duas medidas feitas na parte de cima, uma na parte central e duas na parte inferior (semelhante ao número 5 num dado). Tal medida foi adotada pelo fato de a deposição do resíduo não ser homogêneo devido à distribuição das partículas de GSR nas mãos dos atiradores ser bem dispersa. Para cada membrana foram registrados os sinais e a média entre eles foi calculada. Curvas de decaimento do sinal foram feitas, como mostrado na Figura 38 para cada uma das coletas. As mãos dos atiradores não foram lavadas e foram mantidas longe de qualquer tipo de interferências durante a espera da coleta.

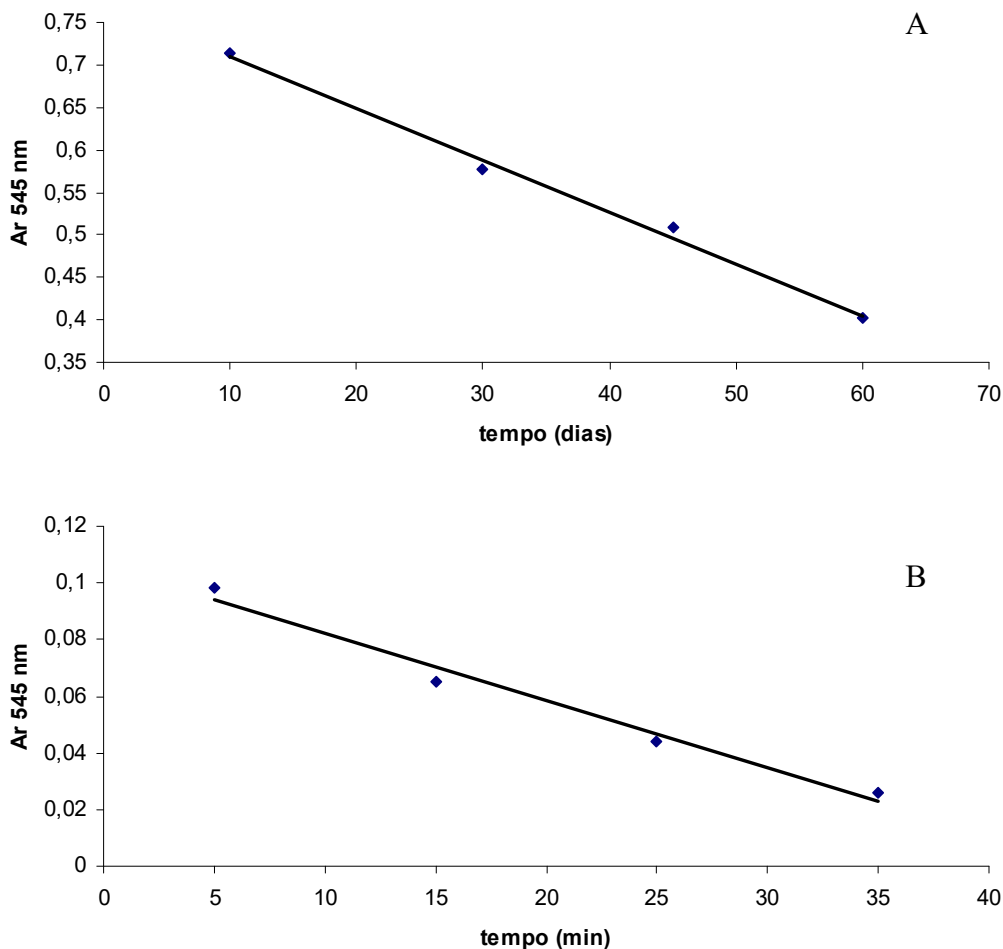


Figura 38. Curvas analíticas para ambas as coletas. A curva A, cuja equação é $A_R = 0,7714 - 0,0061x(\text{tempo})$, representa a coleta da pólvora com mais chumbo e a curva B, cuja equação é $A_R = 0,1057 - 0,0024x(\text{tempo})$, representa a coleta da pólvora com menores quantidades de chumbo.

Através das equações da curva, pode-se perceber que, se a quantidade de chumbo na curva A é 0 (onde A_R é 0, o tempo de disparo é de 126 minutos e, para a curva B, o tempo de disparo é de 44 minutos). Estes resultados nos mostram que, para a coleta da pólvora nas mãos dos atiradores, ao considerarmos A_R como sendo 0, ou seja, como sendo o ponto onde não se pode mais haver a quantificação de chumbo por este método, temos um tempo de coleta limite de, aproximadamente, 2 horas para a pólvora com maior quantidade de chumbo e de 40 minutos para a pólvora com menor quantidade, caso se deseja quantificar através deste método espectrofotométrico.

Porém, é importante frisar que estas curvas estão sujeitas a alterações dependendo do dia, do lugar e das condições de coleta (como tempo, umidade do ar, tipo de arma envolvida, modo de empunhadura, etc...), o que torna necessária a confecção de várias

curvas ao longo da pesquisa de tempo de disparo, devendo-se escolher uma curva que representa o ajuste melhor para as condições do dia da efetuação do disparo.

As Tabelas 12 e 13 mostram o resultado de outras 40 coletas feitas, sendo o branco considerado como a completa ausência de chumbo na coleta ou a não-detecção deste por parte do método de quantificação considerado.

Tabela 12. Coletas realizadas e suas respectivas quantificações através do método proposto para a pólvora com maior quantidade de chumbo.

Coleta	Tempo calculado (min:seg)	Tempo de coleta (min:seg)
1	7:18	10
2	10:06	
3	10:54	
4	8:06	
5	9:36	
6	31:24	30
7	32:42	
8	29:18	
9	28:30	
10	26:12	
11	42:24	45
12	41:24	
13	38:18	
14	39:36	
15	42:36	
16	59:18	60
17	54:30	
18	53:30	
19	54:12	
20	54:24	

Tabela 13. Coletas realizadas e suas respectivas quantificações através do método proposto para a pólvora com menor quantidade de chumbo.

Coleta	Tempo calculado (min:seg)	Tempo de coleta (min:seg)
1	6:24	5
2	3:18	
3	6:24	
4	7:18	
5	5:30	
6	16:48	15
7	14:42	
8	17:18	
9	13:48	
10	15:06	
11	26:24	25
12	28:36	
13	28:06	
14	23:18	
15	21:36	
16	32:30	35
17	29:00	
18	28:06	
19	31:36	
20	29:54	

Como se pode perceber através das tabelas acima, ainda que alguns dos tempos de disparo calculados através das curvas obtidas encontram-se acima ou abaixo de 10% do valor do tempo de disparo original, principalmente para a Tabela 12, estes ainda encontram-se de acordo com o esperado, garantindo-nos uma boa aproximação da realidade, podendo nos informar se um determinado indivíduo chegou a realizar um disparo no tempo em que se deseja saber.

Portanto, fica evidente que a membrana de celulose bacteriana é um substrato promissor para a coleta de GSR e pode ser previamente impregnada com o reagente cromogênico antes da coleta, ajudando na identificação dos lugares onde os microscopistas devem procurar as partículas, uma vez que a reação com o reagente cromogênico estudado tem resultado instantâneo. Além disso, apesar da membrana impregnada com o reagente cromogênico não ter uma boa estabilidade, porém, se já foi utilizada para revelar os resíduos de disparo e, se mantida em refrigerador e coberta de modo a ficar longe da luz, pode ser estocada por meses.

As curvas analíticas também mostraram bons resultados, o que torna o método adequado para a detecção e quantificação de GSR nas mãos do atirador e a possibilidade de se descobrir o tempo de disparo para aqueles realizados recentemente.

4.3 Controle de qualidade: loções progressivas para cabelo

A quantificação de chumbo em loções progressivas para cabelo constitui um adendo ao trabalho apresentado, realizado também durante o período do doutorado utilizando método já desenvolvido durante período anterior¹⁸¹, utilizado anteriormente para quantificação de chumbo em amostras de cachaaças comerciais, cujas figuras de mérito resumidas estão apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14. Resumo das figuras de mérito para o método de quantificação de chumbo previamente desenvolvido.

Comprimento de onda (nm)	545
Componentes do reagente cromogênico	ROD em meio de SDS e tampão ácido tartárico/tartarato de sódio a pH 2,8
Concentrações dos componentes do reagente cromogênico	[ROD] = 0,28% [SDS] = 9 mmol L ⁻¹
Ordem de adição dos reagentes	Reagente cromogênico + analito
Estabilidade óptica	5 a 60 minutos
Linearidade	4,7 a 140 ppm
Curva analítica	$0,00407 \times [\text{Pb}^{2+}] - 0,00511$
Coefficiente de correlação	0,9977
Repetibilidade intradia (%)	1,10
Repetibilidade interdía (%)	2,40
LD	1,12 ppm
LQ	3,75 ppm

O método proposto foi aplicado usando 4 amostras de loção progressiva para cabelos obtidas em estabelecimentos brasileiros. Para o método proposto, as amostras foram preparadas através da diluição de 1mL de cada amostra em um balão volumétrico de 25mL, sendo os volumes completados com água deionizada.

Os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados estatisticamente (usando testes-t a 95% de confiança) com aqueles usando o método de comparação¹⁸³, mostrando uma boa concordância (tabela 15).

Tabela 15. Resultados para a determinação de chumbo(II) em loções progressivas para cabelos.

Amostra	Método de Referência Pb²⁺ (% m/v)	Método Proposto Pb²⁺ (% m/v)	Teste-t^a (4,303)
1	0,0609	0,0607	0,1628
2	0,0618	0,0594	0,6776
3	0,0990	0,0996	0,8532
4	0,2538	0,2517	1,3567

^a: Valores críticos a 95% de confiança.

Os valores de t calculado não excederam os valores críticos, indicando que não houve diferença significativa entre os dois métodos em termos de precisão, tornando o método viável para a quantificação de chumbo em loções progressivas para cabelo com confiabilidade e repetibilidade.

4.4 Doping Esportivo

A seguir, serão apresentados os resultados obtidos utilizando-se os papéis de filtro qualitativo com barreiras hidrofóbicas para a quantificação de furosemida (utilizando reflectância, em 585nm e medida por scanner) e bumetanida (utilizando apenas medida por scanner) em amostras de urina natural.

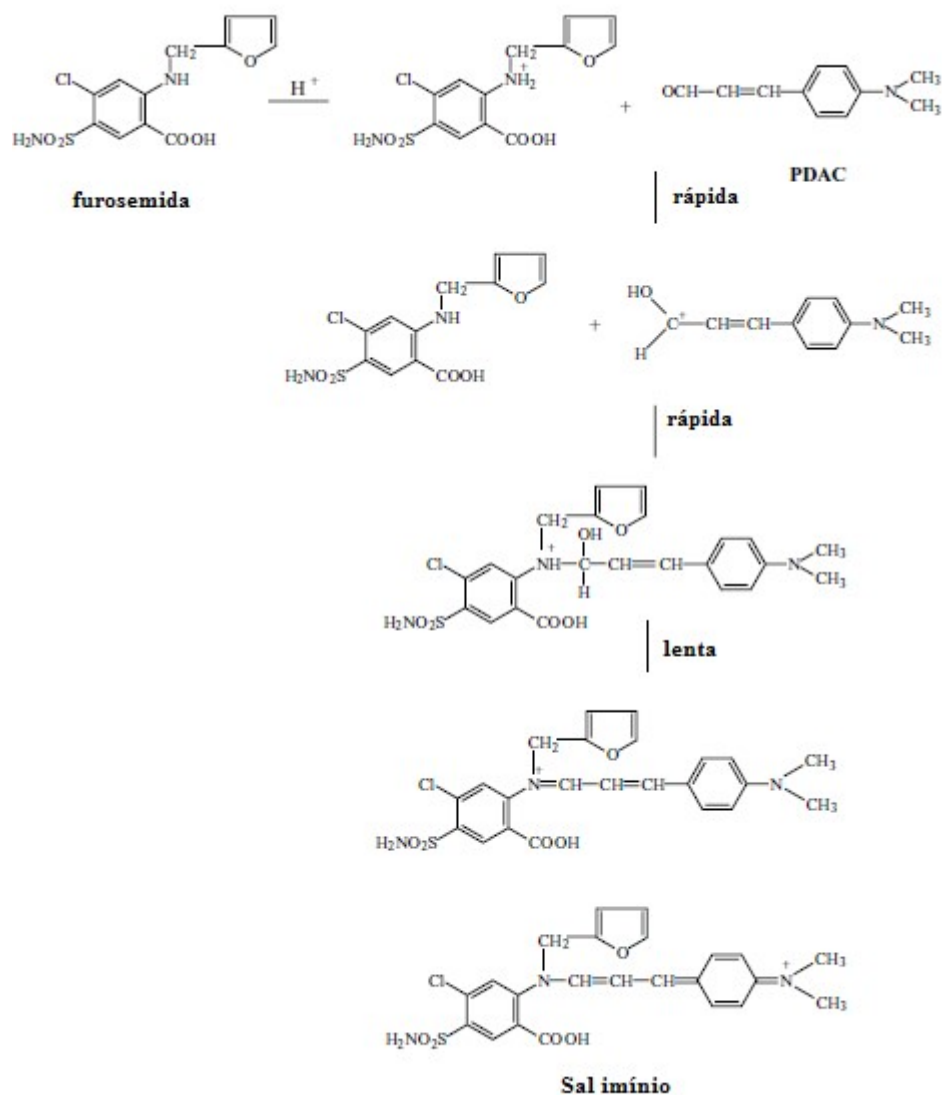
4.4.1. Doping por furosemida

Os papéis de filtro para todos os testes a seguir foram confeccionados a partir da impressão de uma área circular de 1,5cm de diâmetro e 0,75mm de espessura das bordas (antes do aquecimento) com uma impressora de cera e posterior aquecimento a 120°C por 2 minutos em estufa a fim de derreter a cera para que esta se impregne nos poros do papel de filtro, impedindo assim que os reagentes passem pela barreira hidrofóbica.

Após os testes iniciais a fim de selecionar o reagente cromogênico e os respectivos solventes (utilizando p-DAC 0,4% e HCl 6,3% em metanol), foi realizado um teste de ordem de adição a fim de se verificar se haveria alguma alteração (melhora ou piora) na mancha e no sinal obtido a partir da leitura de reflectância da mancha do composto formado. Para tal, foram adicionados no papel de filtro qualitativo com área delimitada 10 µL de cada reagente e do analito (FUR $6,05 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, em acetona), tomando-se o cuidado de esperar a adição anterior secar para não haver a passagem do reagente ou do analito pelas bordas da resina polimérica impressa no papel de filtro.

A reação que ocorre entre a furosemida e o p-DAC em meio ácido está representada na Reação 3, sendo que as ordens de adição testadas foram:

1. p-DAC + HCl + FUR;
2. p-DAC + FUR + HCl;
3. HCl + p-DAC + FUR;
4. HCl + p-DAC + FUR;
5. FUR + p-DAC + HCl;
6. FUR + HCl + p-DAC.



Reação 3. Representação da reação da furosemida com p-DAC em meio ácido.
 Fonte: adaptado de Gotardo¹⁰⁰.

Foi observado que, nos experimentos 2, 4 e 6, a mancha formada não ficou homogênea e que o experimento 3 apresentou um melhor sinal de reflectância comparado com o sinal dos demais experimentos com mancha homogênea. Portanto, os próximos testes apresentados foram realizados através da adição de 10 μL de HCl em metanol, 10 μL de p-DAC em metanol e 10 μL de furosemida em acetona, sempre esperando a secagem das adições anteriores.

4.4.1.1. Planejamento composto central para a quantificação de furosemida

Em seguida, a fim de se otimizar as concentrações dos reagentes envolvidos, foi realizado o Planejamento Composto Central utilizando as variáveis: concentração de p-DAC (%), num intervalo entre 0,2 e 0,8% e concentração de HCl (mol L^{-1}), num intervalo de 0,10 a 2,0 mol L^{-1} , analisadas em cinco níveis (-1,41; -1; 0; +1; +1,41). As variáveis estudadas em seus respectivos níveis e a matriz utilizadas estão apresentadas na Tabela 16. Tal matriz foi utilizada para a realização do experimento tanto para as medidas de reflectância quanto para as medidas por scanner, cujas imagens foram tratadas através do software ImageJ.

Tal planejamento é utilizado para estimar os efeitos de duas variáveis nas respectivas leituras. Quando há mais de duas variáveis, é utilizado antes do Planejamento Composto Central o Planejamento Fatorial, que selecionará as duas variáveis de maior significância para o método em questão para que possa então ser realizado o Planejamento Composto Central já que, de outro modo, com muitas variáveis, resultaria em mais que cinco níveis de análise, tornando-se necessária a realização de muitos testes, o que seria demorado, além de consumir muito mais reagentes. Ambos os planejamentos são importantes para desenvolver novas análises e métodos analíticos, pois determinam as condições ótimas com poucos testes.

Tabela 16. Matriz do Planejamento Composto Central para a determinação de furosemida.

Experimento	Fatores		Medidas	
	[p-DAC] (%) ^a	[HCl] (mol L^{-1}) ^a	Reflectância	Padrão RGB
1	0,29 (-)	0,38 (-)	0,153	0,089
2	0,71 (+)	0,38 (-)	0,199	0,097
3	0,29 (-)	1,72 (+)	0,279	0,150
4	0,71 (+)	1,72 (+)	0,398	0,255
5	0,20 ($-\sqrt{2}$)	1,05 (0)	0,189	0,090
6	0,80 ($+\sqrt{2}$)	1,05 (0)	0,348	0,223
7	0,50 (0)	0,10 ($-\sqrt{2}$)	0,041	0,017
8	0,50 (0)	2,00 ($+\sqrt{2}$)	0,348	0,204
9	0,50 (0)	1,05 (0)	0,286	0,175
10	0,50 (0)	1,05 (0)	0,289	0,178
11	0,50 (0)	1,05 (0)	0,297	0,188
12	0,50 (0)	1,05 (0)	0,294	0,183
13	0,50 (0)	1,05 (0)	0,298	0,185

^a: os valores codificados são mostrados entre parênteses.

A obtenção dos valores lidos no canal verde do histograma de cores, convertidos a reflectância, deu-se como apresentado no Esquema 3, em 3.1.4. As superfícies de resposta para ambos (reflectância e scanner) são apresentadas abaixo, na Figura 39.

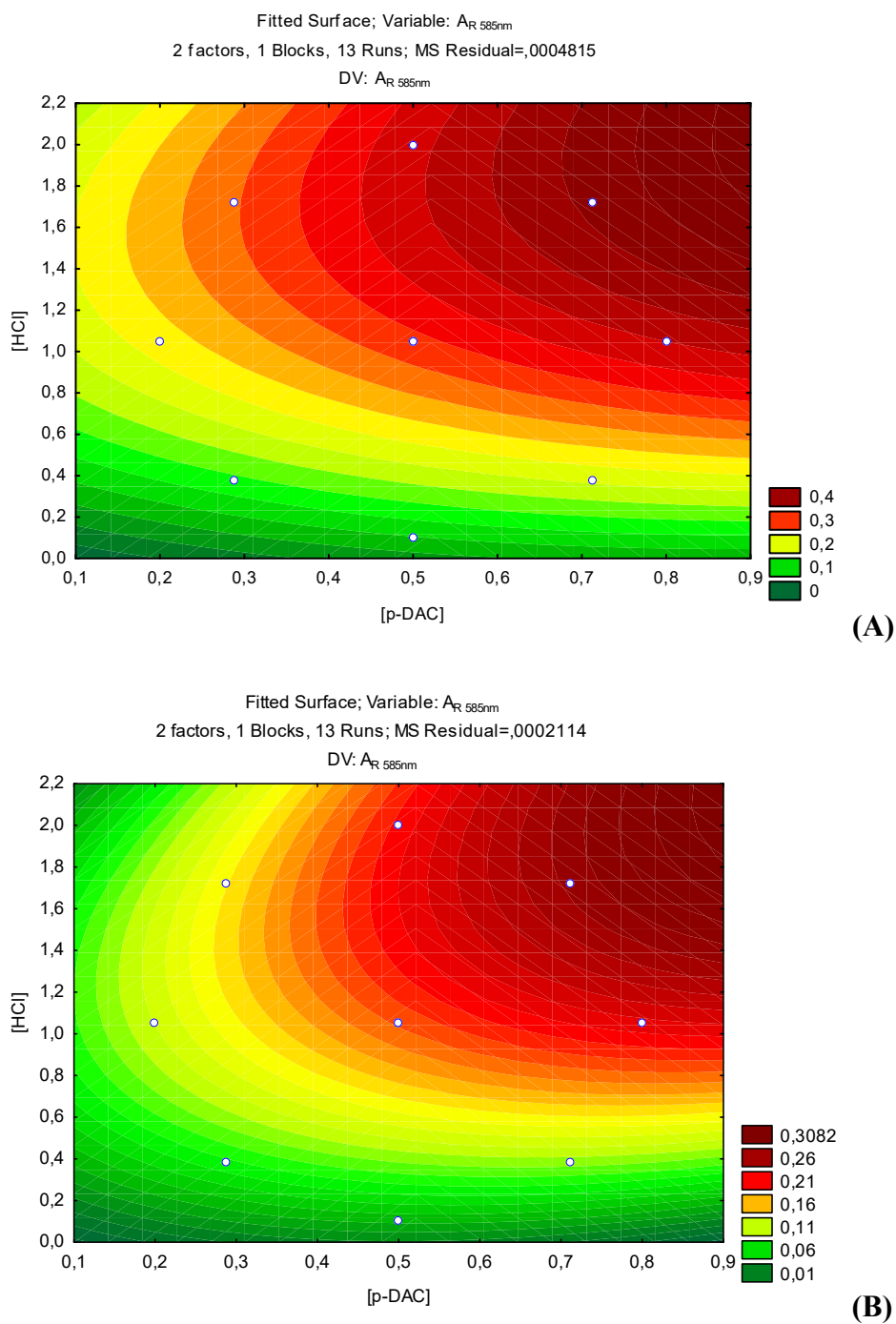


Figura 39. Superfície de resposta gerada para as medidas de (A) reflectância em 585 nm e por (B) imagem digital no canal verde em função da [p-DAC] (%) e [HCl] (mol L^{-1}) para a quantificação de furosemida.

As equações das curvas são representadas, respectivamente por:
 $z = -0,0392 + 0,2222x - 0,1269x^2 + 0,2760y - 0,0947y^2 + 0,1281xy$ e
 $z = -0,0409 + 0,2007x - 0,2019x^2 + 0,1542y - 0,0711y^2 + 0,1702xy$.

A análise estatística das superfícies geradas, feitas através do programa STATISTICA 7.0, mostrou que a melhor condição para este experimento pode ser alcançada usando uma concentração de p-DAC de 0,70% e uma concentração de HCl de $1,72 \text{ mol L}^{-1}$, ambas sendo um meio termo entre os pontos ótimos utilizando o método por reflectância e por imagem por scanner. Não foi possível obter uma curva com um ponto ótimo melhor definido pois os experimentos realizados pediam sempre uma maior concentração de p-DAC e de HCl, como é evidenciado pelas curvas apresentadas. Porém, acima desta concentração de p-DAC, a solubilização deste em metanol torna-se inviável além de que, com uma concentração muito grande de HCl, começa a haver a sua degradação ácida.

Uma região é considerada ótima porque, ao se considerar os fatores estudados no planejamento, apresenta um maior sinal, o que permite uma maior sensibilidade do método uma vez que, quanto maior o sinal, mais vezes o analito pode ser diluído e, conseqüentemente, menores concentrações deste podem ser quantificadas.

4.4.1.2. Estabilidade óptica do produto da reação entre furosemida e p-DAC

Em seguida, com o objetivo de avaliar a estabilidade óptica do produto colorido da reação de *spot test* em relação ao tempo entre a furosemida, p-DAC e HCl no papel de filtro, realizou-se um acompanhamento cinético do valor de A_R (por reflectância) a 585 nm a cada 5 minutos por 1 hora.

O resultado obtido no estudo de estabilidade óptica do produto formado demonstra que o produto atinge sua estabilidade após 20 minutos de adicionada a solução de furosemida, mostrando um sinal aproximadamente constante até, pelo menos, 1 hora, de acordo com a Figura 40.

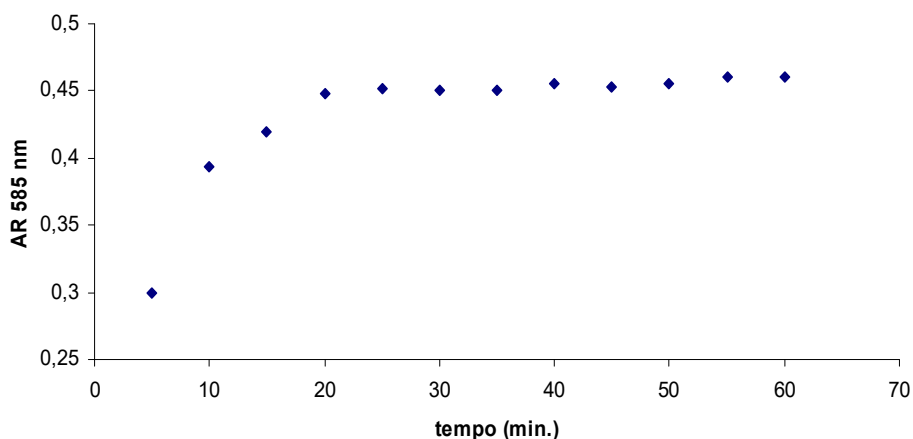
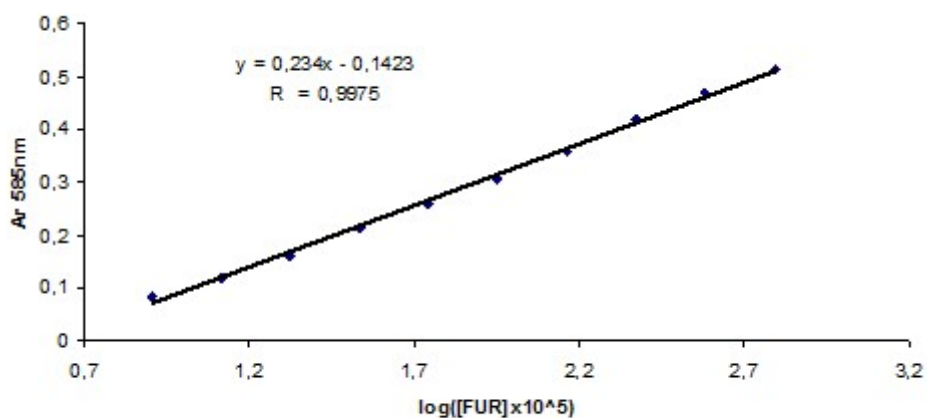


Figura 40. Estabilidade do produto da reação da furosemida em spot test entre 0 e 60 minutos. A concentração de furosemida utilizada foi de $4,32 \text{ mmol L}^{-1}$.

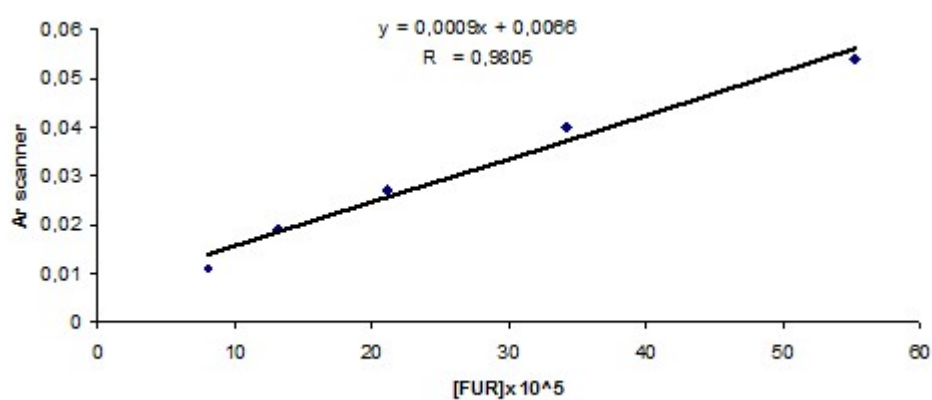
4.4.1.3. Linearidade, repetibilidade e curva analítica para a quantificação de furosemida

A curva analítica, numa faixa linear de $8,07 \times 10^{-5}$ a $6,22 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, para as medidas realizadas no espectrofotômetro e de $8,07 \times 10^{-5}$ a $5,53 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, para as medidas por histograma de cores foram construídas através das devidas diluições de uma solução estoque de furosemida. Um branco contendo $10 \mu\text{L}$ de p-DAC, $10 \mu\text{L}$ de HCl e $10 \mu\text{L}$ de acetona foi preparado para zerar o equipamento.

A Figura 41 apresenta as curvas analíticas construídas a partir dos resultados obtidos, sendo que a curva analítica para a análise através do espectrofotômetro encontra-se em função do logaritmo da concentração e a curva para análise através do histograma de cores, em função da concentração direta.



(A)



(B)

Figura 41. Curvas analíticas para a determinação de furosemida por (A) medidas da reflectância difusa no espectrofotômetro e (B) imagens escaneadas.

Em seguida, foram feitos ensaios a fim de verificar a repetibilidade do método dentro de um mesmo dia e entre dias diferentes. Para tal, foram feitos 3 experimentos repetindo dois pontos da curva analítica: $1,31 \times 10^{-4}$ e $5,53 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ a fim de se calcular o Desvio Padrão Relativo (RSD). Os resultados, apresentados na Tabela 17, mostram que as medidas foram bastante precisas e satisfatórias, mesmo considerando-se os desvios maiores encontrados para as medidas nas imagens por scanner, uma vez que foram utilizados equipamentos sem calibração do ponto de vista analítico, sujeitos a um erro maior.

Tabela 17. Desvios Padrões Relativos para as medidas Intradia e Interdia para a quantificação de furosemida

	Espectrofotômetro	Scanner
Intradia ($1,31 \times 10^{-4}$)	3,80%	4,22%
Intradia ($5,53 \times 10^{-4}$)	1,59%	6,20%
Interdia ($1,31 \times 10^{-4}$)	2,09%	4,97%
Interdia ($5,53 \times 10^{-4}$)	1,06%	5,91%

4.4.1.4. Limites de detecção e quantificação para o método de quantificação de furosemida

Com o objetivo de determinar os Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ), foram preparados 10 brancos, segundo a IUPAC¹⁹⁰, do mesmo modo descritos nos procedimentos acima realizando-se a leitura dos *spot tests* em 585 nm, cujos resultados estão expressos na Tabela 18.

Tabela 18. Limites de detecção e quantificação para a furosemida

	[FUR] mol L ⁻¹
LD reflectância	1,10x10 ⁻⁵
LQ reflectância	3,66x10 ⁻⁵
LD scanner	2,30x10 ⁻⁵
LQ scanner	7,66x10 ⁻⁵

4.4.1.5. Estudo de interferentes da matriz para a quantificação de furosemida

A urina sintética utilizada foi preparada segundo LAUBE, N.¹⁸⁶, exceto pelo uso da creatinina, que não fora utilizada, segundo recomendação de SEMAAN, F. S.¹⁸⁷, A composição está demonstrada na Tabela 19.

Tabela 19. Principais sais componentes da urina e suas interferências. A leitura da absorbância do spot test da solução de furosemida 3,45x10⁻⁴ mol L⁻¹, utilizada neste teste, é de 0,228.

Composição	Concentração (g L ⁻¹)	A _R médio	Interferência (%)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,0	0,229	0,4
NaCl	3,0	0,220	-3,6
Na ₂ SO ₄	2,0	0,232	1,8
KH ₂ PO ₄	1,0	0,225	-1,3
KCl	2,0	0,232	1,8
NH ₄ Cl	1,0	0,231	1,3
Uréia	25	0,127	-44,3

Tal estudo foi realizado na concentração apresentada na tabela e apenas a uréia apresentou interferência, devendo ser eliminada antes da etapa de quantificação. Optou-se por fazer a eliminação através de extração em fase sólida com coluna C₁₈ (*Bond Elut*) por ser um processo rápido, fácil e eficiente tanto para fins de pré-concentração quanto para eliminação de interferentes solúveis em água.

4.4.1.6. Adição de padrão e recuperação para quantificação de furosemida em amostras de urina natural

O condicionamento da coluna foi feito através da adição de 3mL de metanol seguido de 3mL de água deionizada. Em seguida, foram inseridos 2 mL de amostra. A lavagem foi feita com 3mL de água deionizada e a eluição com 2mL de acetona. Para as últimas concentrações para o procedimento feito através da leitura das imagens escaneadas, a eluição foi feita com 4 mL de acetona (diluição de 2x), uma vez que estes pontos ficariam fora da curva analítica. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Os resultados estão mostrados na Tabela 20.

Tabela 20. Adição de Padrão e Recuperação para a quantificação de furosemida em amostras de urina natural

Reflectância		
[FUR] adicionada	[FUR] encontrada	Recuperação (%)
-	2,55	-
1,50	4,16	107,3
3,00	5,75	106,7
4,50	7,23	104,0
6,00	9,15	110,0

Scanner		
[FUR] adicionada	[FUR] encontrada	Recuperação (%)
-	2,83	-
1,50	4,48	110,0
3,00	6,12	109,7
4,50	7,24	98,0
6,00	9,75	115,3

OBS: todos os valores estão expressos em 10^{-4} mol L⁻¹.

Os resultados expressos na tabela acima mostram que o método proposto possui uma boa recuperação para análises de urinas tratadas com extração em fase sólida com uma boa precisão, exatidão e confiabilidade mesmo ao se utilizar o procedimento por scanner, uma vez que não é uma técnica com calibração analítica.

4.4.1.7 Aplicação dos métodos propostos para a quantificação de furosemida em amostras de urina natural

A determinação de furosemida foi realizada em 3 amostras de urina natural com uma concentração de $2,18 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, referente a 90% de excreção de um comprimido de 20mg de furosemida, e o método de referência utilizado para comparação se baseia na reação de Fe^{3+} em meio de DTAB¹¹¹, onde a amostra passou pelo mesmo tratamento (extração em fase sólida) e, em seguida, foi reagida com o reagente cromogênico.

As amostras de urina natural são provenientes de:

- Amostra A: doador sadio do sexo masculino com idade de 23 anos;
- Amostra B: doador sadio do sexo masculino com idade de 58 anos;
- Amostra C: doadora sadia do sexo feminino com idade de 54 anos.

As determinações foram realizadas, em triplicata, em amostras de urina natural e o tratamento da amostra se deu como citado no procedimento 4.2.1.6. Os resultados estão mostrados na Tabela 21. O teste-t foi realizado a 95% de confiança.

Tabela 21. Validação do Método Proposto para a quantificação de furosemida em amostras de urina natural

Amostra	Método de Comparação	Reflectância Proposta	Teste t (4,303)	Scanner Proposto	Teste t (4,303)
A	2,04	2,13	2,18	2,45	4,24
B	2,04	2,00	1,94	1,90	3,28
C	2,01	2,06	0,908	2,22	3,71

OBS: todos os valores estão expressos em $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Os resultados expressos na tabela acima mostram que os métodos propostos podem ser aplicados para análises de amostras de urina com uma boa precisão e confiabilidade.

O método proposto possui maior sensibilidade que o método de comparação¹¹¹. Além disso, por utilizar barreiras hidrofóbicas, os reagentes ficam confinados em uma área delimitada, o que aumenta a homogeneidade da mancha. A utilização de imagem por scanner e leitura por histograma de cores diminui consideravelmente o custo do método ao utilizar equipamentos simples.

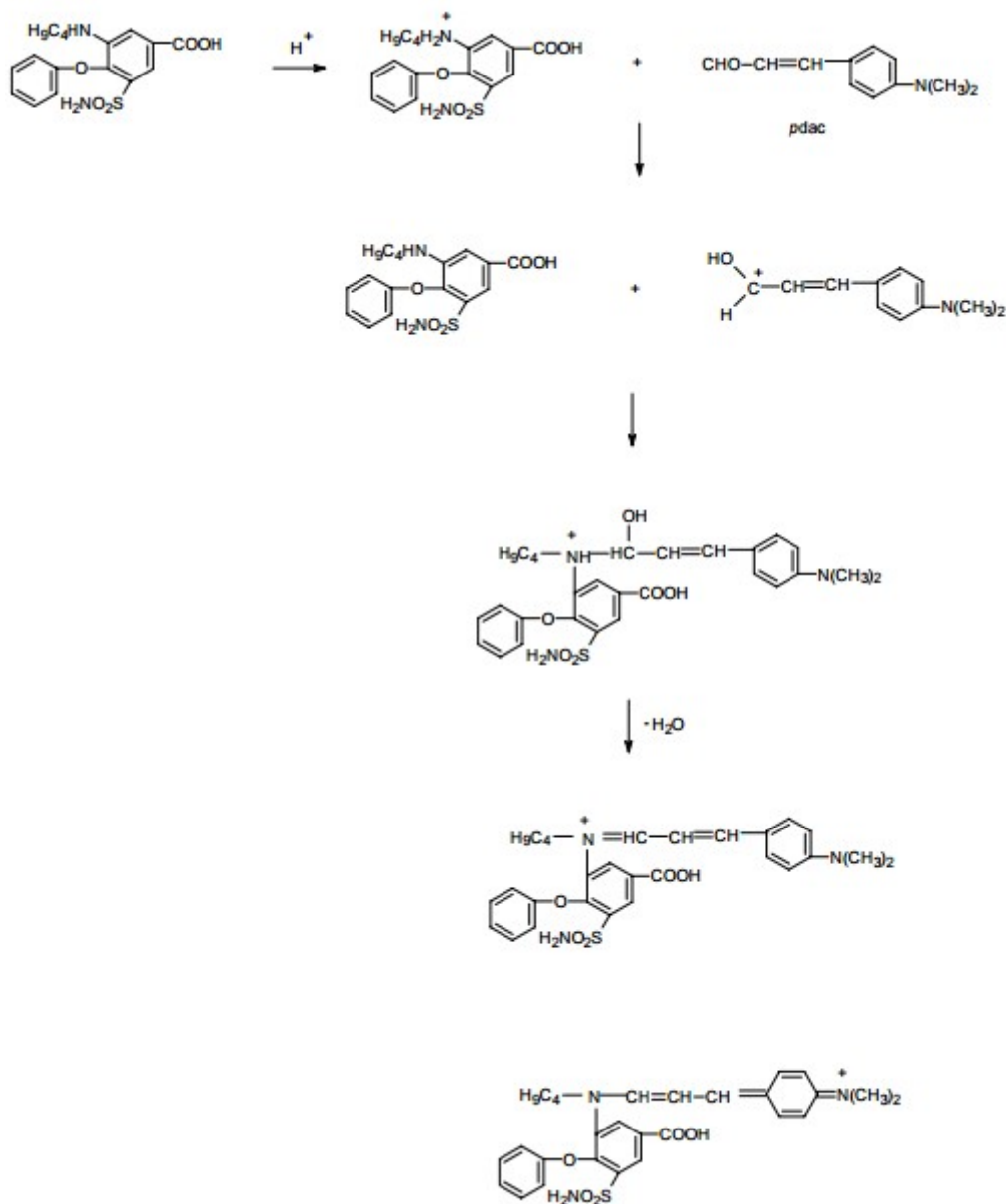
4.4.2. *Doping por bumetanida*

O método desenvolvido para detectar doping por bumetanida em urina seguiu os mesmos procedimentos utilizados para o desenvolvimento do método para detecção de furosemida em urina com a única diferença de que houve apenas o desenvolvimento utilizando-se scanner para gerar as imagens digitais e a leitura destas através do histograma de cores para o padrão RGB uma vez que já havia outro método descrito na literatura¹⁸⁸ utilizando-se os mesmos reagentes cromogênicos e leitura por espectrofotômetro, não havendo diferença significativa na sensibilidade ao se utilizar barreiras hidrofóbicas em relação ao anteriormente desenvolvido.

Após os testes iniciais de seleção do reagente cromogênico e os respectivos solventes, nos quais foram selecionados p-DAC e HCl em metanol, separadamente e bumetanida em metanol (resultando na Reação 4), foram realizados testes de ordem de adição. Para tal, foram adicionados no papel de filtro qualitativo com área delimitada 10 μL de cada reagente e do analito (BMT $1,37 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em metanol), tomando-se o cuidado de esperar a adição anterior secar para não haver a passagem do reagente ou do analito pelas bordas da resina polimérica impressa no papel de filtro.

As ordens de adição testadas foram:

1. p-DAC + HCl + BMT;
2. p-DAC + BMT + HCl;
3. HCl + p-DAC + BMT;
4. HCl + p-DAC + BMT;
5. BMT + p-DAC + HCl;
6. BMT + HCl + p-DAC.



Reação 4. Representação da reação da bumetanida com p-DAC em meio ácido.
 Fonte: adaptado de Pollo¹⁸⁸.

Foi observado que, nos experimentos 2, 5 e 6, a mancha formada não ficou homogênea e que o experimento 3 apresentou um melhor sinal de reflectância comparado com o sinal dos demais experimentos com mancha homogênea. Portanto, os próximos testes apresentados foram realizados através da adição de 10 μ L de HCl em metanol, 10 μ L de p-DAC em metanol e 10 μ L de bumetanida em metanol, sempre esperando a secagem das adições anteriores.

4.4.2.1. Planejamento composto central para a quantificação de bumetanida

Em seguida, a fim de se otimizar as concentrações dos reagentes envolvidos, foi realizado o Planejamento Composto Central utilizando as variáveis: concentração de p-DAC (%), num intervalo entre 0,2 e 0,6% e concentração de HCl (mol L^{-1}), num intervalo de 0,10 a 1,0 mol L^{-1} , analisadas em cinco níveis (-1,41; -1; 0; +1; +1,41). As variáveis estudadas em seus respectivos níveis e a matriz utilizadas estão apresentadas na Tabela 22. Todas as imagens foram tratadas através do software ImageJ.

Tabela 22. Matriz do Planejamento Composto Central para a determinação de bumetanida.

Experimento	Fatores		Medidas (Padrão RGB)
	[p-DAC] (%) ^a	[HCl] (mol L^{-1}) ^a	
1	0,26 (-)	0,32 (-)	0,089
2	0,54 (+)	0,23 (-)	0,097
3	0,26 (-)	0,87 (+)	0,150
4	0,54 (+)	0,87 (+)	0,255
5	0,20 ($-\sqrt{2}$)	0,55 (0)	0,090
6	0,60 ($+\sqrt{2}$)	0,55 (0)	0,223
7	0,40 (0)	0,10 ($-\sqrt{2}$)	0,017
8	0,40 (0)	1,00 ($+\sqrt{2}$)	0,204
9	0,40 (0)	0,55 (0)	0,175
10	0,40 (0)	0,55 (0)	0,178
11	0,40 (0)	0,55 (0)	0,188
12	0,40 (0)	0,55 (0)	0,183
13	0,40 (0)	0,55 (0)	0,185

^a: os valores codificados são mostrados entre parênteses.

A obtenção dos valores lidos no canal verde do histograma de cores, convertidos a reflectância, deu-se como apresentado no Esquema 3, em 3.1.4. A superfície de resposta está representada abaixo, na Figura 42:

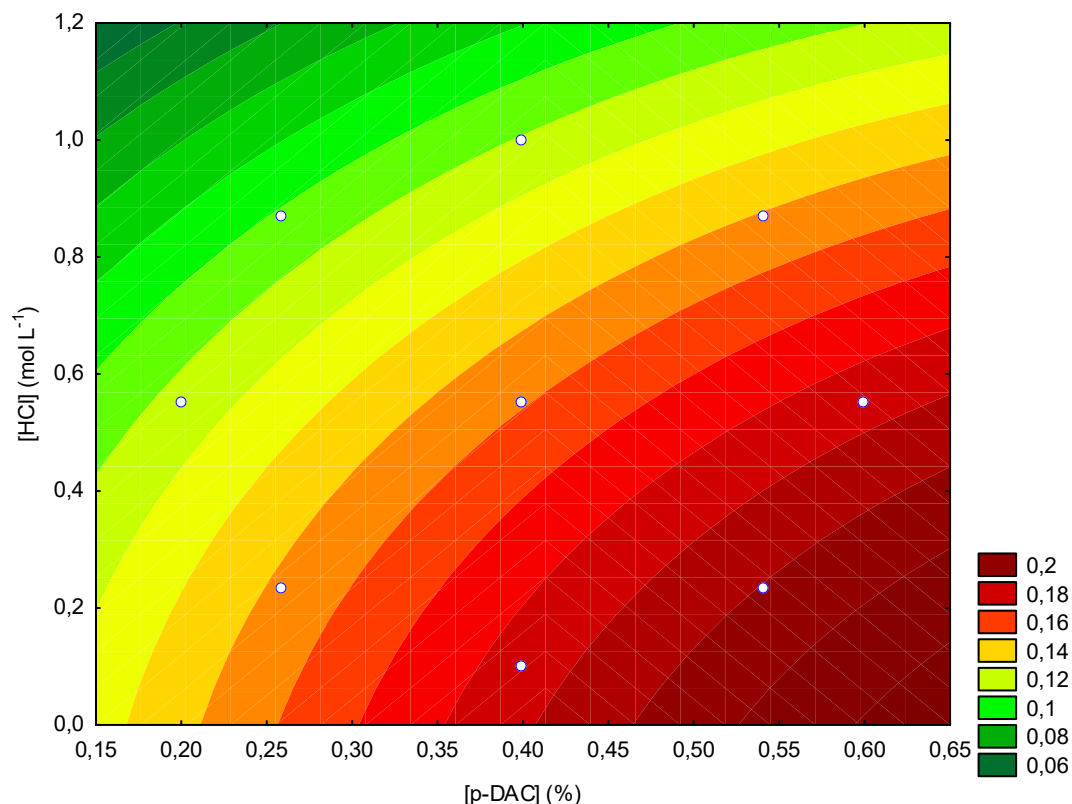


Figura 42. Superfície de resposta gerada para a medida do histograma de cores no canal verde para a imagem digital em função da [p-DAC] (%) e [HCl] (mol L^{-1}) para a quantificação de bumetanida.

A equação da curva é representada por : $z = 0,0872 + 0,2739x - 0,1131x^2 - 0,0155y - 0,0322y^2 - 0,05xy$.

A análise estatística da superfície gerada, feita através do programa STATISTICA 7.0, mostrou que a melhor condição para este experimento pode ser alcançada usando uma concentração de p-DAC de 0,60% e uma concentração de HCl de, aproximadamente, 0,26 mol L^{-1} . Não foram confeccionadas outras superfícies de resposta a fim de se obter um ponto ótimo melhor definido porque, pelo que se pode perceber para a detecção de bumetanida, quanto maior a concentração de p-DAC, menor a concentração de HCl necessária. Portanto, seria necessário fazer soluções com concentrações maiores de p-DAC, havendo problemas de solubilização e, em consequência das altas concentrações deste, a quantidade de ácido não seria suficiente para que a reação ocorresse, já que é pedido sempre uma diminuição da concentração de HCl para a quantificação.

4.4.2.2. Estabilidade óptica do produto da reação entre bumetanida e p-DAC.

Em seguida, com o objetivo de avaliar a estabilidade óptica do produto colorido da reação de *spot test* em relação ao tempo entre a bumetanida, p-DAC e HCl no papel de filtro, realizou-se um acompanhamento cinético do valor de A_R (por reflectância) a 585 nm a cada 5 minutos por 1 hora.

O resultado obtido no estudo de estabilidade óptica do produto formado demonstra que o produto já é estável logo após 5 minutos de adicionada a solução de bumetanida, mostrando um sinal constante até, pelo menos, 1 hora, de acordo com a Figura 43.

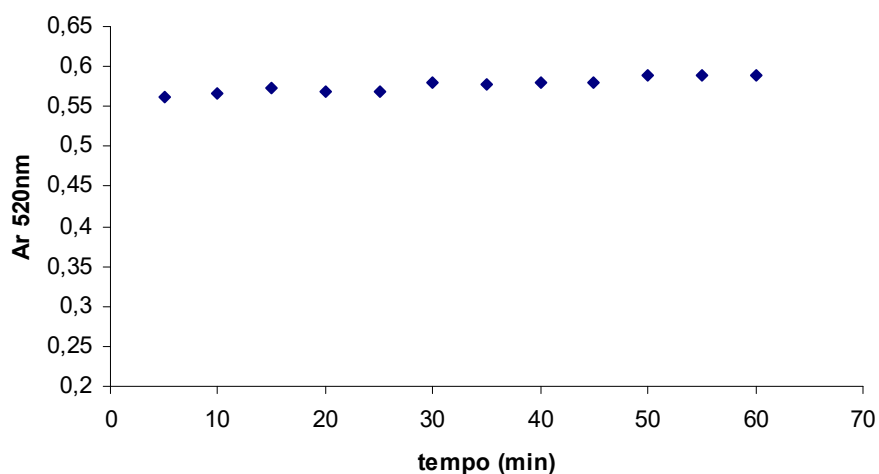


Figura 43. Estabilidade do produto da reação da bumetanida em spot test entre 0 e 60 minutos. A concentração de bumetanida utilizada foi de $1,37 \text{ mmol L}^{-1}$.

4.4.2.3. Linearidade, repetibilidade e curva analítica para a quantificação de bumetanida

A curva analítica apresenta linearidade numa faixa de $6,90 \times 10^{-5}$ a $1,37 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, sendo construída através das devidas diluições de uma solução estoque de bumetanida. Um branco contendo $10 \text{ }\mu\text{L}$ de p-DAC, $10 \text{ }\mu\text{L}$ de HCl e $10 \text{ }\mu\text{L}$ de metanol foi preparado para zerar o equipamento.

A Figura 44 apresenta a curva analítica construída a partir dos resultados obtidos, sendo esta em função da concentração direta.

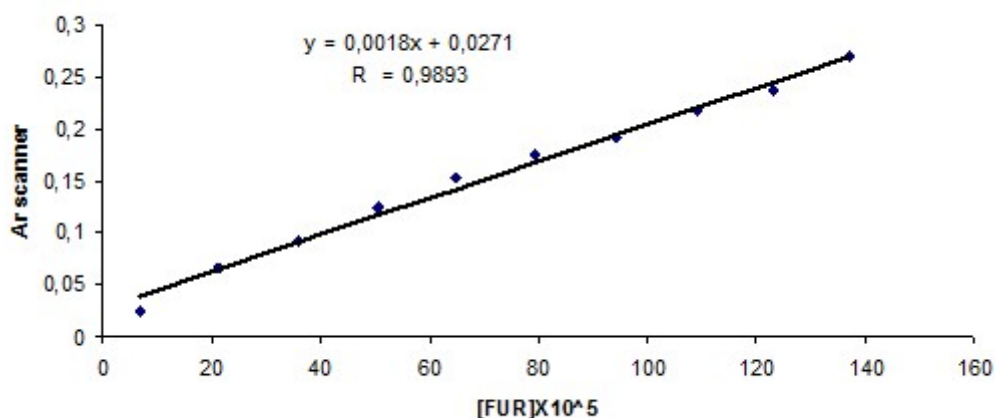


Figura 44. Curva analítica para a determinação de bumetanida por histograma de cores.

Em seguida, foram feitos ensaios a fim de verificar a repetibilidade do método dentro de um mesmo dia e entre dias diferentes. Para tal, foram feitos 3 experimentos repetindo dois pontos da curva analítica: $2,14 \times 10^{-4}$ e $1,09 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ a fim de se calcular o Desvio Padrão Relativo (RSD). Os resultados, apresentados na Tabela 23, mostram que as medidas foram satisfatórias, uma vez que foram utilizados equipamentos sem calibração do ponto de vista analítico, sujeitos a um erro maior.

Tabela 23. Desvios Padrões Relativos para as medidas Intradia e Interdia para a quantificação de bumetanida

	RSD Scanner
Intradia ($2,14 \times 10^{-4}$)	7,92%
Intradia ($1,09 \times 10^{-3}$)	5,40%
Interdia ($2,14 \times 10^{-4}$)	9,12%
Interdia ($1,09 \times 10^{-3}$)	3,93%

4.4.2.4. Limites de detecção e quantificação para o método de quantificação de bumetanida

Com o objetivo de determinar os Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ), foram preparados 10 brancos, como descrito no procedimento para a furosemda, em 4.2.1.4., com a única diferença de a leitura ser feita apenas através do histograma de cores, no canal verde. Os resultados estão mostrados na Tabela 24.

Tabela 24. Limites de detecção e quantificação para a quantificação de bumetanida

	[FUR] mol.L ⁻¹
LD scanner	$4,18 \times 10^{-5}$
LQ scanner	$13,9 \times 10^{-5}$

4.4.2.5. Adição de padrão e recuperação para a quantificação de bumetanida em urina natural

Uma vez que o reagente cromogênico utilizado era o mesmo para o método desenvolvido para a furosemida e, considerando-se que a uréia é interferente por reagir com o p-DAC, formando um produto colorido, optou-se por utilizar também a extração em fase sólida para retirar os possíveis interferentes da matriz.

O condicionamento da coluna foi feito através da adição de 3mL de metanol seguido de 3mL de água deionizada. Em seguida, foram inseridos 2 mL de amostra. A lavagem foi feita com 3mL de água deionizada e a eluição com 2mL de metanol. Para as últimas concentrações para o procedimento feito através da leitura das imagens escaneadas, a eluição foi feita com 4 mL de acetona (diluição de 2x), uma vez que estes pontos ficariam fora da curva analítica.

Os resultados estão mostrados na Tabela 25 e foram todos realizados em triplicata.

Tabela 25. Adição de Padrão e Recuperação para a quantificação de bumetanida em amostras de urina natural.

Scanner		
[BMT] adicionada	[BMT] encontrada	Recuperação (%)
-	37,5	-
20	56,1	93
40	76,9	99
60	98,7	102
80	116,7	99

OBS: todos os valores estão expressos em 10^{-4} mol L⁻¹.

Os resultados expressos na tabela acima mostram que o método proposto possui uma ótima recuperação para análises de urinas tratadas com extração em fase sólida com uma boa precisão, exatidão e confiabilidade.

4.4.2.6 Aplicação do método proposto para a quantificação de bumetanida em amostras de urina naturais e sintética

A determinação de bumetanida foi realizada em 3 amostras de urina natural e uma amostra de urina sintética com uma concentração de $6,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e o método de

referência utilizado para comparação se baseia na detecção por HPLC-UV, de acordo com ZHANG¹³⁴.

A preparação da amostra para o método de comparação foi feita exatamente igual que para o método proposto até a parte da eluição da bumetanida na extração em fase sólida, como já explicado anteriormente. Após este passo, foi adicionada na solução eluída água deionizada suficiente para se obter uma proporção metanol/água deionizada 3:7. Esta solução foi transferida para balão volumétrico de 10mL e o menisco foi completado com um solvente metanol/água 3:7, preparado anteriormente.

A solução de purgamento consistiu em um tampão fosfato 50mmol L⁻¹ pH 3,0 e acetonitrila. A coluna utilizada foi uma de C₁₈ (150 mm comprimento x 4,6 mm diâmetro interno, 5µm de tamanho de partícula) conectada a uma coluna guarda de C₁₈ (20mm comprimento x 4 mm diâmetro interno, 5µm de tamanho de partícula). O programa de gradiente de eluição ótima e da taxa de fluxo da fase móvel foi variada de 70:30 a 30:70. Todas as soluções foram filtradas em um filtro de membrana 0,45µm antes do uso. A vazão da fase móvel foi 1,0 mL min⁻¹ e o comprimento de onda de detecção foi de 214 nm. O volume de injeção foi de 10 µL. A temperatura da coluna foi mantida a 27±1 °C.

As amostras de urina são provenientes de:

- Amostra A: urina sintética;
- Amostra B: doadora sadia do sexo feminino com idade de 26 anos;
- Amostra C: doador sadio do sexo masculino com idade de 22 anos;
- Amostra D: doador sadio do sexo masculino com idade de 27 anos.

Os resultados estão mostrados na Tabela 26, todos realizados em triplicata. O teste-t foi realizado a 95% de confiança.

Tabela 26. Validação do Método Proposto para quantificação de bumetanida em amostras de urina natural e sintética.

Amostra	Método de Comparação ¹³⁴	Scanner Proposto	Teste t (4,303)
Sintética	5,76	6,03	1,263
A	5,30	5,76	2,672
B	5,49	5,32	1,125
C	5,56	6,44	4,048

OBS: todos os valores estão expressos em 10⁻⁴ mol L⁻¹.

Os resultados expressos na tabela mostram que os métodos propostos podem ser aplicados para análises de amostras de urina com uma boa precisão e confiabilidade.

CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou um estudo sobre o desenvolvimento de novos métodos e procedimentos limpos, simples, baratos e portáteis para a análise e coleta para fins forenses.

No âmbito das impressões digitais com a coleta sendo feita através de membranas de celulose bacteriana, a utilização de óxido de zinco não foi viável. Porém, a ninidrina e o nitrato de prata atuaram como agentes de coleta razoáveis. Em relação ao nitrato de prata, este pode ser utilizado para coleta direta das impressões digitais de um indivíduo, não havendo a necessidade de utilização de cola para isso. Porém, ao ser utilizada para a coleta de impressões digitais em superfícies lisas, a utilização de cola lavável branca diluída na solução de impregnação de nitrato de prata melhora consideravelmente a resolução das linhas, podendo estas ser fotografadas diretamente no local ou serem levadas para arquivamento em local escuro. O software gratuito ImageJ mostrou ser bem eficiente para o tratamento das imagens obtidas.

Para a análise de doping esportivo foram desenvolvidos novos métodos para a análise de furosemida (utilizando *spot test* em papel de filtro qualitativo com área delimitada combinado com espectroscopia de reflectância difusa e histograma de cores) e de bumetanida (por histograma de cores). Tais métodos mostraram ser viáveis para a determinação qualitativa e quantitativa destes analitos na matriz estudada. A utilização de papel de filtro qualitativo com barreiras hidrofóbicas mostrou ser bastante eficiente, podendo haver o aumento da sensibilidade da reação além de ajudar na formação de uma mancha mais homogênea. A utilização de scanner a fim de digitalizar as imagens para serem tratadas no software ImageJ, através do histograma de cores mostrou também ser bastante efetiva, eliminando a utilização de equipamentos caros, como o espectrofotômetro, sendo uma alternativa barata para laboratórios com menores condições financeiras.

Para a coleta de chumbo em resíduos de disparo de armas de fogo, a utilização de membranas de celulose bacteriana foi bem eficiente, principalmente se o rodizonato de sódio em meio tamponado para a identificação de chumbo for impregnado na membrana antes da coleta. Tal procedimento permite que as regiões de interesse sejam identificadas na membrana antes desta analisada no microscópio eletrônico de varredura, diminuindo o tempo de procura das partículas. Além disso, ainda que o reagente cromogênico não

tenha uma boa estabilidade na membrana, devendo esta ser utilizada no mesmo dia, o produto formado após a reação com os resíduos de disparo é estável por, pelo menos, 6 meses, podendo esta ser estocada em geladeira e livre de iluminação para servir de contra-prova. Além disso, o método desenvolvido para a previsão de tempo de disparo mostrou ser bem promissor, mas ainda há a necessidade da construção de curvas analíticas que se aproximem das diversas realidades e situações nas quais uma arma de fogo pode ser disparada.

Portanto, considerando-se a simplicidade, rapidez, baixo custo, baixo consumo, eficiência, repetibilidade e sensibilidade, os métodos desenvolvidos podem ser considerados em consonância com a química verde e cumpriram o seu objetivo de tornar mais fácil os métodos analíticos e de coletas do âmbito forense estudados, oferecendo vantagens sobre os utilizados atualmente.

REFERÊNCIAS

- 1 MELSON, K. E. President's editorial: the journey to justice. **Journal of Forensic Sciences**, v. 48, n. 705, p. 5-7, 2003.
- 2 GERAQUE, E. Ciência que desvenda crimes. **Agência FAPESP**, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.agencia.fapesp.br/5588>>. Acesso em: 30 out. 2015.
- 3 BOHAN, T. L. Strengthening forensic science: a way station on the journey to justice. **Journal of Forensic Sciences**, v. 55, n. 1, p. 5-7, 2010.
- 4 TURILLAZZI, E. et al. Analytical and quantitative concentration of gunshot residues (Pb, Sb, Ba) to estimate entrance hole and shooting-distance using confocal laser microscopy and inductively coupled plasma atomic emission spectrometer analysis: an experimental study. **Forensic Science International**, v. 231, p. 142-149, 2013.
- 5 STUMVOLL, V. P. **Criminalística**. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 1999.
- 6 FERREYRO, M. F. **Balística manual**. Buenos Aires: BdeF, 2007.
- 7 FIGINI, A. R. L. **Identificação humana**. 2. ed. Campinas: Millennium, 2003.
- 8 DOREA, L. E. **Fenômenos cadavéricos & testes simples para cronotanatognose**. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 1995.
- 9 SULLIVAN, D. M. Forensic chemistry. In: CHEMISTRY explained: foundations and applications. **Forensic Chemistry**. Disponível em: <<http://www.chemistryexplained.com/Fe-Ge/Forensic-Chemistry.html>>. Acesso em: 05 nov. 2015.
- 10 FARIAS, R. F. **Introdução à química forense**. 3. ed. Campinas: Átomo, 2010.
- 11 INTRODUÇÃO à higiene ocupacional. São Paulo: FUNDACENTRO, 2004.
- 12 JOULLIÉ, M. M.; THOMPSON, T. R.; NEMEROFF, N. H. Ninhydrin and ninhydrin analogs. Syntheses and applications. **Tetrahedron**, v. 47, n. 42, p. 8791-8830, 1991.
- 13 ODEN, S.; VON HOFSTEN, B. Detection of fingerprints by the ninhydrin reaction. **Nature**, v. 173, n. 4401, p. 449-450, 1954.
- 14 HO, M. H. **Analytical methods in forensic chemistry**. New York: Horwood, 1990.
- 15 VANINI, G. et al. Forensic ballistics by inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy: quantification of gunshot residues and prediction of the number of shots using different firearms. **Microchemical Journal**, v. 118, p. 19-25, 2015.
- 16 TANGTAWEE, N. et al. ICP and bullet damage analysis on sheet-metal and wooden boards. **Chemical Science Transactions**, v. 4, n. 3, p. 668-671, 2015.

- 17 ABREGO, Z. et al. A novel method for the identification of inorganic and organic gunshot residues particles of lead-free ammunitions from the hands of shooters using scanning laser ablation-ICPMS and Raman micro-spectroscopy. **Analyst**, v. 139, n. 23, p. 6232-6241, 2014.
- 18 LOPEZ-LOPEZ, M. et al. Fast analysis of complete macroscopic gunshot residues on substrates using Raman imaging. **Applied Spectroscopy**, v. 69, n. 7, p. 889-893, 2015.
- 19 BETONJIC-SEHIC, E. et al. Forensic application of near-infrared spectroscopy: aging of bloodstains. **Spectroscopy**, v. 24, n. 2, p. 44-48, 2009.
- 20 PAYNE, G. et al. Visible and near-infrared chemical imaging methods for the analysis of selected forensic samples. **Talanta**, v. 67, n. 2, p. 334-344, 2005.
- 21 MASSONNET, G.; STOECKLEIN, W. Identification of organic pigments in coatings: applications to red automotive topcoats. Part III: Raman spectroscopy (NIRFT-Raman). **Science & Justice**, v. 39, n. 3, p. 181-187, 1999.
- 22 JAISWAL, A. K. et al. Determination of barium in forensic samples by atomic absorption spectrophotometer. **Journal of Forensic Medicine and Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 6-8, 2006.
- 23 AKSOY, C. et al. determination of antimony in gunshot residues using GFAAS and SEM/EDX. **Atomic Spectroscopy**, v. 34, n. 5, p. 170-174, 2013.
- 24 LUZANOVA, I. S. et al. Determination of thallium content in human urine by atomic absorption spectroscopy after acute poisoning. **Sudebno-Meditsinskaya Ekspertiza**, v. 51, n. 5, p. 41-43, 2008.
- 25 LECH, T.; DUDEK-ADAMSKA, D. Optimization and validation of a procedure for the determination of total chromium in postmortem materials by ETAAS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 97-101, 2013.
- 26 FRENCH, H. E. et al. Graphite furnace atomic absorption elemental analysis of ecstasy tablets. **Forensic Science International**, v. 231, n. 1/3, p. 88-91, 2013.
- 27 PIETSCH, J. et al. Alternative method for forensic determination of lysergic acid diethylamide and related compounds in body fluids by liquid-liquid extraction and HPLC with fluorescence detection. **Chromatographia**, v. 60, n. 1/2, p. 89-92, 2004.
- 28 LAUSSMANN, T.; MEIER-GIEBING, S. Forensic analysis of hallucinogenic mushrooms and khat (*Catha edulis FORSK*) using cation-exchange liquid chromatography. **Forensic Science International**, v. 195, p. 160-164, 2010.
- 29 ADAMOWICZ, P.; KALA, M. Simple HPLC method for the identification of the most commonly used rodenticides in Poland. **Problems of Forensic Sciences**, v. 64, p. 373-381, 2005.

- 30 MEISER, H. Detection of anticoagulant residues by a new HPLC method in specimens of poisoned animals and a poison control case study. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, n. 6, p. 556-563, 2005.
- 31 CLYDE, C. et al. Application of mixed-mode ultra high performance liquid chromatography to forensic drug analysis. **Analytical Methods**, v. 7, p. 9763-9772, 2015.
- 32 KUWAYAMA, K. et al. Micro-pulverized extraction pretreatment for highly sensitive analysis of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in hair by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 29, n. 22, p. 2158-2166, 2015.
- 33 HELFER, A. G. et al. Orbitrap technology for comprehensive metabolite-based liquid chromatographic-high resolution-tandem mass spectrometric urine drug screening-exemplified for cardiovascular drugs. **Analytica Chimica Acta**, v. 891, p. 221-233, 2015.
- 34 MORENO-GONZALEZ, D. et al. Determination of carbamates in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a new clean-up based on zirconia for QueChERS methodology. **Talanta**, v. 128, p. 299-304, 2014.
- 35 FISHBEIN, L.; ZIELINSKI, W. L. Chromatography of carbamates. **Chromatographic Reviews**, v. 9, n. 1, p. 37-101, 1967.
- 36 FISHBEIN, L.; ZIELINSKI, W. L. Structural transformations during the gas chromatography of carbamates. **Chromatographia**, v. 2, p. 38-56, 1969.
- 37 FISHBEIN, L.; ZIELINSKI, W. L.; THOMAS, R. O. Gas chromatography of carbamates. X. N-(p-tolylsulfonyl) derivatives. **Journal of Chromatography**, v. 30, n. 2, p. 596-599, 1967.
- 38 GOERGENS, C. et al. "Dilute-and-inject" multi-target screening assay for highly polar doping agents using hydrophilic interaction liquid chromatography high resolution/high accuracy mass spectrometry for sports drug testing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 18, p. 5365-5379, 2015.
- 39 DOMÍNGUES-ROMERO, J. C. et al. Screening confirmation capabilities of liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry for the determination of 200 multiclass sport drugs in urine. **Talanta**, v. 134, p. 74-88, 2015.
- 40 NOVAKOVA, L. et al. Ultra high performance supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for screening of doping agents. II: analysis of biological samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, p. 647-659, 2015.
- 41 CUERVO, D. et al. An automated sample preparation for detection of 72 doping-related substances. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. 6, p. 516-527, 2014.
- 42 KELLY, B. N. et al. A population study of urine glycerol concentrations in elite athletes competing in North America. **Drug Testing and Analysis**, v. 5, n. 11/12, p. 890-895, 2013.

43 YOUNG, R. Evolution of the world anti-doping code. In: ACS NATIONAL MEETING & EXPOSITION, 249th, 2015, Denver. **Abstracts...** Washington, DC: American Chemical Society, 2015. p. CHAL-7.

44 BROZEK-MUCHA, Z. Comparison of cartridge case and airborne GSR—a study of the elemental composition and morphology by means of SEM-EDX. **X-Ray Spectrometry**, v. 36, p. 398-407, 2007.

45 BROZEK-MUCHA, Z.; JANKOWICZ, A. Evaluation of the possibility of differentiation between various types of ammunitions by means of GSR examination with SEM-EDX method. **Forensic Science International**, v. 123, p. 39-47, 2001.

46 CASTRO, K. et al. Are these liquids explosive? Forensic analysis of confiscated indoor fireworks. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 3065-3071, 2011.

47 RAMOS, D.; ZADORA, G. Information-theoretical feature selection using data obtained by scanning electron microscopy coupled with and energy dispersive X-ray spectrometer for the classification of glass traces. **Analytica Chimica Acta**, v. 705, n. 1/2, p. 207-217, 2011.

48 GEORGE, C. R. Controlled study of burned bones using scanning electron microscopy from forensic contexts. In: ACS NATIONAL MEETING & EXPOSITION, 241st, 2011, Anaheim. **Abstracts...** Washington, DC: ACS, 2011. p. CARB-113.

49 DUARTE, G. L. **O papel da ciência forense na investigação de crimes de homicídio**. 2009. 114 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses) - Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2009.

50 KUMAR, M. K. et al. Microscopic and spectrometric characterizations of trace evidence materials present on the discharged lead bullet and shot: a case report. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 11-18, 2011.

51 TOCCHETTO, D. **Balística forense: aspectos técnicos e judiciários**. 6. ed. Campinas: Millennium, 2011.

52 CHEMELLO, E. Ciência forense: balística. **Química Virtual**, fev. 2007. Disponível em: <http://www.quimica.net/emiliano/artigos/2007fev_forense3.pdf>. Acesso em: 07 nov. 2015.

53 HU, S. et al. Trajectory reconstruction through analysis of trace evidence in bullet-intermediate target interaction by SEM/EDX. **Journal of Forensic Sciences**. v. 54, n. 6, p. 1349-1352, 2009.

54 GENGE, N. E. **The forensic casebook: the science of crime scene investigation**. New York: Ballantine Books, 2002.

55 MAIA, F. S. **Criminalística geral**. Fortaleza, 2012. [Apostila online]. Disponível em: <http://www.mpce.mp.br/esmp/apresentacoes/I_Curso_de_Investigacao_Criminal_Homic%3%ADdio/02_Criminalistica_Geral_29_11_2012.pdf>. Acesso em: 07 nov. 2015.

- 56 RABELLO, E. **Curso de criminalística**. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 1996.
- 57 REID, L. et al. Stubs versus swabs? a comparison of gunshot residue collection techniques. **Journal of Forensic Sciences**, v. 55, n. 3, p. 753-756, 2010.
- 58 PINTO, A. L. et al. Análise de resíduos de tiro oriundos de munição sem chumbo por MEV/EDS. **Perícia Federal**, v. 4, n. 22, p. 18-19, 2005. Edição especial.
- 59 CHEMELLO, E. Ciência forense: impressões digitais. **Química Virtual**, dez. 2006. Disponível em: <http://www.quimica.net/emiliano/artigos/2006dez_forense1.pdf>. Acesso em: 07 nov. 2015.
- 60 MENZEL, E. R. Recent advances in photoluminescence detection of fingerprints. **The Scientific World**, v. 1, p. 498-509, 2001.
- 61 PAPILOSCOPIA: pontos característicos. Disponível em: <<http://www.papiloscopia.com.br/pontos.html>>. Acesso em: 07 nov. 2015.
- 62 COSTA, S. M. F. **Classificação e verificação de impressões digitais**. 2001. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- 63 MOENSSENS, A. A. **Fingerprint techniques**. New York: Chilton, 1971.
- 64 LEE, H. C.; GAENSSLEN, R. W. **Advances in fingerprint technology**. New York: Elsevier, 1991.
- 65 DALRYMPLE, B. E. et al. Unherent fingerprint luminescence: detection by laser. **Journal of Forensic Sciences**, v. 22, p. 106-115, 1977.
- 66 CHOI, M. J. et al. An evaluation of nanostructured zinc oxide as a fluorescent powder for fingerprint detection. **Journal of Materials Sciences**, v. 43, p. 732-737, 2008.
- 67 ARAÚJO, T. T. Ciência contra o crime. **Superinteressante**, n. 257, p. 70-79, out. 2008.
- 68 WORLD ANTI-DOPING AGENCY. **The prohibited list**. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/prohibited-list>>. Acesso em: 09 nov. 2015.
- 69 WORLD ANTI-DOPING AGENCY. **World anti-doping code**. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/the-code>>. Acesso em: 01 nov. 2015.
- 70 ARTIOLO, G. G. et al. Terapia gênica, doping genético e esporte: fundamentação e implicações para o futuro. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, p. 349-354, 2007.

- 71 KOLMONEN, M. et al. A general screening method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, p. 94-102, 2007.
- 72 COMITÊ OLÍMPICO BRASILEIRO. **Controle antidoping no Brasil**. Disponível em: <<http://www.cob.org.br/pt/cob/documentos/docs-antidoping/>>. Acesso em: 09 nov. 2015.
- 73 CARPENTER, P. C. Performance-enhancing drugs in sport. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 36, p. 481-495, 2007.
- 74 SJÖQVIST, F.; GARLE, M.; RANE, A. Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. **The Lancet**, v. 371, p. 1872-1882, 2008.
- 75 PARR, M. K. et al. Sports-related issues and biochemistry of natural and synthetic anabolic substances. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**. v. 39, n. 1, p. 45-57, 2010.
- 76 TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN. **Substâncias e métodos**. Disponível em: <<http://www.doping-prevention.de/pt/substances-and-methods/>>. Acesso em: 09 nov. 2015.
- 77 DOPING: a química vai ao Pan. **Química Hoje**, n. 7, p. 14-16, jan.-mar. 2007.
- 78 KINTZ, P. Detection of doping agents in human hair. In: _____. (Ed.). **Analytical and practical aspects of drug testing in hair**. Boca Raton: Taylor and Francis, 2006. Chap. 11, p. 241-254.
- 79 THEVIS, M. et al. Current role of LC-MS(/MS) in doping control. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 2, p. 405-420, 2011.
- 80 THEVIS, M. et al. Ultrahigh pressure liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in human sports drug testing: possibilities and limitations. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 38-50, 2013.
- 81 OJANPERA, I. et al. Current use of high-resolution mass spectrometry in drug screening relevant to clinical and forensic toxicology and doping control. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 5, p. 1203-1220, 2012.
- 82 HINTIKKA, L. et al. Feasibility of gas chromatography-microchip atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry in analysis of anabolic steroids. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 52, p. 8290-8297, 2010.
- 83 MUSENGA, A. et al. Use of ultra-high pressure liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for fast screening in high throughput doping control. **Journal of Chromatography A**, v. 1288, p. 82-95, 2013.

- 84 GIRON, A. J. et al. Development and validation of an open screening method for diuretics, stimulants and selected compounds in human urine by UHPLC-HRMS for doping control. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, p. 137-146, 2012.
- 85 HEFNAWY, M. M; ABOUL-ENEIN, H. Y. Fast high-performance liquid chromatographic analysis of mianserin and its metabolites in human plasma using monolithic silica column and solid phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 504, p. 291-297, 2004.
- 86 ZHOU, Q. Chiral reversed phase high-performance liquid chromatography for determining propranolol enantiomers in transgenic Chinese hamster CHL cell lines expressing human cytochrome P450. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 54, p. 369-376, 2002.
- 87 MISL'ANOVA, C.; HUTTA, M. Influence of various biological matrixes (plasma blood microdialysate) on chromatographic performance in the determination of β -blockers using an alkyl-diol silica precolumn for sample clean-up. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**. v. 765, n. 2, p. 167-177, 2001.
- 88 BARROSO, M. B.; ALONSO, R. M.; JIMÉNEZ, R. M. Electrochemical determination of the loop diuretics piretadine and furosemide in pharmaceutical formulations and urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 305, n. 1/3, p. 332-339, 1995.
- 89 LUIZ, V. H. M. et al. Rapid determination of furosemide by combined spot-test/diffuse reflectance spectroscopy to detect doping in sport. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 68-72, 2013.
- 90 JACKSON, E. K. Diuréticos. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GOODMAN GILMAN, A. (Ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. Cap. 29, p. 569-592.
- 91 BUITRAGO, A. et al. Desarrollo y validación de un método espectrofluorométrico para la determinación de furosemida em formas farmacêuticas sólidas. **Avances en Química**, v. 5, n. 1, p. 15-25, 2010.
- 92 BOSCH, M. E. et al. Recent development in analytical determination of furosemide. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 519-532, 2008.
- 93 CASLAVSKA, J.; THORMANN, W. Rapid analysis of furosemide in human urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence and electrospray ionization-ion trap mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 770, p. 207-216, 2002.
- 94 RANKIN, G. O. Diuretics. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. Chap. 22, p. 518-531.

- 95 ABOU-AUDA, H. S. et al. High-performance liquid chromatographic determination of furosemide in plasma and urine and its use in bioavailability studies. **Journal of Chromatography B**, v. 710, p. 121-128, 1998.
- 96 SHARMA, S. P.; LAHIRI, S. C. A preliminary investigation into the use of FTIR microscopy as a probe for the identification of bullet entrance holes and the distance of firing. **Analytica Chimica Acta**, v. 49, p. 197-204, 2009.
- 97 SEVILLANO-CABEZA, A. et al. Extractive spectrophotometric determination of furosemide with sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate in pharmaceutical formulations. **Analytical Letters**, v. 30, n. 1, p. 91-107, 1997.
- 98 GARCIA, M. S. et al. Flow-injection spectrophotometric determination of frusemide or sulphathiazole in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 453-459, 1997.
- 99 LIU, Y. et al. A simple and sensitive spectrofluorimetric method for the determination of furosemide using zinc(II)-1,4-bis(imidazol-1-ylmethyl) benzene complexes. **Luminescence**, v. 28, p. 882-887, 2013.
- 100 GOTARDO, M. A. et al. Determination of furosemide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. **Talanta**, v. 64, n. 361-365, 2004.
- 101 PERALTA, C. M. et al. Solid phase extraction using nylon membranes with fluorescence detection as a fast and sensitive method for amiloride and furosemide determination in urine samples. **Microchemical Journal**, v. 98, p. 39-43, 2011.
- 102 SEMAAN, F. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Spectrophotometric determination of furosemide based on its complexation with fe(III) in ethanolic medium using a flow injection procedure. **Analytical Letters**, v. 39, p. 2557-2567, 2006.
- 103 TSYRULNEVA, I.; ZAPOROZHET, O. Simple and rapid determination of diuretics by luminescent method. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, p. 520-527, 2013.
- 104 THARPA, K. et al. Use of a diazocoupling reaction for sensitive and selective spectrophotometric determination of furosemide in spiked human urine and pharmaceuticals. **Chemical Papers**, v. 64, n. 4, p. 415-423, 2010.
- 105 BARROSO, M. B. et al. Determination of piretanide and furosemide in pharmaceuticals and human urine by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 675, p. 303-312, 1996.
- 106 DIAS, I. L. T. et al. a poly(vinyl chloride) membrane electrode for the determination of the diuretic furosemide. **Analytical Letters**, v. 37, n. 1, p. 35-46, 2004.
- 107 HEIDARIMOGHADAM, R.; FARMANY, A. Rapid determination of furosemide in drug and blood plasma of wrestlers by a carboxyl-MWCNT sensor. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 1242-1245, 2016.

- 108 MEDEIROS, R. A. et al. Comparative study of basal-plane pyrolytic graphite, boron-doped diamond, and amorphous carbon nitride electrodes for the voltammetric determination of furosemide in pharmaceutical and urine samples. **Eletrochimica Acta**, 2015. In press. doi:10.1016/j.electacta.2015.10.065.
- 109 SANTINI, A. O. et al. Potentiometric sensor for furosemide determination in pharmaceuticals, urine, blood serum and bovine milk. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 64-73, 2009.
- 110 BANSAL, T. et al. Concurrent determination of topotecan and model permeability markers (atenolol, antipyrine, propranolol and furosemide) by reversed phase liquid chromatography: utility in Caco-2 intestinal absorption studies. **Journal of Chromatography B**, v. 859, p. 261-266, 2007.
- 111 CARDA-BROCH, S. et al. Determination of furosemide in urine samples by direct injection in a micellar liquid chromatographic system. **The Analyst**, v. 127, p. 29-34, 2002.
- 112 DOROSHCHUK, V. A. et al. Determination of furosemide in urine by HPLC with preconcentration by micellar-extraction. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 64, n. 10, p. 1054-1058, 2009.
- 113 GALAON, T. et al. High-throughput liquid-chromatography method with fluorescence detection for reciprocal determination of furosemide or norfloxacin in human plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 21, p. 40-47, 2007.
- 114 HEFFRON, B. et al. Quantification of several acidic drugs in equine serum using LC-MS-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, p. 600-604, 2013.
- 115 LALLJIE, S. P. D. et al. Micellar electrokinetic chromatography as a fast screening method for the determination of the doping agents furosemide and piretanide in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 688, p. 71-78, 1997.
- 116 WENK, M. et al. Determination of furosemide in plasma and urine using monolithic silica rod liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1367-1370, 2006.
- 117 YOUM, I; YOUAM, B. C. Validated reverse-phase high performance liquid chromatography for quantification of furosemide in tablets and nanoparticles. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, 2013. doi: 10.1155/2013/207028.
- 118 ASBURY, M. J. et al. Bumetanide: potent new "loop" diuretic. **British Medical Journal**, v. 1, p. 211-213, 1972.
- 119 GRADEEN, C. Y.; BILLAY, D. M.; CHAN, S. C. Analysis of bumetanide in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 14, p. 123-126, 1990.

120 GILMAN, A. G. et al. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996.

121 REYNOLDS, J. E. F. (Ed.). **Martindale the extra pharmacopoeia**. 31st ed. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996.

122 BUMETANIDA. **MedicinaNet**. Disponível em:
<<http://www.medicinanet.com.br/conteudos/medicamentos/232/bumetanida.htm>>.
Acesso em 14 nov. 2015.

123 BADOUD, F. et al. Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry I. Screening analysis. **Journal of Chromatography**, v. 1216, p. 4423-4433, 2009.

124 LEGORBURU, M. J. et al. quantitative determination of the loop diuretic bumetanide in urine and pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 39, p. 425-430, 2001.

125 MORRA, V. et al. Fast gas chromatographic/mass spectrometric determination of diuretics and masking agents in human urine. Development and validation of a productive screening protocol for antidoping analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, p. 219-229, 2006.

126 PATEL, D. S. et al. Application of a rapid and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of bumetanide in human plasma for a bioequivalence study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 66, p. 365-370, 2012.

127 WELLS, T. G. Measurement of bumetanide in plasma and urine by high-performance liquid chromatography and application to bumetanide disposition. **Journal of Chromatography**, v. 570, p. 235-242, 1991.

128 ZHANG, Z. et al. Determination of diuretics in human urine by hollow fiber-based liquid–liquid–liquid microextraction coupled to high performance liquid chromatography. **The Analyst**, v. 133, p. 1187-1194, 2008.

129 MA, H. Determination of bumetanide by micellar enhanced spectrofluorimetry and its application. **Fenxi Shianshi**, v. 18, n. 3, p. 80-82, 1999.

130 NIKOLIC, K. I; VELASEVIC, K. Coulometric determination of bumetanide and furosemide. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 44, n. 6, p. 387-390, 1989.

131 SOLICH, P. et al. Automated flow injection fluorimetric determination and dissolution studies of bumetanide in pharmaceuticals. **Analytica Chimica Acta**, v. 438, p. 131-136, 2001.

132 ZENG, L. et al. Sensitive phosphorimetric determination of bumetanide in human urine with its inhibition effect on the formation of [Fe-morin]³⁺ complex. **Journal of Fluorescence**, v. 20, p. 923-931, 2010.

- 133 ZIVANOVIC, L. et al. Fe(III) chloride as a color reagent for spectrophotometric determination of bumetanide in pure form and in preparations. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 49, n. 4, p. 9-12, 1992.
- 134 RUY, M. R. S. et al. Electroanalytical determination of bumetanide employing a biomimetic sensor for detection of doping in sports. **Analytical Methods**, v. 6, p. 5792-5798, 2014.
- 135 ZHENG, L. et al. Study on the interaction between two kinds of diuretics and bovine serum albumin by capillary electrophoresis-amperometric detection. **Fenxi Huaxue**, v. 37, n. 1, p. 115-118, 2009.
- 136 ZHENG, X. et al. An online field-amplification sample stacking method for the determination of diuretics in urine by capillary electrophoresis-amperometric detection. **Talanta**, v. 76, p. 15-20, 2008.
- 137 KUANG, H. et al. A sensitive dnzyme-based chiral sensor for lead detection. **Materials**, v. 6, n. 11, p. 5038-5046, 2013.
- 138 SILBERGELD, E. K.; WAALKES, M.; RICE, J. M. Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 38, p. 316-323, 2000.
- 139 MARKUS, J.; McBRATNEY, A. B. A review of the contamination of soil with lead II. Spatial distribution and risk assessment of soil lead. **Environment International**, v. 27, p. 399-411, 2001.
- 140 BOECKX, R. L. Lead poisoning in children. **Analytical Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 274-288, 1986.
- 141 KARITA, K. et al. Possible oral lead intake via contaminated facial skin. **Science of the Total Environment**, v. 199, n. 1/2, p. 125-131, 1997.
- 142 MEYER, I. et al. Factor affecting lead and cadmium levels in house dust in industrial areas of eastern Germany. **Science of the Total Environment**, v. 234, n. 1/3, p. 25-36, 1999.
- 143 RICHTER, E. M. et al. Square-wave quantification of lead in rainwater with disposable gold electrodes without removal of dissolved oxygen. **Electroanalysis**, v. 15, n. 23/24, p. 1871-1877, 2003.
- 144 SOARES, A. R.; NASCENTES, C. C. Simple method for determination of lead in hair dyes using slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical Letters**, v. 46, p. 356-366, 2013.
- 145 NOHYNEK, G. J. et al. Toxicity and human health risk of hair dyes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 517-543, 2004.

- 146 FDA U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **CFR – Code of Federal Regulation title 21**. Food and drugs. Silver Springer, 2015. Section 73.2396. Disponível em:
<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=73.2396>>.
Acesso em: 05 nov. 2015.
- 147 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 79, de 28 de agosto de 2000. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 ago. 2000.
- 148 BELLIS, D. J. et al. Evaluation of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for the quantitative determination of lead in different parts of archeological human teeth. **Spectroscopy Letters**, v. 42, p. 491-496, 2009.
- 149 HEJL, C. G. et al. Working towards accreditation by the international standards organization 15189 standard: how to validate an in-house developed method an example of lead determination in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 34, p. 367-371, 2014.
- 150 LI, C. L. et al. Peroxidase mimicking DNA–gold nanoparticles for fluorescence detection of the lead ions in blood. **The Analyst**, v. 137, p. 5222-5228, 2012.
- 151 LIU, Y. C. et al. using a functional nanogold membrane coupled with laser desorption/ionization mass spectrometry to detect lead ions in biofluids. **Advanced Functional Materials**, v. 21, p. 4448-4455, 2011.
- 152 MEDINA-SÁNCHEZ, M. et al. Eco-friendly electrochemical lab-on-paper for heavy metal detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 28, p. 8445-8449, 2015
- 153 MOLINA-HOLGADO, T. et al. Voltammetric determination of lead with a chemically modified carbon paste electrode with diphenylthiocarbazone. **Analytica Chimica Acta**, v. 309, p. 117-122, 1995.
- 154 MOREIRA, R. F. et al. A direct method for quantification of lead and cadmium content in biological fluids of the human reproductive system. **Analytical Letters**, v. 45, p. 2823-2834, 2012.
- 155 SOUZA, A. P. R. et al. Screen-printed back-to-back electroanalytical sensors: heavy metal ion sensing. **The Analyst**, v. 140, p. 4130-4136, 2015.
- 156 SYVILAY, D. Trace element quantification of lead based roof sheets of historical monuments by laser induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 103/104, p. 34-42, 2015.
- 157 SZPUNAR, J. et al. Speciation analysis for biomolecular complexes of lead in wine by size-exclusion high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 13, p. 749-754, 1998.

- 158 TREVISANI, M. et al. Quantification of lead and cadmium in poultry and bird game meat by square-wave anodic-stripping voltammetry. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 2, p. 180-188, 2011.
- 159 HARRIS, D. C. Fundamentos da espectrofotometria. In: _____. **Análise química quantitativa**. 5. ed. New York: W. H. Freeman. c2001. Cap. 19, p. 435-463.
- 160 SKOOG, D. A. Introdução aos métodos espectrométricos. In: _____. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. Cap. 6, p. 116-138.
- 161 KEALEY, D. Quantitative reflectometry. 1. Principles and scope. **Talanta**, v. 19, p. 1563-1569, 1972.
- 162 NARAYANASWAMY, R. Optical chemical sensors: transduction and signal processing. **Analyst**, v. 118, p. 317-322, 1993.
- 163 GHAUCH, A. et al. Quantitative measurements of ammonium, hydrogenophosphate and Cu(II) by diffuse reflectance spectrometry. **Talanta**, v. 48, n. 2, p. 385-392, 1999.
- 164 TUBINO, M.; ROSSI, A. V.; MAGALHÃES, M. E. A. Quantitative spot tests of Fe(III), Cr(IV) and Ni(II) by reflectance measurements. **Analytical Letters**, v. 30, n. 2, p. 271-282, 1997.
- 165 WENDLANT, W. W.; HECHT, H. G. **Reflectance spectroscopy**. New York: Interscience, 1966.
- 166 VERAS, G. et al. A portable, inexpensive and microcontrolled spectrophotometer based on white LED as light source and CD media as diffraction grid. **Talanta**, v. 77, p. 1155-1159, 2009.
- 167 BENEDETTI, L. P. S. et al. A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. **Analytical Methods**, v. 7, p. 4138-4144, 2015.
- 168 AKTA, S. A. et al. Determination of nitrite in saliva using microfluidic paper-based analytical devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 809, p. 117-122, 2014.
- 169 MARTINEZ, A. W. et al. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 3699-3707, 2008.
- 170 BENEDETTI, L. P. S. **Determinação *in situ* de analitos de interesse alimentício empregando tratamento de imagens digitais de *spot tests***. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
- 171 YAMADA, Y. et al. The phylogeny of acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA. The elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 1244-1251, 1997.

172 WILLIAMS, S.; CANNON, R. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 2448-2458, 1989.

173 KLEMM, D. et al. Nanocellulose materials – different cellulose, different functionality. **Macromolecular Symposia**, v. 280, p. 60-71, 2009.

174 GARDNER, D. J. et al. Adhesion and surface issues in cellulose and nanocellulose. **Journal Adhesion Science and Technology**, v. 22, p. 545-567, 2008.

175 CZAJA, W. K. et al. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1-12, 2007.

176 TABUCHI, M. Nanobiotech versus synthetic nanotech? **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 389-390 2007.

177 BARUD, H. S. **Materiais multifuncionais baseados em celulose bacteriana**. 2010. 172 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

178 UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Green chemistry**. Washington, DC, 2015.
Disponível em: <<http://www.epa.gov/greenchemistry>>. Acesso em: 18 nov 2015.

179 LENARDÃO, E. J. “Green chemistry”: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

180 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. **SciFinder**. Columbus, c2015. Disponível em: <<https://scifinder.cas.org>>. Acesso em: 01 dez. 2015.

181 MUNDO EDUCAÇÃO. **Chumbo em cosméticos**. Disponível em: <<http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/quimica/chumbo-cosmeticos.htm>> Acesso em: 02 março 2016.

182 LUIZ, V. H. M. **Desenvolvimento de métodos analíticos limpos para determinações forenses: chumbo em resíduos de disparo e furosemida em doping**. 2012. 132 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

183 UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO. **Roteiro de Produtos Naturais**. Disponível em: <http://www.academico.uema.br/DOWNLOAD/RoteirosProdutosNaturais_prote%C3%A9Dnas_EBAH.pdf> Acesso em: 02 março 2016.

184 MARTINY, A.; PINTO, A. L. Aplicação da microscopia eletrônica de varredura à análise de resíduos de tiro. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, v. 25, 3º quad., p. 24-35, 2008. Disponível em: <http://rmct.ime.eb.br/arquivos/RMCT_3_quad_2008/aplic_microscop_elet_resid_tiro.pdf>. Acesso em: 29 out. 2015.

185 INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Limit of detection and limit of quantification.**

Disponível em: <<http://old.iupac.org/publications/pac/1997/pdf/6902x0297.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

186 LAUBE, N. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, p. 367-374, 2001.

187 SEMAAN, F. S. et al. Flow-based fluorimetric determination of furosemide in pharmaceutical formulations and biological samples: use of micelar media to improve sensitivity. **Analytical Letters**, v. 41, p. 66-79, 2008.

188 POLLO, F. **Desenvolvimento de métodos analíticos ambientalmente mais amigáveis para a quantificação de bumetanida em medicamentos e urina.** 2007. 133 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.