



Márcia Passadouro Lisboa

Matrizes Biológicas de Interesse Forense

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Isabel Rita Rebelo Ferreira Barbosa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Márcia Passadouro Lisboa

Matrizes Biológicas de Interesse Forense

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Isabel Rita Rebelo Ferreira Barbosa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Márcia Passadouro Lisboa, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2011119743, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 14 de setembro de 2016.

(Márcia Passadouro Lisboa)

A Tutora

(Professora Doutora Isabel Rita Rebelo Ferreira Barbosa)

A Aluna

(Márcia Passadouro Lisboa)

AGRADECIMENTOS

“A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas.”

Horácio

O meu percurso académico além de um grau académico superior trouxe-me grandes ensinamentos a nível pessoal, momentos bons mas também alguns menos bons e difíceis que sem o apoio de algumas pessoas não teria conseguido ultrapassar. Todos me ajudaram a alcançar este objetivo, e me fizeram crescer enquanto pessoa e profissional. Como tal, não poderia deixar de agradecer:

À Professora Doutora Isabel Rita Rebelo Ferreira Barbosa que, desde o primeiro momento, se mostrou disponível para me orientar na realização desta monografia e transmitir conhecimentos, pelo tempo que disponibilizou e pela paciência.

À Professora Doutora Helena Teixeira pela bibliografia facultada e por autorizar a visita aos laboratórios de Toxicologia da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, oportunidade única e muito interessante neste meu projeto. E à D. Ana Sofia Coelho, coordenadora do Gabinete Médico-Legal de Leiria, por me aconselhar e agilizar com os contactos para que esta visita pudesse acontecer.

Aos meus pais, por todos os ensinamentos e valores que sempre me transmitiram e me tornaram a pessoa que sou hoje. Pelos momentos encorajadores e por me terem apoiado nas decisões que tive que tomar ao longo deste percurso. Obrigada por estarem sempre presentes.

Ao meu irmão por toda a dedicação e proteção que sempre teve por mim.

À minha sobrinha Beatriz, que mesmo sem ainda saber me transmitiu uma energia e alegria enormes.

Aos meus avós e restantes familiares, por sempre terem uma palavras de incentivo e um gesto de carinho.

Aos meus amigos e colegas de faculdade, que me proporcionaram bons momentos de companheirismo amizade e alegrias.

Às amigas de sempre, pela solidariedade, apoio, conselhos e pela motivação e ânimo que me transmitiram nos momentos mais difíceis.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO	5
TIPO DE AMOSTRAS: ANTE-MORTEM E POST-MORTEM	6
CADEIA DE CUSTÓDIA	7
SELEÇÃO DAS MATRIZES BIOLÓGICAS EM TOXICOLOGIA FORENSE.....	7
COLHEITA, ARMAZENAMENTO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS....	8
MATRIZES BIOLÓGICAS APLICADAS NAS ANÁLISES TOXICOLÓGICAS FORENSES... I I	
Fluidos Biológicos	11
Sangue	11
Urina.....	13
Conteúdo Gástrico	14
Fluido Oral.....	14
Humor Vítreo.....	15
Suor	17
Bílis.....	17
Órgãos e Tecidos	18
Fígado	18
Rim.....	19
Pulmão	19
Cérebro	19
Baço.....	20
Ossos e Medula Óssea.....	20
Músculo Cardíaco.....	21
Músculo Esquelético	21
Tecido Adiposo.....	22
Matrizes Alternativas	22
Cabelo.....	22
Unhas.....	24
Ar Expirado.....	25
Líquido Cefalorraquidiano	25
Efusão Pleural e Fluido Pericárdico	25
Amostras Entomológicas	26

PROCEDIMENTO ANALÍTICO EM TOXICOLOGIA FORENSE.....	27
Preparação da Amostra.....	27
Métodos Analíticos.....	27
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXOS	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AM – *Ante-mortem*

GC – Cromatografia Gasosa

LC – Cromatografia Líquida

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

ML – Médico(s)-Legal(ais)

MS – Espectroscopia de Massa

PM – *Post-mortem*

RPM – Redistribuição *Post-mortem*

TF – Toxicologia Forense

XB – Xenobiótico(s)

RESUMO

A Toxicologia Forense, área da toxicologia aplicada a propósitos legais, apresenta como objetivo principal fornecer respostas às questões que surgem numa investigação criminal. Utiliza como ferramenta as análises toxicológicas, que são requisitadas com a finalidade de se detetar a presença de substâncias exógenas (xenobióticos), determinar a sua concentração, e, finalmente, relacioná-las com os seus efeitos tóxicos no organismo humano, a fim de serem estabelecidas as conclusões sob as quais recai a suspeita.

O tipo de amostra, *ante-mortem* ou *post-mortem*, influencia todo o processo de investigação, já que a deteção de xenobióticos nos casos *post-mortem* pode apresentar maior dificuldade quando comparada com amostras colhidas “*in vivo*”. A extensão da alteração química no intervalo *post-mortem*, ou mesmo o metabolismo que ocorre após a morte, pode afetar a interpretação dos resultados.

Diversas matrizes biológicas podem ser utilizadas para a realização destas análises. No entanto, nas últimas décadas, matrizes alternativas têm apresentado relevante importância devido às suas vantagens quando comparadas com as amostras convencionais. As características particulares de cada matriz determinam a sua seleção, modo de conservação e armazenamento, etapas cruciais da fase pré-analítica que influenciam a qualidade da amostra e o resultado final obtido. É necessário que ocorra a implementação correta de metodologias analíticas de deteção e quantificação, de modo a permitir a interpretação dos resultados obtidos, e assim inferir acerca das relações em relação à perícia criminal.

Palavras-chave: Toxicologia Forense, investigação médico-legal, *ante-mortem*, *post-mortem*, matrizes biológicas, colheita, armazenamento, conservação, procedimento analítico, interpretação dos resultados toxicológicos.

ABSTRACT

Forensic Toxicology, the field of toxicology applied to lawful purposes, has as main goal to provide answers to questions that arise in a criminal investigation. It uses toxicological analysis as a tool required in order to detect the presence of exogenous substances (xenobiotics), determine its concentration and finally relate them to their toxic effects in the human body. This way, conclusions may be inferred about the suspicious issues.

The type of sample, ante-mortem or post-mortem, influences the whole process of research, as xenobiotic detection in cases post-mortem may face more difficulties when compared with samples obtained "in vivo". The extent of chemical change in the post-mortem interval, or even metabolism that occurs after death may affect interpretation of results.

Several biological matrices may be used for these analyzes; however, in the lastest decades, alternative matrices have shown considerable relevance due to its advantages compared with conventional samples. The specific characteristics of each matrix determine their selection, conservation and storage, which are crucial stages of the pre-analytic phase that influences the quality of the sample and of the final result. It must occur proper implementation of analytical methods of detection and quantification in order to allow the interpretation of results. Therefore, conclusions regarding criminal forensics may be inferred.

Keywords: Forensic Toxicology, medico-legal investigation, ante-mortem, post-mortem, biological matrices, sample, storage, conservation, analytical methods, interpretation of toxicological results.

INTRODUÇÃO

A Toxicologia Forense (TF) resulta do conhecimento e da aplicação da Química Analítica e da Toxicologia Fundamental, para fins médico-legais (ML) e no desempenho de atividades quotidianas, com o intuito de elucidar questões que ocorrem em processos judiciais relacionadas com os efeitos de qualquer substância química exógena, xenobiótico (XB), no organismo^(1,2). Para além disso, a TF é usada para determinar e dosear fármacos, em ambiente hospitalar, para monitorização da terapêutica, em casos de emergências toxicológicas e tirar elações de crimes onde os compostos tóxicos são usados como sedativos ou envenenamento. Neste tipo de investigações existem três objetivos principais: estabelecer se os compostos tóxicos presentes são a causa da morte; se são capazes de causar alterações comportamentais e se o seu uso ou exposição são legítimos, por indicação médica ou exposição laboral⁽³⁾.

Uma intoxicação é definida como condição inaceitável de um indivíduo, num ambiente clínico ou social, como consequência de estar sob influência de XB, numa dose demasiado elevada para o organismo humano, *overdose*. Pode ter causas acidentais, relacionadas com negligência, erros médicos ou a exposição ocupacional; experimentais, que frequentemente resultam da experiência e recreação com as drogas de abuso; ou intencionais, com o propósito de causar dano através de suicídio, homicídio, abuso sexual ou por vontade própria como no caso da eutanásia⁽¹⁾.

A função de um toxicologista forense é realizar análises qualitativas e quantitativas e interpretar a influência que um dado XB, assume no caso em investigação. Para que tal seja possível tem de ser realizada uma seleção, colheita e acondicionamento apropriados das evidências biológicas. A relevância de descobertas nesta área está dependente principalmente da natureza e integridade das amostras submetidas para análise. As propriedades inerentes a cada matriz determinam quais as técnicas de preparação da amostra e ainda, as vantagens e limitações associadas, que devem ser tidas em consideração pelo toxicologista^(1,4,5,6).

O presente trabalho, consta numa revisão bibliográfica, com base em diversos artigos científicos da área e procura expor as vantagens e limitações de cada uma das matrizes biológicas, salientando os aspetos relativos à sua preservação e acondicionamento, bem como à garantia da cadeia de custódia, interpretação dos resultados toxicológicos, terminando numa breve abordagem das principais técnicas analíticas.

TIPO DE AMOSTRAS: ANTE-MORTEM E POST-MORTEM

No campo da TF podemos falar em casos *ante-mortem* (AM) e *post-mortem* (PM). Nos primeiros são avaliados o papel dos XB na modificação do comportamento humano, usualmente aplicado ao nível da segurança rodoviária, na condução de veículos ou no aumento da *performance* desportiva, como nos casos de *doping*; em situações de intoxicação ou negligência médica, dos quais não resultou nenhuma morte, e ainda na deteção de antecedentes ou abusos recentes de determinadas drogas, através da análise a diversas matrizes biológicas⁽¹⁾.

Nas situações PM, são investigadas as causas de morte, através da análise de vários fluidos e tecidos obtidos durante a autópsia. Nestes casos, cai sob jurisdição de um instituto de medicina legal quando a morte resulta de violência, crime, suicídio, acidente, por qualquer tipo de negligência ou atividade suspeita; quando ocorre numa pessoa saudável sem causa aparente; quando decorre de procedimentos médicos; quando é causada por envenenamento ou quando a vítima é um feto ou recém-nascido e se levantam dúvidas⁽¹⁾.

Nos casos AM, o tempo é um fator crucial na colheita das amostras, uma vez que algumas drogas têm tempos de deteção curtos e por isso, janelas de deteção limitadas. Em investigações PM o tempo também é um fator a ter em conta, já que à medida que este aumenta, entre o período da morte e a colheita, torna-se mais difícil obter amostras de qualidade. Para além disso, existem outros desafios relativos ao elevado número de amostras existentes e ao resultado de alterações autolíticas e putrefação, a nível celular^(1,5,7).

Após a morte, ocorrem processos de redistribuição e lise celular que podem alterar a concentração dos XB, por vezes em larga extensão, e por isso, devem ser tomados em conta aquando da interpretação dos resultados. O fenómeno de redistribuição *post-mortem* (RPM) reflete a difusão e redistribuição dos XB, através do gradiente de concentração, que ocorre no organismo, no intervalo entre a morte e a recolha das amostras na autópsia. O que daí resulta são concentrações mais elevadas de XB nos tecidos circundantes, do que no momento da morte. Quando a célula morre perde a integridade da sua membrana libertando o seu conteúdo para o espaço extracelular, e a concentração sanguínea PM também pode ficar mais elevada do que antes da morte, devido a fenómenos de difusão passiva. As características dos XB que influenciam a probabilidade da ocorrência destes fenómenos são o volume de distribuição, pKa, a ligação às proteínas plasmáticas e a lipofilia⁽¹⁾. Para além disso, em alguns casos a intensa atividade microbiana e a fermentação da glicose que acontecem PM podem ser responsáveis pela produção de álcool no organismo⁽⁷⁾.

Nas ocorrências em que prevalece a dúvida acerca da alteração da concentração das drogas em determinada amostra, isto é, de um fenómeno de RPM, deve-se colher múltiplas

matrizes de diferentes locais anatómicos, como forma de comparação dos resultados analíticos⁽⁷⁾.

De notar, que para qualquer tipo de investigação é indispensável obter todas as informações adicionais relativas ao caso em estudo, como os antecedentes pessoais, historial clínico, a dose presumível do XB envolvido, os achados da autópsia, as informações do local da ocorrência, as circunstâncias imediatas da morte e as variáveis que podem afetar a concentração dos XB, tanto antes como depois da morte⁽¹⁾.

CADEIA DE CUSTÓDIA

A cadeia de custódia é uma sistemática de procedimentos que visa à preservação do valor probatório da prova pericial caracterizada. Uma vez que a TF tem repercussões legais, isto implica que todas as evidências associadas a um determinado caso tenham de ser sempre mantidas numa área segura e restrita apenas aos profissionais envolvidos^(1,9).

No que diz respeito à preservação das informações recolhidas, a cadeia de custódia possibilita documentar, em relatório próprio, a cronologia das evidências, quem foram os responsáveis pelo seu pedido, manuseamento, análise e transporte, minimizando a possibilidade de extravio, manipulação indevida, ou adulteração, com o objetivo de manter as evidências seguras e íntegras⁽¹⁾.

SELEÇÃO DAS MATRIZES BIOLÓGICAS EM TOXICOLOGIA FORENSE

Consoante a especificidade do caso e o tipo de análise toxicológica pretendida procede-se à colheita das matrizes mais adequadas. Desta forma, existem análises que requerem apenas um tipo de amostra, enquanto outras ficarão incompletas se não forem enviados diversos tipos de amostras. No caso das determinações de alcoolemia (etanol no sangue) e de carboxihemoglobina (monóxido de carbono presente na hemoglobina sanguínea), por exemplo, é necessário apenas um único substrato, o sangue⁽¹⁰⁾.

Contudo, e em especial para o sangue, existem condições em que não é possível obter as amostras mais apropriadas de uma forma qualitativa e/ou quantitativa, particularmente em situações de putrefação avançada, exumações ou de mortes por choque traumático. Neste caso, há que recorrer a matrizes alternativas ou complementares, que permitam inferir acerca da concentração provável do tóxico presente no sangue. Para a determinação de álcool etílico é possível efetuar essa pesquisa noutros fluidos, tais como urina, humor vítreo, medula óssea ou saliva⁽¹⁰⁾.

Segundo diretivas europeias, qualquer suspeita de intoxicação e/ou situação cujos achados da autópsia não revelaram causa de morte evidente, deve-se incluir a recolha das seguintes amostras básicas para exame toxicológico: sangue periférico, urina, conteúdo gástrico, bÍlis, fÍgado e rim. Estas permitem a pesquisa de diversos grupos de tÓxicos como hipnÓtico-sedativos, substâncias psicoativas, cardiotÓnicos, analgésicos e pesticidas⁽¹⁰⁾.

A pesquisa de drogas de abuso deve englobar, além das amostras descritas, líquido cefalorraquidiano (LCR), encéfalo, cabelo e local da picada⁽¹⁰⁾.

A inclusão de sangue cardíaco da cavidade do ventrÍculo esquerdo, encéfalo, tecido gordo subcutâneo, pulmão e vestuário, deve complementar a amostragem básica sobretudo na pesquisa de substâncias lipossolúveis voláteis, tais como combustÍveis e solventes⁽¹⁰⁾.

Já no caso de a intoxicação ser crÓnica por metais pesados, por certos medicamentos ou por pesticidas, deve-se adicionar à recolha de amostras normal, cabelo, ossos, tecido adiposo e conteúdo intestinal⁽¹⁰⁾.

Uma análise toxicológica tem, muitas vezes, por limite a qualidade ou quantidade das amostras de que se dispõe, daí que, seja preferÍvel o envio de amostras em excesso, com a vantagem de poder diversificar as pesquisas, duplicar, garantir ou até contribuir para o sucesso analÍtico de uma determinada investigação⁽¹⁰⁾.

COLHEITA, ARMAZENAMENTO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para o sucesso da análise toxicológica e do resultado que daí advém, existem detalhes importantes a acautelar relativamente ao procedimento de colheita das amostras, especificamente no que toca aos tubos de acondicionamento, bem como a sua rotulagem. Sob este tÓpico há a salientar o seguinte⁽⁴⁾:

- Cada amostra deve ser colhida em recipiente independente⁽⁴⁾ (Figura 1);
- Tubos de plÁstico com tampas de rosca são preferÍveis para a colheita de fluidos e Órgãos, para se evitar a sua quebra durante o congelamento, no entanto em algumas situações são preferÍveis recipientes de vidro ou de plÁstico inerte uma vez que os constituintes do plÁstico são mais suscetÍveis de causar interferências na análise^(4,5);
- Os tubos devem ser preenchidos (mas não demasiadamente cheios) para minimizar *headspace* e, portanto, evitar as perdas por oxidação ou evaporação (especialmente para compostos voláteis) e só devem ser abertos quando necessÁrio para análise e somente após refrigeração a 4°C⁽⁴⁾;

- Etiquetas autoadesivas invioláveis devem ser colocadas sobre as tampas dos tubos que acondicionam a amostra e dos recipientes de transporte daqueles tubos, para assegurar o cumprimento da cadeia de custódia. Os rótulos devem conter, pelo menos as seguintes informações: número identificador institucional do caso ou o número do pedido; nome da vítima ou outra identificação; data e hora da colheita; tipo de amostra e local anatómico da colheita, quando aplicável e assinatura do perito⁽⁴⁾.

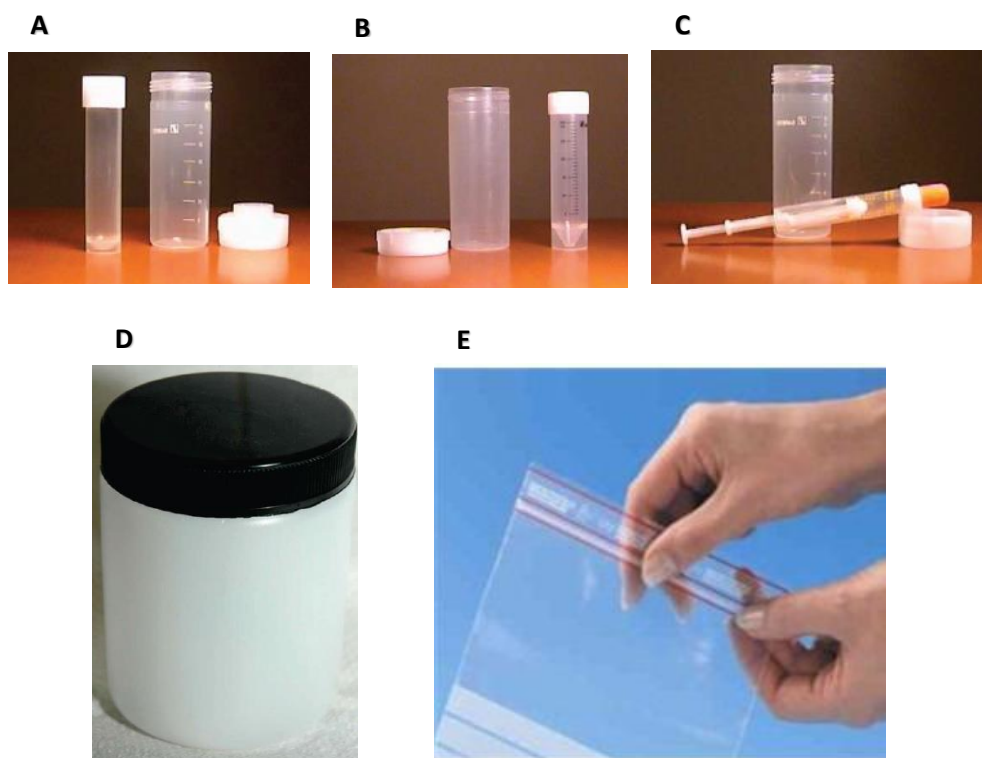


Figura 1 – Recipientes de acondicionamento e envio das amostras biológicas^(1,2)

Tubo de 10 ml de capacidade contendo fluoreto de sódio e EDTA (apenas para amostras AM) usado para sangue periférico e respetivo contentor de transporte. (B) Tubo de 30 ml de capacidade usado para sangue da cavidade cardíaca, urina, amostras de órgãos e respetivo contentor de transporte. (C) Seringa de 2 ml de capacidade usada para pesquisa de voláteis no sangue periférico e humor vítreo e respetivo contentor de transporte. (D) Frasco adaptado para análises histológicas. (E) Saco para envio das amostras (sistema de fecho permite evitar a quebra de integridade).

A estabilidade das matrizes biológicas durante o armazenamento constitui também uma questão crucial a ser considerada durante a fase pré-analítica, uma vez que influencia a qualidade da amostra e o resultado final obtido. O conhecimento dos mecanismos de degradação e de métodos que aumentem a estabilidade e conservação das matrizes biológicas é essencial para o trabalho dos toxicologistas forenses. De seguida, salientam-se os procedimentos genéricos de maior importância^(1,4):

- As amostras, depois de colhidas, devem ser enviadas para o laboratório no mais curto intervalo de tempo⁽²⁾;
- As amostras devem ser armazenadas em tubos hermeticamente fechados a 4°C, para um curto prazo, ou a -20°C/ -80°C, para longos prazos de armazenamento (mais de uma semana); a exceção inclui o cabelo e unhas, que são estáveis à temperatura ambiente⁽⁴⁾;
- Nos tubos destinados ao acondicionamento de sangue é recomendado conter uma quantidade de fluoreto de sódio, na concentração aproximada de 1% (p/v), com inibidor enzimático e prevenir a glicólise (e.g. diminuir a conversão de glucose em etanol pelos microrganismos; a conversão PM, pela ação de colinesterases, da cocaína em éster metílico de ecgonina; e reduzir a perda por ação enzimática, de alguns ésteres como a 6-acetilmorfina, principal metabolito da heroína)^(1,2,5);
- Na conservação das amostras deve ser eliminado qualquer fator suscetível de contaminação. Atender às condições de luz, humidade e calor, fontes prováveis de reações de oxidação ou hidrólise que podem acelerar a decomposição dos analitos⁽¹⁰⁾;
- Deve-se estabelecer o menor número possível de pessoas envolvidas no manuseamento das amostras, de forma a garantir a segurança e integridade das mesmas^(1,2).

As amostras podem sofrer alterações a partir do momento da sua colheita, consoante as condições e durações do manuseamento e armazenamento. Deste modo, as matrizes devem ser armazenadas a uma temperatura apropriada, com um conservante adequado, nos casos de necessidade demonstrada, e num ambiente seguro e adequado, acessível apenas ao *staff* autorizado, de forma a garantir a sua segurança e integridade, minimizando as interferências com os métodos analíticos e os erros de interpretação dos resultados⁽¹⁾.

O envio para análise de amostras inadequadas ou mal acondicionadas pode colocar em causa o valor de um resultado analítico e a credibilidade das mesmas a nível judicial, pelo que é crucial garantir a integridade das matrizes e a qualidade dos resultados analíticos, através de práticas corretas de colheita, acondicionamento e conservação⁽²⁾.

Aspetos a ter em consideração:

Durante o processo de putrefação das matrizes biológicas é produzido um composto característico, a β -feniletilamina. Esta é uma amina com uma estrutura química semelhante à

das anfetaminas. A semelhança desta amina origina, por vezes, falsos positivos, nos resultados de *screening*⁽¹⁾.

Os ésteres, sujeitos a hidrólise alcalina, são mais estáveis no sangue PM do que no sangue AM, visto que o pH sanguíneo diminui após a morte devido à glicólise anaeróbia. Assim, a acidez do sangue estabiliza alguns compostos lábeis como a cocaína que sendo um dos compostos mais instáveis, não sofre hidrólise em benzoilecgonina^(1,5).

MATRIZES BIOLÓGICAS APLICADAS NAS ANÁLISES TOXICOLÓGICAS FORENSES

Com o desenvolvimento de novas tecnologias na extração de analitos, a utilização de uma variedade de amostras biológicas tornou-se ainda mais acessível e possível⁽⁶⁾.

Qualquer matriz biológica que tenha entrado em contacto com algum XB é um potencial candidato a ser submetido a investigações toxicológicas, no mínimo para análises qualitativas, para ajudar à interpretação dos resultados⁽¹⁾.

In vivo o sangue ou soro, a urina, o cabelo e o conteúdo gástrico (lavado gástrico e vómito), são as amostras mais importantes a colher. Nos casos PM o sangue (femoral e cardíaco), a urina, o humor vítreo, o conteúdo gástrico e os órgãos (particularmente o fígado), são as amostras mais significantes⁽⁴⁾.

No entanto, a bÍlis, o LCR, o rim, o cérebro, o pulmão, o baço e o músculo esquelético podem ocasionalmente ser colhidos no decurso da autópsia⁽⁴⁾. Matrizes adicionais e alternativas como o cabelo, unhas, suor ou pele podem também ser objeto de análise para complementar a investigação toxicológica⁽¹⁾.

Em relação ao tamanho das amostras, não existem diretrizes claras que definam o tamanho de cada matriz, contudo o seu tamanho deve permitir inferir conclusões suficientes e sustentáveis^(1,7).

Cada uma das matrizes referidas de seguida, será abordada em termos da sua composição, forma como o analito é incorporado e sua utilidade no âmbito das análises forenses, com base nas informações que é capaz de fornecer⁽⁶⁾.

Fluidos Biológicos

Sangue

A amostra de sangue pode ser avaliada na forma de sangue total, plasma (sobrenadante obtido por centrifugação do sangue adicionado de anticoagulante) ou o soro (plasma sem os fatores de coagulação obtido por coagulação sanguínea). Se o objetivo da

análise é a quantificação dos XB é mais indicada a avaliação da amostra em sangue total, já que as drogas apresentam diferentes afinidades para as proteínas e podem eventualmente ser descartadas se investigadas apenas em amostra de plasma ou soro⁽⁶⁾.

O sangue constitui a amostra de eleição para detetar, quantificar e interpretar a presença de substâncias tóxicas no organismo. Em todos os casos sujeitos a investigação ML é colhida uma amostra de sangue, sempre que possível. O sangue é uma matriz convencional amplamente estudada nas análises toxicológicas forenses, pois fornece a correlação da concentração do XB no sangue com o estado clínico do indivíduo, além disso, a razão droga/metabolito é útil para prever o período decorrido desde a administração. Contudo, é obtido através de método invasivo, que envolve maior risco de contaminação e possui uma janela de detecção restrita, já que os XB são rapidamente metabolizados, dependendo da sua semivida, desde alguns minutos a algumas horas após a exposição^(2,6,11).

No que concerne à interpretação dos resultados, é de ter em conta que quanto maior for a concentração da substância e/ou respetivo metabolito detetados, maior será a possibilidade de intoxicação aguda. Este aspeto é corroborado se forem encontradas várias substâncias e/ou etanol. A interpretação torna-se especialmente difícil nos casos em que os XB por sofrerem RPM estejam presentes no sangue da cavidade cardíaca em concentrações compreendidas entre o limite máximo terapêutico e o limite mínimo para o qual tenham sido reportados casos de intoxicação ou morte. Nestes casos, a análise de uma amostra de sangue periférico pode ser crucial para avaliar o papel que a substância teve na vítima pelo que, sempre que possível devem ser obtidas amostras de sangue provenientes de dois locais distintos: coração e vasos periféricos⁽²⁾.

Habitualmente, as concentrações de muitas substâncias de interesse são maiores no sangue cardíaco como resultado do fenómeno de RPM, sendo este obtido por aspiração, preferencialmente das câmaras direitas, onde se pode obter um volume de amostra considerável dada a abundância de sangue neste local. O sangue periférico é a amostra preferencial para a determinação de alcoolemia e quantificação de substâncias de interesse ML, já que é menos suscetível à RPM. Nos casos PM deve-se colher sangue venoso e arterial femoral, ou como alternativa sangue venoso da subclávia ou jugular. *In vivo* o sangue é geralmente obtido a partir da veia cefálica, mas é razoavelmente homogéneo em todos os locais anatómicos. Em casos de gravidez o sangue do cordão umbilical também pode ser obtido no parto^(1,2,4).

Pode ser considerada a hipótese de colheita de coágulos do espaço subdural, subaracnoide ou epidural formado nos casos de traumatismos. Esta área apresenta uma redução na perfusão sanguínea, e por isso estes coágulos podem fornecer informação

complementar relativa à concentração de XB no sangue horas antes da morte, no momento do incidente. Contudo deve ter-se em atenção a possibilidade de infeção e contaminação microbiana no local da lesão. O sangue das cavidades torácica e abdominal deve ser colhido apenas em último recurso, devido à possibilidade de contaminação microbiana ou por fluidos das vísceras e conteúdo gástrico resultante de traumas internos severos^(1,4).

Qualquer que seja o local anatómico onde foi obtida a amostra de sangue, este deve ser sempre mencionado no tubo de colheita, é indispensável a adição de anticoagulante, EDTA ou heparina, usados nos casos AM para obtenção do plasma, e ainda um conservante, geralmente usado o fluoreto de sódio (ou potássio)^(4,6).

Urina

A urina é uma matriz biológica de escolha tradicional/convencional em análises toxicológicas forenses, resultante de uma ultrafiltração do sangue pelos rins. Na sua composição constam substâncias químicas orgânicas (ureia, ácido úrico e creatinina) e inorgânicas (iões cloreto e sódio) dissolvidas em água, sendo a quantidade média diária de urina formada num indivíduo saudável de 1200 mL. Como principal via de eliminação, esta matriz é geralmente alvo de investigações de metabolitos⁽⁶⁾.

A urina é utilizada tanto nos casos AM como PM, de colheita fácil e não invasiva, disponível em grandes volumes e com um menor número de interferentes quando comparada com outras matrizes. Apresenta alta estabilidade quando congelada, permitindo o armazenamento a longo prazo de amostras positivas, no entanto, é uma amostra de fácil adulteração, uma vez que a colheita não é vigiada. Nos casos PM a urina é colhida durante a autópsia, através da inserção de uma agulha diretamente na bexiga de forma a aspirar o seu conteúdo seguido da adição de fluoreto de sódio^(2,5,6).

A acumulação nesta matriz de substâncias tóxicas e respetivos metabolitos resulta na ocorrência de concentrações elevadas, facilitando a deteção dos XB. A urina deve ser sempre colhida da bexiga e ureteres, mesmo que disponível em volumes diminutos, pois permite a realização de uma triagem, e um resultado positivo é valioso para orientar uma subsequente análise de quantificação no sangue. Na ausência de urina o perito pode optar por efetuar uma “lavagem” da bexiga com um pequeno volume de água destilada/soro. A maioria dos XB encontram-se presentes na urina por um período de 2 a 5 dias após o consumo, pelo que o uso recente de drogas é detetado. A urina é particularmente indicada para a utilização de métodos imunoenzimáticos, que permitem a triagem rápida de substâncias com significativo interesse ML, como as benzodiazepinas, opióides, cocaína, anfetaminas e canabinóides^(2,6).

Conteúdo Gástrico

Uma alíquota (cerca de 30 mL) de homogeneizado do conteúdo gástrico (incluindo vômito e aspirado gástrico) é particularmente útil em casos de intoxicações por via oral, sendo colhida durante a autópsia. De notar que a abertura do estômago deve ser feita de forma a evitar a contaminação de outros tecidos ou fluidos biológicos^(2,4).

A ingestão oral constitui a principal via de administração de muitos medicamentos e substâncias tóxicas, e por isso muitas situações de sobredosagem podem ser facilmente detetadas através da análise do conteúdo gástrico, uma vez que em muitos casos é possível detetar a presença de comprimidos e cápsulas não dissolvidos⁽²⁾.

A quantidade total de XB remanescentes no conteúdo gástrico é mais importante do que determinar a sua concentração, já que uma estimativa da quantidade pode ser útil para concluir se o resultado é consistente com a hipótese de *overdose* ou dose terapêutica⁽¹⁾. Geralmente, uma quantidade elevada de XB no conteúdo gástrico é indicativa de *overdose* quando confirmada pela análise sanguínea ou de tecidos. No entanto, uma quantidade diminuta não pode descartar a possibilidade de *overdose*, já que pode levar algumas horas até à morte dependendo do tipo de XB ingerido, da quantidade, da ingestão simultânea com álcool, do estado de saúde e idade do indivíduo⁽¹⁾. Pequenas quantidades de XB no conteúdo gástrico não significam que estes foram recentemente consumidos ou que foram administrados por via oral, já que estes podem sofrer difusão passiva, retenção dos iões contidos no sangue que retornam ao estômago através do suco gástrico, o que acontece principalmente com XB de carácter básico que têm tendência a ficar retidos no compartimento gástrico devido ao baixo pH ou resultar de administração intranasal^(2,5).

O odor eventualmente presente neste tipo de amostra pode também ser um forte indicador do tipo de tóxico envolvido, por exemplo o aroma a fruta pode indicar presença de etanol e congéneres, o odor a xilol ou alho sugere presença de inseticidas organofosforados e o cheiro a amêndoa amarga pode indicar intoxicação por cianetos^(1,2).

Caso haja suspeita de intoxicação por metais pesados, como arsénio, chumbo ou mercúrio deve ser colhido o conteúdo gástrico e adicionalmente conteúdo intestinal para serem sujeitos a análises toxicológicas^(1,5).

Fluido Oral

O fluido oral é uma mistura de saliva segregada pelas glândulas salivares, fluido gengival crevicular, células epiteliais orais e microrganismos. São produzidos habitualmente, entre 500 a 1500 mL de fluido oral por dia, em indivíduos saudáveis^(6,12).

A colheita da amostra biológica oral caracteriza-se por ser simples, não invasiva, de fácil realização no local da abordagem, não exige profissionais especializados e fornece um resultado preliminar em poucos minutos, devendo este ser sujeito a confirmação no laboratório por testes mais sensíveis^(1,6,12). A desvantagem, no entanto, é a possibilidade de contaminação por resíduos de comida ou bebida e, principalmente por drogas utilizadas por via oral ou fumadas e o restrito número de estudos existentes acerca dos seus interferentes. Para tal, é recomendado um tempo de espera de cerca de 10 minutos após a ingestão de comida ou bebida, 2 a 4 horas após administração de XB por via oral e não efetuar a higiene da cavidade oral antes de proceder à colheita da amostra. Há situações em que os indivíduos são incapazes de produzir quantidades de amostra suficientes, devido a certas condições médicas ou ansiedade que originam a secura da boca, recorrendo-se nestes casos a técnicas que estimulam o fluxo salivar (i.e. algumas gotas de limão ou ácido cítrico). De salientar que o fluído oral é suscetível de transmitir agentes infecciosos e por isso os procedimentos de colheita e manipulação devem ser efetuados seguindo as devidas medidas de proteção^(1,5,6).

As concentrações de drogas no fluído oral refletem a fração livre da droga no sangue. Assim, o avanço das técnicas analíticas possibilitou a análise de vários XB de interesse forense no fluído oral, como a cocaína, anfetaminas, opióides, canabinóides, benzodiazepinas, ácido gama-hidroxibutírico (GHB) e o etanol, limitando as pesquisas para exposições recentes (até cerca de 2 dias) devido ao curto tempo de semivida de alguns XB^(1,6,12).

Os XB são transferidos do sangue para a saliva por ultrafiltração ou difusão passiva, pelo que as moléculas devem ter um baixo peso molecular, ser lipossolúveis, não ionizadas e não ligadas a proteínas plasmáticas^(1,6).

Uma das principais aplicações desta matriz é a monitorização dos condutores rodoviários, verificação do uso de drogas em ambiente de trabalho e em casos de envenenamento com metais pesados. A colheita de fluído oral é uma ótima alternativa ao teste realizado com o alcoolímetro, já que permite a deteção simultânea de álcool e drogas de abuso, além de permitir que a amostra seja armazenada e reanalisada, caso haja requisição judicial^(6,12).

Humor Vítreo

O humor vítreo é uma substância gelatinosa, localizada no interior do olho, constituída maioritariamente por água (99%), sais, e uma pequena quantidade de proteínas, especialmente colagénio, mantendo-se unida por uma rede de tecido intraocular composto por moléculas de proteoglicanos e mucopolissacarídeos (ácido hialurónico)^(6,13).

Esta matriz tem particular interesse em análises toxicológicas PM, já que apresenta grande estabilidade e resistência nos processos de putrefação, por se encontrar alocada no interior da câmara ocular, em ambiente consideravelmente estéril e protegido de traumas, disponível mesmo em casos de carbonização parcial do cadáver. Todas estas características fazem com que a sua análise possa servir para distinguir a ingestão AM de álcool de uma eventual formação PM^(2,6).

O uso do humor vítreo no âmbito da prática forense baseia-se em três resultados essenciais: a determinação da hora da morte (cronatanatodignóstico); detecção de substâncias tóxicas como os barbitúricos, benzodiazepinas, antidepressivos, anestésicos gerais, opióides, cocaína, canabinóides, anfetaminas, dietilamida do ácido lisérgico (LSD), álcool etílico; e ainda a determinação de estados patológicos anteriores ou relacionados com a morte, através da análise de glicose, compostos de azoto na ureia, ácido úrico, creatinina e iões sódio e cloro^(5,8). A presença de glicose no humor vítreo pode ser indicativa de diabetes ou estado hiperglicémico, devido ao facto desta matriz apresentar baixa celularidade, e os níveis de glicose se manterem estáveis durante um tempo mais prolongado após a morte⁽¹³⁾. As drogas e toxinas chegam ao humor vítreo através da passagem pela barreira sangue-retina, por meio de transporte ativo e passivo, estando ausentes as esterases, responsáveis pela degradação de certas substâncias e metabolitos no sangue⁽⁶⁾.

A colheita do humor vítreo pode ser efetuada por meio de punção no canto lateral do olho, por aspiração através de seringa hipodérmica, obtendo-se 2-3 mL de fluído a partir de cada globo ocular, seguido da adição de fluoreto de sódio (Figura 2). O volume de amostra colhido é pequeno pelo que limita o número de ensaios realizados e, ainda XB com alta afinidade proteica não atravessam a barreira sangue-retina e não são encontrados nesta matriz. Apesar destas desvantagens, o humor vítreo não requer etapas elaboradas na preparação da amostra e pode ainda ser útil na detecção de XB sujeitos ao fenómeno de RPM, devido à sua localização remota relativamente aos órgãos abdominais^(1,2,5,6).



Figura 2 – Procedimento de colheita de uma amostra de humor vítreo⁽¹⁾

Suor

A análise do suor tornou-se uma possibilidade útil em Toxicologia Clínica e Forense, utilizada como matriz biológica alternativa para a monitorização do uso de drogas, por exemplo no local de trabalho^(4,6). Em média, o volume de suor excretado diariamente varia entre 300 a 700 mL em indivíduos saudáveis. As glândulas sudoríparas estão amplamente distribuídas na pele, e são classificadas em écrinas, mais numerosas e presentes nas palmas das mãos, plantas dos pés, face e peito e, as apócrinas que se encontram nas axilas, púbis e mamas^(1,6).

Os XB são incorporados nesta matriz por difusão passiva e migração transdérmica, sendo que as características físico-químicas das drogas como massa molecular, pKa, grau de ligação às proteínas plasmáticas, lipofilia e pH influenciam esta incorporação. Estudos comprovaram que há uma relação entre o pKa do XB e a quantidade excretada no suor e ainda entre a concentração de XB no suor e no plasma, contudo o suor é mais aplicado na análise qualitativa. Dentre as drogas já estudadas e detetadas incluem-se o etanol, as anfetaminas, fenobarbital, cocaína, opióides e GHB^(1,6).

A colheita do suor é simples, não invasiva, com baixo risco de adulteração e podendo ter uma janela de deteção até 14 dias. Na colheita são utilizados dispositivos próprios para a deteção de drogas, os “*patches*”, constituídos de material absorvente coberto de camada adesiva, sendo colocado na superfície da pele limpa, durante alguns dias de modo a obter uma maior quantidade de amostra^(1,5,6).

Em relação às desvantagens no uso desta matriz incluem-se a falta de informação acerca da relação dose-resposta, a quantidade limitada de amostra e a falta de informação disponível relativa ao uso desta matriz. Além disso as concentrações encontradas dos analitos são relativamente baixas, exigindo técnicas analíticas com alta sensibilidade e seletividade⁽⁶⁾.

Bílis

A bílis é um fluido viscoso produzido pelo fígado, e armazenado na vesícula biliar que atua na digestão de gorduras e na absorção de nutrientes no intestino. Este fluido acumula um significativo leque de substâncias com interesse ML, sendo muito utilizado na determinação qualitativa de opiáceos, benzodiazepinas e cocaína, podendo ser interessante para documentar uma história de consumo crónico, e por isso é sempre efetuada a sua colheita nos casos PM^(1,2,4).

A colheita deve ser considerada sobretudo nos casos em que não seja possível a obtenção de uma amostra de urina, sendo diretamente aspirada da vesícula biliar com seringa hipodérmica. De referir que a bÍlis é influenciada pelo fenómeno de difusão PM^(1,2).

A concentração de XB na bÍlis é geralmente maior do que a correspondente às amostras de sangue, por isso é apenas necessário um pequeno volume de amostra seguida de diluição, e exige um pré-tratamento adequado para reduzir a presença de interferentes (como os sais biliares)^(1,2).

Órgãos e Tecidos

A colheita de órgãos para análise pode ser útil quando existe um período prolongado PM, nomeadamente na presença de cadáveres em estado avançado de putrefação e sempre que os fluidos corporais não estejam disponíveis ou sejam difíceis de obter⁽⁴⁾.

Os resultados quantitativos a partir de órgãos não são fáceis de interpretar, mas podem ser valiosos no esclarecimento dos resultados do sangue PM. É recomendável que os órgãos sejam colhidos apenas após a evisceração⁽⁴⁾.

Fígado

O fígado tem sido descrito como o órgão sólido de primeira escolha a ser usado nos casos de toxicologia PM. Os resultados toxicológicos obtidos são as concentrações de XB no fígado, que muitas vezes complementam os dados toxicológicos obtidos a partir do sangue⁽¹⁾.

As vantagens deste órgão incluem o facto de ser o local onde a maioria das substâncias é metabolizada, de conter uma quantidade suficiente para análise, de ser relativamente pouco afetado pelos fenómenos de redistribuição e difusão PM e para o qual existem mais dados analíticos disponíveis⁽¹⁾.

O interior do lóbulo direito do fígado é o local preferencial de colheita, já que é o que se encontra mais afastado do estômago e, por isso é menos afetado pela difusão PM, em casos de *overdose* de XB por via oral e requer homogeneização^(1,4).

O fígado é particularmente útil para determinar antidepressivos tricíclicos e muitos outros XB que se ligam fortemente às proteínas. Uma análise hepática permite diferenciar uma *overdose* aguda de toxicidade crónica resultante do uso extensivo de XB com janela terapêutica estreita. Devido à lipossolubilidade de alguns XB e ao elevado conteúdo lipídico na composição do fígado, é provável que ocorra a retenção de muitos fármacos, fazendo com que estes tenham um tempo de semivida maior⁽¹⁾.

Rim

O rim é uma amostra útil para a identificação de XB, uma vez que a maioria dos fármacos e seus metabolitos passam através dos rins como consequência da eliminação urinária. É relevante em casos de intoxicação por metais pesados devido à sua tendência de acumulação nos rins e para a observação dos cristais de oxalato de cálcio nas intoxicações do etilenoglicol. Para além disso, um dano estrutural nos rins devido à exposição aos metais pesados e ao etilenoglicol pode ser histologicamente comprovado, corroborando a análise toxicológica^(1,4,5).

Pulmão

Altas concentrações de XB são frequentemente encontradas no tecido pulmonar, nomeadamente após uma intoxicação por via inalatória ou intravenosa⁽¹⁾.

Quando há uma suspeita de morte mediada pelo abuso de uma substância volátil ou anestésico, o pulmão é uma amostra disponível para a investigação toxicológica. Nos casos de morte por intoxicação com o herbicida paraquato o pulmão deve ser sempre sujeito a análise, já que este composto fica retido neste órgão, e porque é comum obterem-se falsos negativos a partir de amostras de sangue⁽¹⁾.

Para que seja reduzida a interferência do fenómeno de difusão PM proveniente do estômago, é recomendado que seja colhido o ápice do pulmão direito^(1,4).

Cérebro

O cérebro é um tecido rico em lípidos na sua composição e, por isso é uma amostra útil para avaliar a exposição de XB, uma vez que é o local de ação primária para muitos fármacos de características lipofílicas (e.g. organoclorados). Este órgão está mais protegido anatomicamente e, por isso, é mais resistente à decomposição e tem relevância na perspectiva da interpretação dos efeitos tóxicos dos XB ao nível do sistema nervoso central^(2,4).

A atividade metabólica cerebral também é mais baixa em comparação com outros órgãos e, não é afetado pelo fenómeno de difusão e RPM. Estes fatores aumentam, assim, a probabilidade da deteção dos XB no cérebro, especialmente para compostos pouco estáveis, como a cocaína⁽¹⁾.

Não está especificada qual a região anatómica do cérebro que deve ser colhida para análise. No entanto, a literatura refere que o cérebro não pode ser considerado como um único compartimento no que se refere à farmacocinética, devido à sua diferente composição e estrutura complexa, variando as concentrações dos XB de região para região. É

recomendado que ao ser efetuada a colheita da amostra cerebral seja bem documentado o seu local anatómico^(1,5).

Baço

O baço é um órgão muito vascularizado, sendo útil para a análise de XB que se ligam à hemoglobina, como o monóxido de carbono e os cianetos⁽¹⁾.

Frequentemente, em mortes causadas por incêndios onde há uma extensa carbonização do cadáver, e o sangue não está disponível, o baço pode ser a única amostra disponível para a realização das análises toxicológicas^(1,4).

Ossos e Medula Óssea

Em circunstâncias onde exista extensa decomposição, carbonização, exsanguinação ou fragmentação do corpo, o osso pode ser uma potencial amostra indicativa da exposição a XB⁽¹⁾.

O osso é colhido a partir de restos esqueletizados, sendo que os ossos longos, como o fémur, são preferíveis e particularmente na forma de segmentos de anéis de fémur. Os ossos longos são supridos com maiores quantidades de sangue, e portanto o grau de contacto dos XB com as estruturas ósseas depende da sua localização anatómica e aporte sanguíneo^(1,4).

XB como antidepressivos, antipsicóticos, benzodiazepinas e respetivos metabolitos foram já encontrados nos ossos e correspondem aos resultados qualitativos encontrados no sangue. Os fatores que influenciam a deposição dos XB nesta matriz incluem o tempo de exposição (aguda ou crónica), o local da colheita do osso, tipo de osso, distribuição PM e as características físico-químicas do XB. XB com tempo de semivida curtos não são depositados nos ossos, já os metabolitos polares e ligados às proteínas plasmáticas são depositados embora em baixa extensão⁽¹⁾.

Estudos revelaram não haver qualquer relação entre a concentração sanguínea de XB e a probabilidade de obter resultados positivos no osso. É reconhecido que o tecido ósseo é continuamente remodelado, deste modo os XB incorporados são libertados e redistribuídos na corrente sanguínea. O que significa que uma deteção negativa no osso não pode eliminar uma exposição a um XB, tal como um resultado positivo não irá adiantar informação relevante acerca do tempo de exposição. Os XB incorporados em estruturas ósseas permanecem longos períodos de tempo armazenados devido ao lento *turnover* do osso, aumentando assim a janela de deteção⁽¹⁾.

A medula óssea compreende o tecido vascular presente na cavidade interna dos ossos responsável pela hematopoiese. Foi demonstrada a relação existente entre a concentração de alguns XB no sangue e na medula óssea, incluindo antidepressivos tricíclicos, barbitúricos, benzodiazepinas e o etanol. A medula óssea é assim considerada um tecido alternativo de análise em TF, não sendo utilizada frequentemente, exceto nos casos em que outras amostras biológicas estão indisponíveis, em caso de putrefação avançada, esqueletização ou exsanguinação⁽¹⁾.

Algumas das vantagens desta matriz é que é recuperável após esqueletização, a putrefação da medula é um processo lento, apresenta alto grau de vascularização e é uma matriz lipídica que pode atuar como um depósito de XB lipófilos, permitindo assim, uma análise qualitativa dos XB. Não existem especificações em relação ao local de colheita, no entanto têm sido selecionadas as costelas por ser um local de fácil acesso aquando da realização da autópsia e por não alterar de forma marcada a estrutura do cadáver^(1,4).

Músculo Cardíaco

O músculo cardíaco também é considerado uma amostra útil para a identificação de XB. A colheita do ventrículo esquerdo deve ser considerada para ajudar na interpretação dos dados sanguíneos em intoxicações por digitálicos^(1,4).

Músculo Esquelético

O músculo esquelético apresenta um grande potencial de aplicações na TF PM. Está presente em grandes quantidades, encontra-se disponível nos casos de avançado estado de decomposição do cadáver, uma vez que é relativamente menos propenso à autólise em casos de traumas e incêndios e é usado como indicador das concentrações sanguíneas PM. Geralmente é efetuada a colheita do músculo íliopsoas, que se situa na região do quadril, no trocânter do fémur^(1,4).

Assim, os toxicologistas recomendam a colheita do músculo esquelético nos casos onde os XB estejam implicados na causa de morte, já que a concentração dos XB no tecido muscular reflete a concentração do sangue (e.g. drogas de características básicas e o etanol) à exceção de intoxicações agudas, uma vez que não houve tempo necessário de distribuição para os tecidos. Pode também ser útil na investigação do sítio da injeção devido à elevada concentração de XB que se encontram nestes locais^(1,5).

Requer pré-tratamento, pelo que é necessário proceder à homogeneização da amostra o que torna o processo mais complicado⁽¹⁾.

Tecido Adiposo

A colheita de tecido adiposo pode ser considerada para XB lipófilos, mas raramente é útil, pelo facto da sua extração ser complicada e porque existem variações consideráveis na concentração dos compostos químicos neste tecido^(1,4).

Quando utilizado é colhido o tecido adiposo subcutâneo da zona abdominal⁽¹⁾.

Matrizes Alternativas

Nos últimos anos, o uso de matrizes não convencionais aplicou-se em diferentes campos da rotina clínica e legal, sobretudo quando outras amostras não estão disponíveis ou existem mas não são viáveis devido aos processos PM. A colheita de algumas destas amostras não é invasiva e não requer um ambiente hospitalar, e para além disso a maior parte das matrizes alternativas apresentam uma ampla janela de deteção e proporcionam informação retrospectiva no tempo^(1,14) (Figura 3).

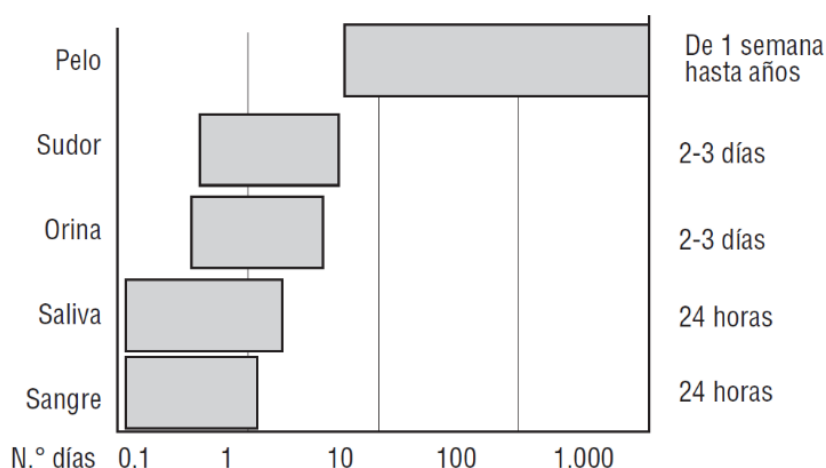


Figura 3 – Janelas de deteção de diferentes amostras biológicas⁽¹⁵⁾

Cabelo

O cabelo é uma matriz biológica complexa composta por proteínas (maioritariamente queratina), água, e uma baixa percentagem de minerais e lípidos. Os fios capilares têm origem na matriz, localizada na base do folículo capilar, abaixo da superfície da epiderme. Os folículos capilares localizam-se no interior da pele do couro cabeludo e são circundados por vasos capilares arteriais, assim como glândulas sudoríparas⁽⁶⁾.

O cabelo é particularmente útil para a definição do padrão histórico da exposição, como por exemplo em casos de agressão sexual facilitada de drogas, exposição crónica a metais pesados, drogas de abuso, entre outros. Se numa investigação forense há suspeita do consumo recente de determinado XB, para ser possível o uso desta matriz biológica é

necessário esperar pelo menos 4 semanas para que haja tempo suficiente para a deposição das substâncias na queratina. A segmentação do cabelo permite estabelecer um cronograma na determinação do tempo de exposição aos XB, definição do historial de abuso ou alterações no seu consumo (como abstinência), baseado na sua taxa de crescimento, aproximadamente de 1 cm por mês^(1,4,5,15,16).

Existem vários mecanismos de incorporação dos XB no cabelo: a integração através da difusão ativa ou passiva do sangue presente nos vasos capilares para o folículo capilar; a incorporação através do suor e secreções provenientes das glândulas sudoríparas e sebáceas adjacentes à porção intradérmica do pelo; e assimilação de substâncias externas (presentes no ambiente), que acabam por se depositar e permanecer na fibra capilar. À medida que as células se alongam e envelhecem, morrem e coalescem, formando a fibra capilar com a droga incorporada na matriz. Portanto, as drogas são incorporadas progressivamente, e deste modo poderão estar presentes em determinado segmento do cabelo, dependendo da taxa de crescimento dos fios⁽⁶⁾. Após a incorporação, os XB não são sujeitos a metabolização e, existe uma grande variedade interindividual em relação aos processos de retenção das drogas, pelo que não se pode estabelecer uma correlação entre a dose consumida e a concentração detetada^(1,15).

O conteúdo proteico, especialmente a melanina, afeta a ligação da droga ao cabelo, pois funciona como sítio de ligação para estas substâncias. Fatores como a lipossolubilidade e basicidade dos compostos também influenciam a sua incorporação no cabelo: drogas de carácter básico (e.g. a cocaína e anfetaminas) tendem a incorporar-se em maior quantidade quando comparadas com drogas de carácter ácido ou neutro (e.g. os canabinóides ou benzodiazepinas). A incorporação dos metais pesados (como arsénio, chumbo e mercúrio) nesta matriz processa-se através da ligação dos grupos sulfidrílo presentes nas moléculas de cisteína (abundantes no cabelo e unhas), formando ligações covalentes^(2,6). Foram também realizados estudos que comprovaram que, em geral, são encontradas concentrações de XB mais elevadas em cabelos pigmentados devido à sua ligação à melanina⁽¹⁵⁾.

A amostra de cabelo deve ser colhida na região do vértice posterior da cabeça onde o crescimento do cabelo é mais homogéneo e menos afetado pelas condições externas (Figura 4). Recomenda-se a colheita de duas madeixas independentes, equivalente à espessura de dois dedos, em duplicado para permitir a realização de uma análise confirmatória caso a primeira seja positiva. Na ausência de cabelo ou em quantidade diminuída deve-se considerar a utilização do pelo axilar, púbico, dos braços ou barba, contudo as diferenças biológicas entres os diferentes tipos de pelo têm de se ter em atenção para uma correta interpretação dos resultados analíticos. Estes apresentam uma velocidade

de crescimento muito mais lenta que o cabelo e a sua análise proporciona uma informação mais prolongada no tempo. No entanto, são mais afetados por contaminação de secreções sebáceas e sudoríparas e pela urina, no caso dos pelos púbicos^(1,2,4,6,15).

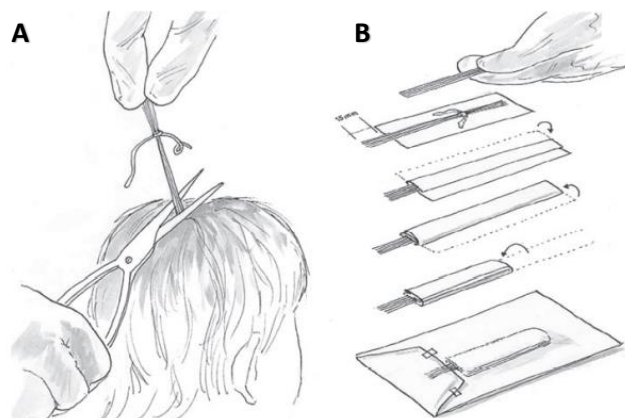


Figura 4 – Método de colheita de amostras de cabelo com finalidade toxicológica⁽¹⁷⁾

(A) O cabelo deve ser retirado da região do vértice posterior da cabeça, o mais próximo possível do couro cabeludo. A amostra de cabelo deve ser firmemente apertada e amarrada com fio de algodão. (B) Devem-se alinhar as raízes da amostra e colocar cuidadosamente sobre um pedaço de folha de alumínio, que é dobrado.

A análise ao cabelo adquiriu grande interesse nas últimas décadas, uma vez que fornece uma longa janela de deteção sendo uma das grandes vantagens em comparação com outras matrizes biológicas, tal como o método de colheita não invasivo, de fácil transporte e armazenamento, e devido à sua alta estabilidade o cabelo permite inferir acerca da exposição à droga, desde várias semanas até alguns meses, dependendo do seu comprimento. Entre as suas múltiplas aplicações a análise do cabelo permite o seguimento de pacientes submetidos a tratamentos de desabituação de drogas, pelo controlo sequencial do tratamento terapêutico^(2,6,15,16).

A estabilidade e retenção dos XB no cabelo são afetadas com os tratamentos cosméticos. Uma etapa de lavagem da amostra é importante para eliminar compostos externamente ligados. Nesta amostra, a concentração dos analitos é geralmente muito baixa, de modo que a alta sensibilidade dos métodos analíticos é essencial⁽⁶⁾.

Unhas

As unhas das mãos e pés, tal como o cabelo, são constituídos por tecido queratinizado e são consideradas amostras úteis para pesquisa de drogas e metais pesados, pois acumulam estas substâncias durante longos períodos, proporcionando uma janela de deteção retrospectiva. Ao contrário do cabelo, o facto de as unhas não possuírem melanina reduz a incorporação dos XB, no entanto é bastante útil quando o cabelo é demasiado curto ou não está disponível, como nos casos de alopecia. Atualmente existe ainda pouca

informação relativa ao processamento de substâncias tóxicas nas unhas, o que faz com que a interpretação dos resultados seja mais complexa^(1,3,5).

A amostra deve ser colhida com uma tesoura de aço inoxidável revestido de teflon, de forma a reduzir contaminações⁽⁴⁾. Há analistas que defendem que devem ser colhidas, preferencialmente, as unhas dos pés porque são menos expostas a contaminação externa⁽¹⁾.

Ar Expirado

A análise do ar expirado é um método de diagnóstico não invasivo que mede a concentração de compostos voláteis no ar expirado. Esta matriz traz vantagens consideráveis no âmbito da segurança rodoviária, uma vez que permite a realização de testes ao álcool de uma forma simples e rápida, no próprio local da bordagem, não exigindo profissionais especializados e sem necessidade de análises sanguíneas⁽¹⁾.

Esta matriz permite para além do etanol detetar o seu metabolito, acetaldeído, e avaliar a exposição a outros XB como monóxido de carbono, cianetos e anestésicos⁽¹⁾.

Líquido Cefalorraquidiano

O LCR é um fluido de aparência límpida e incolor, com um volume total que varia entre 100-160 mL em adultos. É produzido pelos plexos coroides, que ocupam o espaço subaracnoide no cérebro e espinal medula. Está anatomicamente isolado sendo menos suscetível a contaminação bacteriana, e por isso é considerado estéril^(1,5).

Esta matriz é raramente usada em análises toxicológicas, mas quando necessário é colhido por meio de punção lombar ou por punção suboccipital, na base do pescoço, esta última é preferível nos casos PM. Os XB podem entrar no LCR diretamente através dos plexos coroides, ou indiretamente atravessando a barreira hematoencefálica^(1,5).

Contudo os dados relativos às concentrações de XB no LCR são escassos o que limita a sua aplicabilidade na interpretação dos resultados analíticos⁽¹⁾.

Efusão Pleural e Fluido Pericárdico

A efusão pleural é a acumulação de fluido na cavidade pleural, entre as camadas de tecido que revestem os pulmões e a cavidade torácica, resultante da putrefação. É considerada uma amostra alternativa para estimar os níveis de XB, nos casos de avançada putrefação quando a amostra de sangue não está disponível, sendo recomendada a adição de fluoreto de sódio como conservante⁽¹⁾.

O fluido pericárdico constitui um ultrafiltrado do plasma contido no pericárdio, formação sacular que envolve o coração. Devido à sua localização este fluido não é

suscetível de contaminação por microrganismos tendo sido adicionado à lista de fluidos biológicos sujeitos a análise nas autópsias com melhores interpretações dos resultados que o sangue. Foi demonstrado o interesse desta matriz na análise de drogas de abuso como a morfina e cocaína⁽¹⁾.

Amostras Entomológicas

O potencial do uso de insetos na deteção de XB nos tecidos em decomposição tem sido demonstrada em diversos estudos e artigos da área forense. As larvas das moscas (*maggots*), usualmente das famílias *Calliphoridae* (moscas varejeiras), *Sarcophagidae* (moscas da carne) e *Muscidae* (moscas domésticas) podem ser importantes quando a decomposição impede que as amostras convencionais sejam obtidas^(1,4).

Dependendo da temperatura, as larvas podem ser encontradas entre 1 a 2 dias após a morte. Diferentes XB como benzodiazepinas, antidepressivos tricíclicos, opióides, cocaína e o organofosfato malatião foram já identificados neste tipo de amostras entomológicas, no entanto a concentração destes XB depende do tecido do qual a mosca se alimentou, bem como do seu estágio de desenvolvimento que é influenciado pelo tipo de XB presentes no cadáver⁽¹⁾.

Após a colheita dos insetos encontrados nos restos humanos, estes devem ser congelados, sujeitos a pré-tratamentos de lavagem para remoção de contaminações externas, homogeneização, e de seguida o processo analítico é efetuado de forma similar às amostras de tecidos. Requer uma análise rápida já que a larva elimina rapidamente os XB após a remoção da fonte de alimento. Contudo, sob condições de refrigeração, enquanto a larva se encontra em estágio de diapausa, a eliminação dos XB fica mais lenta, ocorrendo ao longo de várias semanas^(1,5).

Estudos recentes sugerem que há uma relação quantitativa entre a concentração de XB na larva e o órgão que lhes serviu de alimento. Outros apenas indicam que estas amostras fornecem dados qualitativos. No entanto, atualmente e devido à ampla variação das conclusões destes estudos é razoável considerar que a acumulação de XB nas larvas e respetiva quantificação é ainda imprevisível⁽¹⁾.

PROCEDIMENTO ANALÍTICO EM TOXICOLOGIA FORENSE

A sequência de procedimentos empregues na pesquisa toxicológica, desde a requisição de autópsia ou exame clínico pelas autoridades judiciais, com o envio das amostras ao laboratório, até à elaboração do relatório toxicológico, assenta em alguns passos fundamentais, como a seguir se demonstram na Figura 5:

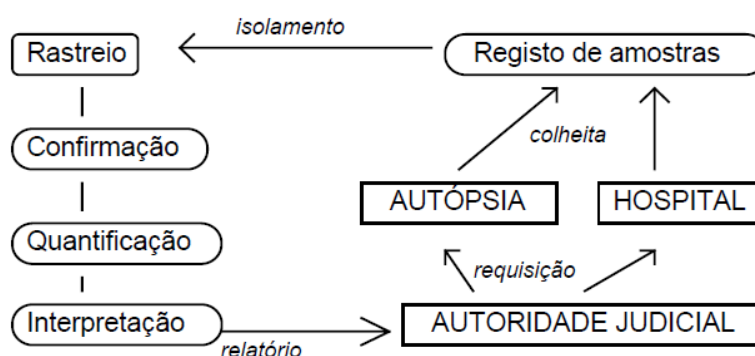


Figura 5 – Sequência de procedimentos aplicados na pesquisa toxicológica⁽¹⁰⁾

Preparação da Amostra

A preparação da amostra é um procedimento chave das análises toxicológicas, pois é nesta fase que se procede ao isolamento e concentração do composto tóxico, minimizando e eliminando os interferentes que podem comprometer a seletividade e sensibilidade ao analito de interesse na matriz biológica, com a intenção de lhe serem aplicadas as técnicas de análise instrumental, para deteção e quantificação das substâncias de interesse forense^(6,10).

As técnicas de preparação das amostras exigem condições para serem aplicadas, entre elas, a perda mínima de amostra com remoção eficaz dos interferentes, a alta recuperação do analito, baixos tempos de análise e custo⁽⁶⁾.

Métodos Analíticos

As metodologias de investigação passam por uma série de fases: *screening*, confirmação, quantificação e interpretação. Iniciam-se por um teste geral, que deteta um grande número de substâncias, permitindo fazer uma triagem das amostras negativas e, só numa fase posterior se recorre aos métodos de confirmação, que permitem confirmar a presença da substância suspeita, bem como identificá-la e/ou quantificá-la⁽¹⁰⁾.

O *screening* é efetuado pela utilização de métodos de elevada sensibilidade e fraca especificidade, no entanto estes testes são limitados, pelo que um resultado positivo só pode ser encarado como tal, se se confirmar através do recurso a testes de identificação e confirmação⁽¹⁰⁾.

As principais técnicas de *screening* dos compostos tóxicos são sobretudo métodos clássicos não instrumentais, como os testes colorimétricos e a cromatografia em camada fina (TLC) ou outros mais sofisticados como os imunoensaios, cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC). O uso da cromatografia (LC e/ou GC) é frequente para separar, identificar e detetar compostos ou drogas apresentando várias vantagens e funcionalidades sendo a cromatografia gasosa (e.g. GC/MS, GC/MSMS) ou a líquida (e.g. LC/MS, LC/MSMS) as técnicas de referência em TF. Métodos uni ou multianalíticos têm sido frequentemente relatados na literatura científica e amplamente aplicados na rotina laboratorial porque apresentam seletividade, sensibilidade e fiabilidade elevadas proporcionando maiores certezas na identificação dos compostos de interesse⁽⁴⁾.

CONCLUSÃO

Em TF executam-se perícias toxicológicas que implicam investigação toxicológica no vivo ou no cadáver, baseada em procedimentos de garantia de qualidade e da cadeia de custódia, com o objetivo de esclarecer questões de âmbito judicial supostamente relacionadas com intoxicações⁽¹⁰⁾.

Os exames *in vivo* têm como objetivo a avaliação da intoxicação como circunstância qualificadora do delito, como causa de perigosidade ou de inimputabilidade. Em caso de morte por intoxicação existe obrigatoriedade de, nesta suspeita, se proceder à autópsia ML, e conseqüentemente, à requisição de perícia toxicológica⁽¹⁰⁾.

Existe uma grande variedade de amostras que podem ser analisadas, conforme a especificidade do caso e tipo de análise pretendida. A utilização de matrizes alternativas para a detecção de XB, especialmente quando outras amostras não estão disponíveis ou existem mas não são viáveis devido aos processos PM têm apresentado relevante importância principalmente devido às suas vantagens quando comparadas com as amostras convencionais, considerando que possuem características interessantes em relação à estabilidade dos analitos, métodos de colheita facilitados e maior janela de detecção^(1,6).

Desafios específicos podem surgir dependendo da matriz escolhida, como nos casos PM as alterações que as amostras sofrem nos processos de autólise, redistribuição e putrefação podem conferir dificuldades adicionais. Uma apropriada seleção, colheita, armazenamento e conservação das matrizes biológicas são fatores cruciais que influenciam a qualidade destas e, por conseguinte a interpretação dos resultados analíticos^(5,6,10).

Os avanços relativos à preparação das amostras e ao uso de técnicas analíticas de alta sensibilidade foram fundamentais para o desenvolvimento das análises toxicológicas forenses, pois possibilitaram a detecção de drogas e seus metabolitos em baixas concentrações e em matrizes complexas⁽⁶⁾. Apesar disto, atualmente, o principal obstáculo à utilização da grande variedade de matrizes alternativas está representado pela ausência de métodos de análise universalmente reconhecidos e estandardizados⁽¹⁵⁾.

Não basta apenas identificar a nível das amostras orgânicas uma substância com relevância toxicológica, mas para além disso, é essencial interpretar adequadamente os resultados obtidos face às variáveis disponíveis. Assim, a interpretação deve ter por base todas as informações disponíveis incluindo os resultados toxicológicos AM ou PM, local da colheita de amostras PM, circunstâncias da morte, história clínica, informações da cena do crime e os achados da autópsia^(1,10).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CARVALHO, F.; DUARTE, J. A.; REMIÃO, F.; MARQUES, A.; SANTOS, A. **Collection of biological samples in forensic toxicology.** Toxicology Mechanisms and Methods. Universidade do Porto. 2010.
2. FRANCO, J. M. **Recomendações para a colheita e acondicionamento de amostras em toxicologia forense.** [Internet]. 2013. Available from: <http://www.inml.mj.pt/wdinmlWebsite/Data/file/OutrasInformacoes/PareceresOrientacoesServico/Normas/NP-INMLCF-009-Rev01.pdf>. [Accessed on July 4th, 2016].
3. **A simplified guide to forensic toxicology.** [Internet]. Available from: <http://www.forensicsciencesimplified.org/tox/Toxicology.pdf>. [Accessed on July 8th, 2016].
4. DINIS-OLIVEIRA, R. J.; CARVALHO, F.; BASTOS, M. **Toxicologia Forense.** 1^a Ed. Pactor-Edições de Ciências Sociais, Forenses e da Educação, 2015.
5. KERRIGAN, S. **Sampling, storage and stability.** Clarke's Anal Drug Poisons. (2011), 445–457.
6. BORDIN, D.; MONEDIRO, F.; CAMPOS, E.; ALVES, M.; BUENO, P.; MARTINIS, B. **Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense.** Scientia Chromatographica. 7, 2 (2015), 125–143.
7. DRUMMER, O. H. **Post-mortem toxicology.** Forensic Science International. 165, 2-3 (2007), 199–203.
8. SANTIAGO, V.; VASCONCELOS, A.; OLIVEIRA, N.; CÂNDIDO, M.; SANTOS, B.; NETO, J. **Humor Vítreo: Um amostra biológica de interesse forense.** Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade. 8,1 (2015), 8–18.
9. JUSTIÇA, M. **Procedimento operacional padrão : perícia criminal.** Secretaria Nacional de Segurança Pública. 2000 (2013), 17–242.
10. RANGEL, R. Toxicologia. **Toxicologia Forense.** Noções gerais sobre outras ciências forenses. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. 2004.
11. MILLO, T.; JAISWA, A. K.; BEHERA, C. **Collection , preservation and forwarding of biological samples for analysis in medicolegal autopsy cases : A review.** Journal of Indian Academy of Forensic Medicine. 30, 2, 96–100.
12. PEREIRA, C. P., **A importância médico-legal e criminalística da saliva : sistematização da sua aplicação nas ciências forenses.** Revista Portuguesa de Estomatologia, M. Dentária e C. Maxilofacial. 5, 1 (2016), 3–6.

13. VÁZQUEZ, Z. S. **Estudios químicos forenses de humor vítreo.** [Internet]. Available from:
<http://www.calera.gob.mx/web/images/HUMOR%20VITREO%20Publicacion.pdf>.
[Accessed on July 13th, 2016].
14. GÓMEZ, S. O. **Matrices biológicas y biomarcadores de exposición fetal a drogas de abuso durante el tercer trimestre de la gestación.** Universitat Autònoma de Barcelona. 2012.
15. BARRERA, A. M.; DUQUE, M. J. **Determinación de drogas de abuso en pelo.** Revista Española de Medicina Legal. 37, 2 (2011), 59–66.
16. MARZANO, A. B. **El pelo como elemento diagnóstico en Toxicología Forense.** Revista Digital de Ciencias. 11, 6 (2011).
17. GORDO, J. M. **O cabelo como amostra biológica em toxicologia forense: colheita, análise e áreas de aplicação.** Universidade Fernando Pessoa. 2013.

ANEXOS

ANEXO I

Esquematização das Vantagens e Desvantagens das Matrizes Biológicas⁽⁵⁾

Specimen	Advantages	Disadvantages
Amniotic fluid	<ul style="list-style-type: none"> • Determination of prenatal drug exposure • Not readily adulterated • Minimal sample preparation • Relatively few interferences 	<ul style="list-style-type: none"> • Invasive collection • Risk of complications • Limited reference data • Collection by medical personnel
Bile	<ul style="list-style-type: none"> • Ease of detection of certain drugs (accumulation) • Particularly useful for conjugated drugs 	<ul style="list-style-type: none"> • Complex matrix • Interferences due to bile salts and fats • Requires sample preparation/pretreatment • Limited reference data
Blood (AM)	<ul style="list-style-type: none"> • Widely accepted matrix • Determines recent drug use (hours–days) • Related to pharmacological effect • Not readily adulterated • Extensive reference data 	<ul style="list-style-type: none"> • Invasive collection • Collection by medical personnel • Shorter detection time
Blood (PM)	<ul style="list-style-type: none"> • See above (AM) • Reference data widely available • Central/peripheral blood drug ratios known for some drugs • Cardiac blood typically in plentiful supply but requires caution with interpretation 	<ul style="list-style-type: none"> • Susceptible to postmortem redistribution (central) • Susceptible to postmortem artefacts and interferences • Susceptible to contamination (e.g. trauma) • Quality of specimen highly dependent on collection protocol • Limited volume of peripheral blood
Brain	<ul style="list-style-type: none"> • Particularly useful for lipophilic drugs, volatiles and centrally acting drugs 	<ul style="list-style-type: none"> • Non-homogeneous matrix • Drug concentrations vary by region • Complex matrix • Requires sample preparation/pretreatment • Limited reference data
Breast milk	<ul style="list-style-type: none"> • Determination of neonatal drug exposure • Not readily adulterated • Many drugs present 	<ul style="list-style-type: none"> • Privacy, invasive collection • Limited reference data • Interferences due to high lipid content • Drug content varies with milk composition • Variable matrix
Cerebrospinal fluid	<ul style="list-style-type: none"> • Determines recent drug use (hours–days) • Minimal sample preparation • Relatively few interferences 	<ul style="list-style-type: none"> • Invasive collection • Limited reference data
Gastric contents	<ul style="list-style-type: none"> • Identification of acute ingestion/delayed absorption • Identification of pill fragments possible • Particularly useful for orally administered drugs/poisons 	<ul style="list-style-type: none"> • Non-homogeneous matrix • Complex matrix • Requires sample preparation/pretreatment • Requires total specimen collection for interpretation
Hair	<ul style="list-style-type: none"> • History of drug use (months) • Readily available, easy collection • Low potential for donor manipulation • Useful for drug and non-drug analytes, e.g. metals 	<ul style="list-style-type: none"> • New technology • Recent drug use not detected • Environmental contamination • Potential for ethnic bias • Limited reference data
Kidney	<ul style="list-style-type: none"> • Particularly useful for non-drug analytes, e.g. metals 	<ul style="list-style-type: none"> • Complex matrix • Requires sample preparation/pretreatment

Specimen	Advantages	Disadvantages
Liver	<ul style="list-style-type: none"> • Ease of detection of certain drugs (accumulation) • Interpretive value for some drugs • Reference data available 	<ul style="list-style-type: none"> • Complex matrix • Requires sample preparation/pretreatment
Lung	<ul style="list-style-type: none"> • Particularly important for volatile analyses 	<ul style="list-style-type: none"> • Complex matrix • Requires sample preparation/pretreatment
Meconium	<ul style="list-style-type: none"> • Long-term window of drug exposure • Non-invasive sample collection 	<ul style="list-style-type: none"> • Non-homogeneous matrix • Complex matrix (waxy) • Interferences • Requires sample preparation/pretreatment • Limited reference data
Nails	<ul style="list-style-type: none"> • Easy collection • History of drug use (months) • Particularly useful for metals 	<ul style="list-style-type: none"> • Limited data • New technology • Not yet widely accepted • Recent drug use not detected • Environmental contamination
Saliva (oral fluid)	<ul style="list-style-type: none"> • Readily available, easy collection • Parent drug present • Related to free drug concentration in plasma • Minimal sample preparation • Many drugs determined • Indicates recent drug use 	<ul style="list-style-type: none"> • New technology • Short drug detection time • Small sample volume (1–5 mL) • Potential for oral contamination • Collection method influences specimen pH and drug content
Spleen	<ul style="list-style-type: none"> • Particularly useful for certain analytes if no blood is available 	<ul style="list-style-type: none"> • Complex matrix • Requires sample preparation/pretreatment • Limited data for most analytes
Sweat	<ul style="list-style-type: none"> • History of drug use (weeks) • Cumulative measure of drug use • Parent drug present • Non-invasive collection • Less frequent drug testing required • Not readily adulterated 	<ul style="list-style-type: none"> • Newer technology • Potential for environmental contamination • High inter-subject variability • Requires special collection device • Skin irritation and discomfort • Small sample volume • No pharmacological interpretation possible • Non-homogeneous matrix (sweat/sebum)
Urine	<ul style="list-style-type: none"> • Widely accepted matrix • Easy collection • Plentiful supply • Amenable to automated analysis • Longer detection window than blood (days–weeks) 	<ul style="list-style-type: none"> • Potential for donor manipulation • Minimal parent drug • Not useful for quantitative analysis • Not related to impairment or pharmacological effect
Vitreous humour	<ul style="list-style-type: none"> • Determines recent drug use (hours–days) • Related to pharmacological effect • Resistant to putrefaction • Interpretive value for ethanol-related investigations • Minimal sample preparation 	<ul style="list-style-type: none"> • Limited data compared with blood • Small sample volume

ANEXO 2

Procedimentos Relativos à Detecção da Influência de Substâncias Psicoativas na Circulação Rodoviária (Adaptado)⁽¹⁰⁾

A legislação do Código da Estrada (Decreto-Lei n° 265-A/2001, de 28/09) na parte relativa à fiscalização da circulação na via pública sob efeito de álcool e das substâncias legalmente consideradas estupefacientes ou psicotrópicas pressupõe a participação, além das autoridades fiscalizadoras, dos serviços de urgência hospitalares e do Instituto Nacional de Medicina Legal (INML).

Aos primeiros compete executar os procedimentos de avaliação clínica e de colheita de amostras biológicas, realizar os exames de rastreio analítico a estupefacientes e psicotrópicos e, caso necessário, requisitar exames toxicológicos de quantificação de álcool no sangue ou de confirmação da presença de estupefacientes e psicotrópicos através da remessa de amostras adequadas em bolsas próprias à Delegação do INML da área respetiva.

Aos Serviços de Toxicologia Forense do INML compete equipar e distribuir as bolsas destinadas à colheita de amostras biológicas, verificar o cumprimento dos procedimentos de cadeia de custódia, e executar as análises toxicológicas de quantificação de álcool no sangue ou de confirmação da presença de estupefacientes e psicotrópicos por equipamentos e metodologias adequadas.

A realização de exames clínicos e de colheita de amostras biológicas para diagnóstico do estado de influenciado por substâncias aplica-se, quer em indivíduos admitidos no serviço de urgência na sequência de acidentes de viação, quer em indivíduos conduzidos ou notificados pelas autoridades fiscalizadoras para serem avaliados no serviço de urgência no âmbito de operações de fiscalização.

Quando se suspeita que um indivíduo possa estar influenciado pelo álcool etílico, se tiver sido possível, antes da sua admissão hospitalar a autoridade fiscalizadora procedeu aos exames prévios de determinação da taxa de álcool no sangue (TAS) através de aparelhos de medição no ar expirado. Deste modo, interessa a realização de contraprova mediante análise de sangue, pelo que compete ao serviço hospitalar a colheita de amostra de sangue, preenchimento da requisição de exame de quantificação de TAS e remessa da respetiva bolsa contendo requisição e amostra de sangue ao INML. Na impossibilidade da colheita de amostra de sangue, o médico deve proceder a exame clínico adequado.

No que se refere ao diagnóstico do estado de influenciado por substâncias legalmente consideradas estupefacientes ou psicotrópicas, em virtude das autoridades não disporem de

métodos com vista à sua deteção, todos os indivíduos envolvidos em acidentes de viação dos quais resultem mortos ou feridos graves, bem como os conduzidos pelas autoridades ao serviço de urgência com esse objetivo devem ser avaliados por médico, seja por via de exame médico de rastreio, seja através de exame analítico de rastreio na urina, por utilização de imunoenaios, efetuado a nível do serviço de patologia clínica do hospital. Os exames analíticos de rastreio a realizar no hospital destinam-se a despistar a presença de substâncias que integrem os seguintes grupos: metabolitos da marijuana, opiáceos, cocaína e metabolitos e anfetaminas e derivados. Somente em caso de algum dos exames analíticos de rastreio dar resultado positivo é que o médico responsável deve providenciar pela remessa ao INML de amostras de urina e de sangue colhidas ao examinando, acompanhadas de requisição de análise toxicológica de confirmação da presença de psicotrópicos.

Os conjuntos de recolha de amostras, também designados como Kit's, dos quais fazem parte as bolsas a enviar ao INML são fornecidos pela autoridade fiscalizadora (PSP ou GNR). Outros elementos como data/hora de colheita das amostras, resultados de exames prévios, tipo de amostras enviadas, terapêuticas efetuadas, e identidade do serviço hospitalar e do médico responsável são essenciais para evitar falhas de procedimento.

Os Serviços de Toxicologia Forense assumem o papel de entidade reguladora por garantir a segurança dos materiais incluídos nos Kit's, pela execução de análises rigorosas com o intuito de confirmar a presença de psicotrópicos ou estabelecer a taxa de alcoolemia em amostras biológicas, e pelo controlo dos procedimentos relativos à cadeia de custódia de amostras.

ANEXO 3

Casos Práticos Referentes a Diferentes Áreas de Aplicação das Análises ao Cabelo e Interpretação dos Resultados (Adaptado)⁽¹⁷⁾

I. Crimes facilitados por drogas

O GHB, também conhecido por “droga da violação”, é bastante utilizado em crimes sexuais. O GHB é produzido endogenamente pelo organismo, o que por si só não permite afirmar que a exposição a esta substância tenha ocorrido fruto de administração exógena. Diferentes doses de GHB induzem efeitos distintos. O GHB provoca amnésia na dose de 10 mg/kg, entre 20 e 30 mg/kg induz o sono, e em doses superiores a 50 mg/kg provoca anestesia.

Quando administrado exogenamente é rapidamente eliminado do organismo, tornando a sua identificação em amostras de sangue e urina pouco provável, dado que doses superiores a 60 mg/kg são eliminadas em menos de seis horas no sangue, e entre 10 a 12 horas na urina. A colheita de amostras de cabelo três a quatro semanas após o crime revela-se uma alternativa fiável para a identificação deste composto, visto que um aumento na concentração de GHB consistente com a altura em que se supõe que tenha ocorrido a administração permite a diferenciação de concentrações endógenas e exógenas.

Caso I: Uma rapariga de 19 anos alegou ter sido vítima de violação após ter ingerido uma bebida que continha GHB. A rapariga alegou também que não tinha qualquer recordação do sucedido e apenas reportou o crime cinco dias após a violação. O laboratório recomendou que fossem recolhidas amostras de cabelo, tendo sido, no entanto, necessário esperar cerca de um mês, de modo a que o cabelo fosse dotado do comprimento necessário para analisar corretamente o intervalo em que supostamente teria ocorrido a violação. Procedeu-se à análise segmentar do cabelo.

Resultado: Como o xenobiótico já não era passível de ser identificado em amostras de sangue ou urina, após o crescimento do cabelo durante um mês, foi possível detetar a presença do composto no segmento de cabelo correspondente à altura em que ocorreu o crime, na concentração de 2,4 ng/mg. Dado que os outros segmentos apresentavam concentrações consideradas correspondentes a níveis endógenos, entre as 0,6 a 0,8 ng/mg, foi possível confirmar a administração exógena de GHB.

2. Controlo de doping

Apesar das análises de controlo *antidoping* serem efetuadas preferencialmente em amostras de urina, quando efetuadas conjuntamente em amostras de cabelo, torna-se possível obter informação complementar relativa aos períodos que antecederam o momento da análise (semanas a meses). Esta informação permite não só averiguar se foram administrados xenobióticos nas semanas ou meses que antecederam a análise *antidoping* mas também se essa exposição terá ocorrido através de uma administração única ou crónica.

Para além dos fatores acima referidos, a presença de numerosos resultados falsos negativos em análises de urina torna a análise do cabelo uma peça chave. O recurso a esta matriz permite a deteção de xenobióticos administrados durante o período de treino e no período de abstinência, ultrapassando os problemas relacionados com a diminuição da concentração dos xenobióticos em consequência de uma elevada ingestão de líquidos.

O uso de esteroides anabolizantes encontra-se predominantemente associada a atletas de alta competição como forma de aumentar a sua performance. Estes compostos são derivados da testosterona, aumentando deste modo não só o tecido muscular mas também os níveis proteicos a nível genital, ósseo e dérmico, acelerando o processo de recuperação muscular.

Caso 2: Um atleta apresentou resultados positivos para os metabolitos da nandrolona (norandrosterona e noreticolanolona), um esteroide anabolizante sintético, em amostras de urina. A sua carta de atleta foi retirada, mesmo depois deste ter alegado que nunca tinha usado nandrolona. Várias foram as explicações propostas como forma de provar a presença dos metabolitos na urina, tais como contaminação de comida que envolvesse chocolate ou até mesmo secreção endógena. Para os esteroides anabolizantes exercerem os seus efeitos de forma eficiente seria necessário que estes tivessem sido administrados de forma crónica. Como tal, o atleta requereu uma análise ao cabelo para que deste modo fosse provada a sua inocência.

Resultado: Usando limites de deteção da ordem de 1 pg/mg e um limite de quantificação de 10 pg/mg, as amostras de cabelo apresentaram resultados negativos, provando deste modo que a administração não tinha sido efetuada de forma crónica, pelo que os esteroides não poderiam ter sido usados para benefício desportivo.

3. Toxicologia post-mortem

Numa análise toxicológica *post-mortem* é necessário ter em atenção os inúmeros processos que ocorrem no cadáver capazes de influenciar o resultado toxicológico. Um dos fenómenos que mais afeta a análise é a redistribuição *post-mortem*. Este fenómeno traduz-se na alteração da concentração de xenobióticos presentes no sangue em consequência da difusão dos mesmos a partir de compartimentos vizinhos, nomeadamente tecidos e órgãos. Contudo este não é o único fator capaz de influenciar a concentração sanguínea dos xenobióticos *post-mortem*. No caso de cadáveres não frescos, estes apresentam putrefação avançada. O metabolismo associado a estes estados, poderá originar a degradação de compostos lábeis, fazendo com que a sua presença nem sempre seja detetada nas matrizes mais comuns.

Também a produção endógena de compostos, tais como o etanol e cianeto, nos momentos que sucedem à morte está associada a flutuações de concentrações em consequência da atividade bacteriana existente nos corpos em decomposição. Devido às flutuações verificadas nas concentrações dos xenobióticos em ambiente *post-mortem* nas matrizes mais comuns, é preferível optar por matrizes que possuam tempos de retenção mais elevados como é o caso de amostras de cabelo.

Caso 3: Um cadáver foi encontrado numa floresta em estado avançado de decomposição, apresentando como material orgânico remanescente o cabelo, ossos e tecidos putrefatos. Não foi possível identificar o cadáver nestas condições.

Resultado: As análises realizadas a amostras de cabelo revelaram a presença simultânea de clorpromazina (3,2 ng/mg), fluoxetina (1,4 ng/mg), carbamazepina (12,6 ng/mg) e lorazepam (124 pg/mg). As concentrações encontradas correspondiam a um doente em tratamento psiquiátrico que tinha desaparecido de um hospital há 14 semanas. A identificação final foi obtida através de análise do ADN. A análise do cabelo revelou-se deste modo uma ótima ferramenta na identificação da classe dos xenobióticos (antipsicóticos) o que facilitou a investigação da identidade do indivíduo.

4. Determinação da exposição a xenobióticos durante a gestação

A identificação de recém-nascidos expostos a xenobióticos durante a gravidez pode ser efetuada pelos seguintes métodos: a) o reconhecimento por parte da mãe da administração de certas substâncias ao longo da gravidez, b) amostras de urina de origem materna ou c) análise do líquido amniótico, urina ou meconio do recém-nascido.

Como alternativa às matrizes acima referidas, tanto as amostras de cabelo do recém-nascido como as da mãe permitem aumentar a janela de deteção possibilitando desta forma a recolha de informação relativamente ao(s) xenobiótico(s) utilizado(s) durante a gravidez e consequente avaliação das repercussões no neonato.

A cetamina, droga psicadélica derivada da fenciclidina, é um poderoso anestésico dissociativo de ação rápida, e tem como principais efeitos o elevado estado de sedação que proporciona, efeitos analgésicos e amnésicos. Devido aos seus efeitos céleres, dissociativos e alucinogénios, tornou-se uma popular droga de abuso.

Caso 4: O caso incide sobre um neonato cuja mãe é suspeita de ter abusado de cetamina durante a gravidez. Dentro das informações relativas à mãe destacam-se: (i) deu à luz na 38ª semana de gestação; (ii) não se submeteu a nenhum teste pré-natal até à 29ª semana de gestação; (iii) fumava 5 cigarros por dia; (iv) admitiu uso de cetamina, tendo, no entanto, alegado a cessação do consumo da mesma por volta da 8ª semana de gestação.

Relativamente ao neonato vários foram os parâmetros analisados após o seu nascimento, nomeadamente: (i) hipotonia aparente; (ii) baixo peso ao nascimento; e (iii) disfunção cerebral moderada.

Apesar das amostras de urina serem as mais utilizadas quando se pretende analisar o uso de cetamina, esta apresenta um tempo de semivida de 2 a 3 horas, dificultando a sua deteção. Foram analisadas amostras de cabelo do neonato com 2 centímetros de comprimento.

Resultado: Apesar da mãe ter afirmado que o consumo de cetamina tinha cessado por volta da 8ª semana de gestação, os resultados evidenciaram a presença da mesma e do seu metabolito, a norcetamina, nas concentrações de 141 pg/mg e 63 pg/mg, respetivamente. Tendo em conta os resultados obtidos é possível concluir que a mãe terá tido contacto com a cetamina pelo menos nos dois últimos meses de gravidez.