



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Eva Catarina Tomé Silva

AS DROGAS DE ABUSO EM CONTEXTO FORENSE

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses, orientado pelo Professor Doutor Francisco Manuel Andrade Corte Real Gonçalves e pela Doutora Cláudia Isabel Reis Margalho e apresentado à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Outubro de 2020

FACULDADE DE MEDICINA

AS DROGAS DE ABUSO EM CONTEXTO FORENSE

Ficha Técnica

Tipo de trabalho	Relatório de Estágio
Título	As drogas de abuso em contexto forense
Autor/a	Eva Catarina Tomé Silva
Orientador/a(s)	Professor Doutor Francisco Manuel Andrade Corte Real Gonçalves Doutora Cláudia Isabel Reis Margalho
Identificação do Curso	2º Ciclo em Medicina Legal e Ciências Forenses
Área científica	Química e Toxicologia Forenses
Ano	2020

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Relatório de Estágio de Mestrado apresentado à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina Legal e Ciências Forenses (Enquadramento Legal da Qualificação: Decreto-Lei n.º 74/2006 com as alterações induzidas pelo Decreto-Lei n.º 107/2008 e Portaria n.º 782/2009). Relatório de Estágio elaborado sob orientação do Professor Doutor Francisco Corte Real e da Doutora Cláudia Margalho.

*Dedico este Relatório de Estágio
aos meus pais*

Agradecimentos

É com grande satisfação que venho expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que me ajudaram a tornar possível a realização do presente relatório de estágio, em especial:

Ao Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF, I.P.), na pessoa do Presidente Professor Francisco Corte Real Gonçalves, por consentir a realização do presente estágio e por toda a disponibilidade demonstrada para a realização do mesmo.

Ao meu orientador, Professor Doutor Francisco Corte Real Gonçalves, que tão gentilmente se disponibilizou a orientar o presente estágio, e por todos os conselhos e incentivo para a realização do mesmo.

À minha orientadora, Doutora Cláudia Margalho, por toda a sabedoria e conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade, apoio e orientação científica prestados e, acima de tudo, pela dedicação e paciência dispensadas durante a elaboração do presente relatório, o que tornou possível a sua concretização.

Ao Dr. João Miguel Franco, Diretor do Serviço de Química e Toxicologia Forenses do INMLCF, I.P., que possibilitou a realização do presente estágio no serviço.

A todos os profissionais do Serviço de Química e Toxicologia Forenses do INMLCF, I.P., pela acolhedora receção e disponibilidade demonstrada ao longo deste percurso e todos os conselhos e incentivos, em especial à D. Alice Castanheira pelo seu profissionalismo, espírito de equipa e entreaajuda e por todos os conhecimentos transmitidos e apoio prestado.

À Ana Guedes, colega de curso e amiga, que rapidamente passou a ser como uma irmã, a quem quero agradecer por toda a amizade demonstrada, por todo apoio e compreensão, por toda a cumplicidade e paciência ao ouvir os meus desabafos e aturar o meu desalento, por toda a motivação e por estar sempre presente ao longo destes dois anos, nos bons e nos maus momentos.

A todos os meus amigos pelo carinho, amizade, apoio e acima de tudo compreensão pela minha ausência.

À minha família, em particular aos meus avós, por todo o carinho e motivação e, principalmente, por toda a compreensão e preocupação com o meu bem-estar, tendo sido um ano de difícil conciliação entre a vida académica e familiar, mas sei que posso contar sempre convosco.

Aos meus pais, a quem dedico este relatório de estágio e agradeço por todo o amor e carinho, pela constante presença, pelo apoio incondicional, pela motivação que sempre me incutiram, pela confiança de demonstram em mim e nas minhas capacidades, por toda a força e energia incentivando-me a não desistir e especialmente por todo o orgulho que demonstram na pessoa em que me tornei. Quero agradecer-vos por todos os valores que me transmitiram, por tudo o que me ensinaram e ainda me ensinam e por nunca terem deixado de acreditar em mim.

Resumo

As drogas de abuso são substâncias químicas que produzem efeitos prejudiciais à saúde e, por serem nocivas para os consumidores, são controladas em todo o mundo. O consumo destas substâncias está presente no quotidiano do Homem desde os tempos primórdios, fazendo parte da cultura, da religião e das relações humanas e está quase sempre associado à procura de alterações do grau de consciência e do estado emocional e/ou físico.

O consumo de drogas de abuso tem atingido dimensões significativas, maioritariamente na Europa e na população jovem, sendo uma preocupação para as autoridades e um perigo para a saúde pública a nível mundial. Dada a diversidade de drogas de abuso existentes no mundo e a rápida evolução destas no mercado ilícito, os laboratórios de toxicologia forense têm demonstrado dificuldade em acompanhar esse crescimento. O SQTF-C analisa essencialmente cinco grupos de drogas de abuso ilícitas destacando-se os opiáceos, cocaína e metabolitos, anfetaminas e derivados, canabinóides e novas substâncias psicoativas (catinonas sintéticas e feniletilaminas).

Em toxicologia forense, as análises definidas para a deteção e quantificação de drogas de abuso são realizadas no sangue, sendo esta a matriz biológica preferencial. Porém, quando necessário são utilizadas outras matrizes biológicas (fluidos e órgãos), para detetar e confirmar a presença de drogas de abuso, alternativas ou auxiliares ao sangue, com o intuito de fornecer informações relevantes ou de orientar a análise toxicológica, nomeadamente a urina, o humor vítreo, o líquido pericárdico, o fígado, o rim, a bília, o estômago e seu conteúdo, a saliva, o cabelo, entre muitas outras.

O presente estágio consistiu na observação e no acompanhamento de todos os procedimentos realizados nas amostras biológicas e não biológicas no SQTF-C do INMLCF, I.P., desde a receção, armazenamento e conservação das amostras, bem como também na aplicação dos procedimentos de ensaio validados e acreditados de confirmação e de quantificação dos diferentes grupos de drogas de abuso.

Durante o estágio foi possível observar a preparação da amostra através da técnica de extração em fase sólida (SPE) e a aplicação da cromatografia de gases acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), como técnica analítica de rotina do SQTF-C do INMLCF, I.P. para a deteção e quantificação dos respetivos grupos de drogas de abuso em sangue.

Com o presente estágio foram adquiridos e desenvolvidos conhecimentos que permitiram o seu relacionamento com os adquiridos durante toda a formação académica.

Palavras-chave: Toxicologia Forense; INMLCF, I.P.; Drogas de abuso; SPE; GC-MS

Abstract

Drugs of abuse are chemicals that cause harmful health effects, and because they are harmful to consumers, they are controlled worldwide. The consumption of these substances has been present in the daily life of Man since pre-historic times, being part of their culture, religion and human relations, and is almost always associated with the search for changes in the level of consciousness and emotional and/or physical state.

The consumption of drugs of abuse has reached significant proportions, mainly in Europe and within the young population, having become a concern for the authorities and a danger to public health worldwide. Given the diversity of drugs of abuse that exist in the world and their rapid evolution in the illicit market, the forensic toxicology laboratories have faced some challenges when it comes to keeping up with this growth. Essentially, the SQTf-C analyzes five groups of illicit drugs of abuse: opiates, cocaine and metabolites, amphetamines and derivatives, cannabinoids, and new psychoactive substances (synthetic cathinones and phenylethylamines).

In forensic toxicology, analysis used for the detection and quantification of drugs of abuse are performed to blood, which is the preferred biological matrix. However, when necessary, analysis to detect and confirm the presence of drugs of abuse can be made to other biological matrices (fluids and organs), alternative or auxiliary to blood, namely urine, vitreous humor, pericardial fluid, liver, kidney, bile, stomach contents, saliva, hair, among many others, with the aim to provide relevant information or guide the toxicological analysis.

The present internship involved the observation and monitoring of all procedures performed on biological and non-biological samples in the SQTf-C of INMLCF, I.P., from sample reception, storage and conservation, as well as the application of the validated and accredited confirmation and quantification testing procedures for the different groups of drugs of abuse.

During the internship, it was possible to observe sample preparation using the solid phase extraction technique (SPE) and the application of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), as a routine analytical technique used in the SQTf-C of INMLCF, I.P. for the detection and quantification of the respective groups of drugs of abuse present in blood samples.

With this internship, different skills were acquired and developed that could be related to the theoretical knowledge gained during academic training.

Keywords: Forensic Toxicology; INMLCF, I.P.; Drugs of abuse; SPE; GC-MS

Índice Geral

Agradecimentos.....	v
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Índice Geral.....	xi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas.....	xv
Índice de Equações	xvii
Abreviaturas	xix
Capítulo I – Revisão bibliográfica.....	1
1.1. Toxicologia	3
1.1.1. Toxicologia forense	4
1.2. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses	5
1.2.1. Serviço de Química e Toxicologia Forenses.....	6
1.2.1.1. Exames toxicológicos	7
1.3. Drogas de abuso	8
1.3.1. Opiáceos.....	10
1.3.2. Cocaína e metabolitos	11
1.3.3. Anfetaminas e derivados.....	14
1.3.4. Canabinóides	15
1.3.5. Novas substâncias psicoativas.....	17
1.3.6. Legislação das drogas de abuso.....	20
1.3.6.1. Legislação das NSP	21
1.3.6.1.1. Na Europa.....	21
1.3.6.1.2. Em Portugal.....	22
1.4. Matrizes biológicas.....	24
1.4.1. Sangue.....	25
1.4.2. Urina	27
1.4.3. Humor vítreo	29
1.5. Cadeia de custódia	30
1.5.1. Colheita, acondicionamento, transporte e entrega.....	30
1.5.2. Receção, registo e armazenamento.....	31
1.5.3. Manuseamento e análise	31

1.5.3.1. Triagem ou exame de rastreio	31
1.5.3.2. Exame de confirmação e quantificação	31
1.6. Escolha do padrão interno.....	32
1.7. Preparação da amostra	32
1.7.1. Técnica de extração em fase sólida (SPE)	33
1.7.2. Técnica de derivatização.....	35
1.8. Metodologia analítica	37
1.8.1. Cromatografia de gases acoplada à espetrometria de massa.....	37
Capítulo II – Objetivos	41
Capítulo III – Atividades realizadas	45
3.1. Cadeia de custódia intralaboratorial	47
3.2. Receção, registo e armazenamento das amostras	47
3.3. Triagem.....	48
3.4. Metodologia analítica	49
3.5. Análise de resultados	50
Capítulo IV – Conclusão.....	55
Capítulo V – Bibliografia	59

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura química da morfina (a) e da heroína (b)	11
Figura 2 – Estrutura química da ecgonina e da cocaína, respetivamente	12
Figura 3 – Principais vias metabólicas da cocaína	13
Figura 4 – Estrutura química da anfetamina (a), da metanfetamina (b) e da MDMA (c)	14
Figura 5 – Estrutura química do Δ^9 -THC (a), do canabinol (b) e do canabidiol (c)	16
Figura 6 – Número e principais grupos de NSP notificadas pela primeira vez ao mecanismo de alerta rápido (EWS) da UE, entre 2008 e 2019	19
Figura 7 – Sanções legais: possibilidade de prisão por posse de drogas para uso pessoal (delito menor)	21
Figura 8 – Extração em fase sólida (SPE)	35

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Detetores utilizados em GC	40
Tabela 2 – Intervalos de abundâncias relativas dos íons diagnóstico e respetiva tolerância máxima, a utilizar em ensaios de confirmação	51

Índice de Equações

Equação 1 – Fórmula para o cálculo do tempo de retenção	52
Equação 2 – Fórmula para o cálculo da variação relativa do tempo de retenção relativo	52

Abreviaturas

AA	Absorção atómica
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
BSTFA	N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida
CI	Ionização Química
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> – Ensaio de imunoabsorção enzimática
EI	Impacto eletrónico
EMCDDA	<i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>
<i>Evolis</i>	<i>Evolis Twin Plus System</i>
EUROPOL	<i>European Union's Law Enforcement Agency</i> – Serviço Europeu de Polícia
EWS	<i>Early Warning System</i> – Mecanismo de Alerta Rápido
GC	Cromatografia de Gases
GC-FID	Cromatografia de Gases acoplada ao Detetor de Ionização de Chama
GC-MS	Cromatografia de Gases acoplada à Espetrometria de Massa
GC-MS-EI	Cromatografia de Gases acoplada à Espetrometria de Massa com Ionização por Impacto Eletrónico
GNR	Guarda Nacional Republicana
HV	Humor vítreo
INEM	Instituto Nacional de Emergência Médica
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
INMLCF, I.P.	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.
ISO	Organização Internacional de Normalização
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espetrometria de Massa
LIMS	<i>Laboratory Information Management System</i> – Sistema de Gestão de Informação Laboratorial
LLE	Extração Líquido-Líquido
LPC	Laboratório de Polícia Científica
LP	Líquido Pericárdico
MS	Espetrometria de Massa
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida

m/z	massa/carga
NaF	Fluoreto de sódio
NSP	Novas Substâncias Psicoativas
OEDT	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência
OMS	Organização Mundial de Saúde
PFN	Pontos Focais Nacionais
PJ	Polícia Judiciária
PSP	Polícia de Segurança Pública
REITOX	Rede Europeia de Informação sobre Droga e Toxicodependência
rpm	Rotações por minuto
RPM	Redistribuição <i>Post Mortem</i>
SICAD	Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências
SIM	Monitorização Seletiva de Iões
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em Fase Sólida
SPME	Microextração em Fase Sólida
SQTF	Serviços de Química e Toxicologia Forenses
SQTF-C	Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação Centro
SWGTOX	<i>Scientific Working Group for Forensic Toxicology</i> - Grupo de Trabalho Científico para Toxicologia Forense
TMCS	Trimetilclorossilano
<i>TRr</i>	Tempo de retenção relativo
ΔTRr	Variação relativa do <i>TRr</i>
UE	União Europeia
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i> – Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime
UV/VIS	Ultravioleta/Visível

Capítulo I – Revisão bibliográfica

1. Introdução

1.1. Toxicologia

A toxicologia é uma ciência multidisciplinar que estuda as substâncias tóxicas e as alterações que estas produzem no organismo, por outras palavras, é o estudo da interação entre as substâncias tóxicas e os sistemas biológicos a fim de determinar qualitativa e quantitativamente o potencial tóxico destas substâncias que induzem danos e de onde podem resultar efeitos adversos para os diferentes sistemas. A toxicologia investiga a natureza destes efeitos adversos, a sua incidência, os fatores que influenciam o seu desenvolvimento e a sua reversibilidade, bem como também desenvolve os tratamentos para as intoxicações. Dentro dos fatores que influenciam a toxicidade da substância podem ser destacados os seguintes: dose, concentração, composição, via de administração, excreção, estado de saúde, idade, sexo, variabilidade genética, fatores ambientais e interações medicamentosas (1–4).

A toxicologia pretende avaliar os efeitos das substâncias tóxicas nos seres vivos de forma a prevenir intoxicações e os seus efeitos adversos, porém, uma vez ocorrida a intoxicação, a toxicologia tem como objetivo identificar, diagnosticar, tratar ou atenuar os efeitos nocivos e estabelecer o prognóstico. A toxicologia compreende também o estudo do próprio agente tóxico, desde a origem, mecanismo de ação, propriedades, consequências dos seus efeitos lesivos, métodos qualitativos e quantitativos, meios de contrariar os desequilíbrios dinâmicos que provocam, valorização do grau de toxicidade dos agentes tóxicos, medidas profiláticas da intoxicação e tratamento geral (1–3,5–7).

Segundo Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim, o primeiro grande toxicologista, mais conhecido pelo seu pseudónimo Paracelso, “todas as substâncias são venenos: não há nenhuma que não seja veneno. A dose distingue o veneno do remédio” (1–5,8,9).

Mathieu Joseph Bonaventure Orfila, toxicologista espanhol conhecido por Orfila, em 1813, ganhou o título de “pai da Toxicologia” após ter publicado o seu primeiro trabalho científico completo de importância internacional na área da toxicologia forense, denominado por “*Traité des poisons tirés des règnes minéral végétal et animal*” ou, “*Toxicologie générale, considérée sous rapports of the physiologie, the pathologie et la médecine legal*” onde definiu veneno como “qualquer substância que, quando tomada internamente numa dose muito pequena, ou aplicada de qualquer forma a um corpo vivo, deprecia a saúde ou destrói completamente a vida” (2–5,8,9). Orfila foi quem introduziu as provas químicas em sede judicial, afirmando que “deve ser provada a presença de um veneno no sangue ou nos órgãos antes de o veneno ser considerado como a causa de morte” (1,2,5).

Dado que a toxicologia consiste numa ciência multidisciplinar e dada a sua abrangência e o seus objetivos, esta implica o domínio de diversas áreas como a anatomia, farmacologia, bioquímica, imunologia, fisiologia, química, biologia entre outras, e possui vários ramos, sendo os mais referidos a toxicologia clínica, forense, ocupacional, farmacológica, mecanística, ambiental, analítica, regulatória, veterinária e a experimental (1,2,5,6,8).

1.1.1. Toxicologia forense

A toxicologia forense é uma área da toxicologia que aplica os princípios da toxicologia fundamental e os princípios da química analítica instrumental no esclarecimento de questões judiciais e judiciais. Estas questões estão relacionadas com situações de intoxicação e seus potenciais efeitos adversos, fatais ou não, no âmbito dos diversos domínios do direito, nomeadamente o direito penal, civil e do trabalho. A aplicação da toxicologia forense associada ao direito tem como intuito cooperar na investigação toxicológica em causas civis, criminais e sociais, de forma a evitar possíveis injustiças a qualquer membro da sociedade. Deste modo, a toxicologia forense estuda e aplica a toxicologia aos objetivos da lei (1–3,7,9,10).

A principal área de atuação da Toxicologia Forense consiste na correta interpretação dos resultados toxicológicos e na forma como esta ciência se pode e deve articular com as restantes áreas da intervenção forense e não propriamente na química analítica e nos seus métodos instrumentais, porém estes são fundamentais para a obtenção de resultados laboratoriais de qualidade (1).

A interpretação dos resultados toxicológicos tem por base o estudo simultâneo da toxicocinética e toxicodinâmica de diferentes substâncias, dos fatores que interferem com as mesmas, dos sinais e sintomas que resultam da intoxicação, assim como das tabelas das doses tóxicas e letais. Os sinais e sintomas auxiliam na orientação da análise toxicológica e as tabelas das doses tóxicas e letais apenas são úteis quando interpretadas em conjunto com todos os outros fatores (1). Deste modo, a toxicologia forense pode ser considerada uma ciência forense multidisciplinar que aplica métodos e práticas científicas para investigar os efeitos nocivos que drogas ou outras substâncias químicas tóxicas possam causar num organismo (11).

Dada a extensa aplicabilidade prática da toxicologia forense, o toxicologista forense deve apresentar inúmeras competências, nomeadamente o domínio dos fundamentos teóricos e práticos das diversas áreas de atuação da toxicologia forense, a capacidade de análise das propriedades físicas e químicas dos tóxicos e os seus mecanismos de ação, bem como a compreensão da atuação destes nos sistemas biológicos. O toxicologista forense deve ainda compreender os fatores que interferem na toxicocinética e na toxicodinâmica, particularmente os fatores químicos, biológicos e dinâmicos. Para além destas competências, o toxicologista forense deve compreender o fenómeno de redistribuição *post mortem* e interpretar os resultados toxicológicos obtidos tendo em conta este fenómeno. É também da competência do toxicologista forense reconhecer os sinais e sintomas provocados pela exposição a diferentes tóxicos, bem como compreender o motivo da maior ou menor vulnerabilidade dos diferentes órgãos e sistemas fisiológicos aos efeitos tóxicos provocados por estes. O toxicologista forense deve também ser capaz de comunicar eficazmente com médicos, patologistas, legistas, polícias e membros de profissão jurídica (1,2,5,6).

Das principais competências do toxicologista forense podem destacar-se as seguintes: o domínio dos fundamentos teóricos e práticos das metodologias analíticas utilizadas nas análises toxicológicas, a interpretação dos resultados toxicológicos obtidos e respetivo enquadramento legal, a manutenção da cadeia de custódia em todos os

procedimentos realizados no laboratório, devido às implicações legais, e a garantia da qualidade dos procedimentos analíticos (1,2,5).

Segundo Orfila “a presença de um veneno deve ser comprovada no sangue e nos órgãos antes que possa ser considerada uma causa de morte”, pelo que o toxicologista forense deve ter em conta cinco etapas em qualquer exame toxicológico, são elas: a deteção, de forma a detetar quaisquer drogas ou venenos nas amostras submetidas a procedimentos de triagem; a identificação, de modo a identificar conclusivamente quaisquer drogas, metabólitos ou venenos através de testes físico-químicos específicos; a utilização de testes corroborativos, quando disponíveis, para confirmar a identificação e a quantidade de qualquer substância encontrada; a quantificação, de forma a quantificar com precisão as drogas, metabólitos ou venenos presentes; e, por fim, a interpretação e o relatório, de modo a relatar os achados analíticos no contexto do caso, as informações fornecidas e as perguntas feitas pelo investigador (2,3).

A primeira etapa, a deteção da droga ou veneno, é a etapa mais difícil, dado que a natureza do veneno pode não ser conhecida, pelo que os testes de triagem para possíveis drogas ou venenos devem ser utilizados quando não existem informações sobre a possível identidade, estando disponíveis imunoensaios para a triagem de uma ampla gama de substâncias presentes em amostras biológicas como o sangue, a urina e o humor vítreo. Os métodos de triagem são mais flexíveis que os métodos analíticos específicos e, como tal, podem ser aplicados a diversas substâncias, sendo estes, portanto, essenciais para a investigação de intoxicações com substâncias desconhecidas ou até mesmo quando o agente tóxico é conhecido ou suspeito. Após ser verificada a presença do agente tóxico, procedimentos analíticos específicos devem ser usados para identificá-lo conclusivamente (2,3).

1.2. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

O Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF, I.P.) é um instituto público, sob superintendência e tutela do Ministério da Justiça, dotado de autonomia administrativa e financeira e de património próprio (12).

O INMLCF, I.P. é a instituição nacional de referência na área científica da medicina legal e outras ciências forenses, à qual cabe a prestação de um conjunto de serviços especializados de apoio técnico pericial e laboratorial e a cooperação com os tribunais, com o Ministério Público e com órgãos de polícia criminal e demais serviços e entidades que intervêm no sistema de administração da justiça através da realização de exames e perícias médico-legais e forenses que lhe são solicitados, nos termos da lei (12–14). Esta instituição realiza uma série de exames e perícias em indivíduos vivos e em cadáveres, nomeadamente exames e perícias laboratoriais químicas e toxicológicas para determinar inúmeras substâncias em amostras biológicas e não biológicas no Serviço de Química e Toxicologia Forenses do INMLCF, I.P. (13).

O INMLCF, I.P. tem por base o valor da administração da justiça e dedica-se de forma a que a sua intervenção nos processos judiciais sirva os interesses legalmente protegidos dos cidadãos (15). A prossecução do interesse público é sem dúvida um dos

principais valores desta instituição, desenvolvendo a sua missão pericial em articulação funcional com as autoridades judiciárias e judiciais no âmbito da administração da justiça, na execução e cumprimento das normas e dos princípios legais e éticos que asseguram o devido respeito pelos direitos, liberdades e garantias dos cidadãos (14,15). Para além disso, toda a atividade pericial da responsabilidade do INMLCF é realizada com autonomia técnica e científica, com isenção e imparcialidade, sob as normas legais processuais aplicáveis e as decisões das autoridades judiciárias e judiciais competentes (15). Quanto ao rigor e à qualidade, o INMLCF encontra-se permanentemente em atualização relativamente à evolução das metodologias técnico-científicas de âmbito pericial, desenvolvendo regularmente trabalhos científicos relevantes, o que promove a investigação e o desenvolvimento quer da medicina legal quer de outras ciências forenses (15).

O Decreto-Lei n.º 166/2012, de 31 de julho, define a instituição e as competências funcionais do INMLCF, I.P. na área das ciências forenses e nos diversos domínios do Direito, de forma a garantir a realização das perícias médico-legais e forenses no INMLCF, I.P. Os estatutos do INMLCF, I.P. nomeadamente a organização interna dos serviços e as competências das diferentes unidades orgânicas do INMLCF, I.P., encontram-se disponíveis no anexo da Portaria n.º 19/2013, de 21 de janeiro.

1.2.1. Serviço de Química e Toxicologia Forenses

O Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF), com sede na Delegação Sul e extensões funcionais nas delegações do Centro e do Norte, rege-se pelo artigo 6.º da Portaria n.º 19/2013, de 21 de janeiro, que refere que o SQTF é responsável por assegurar a realização de perícias e exames laboratoriais químicos e toxicológicos, a nível nacional, para a determinação, confirmação e quantificação de substâncias com interesse forense, nomeadamente de drogas de abuso (e.g. opiáceos, cocaína e metabolitos, anfetaminas e derivados, canabinóides), medicamentos (e.g. ansiolíticos, sedativos, hipnóticos, antipsicóticos, antidepressivos, anticonvulsivos), pesticidas (e.g. organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides), substâncias voláteis (e.g. etanol, solventes orgânicos) e de outras substâncias e grupos (e.g. monóxido de carbono, metais e metalóides), em diferentes tipos de amostras biológicas, principalmente sangue, urina, humor vítreo, fígado, conteúdo gástrico e em amostras não biológicas (16,17).

As referidas perícias e exames laboratoriais são realizados no âmbito da atividade das delegações e dos gabinetes médico-legais e forenses assim como quando solicitados pelas autoridades e entidades para o efeito competentes ou pelo presidente do conselho diretivo do INMLCF. Para além das referidas competências, também compete ao SQTF emitir pareceres e prestar auxílio técnico-científico no domínio das suas competências (16,17).

O SQTF consiste num serviço acreditado pelo Instituto Português de Acreditação, I.P. (IPAC), que confirma o cumprimento dos requisitos da norma internacional NP EN ISO/IEC 17025:2005, nomeadamente para os procedimentos de ensaio do álcool, drogas de abuso e benzodiazepinas (16). Deste modo, o serviço garante a qualidade dos seus

resultados, uma vez que todas as atividades realizadas no mesmo decorrem de acordo com a legislação e as boas práticas laboratoriais.

O SQTF da Delegação Centro está dividido em três setores, nomeadamente o setor administrativo, o setor de receção, registo e armazenamento de amostras e o setor de análises químicas e toxicológicas. O setor de receção, registo e armazenamento de amostras é responsável por receber e verificar as amostras e os respetivos documentos para a realização dos exames toxicológicos assim como armazenar, preparar e entregar as bolsas com o devido material para acondicionamento e transporte de amostras e ainda a limpeza e preparação do material utilizado no serviço. Relativamente ao setor de análises químicas e toxicológicas, este é responsável por desenvolver, validar e executar procedimentos de ensaio bem como desenvolver projetos científicos com interesse para o serviço. Este setor é constituído por 5 equipas de trabalho que estão divididas de acordo com o tipo de técnica analítica utilizada. A equipa 1 realiza testes de triagem de drogas de abuso e benzodiazepinas através de reações imuno-enzimáticas. A equipa 2 é responsável pela realização de ensaios de confirmação e quantificação de drogas de abuso e pela triagem e confirmação de medicamentos e pesticidas através da cromatografia de gases acoplada à espetrometria de massa (GC-MS). A equipa 3 realiza a confirmação e quantificação de medicamentos por cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa (LC-MS). A equipa 4 realiza análises de deteção, confirmação e quantificação de substâncias voláteis, nomeadamente etanol, por cromatografia de gases com detetor de ionização de chama (GC-FID). A equipa 5 realiza a confirmação e quantificação de monóxido de carbono pela técnica analítica de espectrofotometria molecular (UV/VIS) e a confirmação e quantificação de metais, nomeadamente o arsénio e o cianeto por absorção atómica (AA).

1.2.1.1. Exames toxicológicos

As perícias médico-legais e forenses, nomeadamente os exames e perícias no âmbito da toxicologia forense, são regidos pela lei n.º 45/2004, de 19 de agosto, que estabelece o regime jurídico das perícias médico-legais e forenses. Os exames toxicológicos são realizados obrigatoriamente no SQTF do INMLCF, I.P., para a determinação, confirmação e quantificação de substâncias químicas tóxicas com interesse forense em amostras biológicas e não biológicas, nomeadamente de drogas de abuso, medicamentos, pesticidas, substâncias voláteis e de outras substâncias e grupos, e somente são realizados por entidades terceiras, públicas ou privadas, contratadas ou indicadas para o efeito pelo INMLCF, I.P. quando perante manifesta impossibilidade dos serviços do INMLCF, I.P.. Estas perícias toxicológicas podem ainda ser solicitadas diretamente pelos tribunais às entidades terceiras supracitadas, sempre que o considerem necessário (18).

Os exames toxicológicos são obrigatoriamente solicitados ao SQTF da delegação do Instituto da área territorial do tribunal ou da autoridade policial que os requer, pelo que as perícias toxicológicas podem ser solicitadas pelos tribunais e demais serviços e entidades que intervêm no sistema de administração da justiça (como a autoridade

judiciária e judicial e órgãos de policia criminal), por entidades públicas e privadas (como os hospitais), por particulares, pelo Serviço de Patologia Forense das Delegações e Gabinetes Médico-legais e Forenses do INMLCF, I.P., no âmbito das suas atividades, e pelo presidente do conselho diretivo (12,18,19).

As perícias toxicológicas *ante mortem* mais solicitadas atualmente aos Serviços de Química e Toxicologia Forenses do INMLCF, I.P. incluem a determinação e quantificação de álcool e substâncias psicotrópicas e estupefacientes, nomeadamente cocaína e metabolitos, anfetaminas e derivados, canabinóides e opiáceos. Estas perícias são solicitadas essencialmente para fiscalização da condução rodoviária sob estado de influência, verificação do estado de toxicodependência, avaliação de intoxicações abusivas, avaliação da dopagem em atletas de alta competição e verificação do estado de influência no local de trabalho. Relativamente às perícias toxicológicas *post mortem*, estas geralmente são solicitadas para auxiliar as autópsias médico-legais na determinação da causa de morte, seja por morte violenta (acidente, suicídio, homicídio), morte relacionada com o consumo de drogas de abuso ou morte súbita (5).

1.3. Drogas de abuso

O consumo de drogas de abuso está presente no quotidiano do Homem e faz parte da história da Humanidade desde a antiguidade, uma vez que remonta aos tempos primórdios aquando da descoberta experimental das características de algumas plantas (20,21).

A utilização destas substâncias fez desde sempre parte da cultura, da religião e das relações humanas e esteve quase sempre associada à procura de alterações do grau de consciência e do estado emocional e/ou físico, tanto em cerimónias religiosas ou culturais, como para fins terapêuticos, místicos ou unicamente recreativos associados à procura de sensações de prazer e de bem-estar por parte do consumidor (20–22).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o termo “droga”, utilizado atualmente por todo o mundo, veio substituir os termos inicialmente utilizados como “substâncias tóxicas” e “narcóticos”. Este conceito refere-se a qualquer substância química, lícita ou ilícita, não produzida pelo organismo, que pode afetar os processos fisiológicos e/ou bioquímicos de tecidos do organismo, com capacidade de curar ou prevenir uma dada patologia ou até mesmo melhorar a condição física ou mental.

Esta terminologia é ambígua, uma vez que não distingue a finalidade para a qual as substâncias são utilizadas nem quais os efeitos por elas provocados (23). De acordo com OMS, as substâncias utilizadas com fins terapêuticos, para evitar ou tratar uma doença produzindo efeitos benéficos são chamadas de medicamentos. As que são utilizadas com outros fins e que produzem efeitos prejudiciais à saúde são denominadas de drogas ilegais que por serem nocivas para os consumidores são controladas em todo mundo. Assim, todos os medicamentos são drogas, contudo nem todas as drogas são medicamentos.

Existem diversos critérios para classificar as drogas, uma vez que não é possível reunir todas numa só classe devido à diversidade de estruturas químicas, dos seus efeitos

e dos mecanismos de ação (24). A classificação mais utilizada é a que tem por base o efeito das drogas no Sistema Nervoso Central (SNC), onde se dividem em drogas estimulantes, supressoras e alucinogénias (24–26). As drogas estimulantes são as que ativam ou aumentam a atividade do SNC, desenvolvendo o estado de alerta e atenção, suprimindo o sono, a fadiga e o apetite, como a cocaína, as anfetaminas e a nicotina, as supressoras são as que suprimem, diminuem ou inibem a atividade do SNC, como a heroína, a morfina, a codeína, as benzodiazepinas e até mesmo o álcool, e as alucinogénias são as que causam um efeito perturbador do SNC induzindo alterações na percepção, sentimento e sensação, como a cannabis, a metilenedioximetanfetamina (MDMA) e a dietilamida do ácido lisérgico (LSD) (26,27). Importa ainda realçar que os efeitos das drogas e as respetivas doses letais não dependem só da substância em si como também da qualidade e quantidade desta, bem como de vários outros fatores, nomeadamente das doses, da via de administração, da frequência e duração do consumo, das características do consumidor e do meio ambiente onde ocorre o consumo (24).

Uma outra classificação utilizada tem por base a origem das drogas, agrupando-as em três grupos, as drogas naturais, as semissintéticas e as sintéticas. As drogas naturais são aquelas que se obtêm diretamente da natureza, como o ópio, a morfina, a codeína e a coca, as semissintéticas são obtidas por modificação da estrutura das substâncias de origem natural, como a heroína e a LSD e, as drogas sintéticas são as que se obtêm totalmente por síntese química como a metadona, a MDMA (conhecida por *ecstasy*) e as anfetaminas (26).

Segundo a *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), as drogas podem ser classificadas em drogas lícitas, como o álcool e o tabaco e em drogas ilícitas, sendo estas todas as substâncias consumidas, produzidas e traficadas ilegalmente e que por isso estão sob controlo internacional (26).

De acordo com a OMS, as drogas podem ainda ser classificadas em drogas mais perigosas e menos perigosas, sendo as primeiras aquelas que causam dependência física, com maior rapidez e que apresentam maior toxicidade e as menos perigosas aquelas que só criam dependência psicológica, com menor rapidez e que apresentam menor toxicidade.

As drogas de abuso são designadas substâncias psicoativas bem como drogas psicotrópicas dadas as alterações que as mesmas causam ao nível do SNC e, conseqüentemente as perturbações que causam ao nível da função mental (26).

Desde o século XIX até à atualidade o consumo de drogas tem tomado proporções significativas, principalmente na Europa e na população jovem, o que se tornou uma preocupação para as autoridades e um perigo para a saúde pública a nível mundial. Na última década têm surgido outras substâncias que vieram juntar-se às já existentes de forma a desviar o controlo internacional e as implicações legais das drogas, o que comprova a evolução do mercado (24,28–33).

Dada a diversidade de drogas de abuso existentes no mundo, neste relatório serão apenas abordados os grupos de drogas de abuso ilícitas analisadas no SQTf do INMLCF, I.P., destacando-se os opiáceos, cocaína e metabolitos, anfetaminas e derivados, canabinóides e novas substâncias psicoativas (NSP), considerados pelo Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD) como as drogas

ilícitas de maior consumo e importância a nível nacional e pelo Observatório Europeu da Droga e da Toxicodpendência (OEDT) a nível europeu (16,34).

1.3.1. Opiáceos

Os opiáceos são substâncias extraídas de uma planta denominada popularmente de papoila (*Papaver somniferum*), que após ser cortada liberta um líquido leitoso de coloração branca, que ao secar constitui o chamado ópio, responsável pela denominação de opiáceo (35).

Os termos “opiáceos” e “opioides” são geralmente considerados na literatura como sinónimos, porém o termo “opiáceos” refere-se aos compostos que apresentam uma estrutura base relacionada com os produtos encontrados no ópio, pelo que inclui os alcaloides naturais do ópio e os seus derivados semissintéticos. O termo “opioides” refere-se a compostos que apresentem as mesmas propriedades funcionais e farmacológicas do opiáceo, independentemente da sua estrutura, pelo que inclui os opiáceos, os compostos semissintéticos, os sintéticos e os compostos endógenos que interagem com os recetores opioides, como é o caso das encefalinas, endorfinas e dinorfinas (35).

Com base na origem, os opiáceos podem ser naturais, semissintéticos ou sintéticos, sendo os naturais os que não sofrem nenhuma modificação, ou seja, são obtidos diretamente da planta do opio, como é o caso da morfina e codeína ou os produzidos pelo corpo humano (opioides endógenos), os semissintéticos os que resultam de modificações químicas parciais das substâncias naturais, como é o caso da oxicodeona e da heroína que é obtida da morfina através de uma pequena modificação química, nomeadamente a acetilação de grupos hidroxilo, e os sintéticos como é o caso da metadona, do fentanilo e do levorfanol, que não são derivados de opiáceos mas apresentam afinidade para o recetor opioide produzindo efeitos clinicamente semelhantes (34,35).

A morfina é o principal alcaloide presente no ópio e a sua utilização iniciou-se devido à sua eficácia na capacidade de aliviar a dor intensa. A morfina foi isolada pela primeira vez em 1806 (Figura 1 (a)), e somente em 1874 foi sintetizada a heroína (Figura 1 (b)) (35). A heroína é o opiáceo ilícito mais comum no mercado de drogas da UE e, como tal, o mais consumido na Europa (34). Habitualmente, a heroína está disponível de duas formas, a heroína castanha produzida maioritariamente a partir da morfina extraída da papoila, sendo esta a forma mais comum, e a heroína branca. Esta droga pode ser fumada, inalada ou injetada. O consumo de drogas de abuso por via endovenosa está normalmente associado ao consumo de opiáceos, porém também é comum o consumo por esta via de estimulantes como as anfetaminas ou a cocaína (34).

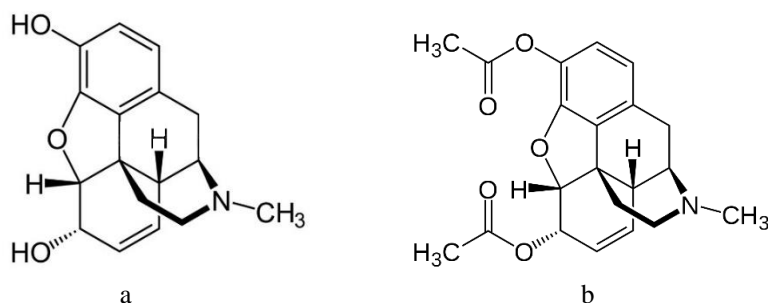


Figura 1 – Estrutura química da morfina (a) e da heroína (b) (adaptado de (35))

Para além da heroína, existem outros opiáceos sintéticos disponíveis nos mercados ilícitos da Europa que também são apreendidos, em menores quantidades, tendo, no entanto, ocorrido um aumento significativo de apreensões em 2017 deste tipo de opiáceos. Os opiáceos sintéticos incluem o ópio e os opiáceos medicinais como a morfina, a metadona, a buprenorfina, o tramadol, vários derivados do fentanilo, a codeína, a dihidrocodeína e a oxicodona (34). As quantidades de morfina, codeína e metadona apreendidas em 2018 foram superiores às de 2017, tendo este aumento confirmado o crescente interesse por estes opiáceos medicinais (36). Alguns destes opiáceos podem ter sido desviados da indústria farmacêutica, enquanto outros são fabricados ilegalmente (34).

As principais aplicações terapêuticas dos opiáceos são a analgesia, edema pulmonar agudo, tosse, diarreia, tremores, anestesia, entre outros (35).

1.3.2. Cocaína e metabolitos

A cocaína é o principal alcaloide produzido a partir das folhas da planta *Erythroxylum coca*, cultivada essencialmente na América Central e do Sul e consiste num estimulante do SNC. A sua utilização remonta a épocas muito anteriores à descoberta da América (1492), onde as suas folhas eram mastigadas para combaterem a sensação de fome e de fadiga (24,30,31,37–39). A primeira referência às propriedades anestésicas surgiu em 1653, nomeadamente no alívio de dores de dentes, depois no século XIX passou a ser considerado um remédio milagroso para dores, cansaço, depressão, substituto alimentar e estimulante. Pela primeira vez, em 1860, Niemann isolou das folhas de coca uma substância à qual se designou cocaína (25,30,39).

A cocaína é sintetizada a partir da ecgonina na presença de metanol e ácido benzoico, originando um éster do ácido benzoico e da metilecgonina (metilbenzoilecgonina) (Figura 2). A estrutura química da cocaína para além de ligações ésteres é constituída por um grupo hidrofílico (amina) e um grupo hidrofóbico (benzeno) (38–40).

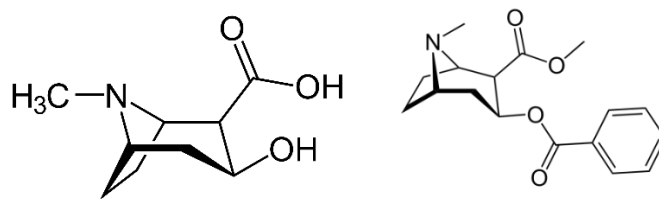


Figura 2 - Estrutura química da ecgonina e da cocaína, respetivamente (adaptado de (39,41))

Enquanto droga de abuso, a cocaína pode ser encontrada sob quatro formas distintas, nomeadamente as folhas de coca, a pasta de coca (sulfato de cocaína), cloridrato de cocaína e base de cocaína (base livre ou *crack*). As folhas são consumidas por mastigação ou por infusão em que a sua velocidade de atuação é lenta enquanto a pasta é um produto não refinado que resulta da maceração das folhas de coca com ácido sulfúrico e outros solventes sendo posteriormente fumada e em que o seu início de ação é muito rápido. O cloridrato de cocaína resulta da adição de ácido clorídrico formando um sal, que forma um pó cristalino, branco, inodoro de sabor amargo e solúvel em água, com ação rápida e habitualmente é inalado ou administrado por via endovenosa. O crack resulta da mistura cloridrato de cocaína com uma solução básica (amoníaco, hidróxido de sódio ou bicarbonato de sódio) e éter, com um início de ação muito rápido e habitualmente é fumado. Esta forma geralmente é conhecida por “coca”, “branca”, “neve”, “gulosa”, “júlia” entre outras (39). Contudo, na Europa, a cocaína encontra-se disponível principalmente sob duas formas, das quais a mais comum é a cocaína em pó (sal de cloridrato de cocaína), consumida por absorção pela mucosa nasal, e a menos comum é a cocaína-crack (forma livre), consumida por inalação (34). A cocaína pode também ser consumida por outras vias de administração, ainda assim menos comuns, como a administração intravenosa e a via oral (24,31).

A cocaína contém duas ligações éster, pelo que é rapidamente metabolizada através da hidrólise destas. A benzoilecgonina (BE) é o metabolito originado pela hidrólise do éster alquílico da cocaína e o éster metílico da ecgonina (EME) é o metabolito resultante da hidrólise do éster fenílico (grupo benzoato) (Figura 3 (a,b)). Estes metabolitos são, por sua vez, metabolizados em ecgonina (Figura 3 (c)) (38,39,42). Para além da ecgonina, a BE pode ainda originar as *m*- e *p*-hidroxibenzoilecgonina, por mecanismos de oxidação, sendo ambos metabolitos minoritários na urina (Figura 3 (d)) (38,39). A administração simultânea de cocaína e etanol origina o metabolito cocaetileno (CE), através da transesterificação hepática (Figura 3 (e)) (38,39,42). Este metabolito, ao contrário da BE e do EME, que são metabolitos inativos, é um metabolito ativo (38). A toxicidade do cocaetileno é superior à da cocaína, apresentando efeitos adversos mais intensos, nomeadamente a euforia (38). O cocaetileno pode ser utilizado como marcador do consumo simultâneo de cocaína e etanol (42).

Para além destes metabolitos, a cocaína apresenta outros metabolitos minoritários incluindo a norcocaína e o éster metílico da anidroecgonina (EMAE) (Figura 3 (f, g)) (38). A norcocaína é um metabolito ativo resultante da N-desmetilação da cocaína e está associada a distúrbios respiratórios, convulsões e choques hipovolémicos, enquanto o éster metílico anidroecgonina (EMAE) é um metabolito resultante da pirólise da cocaína,

quando fumada, pelo que este é um pode ser utilizado como marcador de exposição ao *crack* (38,39,42).

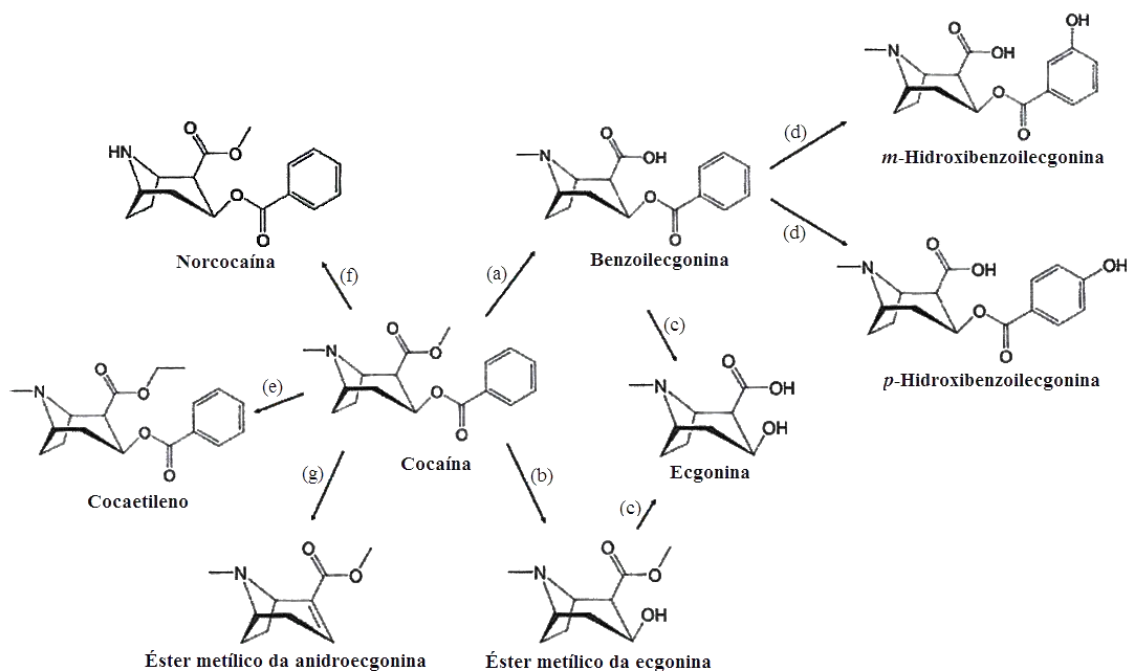


Figura 3 - Principais vias metabólicas da cocaína (adaptado de (39))

A cocaína e os seus metabolitos são excretados principalmente através da urina, sendo que a dose de cocaína administrada é eliminada em 1-9% na forma inalterada, em 35-54% na forma de benzoilecgonina (BE) e 32-49% como éster metílico ecgonina (EME) (39,42). Após o consumo de uma dose de cocaína, independentemente da via de administração, cerca de 64-69% desta dose ainda se encontra presente na urina ao fim de 3 dias (42).

Diversos produtos contendo cocaína foram surgindo e tornando-se populares, provavelmente devido às sensações de bem-estar físico que estes provocavam, apesar de inúmeros relatos de arritmias cardíacas ou até mesmo mortes. Atualmente, a aplicação da cocaína para fins terapêuticos está limitada à sua utilização como anestésico local em oftalmologia e em cirurgias ao ouvido, nariz e garganta (38).

O consumo de cocaína afeta diversos sistemas fisiológicos, porém os primeiros sinais do consumo crónico refletem-se em lesões da mucosa nasal e perfurações do septo nasal. Os sintomas mais comuns estão associados a complicações cardiovasculares, como arritmias, miocardite, isquemia e enfarte do miocárdio, rutura da aorta e morte súbita, e perturbações neurológicas, como psicose, depressão, paranoia, esquizofrenia, insónias e alucinações tácteis. As complicações cardiovasculares são as principais causas de morte entre os consumidores de cocaína (24,31,39,43,44).

As principais drogas estimulantes ilícitas disponíveis na Europa são a cocaína, as anfetaminas, as metanfetaminas e a MDMA. Porém, a cocaína tem demonstrado ser o estimulante ilícito mais consumido na Europa, tendo o seu consumo aumentado nos últimos anos (34).

Em 2018, na União Europeia, o número de apreensões e as quantidades apreendidas de cocaína atingiram os níveis mais elevados de sempre. A cocaína é a segunda droga ilícita mais apreendida (10%) na Europa, logo a seguir à *cannabis* herbácea (40%) e à resina de *cannabis* (29%) (36).

O número de apreensões de cocaína-*crack* tem-se mantido baixo e estável nos países que comunicam a sua ocorrência. Isto pode, em parte, ser explicado pelo facto de o *crack* ser fabricado na Europa, próximo dos mercados de consumidores, e não ser transportado através de fronteiras, onde habitualmente têm lugar muitas apreensões de droga. O número de apreensões de folhas de coca tem aumentado (34).

1.3.3. Anfetaminas e derivados

As anfetaminas são um conjunto substâncias sintéticas quimicamente derivadas da estrutura da feniletilamina, que constituem um grupo farmacológico muito extenso. A anfetamina (AMPH) foi sintetizada pela primeira vez em 1887, porém somente foi colocada no mercado em 1935. A sua utilização generalizou-se durante a II Guerra Mundial, em que os exércitos utilizavam a AMPH de forma a combater a fadiga dos soldados, devido aos seus efeitos estimulantes, e durante o pós guerra foi amplamente consumido por parte da população do Japão provocando uma pandemia de consumo de forma a aumentar a capacidade de trabalho, o que levou a que a OMS adotasse medidas para o seu controlo (45).

A partir da estrutura química base da anfetamina foram desenvolvidos vários derivados, sendo os mais conhecidos a anfetamina (*speed*), a metanfetamina (*ice, crystal meth*) e a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) (Figura 4). Estas habitualmente são denominadas coletivamente por “anfetaminas” e dada a facilidade de síntese dos seus princípios ativos, são produzidas permanentemente novas anfetaminas em laboratórios clandestinos, o que dificulta bastante o seu controlo (34,45).

As anfetaminas apresentam-se como um óleo incolor volátil insolúvel em água ou como um pó branco solúvel em água, sendo o pó a forma mais comum da maioria dos produtos ilícitos de anfetaminas e conhecido por *speed* (34).

As anfetaminas são fortes estimulantes do SNC e do sistema simpático, porém também apresentam efeitos nos sistemas cardiovascular, pulmonar, gastrointestinal, metabólico e muscular (45).

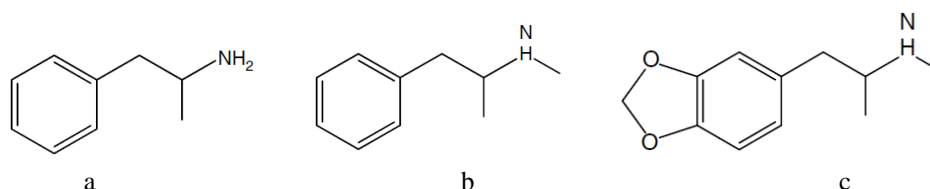


Figura 4 – Estrutura química da anfetamina (a), da metanfetamina (b) e da MDMA (c) (adaptado de (45))

Na última década, os dados sobre as apreensões indicam que a oferta de metanfetamina está a aumentar lentamente e a expandir-se geograficamente, mas ainda é

muito inferior à de anfetamina. Contudo, apreensões de óleo de anfetamina em alguns Estados-Membros sugerem que este produto pode ser traficado entre países, realizando-se a fase final da produção no local de destino ou nas suas proximidades. Na União Europeia, é também fabricada alguma anfetamina para exportação (34).

Em 2018, verificou-se que o número de apreensões de anfetaminas na UE tem vindo a aumentar nos últimos três anos, por outro lado, o número de apreensões de metanfetaminas tem vindo a aumentar desde 2002, observando-se uma estabilização da quantidade apreendida desde 2013. Para além disso, verificou-se que o número de apreensões de metanfetaminas é muito mais baixo que o das anfetaminas (36).

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) é uma droga sintética quimicamente relacionada com a anfetamina e análogo da metanfetamina, embora as propriedades farmacológicas sejam distintas, e é muito utilizada para fins recreativos e tem sido alvo de estudo para produzir NSP com iguais efeitos (46). A MDMA é consumida sob a forma de comprimidos, habitualmente e popularmente denominados *ecstasy*, ou sob a forma de pó ou cristais. Uma das maiores estratégias de comercialização desta substância consiste na constante introdução no mercado de comprimidos com novos desenhos, diversas cores, formas e logótipos de marcas (34).

Segundo o OEDT, o número de apreensões de MDMA na UE tem aumentado desde 2010, nas suas diferentes formas. Apesar de o número de apreensões de comprimidos de MDMA ter vindo a aumentar desde 2015, analogamente ao teor médio de MDMA presente nestes, verificou-se uma diminuição deste no ano de 2018. Deste modo, o aumento do número total de apreensões de MDMA deve-se ao aumento de apreensões de MDMA nas restantes formas, nomeadamente em pó (34,36).

As principais vias de administração desta substância são a via oral, sob a forma de comprimidos, cristais ou pó, e a via inalatória (34).

Geralmente, a MDMA é consumida em simultâneo com outras substâncias, como o álcool, a *cannabis*, alucinogénios e outros estimulantes. Nos países em que são registados níveis elevados de consumo, observou-se que a MDMA deixou de ser uma droga restrita a discotecas, bares e fetais de música, sendo consumida por um conjunto mais alargado de jovens (34).

As anfetaminas e a MDMA, sob a forma de comprimidos e pó, foram duas das drogas de abuso mais encontradas em cenários de diversão noturna (34,36).

1.3.4. Canabinóides

Os canabinóides naturais ou fitocannabinóides obtidos da planta *Cannabis sativa*, original da Ásia Central, são das substâncias ilícitas mais consumidas em todo o mundo e por todas as faixas etárias. A planta *Cannabis sativa* é constituída por mais de 400 substâncias químicas que diferem na sua estrutura, mas que partilham as suas propriedades farmacológicas, sendo a sua principal classe os canabinóides, estando atualmente identificados cerca de 60 fitocannabinóides (47).

O cultivo desta planta remonta aos tempos em que era utilizada para aquisição de fibras têxteis e como planta medicinal e no século VII a.C, os asiáticos incorporavam

a *Cannabis* em rituais religiosos e como medicina artesanal, nomeadamente como elemento terapêutico em doenças psiquiátricas e neurológicas. Em 1842, o cirurgião irlandês O'Shaughnessy estudou os efeitos farmacológicos da planta e promoveu a sua utilização com fim terapêutico após o médico Ramazzini ter estudado os seus potenciais efeitos tóxicos. Em 1964 a OMS classificou os canabinóides dentro das drogas que produzem dependência, uma vez que o seu potencial psicotrópico se destacou em relação ao seu potencial efeito terapêutico. Desde os anos 60, os canabinóides foram estudados com o intuito terapêutico, de forma a encontrar um antagonista dos recetores canabinóides com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias e sem efeitos psicotrópicos (48,49).

Alguns botânicos afirmam que existem três espécies de *cannabis*, a *Cannabis sativa*, a *Cannabis indica* e a *Cannabis ruderalis*. A composição química da *cannabis sativa* varia nas diferentes partes da planta, sendo a *cannabis* predominante no caule, o óleo nas sementes e de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) nas zonas mais altas da planta com flor (47).

O Δ^9 -THC consiste no princípio ativo da *Cannabis* sob a forma pura e foi isolado da planta em 1964 por Gaoni e Mechoulam (Figura 5 (a)), porém este não foi o primeiro canabinóide descoberto, mas sim o Canabinol (CBN), obtido da resina da *cannabis* em 1896 (Figura 5 (b)). A estrutura deste canabinóide foi descoberta em 1940 e no mesmo foi isolado outro princípio da resina da *cannabis*, o Canabidiol (CBD) (Figura 5 (c)). O Δ^9 -THC é o canabinóide natural da *cannabis sativa* com maior potência psicoativa, motivo pelo qual a potência dos produtos de *cannabis* depende da sua quantidade, geralmente representada em percentagem de Δ^9 -THC. Diferentes partes da planta contêm percentagens variadas de Δ^9 -THC, sendo este um dos fatores responsável pela variação das propriedades psicoativas da *cannabis*. Este canabinóide apresenta atividade agonista parcial para com os recetores canabinóides, presentes no Sistema Nervoso (47–49).

Na Europa, a *cannabis* é uma das drogas mais conhecidas sendo a sua utilização recreativa tão antiga quanto a sua utilização em medicina (34,49). Os padrões de consumo de *cannabis* são muito diversificados e vão desde o consumo experimental e/ou ocasional ao regular, existindo ainda o consumo dependente (34).

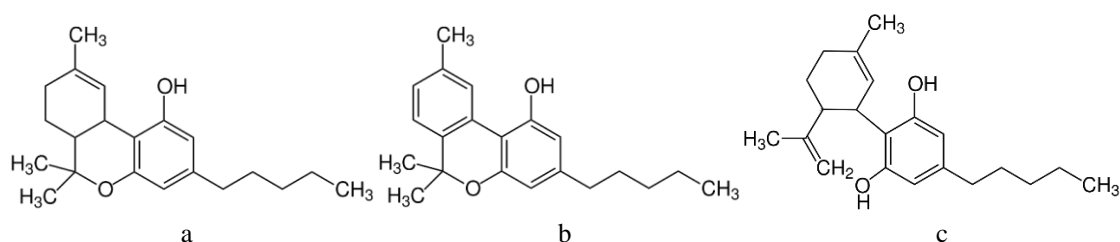


Figura 5 - Estrutura química do Δ^9 -THC (a), do canabinol (b) e do canabidiol (c) (adaptado de (50))

As formas de consumo da *cannabis* variam de acordo com as preparações da mesma e com o seu grau de potência, sendo as mais comuns a *cannabis* herbácea ou erva (“marijuana”), a resina (haxixe) e o óleo de haxixe (óleo de *cannabis*) (34,47). A erva, também conhecida por “marijuana”, é constituída por várias partes da planta sendo habitualmente uma mistura de flores e folhas secas para posterior formação de cigarros, sendo estes fumados. A resina, também conhecida por haxixe, é libertada pela própria

planta em formato de gotas, porém também pode ser extraída com a utilização de solventes orgânicos. Esta depois de obtida da planta é queimada e misturada com tabaco para posteriormente ser fumada em cigarros ou em cachimbos especiais. A resina é cinco a oito vezes mais potente que a erva. O óleo de haxixe ou óleo de *cannabis* é obtido por extração a quente da planta ou do haxixe através da utilização de solventes orgânicos que posteriormente são evaporados. Este óleo consiste na forma concentrada de resina de *cannabis* pelo que apresenta maior potência que o haxixe e é popularmente conhecido por “óleo negro” ou “óleo de mel” (34,47).

A via de administração mais comum da *cannabis* é a inalatória, sendo que na Europa é misturada com tabaco, contudo também pode ser administrada por via oral (48,51).

A *cannabis* é a droga com maior número de apreensões, sendo a herbácea e a resina os dois principais produtos de *cannabis* comercializados no mercado europeu de drogas. Desde 2009, o número de apreensões de *cannabis* herbácea tem ultrapassado o da resina de *cannabis*, porém a quantidade de resina apreendida tem sido superior à herbácea, o que pode ser explicado pelo facto de a resina ser traficada em maiores quantidades (34,36). Apesar do reduzido número de apreensões, o óleo de *cannabis* tem sido apreendido em grandes quantidades nos últimos anos (34).

O número de apreensões de *cannabis* na União Europeia tem-se mantido relativamente estável desde 2012, quer para *cannabis* herbácea, como para resina de *cannabis* (34,36). Ainda que o número de apreensões de plantas de *cannabis* seja muito inferior ao de *cannabis* herbácea e de resina de *cannabis*, este pode ser um forte indicador da produção desta droga (34,36).

Em alguns países da UE, a comercialização de produtos de *cannabis* herbácea e óleo de *cannabis*, desde 2017, tem sido disponibilizada em lojas de alimentação saudável ou lojas de especialidade. Esta comercialização de venda livre assenta no facto de estes produtos apresentarem poucos ou nenhuns efeitos tóxicos devido à sua baixa potência e, como tal, não são fiscalizados ao abrigo da lei de combate à droga (34).

1.3.5. Novas substâncias psicoativas

O conceito “novas substâncias psicoativas” (NSP) refere-se às novas substâncias narcóticas ou psicotrópicas, na forma pura ou em preparação que não são controladas pela Convenção Única das Nações Unidas de 1961 sobre narcóticos, nem pela Convenção das Nações Unidas de 1971 sobre psicotrópicos, mas que podem representar uma ameaça à saúde pública comparável com as que são apresentadas nas referidas convenções (32,52–54).

Atualmente, esta é a definição legalmente utilizada pela União Europeia e adotada pelo Observatório Europeu da Droga e Toxicodpendência - OEDT (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA*), pelo Serviço Europeu de Polícia (*European Union's Law Enforcement Agency, EUROPOL*), pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (*United Nations Office on Drugs and Crime*,

UNODC), pelo Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD) e por outras entidades, que são responsáveis pela monitorização da evolução do consumo de drogas na Europa, as quais têm o objetivo de diminuir a procura e a oferta destas substâncias e, conseqüentemente a diminuição dos riscos associados ao consumo e ao tráfico das mesmas (32).

A utilização do termo “novo” das NSP não se refere unicamente a substâncias descobertas e sintetizadas recentemente, uma vez que a data de origem de grande parte delas remonta a séculos passados, mas sim à recente disponibilidade no mercado e ao novo uso ilícito (32,55).

Até ao atual conceito de NSP surgiram vários termos e conceitos para as mesmas substâncias, todos eles transmitindo a noção de legalidade, ausência de sanções legais e também de segurança (quanto ao nível de perigosidade que as restantes drogas listadas na lei acarretam), como “*Designer Drugs*”, “*Legal Highs*”, “*Legal Drugs*”, “*Research Chemicals*”, “*Herbal Highs*”, “*Smart Drugs*”, “*Party Pills*”, “*Bath Salts*”, “*Plant Fertiliser*”, “*Drug Analogues*”, “*Emerging Psychoactive Substances*”, “*Novel Psychoactive Substances*”, “*Synthetic Drugs*”, “*Plant Food*”, “*Glass Cleaner*” (20,32,52,54,56–60).

Nos anos 80 destacou-se o surgimento das drogas sintéticas, inicialmente para fins terapêuticos, mas rapidamente obtiveram outros fins, dada a sua modificação e manipulação laboratorial de modo a melhorar e a criar dados efeitos psicoativos bem como prevenir efeitos secundários indesejados (61,62). Nos anos 90, devido à *Internet*, a divulgação das NSP aumentou e, conseqüentemente, a comercialização, a disponibilização e consumo também aumentaram. Porém, é a partir da primeira década do século XXI que se dá um aumento significativo de apreensões de inúmeras NSP em todo o mundo e, onde se verifica a diminuição do consumo de drogas por crenças religiosas e o aumento drástico do consumo recreativo (63).

As NSP, nomeadamente as sintéticas, são desenvolvidas como alternativa às drogas ilegais clássicas, ou seja, mimetizam os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas que já são controladas (41,52,64).

A maior parte das NSP provém da Ásia, que segundo a OEDT e a Europol é a sede de produção. É na China, em empresas químicas e farmacêuticas que, a maior parte destas substâncias são produzidas em quantidades a granel e de onde são exportadas para a Europa de forma legal, onde posteriormente são transformadas em produtos, embaladas, publicitadas e comercializadas sob a forma de ambientadores, incensos, sais de banho, comprimidos, ervas, fungos e fertilizantes para plantas (34,65).

Estas substâncias podem ainda ser produzidas na Europa, em laboratórios clandestinos ou noutros locais, como medicamentos e posteriormente introduzidos nas cadeias de abastecimento legítimo (62,66). Geralmente, estes produtos são intencionalmente mal rotulados, nomeadamente com a indicação de ingredientes que não são os reais e que não pertencem ao conteúdo do produto, juntamente com um dos seguintes avisos: “não apropriado para consumo humano”; “proibida a venda a menores”; “manter fora do alcance de crianças” ou “não testado quanto aos riscos e toxicidade” (48,60,64,67–73). Na maior parte dos casos, os consumidores desconhecem o verdadeiro

conteúdo desses produtos, o que os torna ainda mais perigosos para a saúde pública (63,74).

Inicialmente, o aumento do consumo de NSP coincidiu com o aparecimento de novas tecnologias, nomeadamente a *Internet* e com a abertura de “*smartshops*”. As “*smartshops*” são lojas físicas que se dedicaram exclusivamente à comercialização de NSP, tendo sido aberta a primeira loja na Holanda, em 1994. Portugal foi o segundo país da Europa a abrir uma destas lojas, sendo que a primeira se designava “O Cogumelo Mágico” e abriu no ano de 2007 em Aveiro. Esta vendia sobretudo produtos naturais, como cogumelos alucinogénios, *salvia divinorum* ou *kratom*. A partir desta foram sendo abertas várias por todo o país (26,63,75).

A lei portuguesa, relativamente à regulamentação da venda de produtos nas “*smartshops*” não acompanhou a lei holandesa, uma vez que a holandesa legaliza as “*smartshops*” desde que os rótulos e a identificação estejam explícitos e rigorosos quanto a todos os ingredientes da composição do produto, e somente considera ilegal a venda dissimulada de substâncias psicotrópicas (76). Em Portugal, a venda dissimulada a preços reduzidos tornou-se habitual sob diversas formas, tendo-se tornado rapidamente um problema de saúde pública e, conseqüentemente levado ao encerramento destes estabelecimentos, devido à implementação do Decreto-lei n.º54/2013 (77).

Atualmente, o aumento do consumo destas novas substâncias, especialmente nas faixas etárias mais jovens, tem sido notório e presume-se ser devido ao crescente número de NSP, à evolução e ao desenvolvimento científico e tecnológico, ao baixo custo da síntese de compostos orgânicos, à globalização comercial, à fácil disponibilidade de reagentes e principalmente à facilidade de acesso (60).

No final de 2019, o EMCDDA monitorizou mais de 790 novas substâncias psicoativas, 53 delas detetadas pela primeira vez na Europa no referido ano (Figura 6) (34).

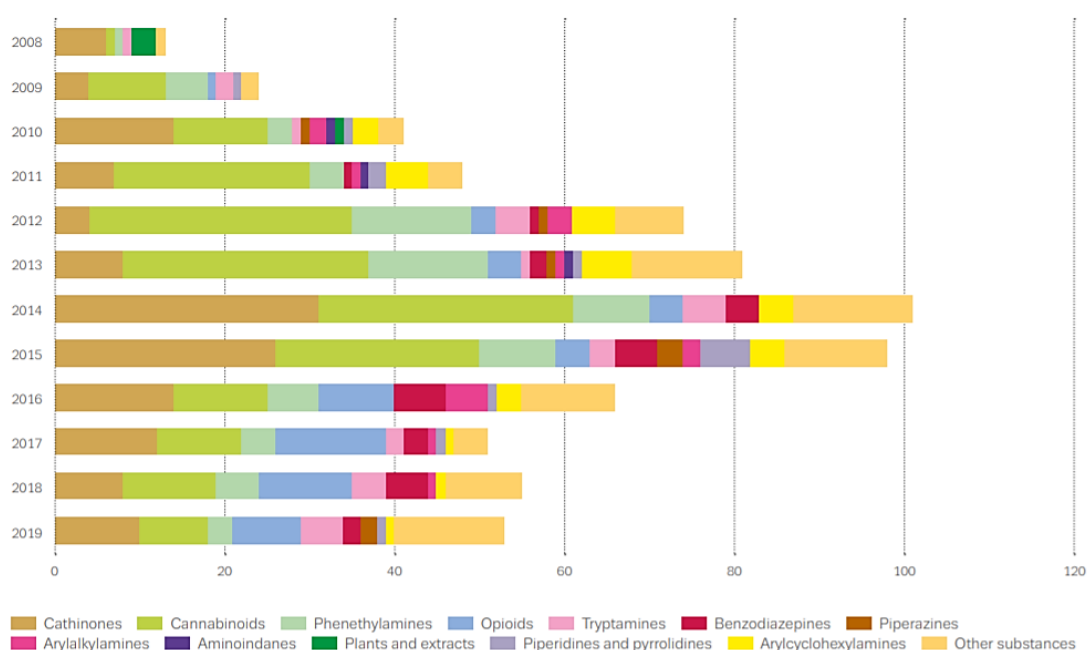


Figura 6 - Número e principais grupos de NSP notificadas pela primeira vez ao mecanismo de alerta rápido (EWS) da UE, entre 2008 e 2019 (adaptado de (36))

De acordo com a Portaria nº154/2013 anexada ao Decreto-Lei nº54/2013, as novas substâncias psicoativas podem ser divididas em 7 categorias, sendo elas: feniletilaminas e derivados, piperazinas e derivados, canabinóides sintéticos, derivados/análogos da cocaína, derivados da catinona, plantas e respetivos constituintes ativos e “outros”.

1.3.6. Legislação das drogas de abuso

Após a aprovação da Convenção das Nações Unidas contra o Tráfico Ilícito de Estupefacientes e de Substâncias Psicotrópicas de 1988 e assinada por Portugal, foi desenvolvida uma legislação de combate à droga em Portugal, o Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro, que sofrera várias atualizações sendo a versão mais atualizada, a vigésima quarta alteração, a Lei n.º 15/2020, de 29 de maio. Este Decreto-lei aprova o regime jurídico aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas e apresenta em anexo, em formato de tabelas, as plantas, substâncias e preparações sujeitas a controlo, nomeadamente ao regime revisto no respetivo decreto-lei, sendo estas atualizadas de acordo com as alterações aprovadas pelos órgãos próprios das Nações Unidas. Este Decreto-lei tem como objetivos a privação dos que se dedicam ao tráfico de estupefacientes, a adoção de medidas adequadas para controlar e fiscalizar os precursores, produtos químicos, solventes e as substâncias utilizadas para a produção de estupefacientes e de psicotrópicos, assim como reforçar e complementar as medidas previstas na Convenção sobre Estupefacientes de 1961 e na Convenção sobre Substâncias Psicotrópicas de 1971 (78,79).

A Lei n.º 15/2020 uma vez que se trata da vigésima quarta alteração do Decreto-Lei n.º 15/93, aprova o regime jurídico aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas, porém acrescenta-lhe novas substâncias, com adaptação da Diretiva Delegada (UE) 2019/369 da Comissão, de 13 de dezembro de 2018, e aplicação das decisões da 62.ª Sessão da Comissão dos Estupefacientes das Nações Unidas, realizada em março de 2019, com o intuito de incluir novas substâncias psicoativas na definição de droga (78,79).

Desde 2001, após a entrada em vigor da Lei n.º 30/2000, de 29 de novembro, em todo o território nacional, que o consumo, a aquisição e a posse para consumo próprio de plantas, substâncias ou preparações presentes nas tabelas I a IV anexas ao Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro, deixaram de ser considerados crime em Portugal, ou seja, o consumo foi descriminalizado, mas não foi despenalizado. Deste modo, consumir substâncias psicoativas ilícitas continua a ser um ato punível por lei, porém já não é crime, mas sim uma contraordenação (80,81).

A Lei n.º 30/2000, de 29 de novembro, frequentemente denominada de “lei da descriminalização do consumo”, define o regime jurídico aplicável ao consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas, bem como a proteção sanitária e social das pessoas que consomem tais substâncias sem prescrição médica e distingue o consumo do tráfico, em que o consumo é penalizado e o tráfico é criminalizado. Para além disso, esta lei cita que “a aquisição e posse para consumo próprio de plantas, substâncias ou preparações presentes nas tabelas supracitadas e anexadas ao Decreto-Lei n.º 15/93 não

pode exceder a quantidade necessária para o consumo médio individual durante o período de 10 dias”. Esta lei permitiu ainda que a forma como o consumidor de drogas é visto pela sociedade mudasse, deixando de ser considerado como um criminoso e passando a ser considerado como um indivíduo que precisa de ajuda e de apoio especializado (80,81).

1.3.6.1. Legislação das NSP

1.3.6.1.1. Na Europa

Atualmente, a legislação das NSP na Europa varia de país para país, ou seja, em função da droga e do próprio país, as sanções aplicáveis ao fornecimento de droga variam, podendo resultar de inúmeros fatores, nomeadamente de fatores históricos e culturais que influenciam diretamente o sistema penal, assim como as diferentes opiniões nacionais sobre a eficácia da condenação. Em todos os países europeus a venda de droga é crime, no entanto como referido anteriormente é punido com diferentes sanções consoante a lei do respetivo país, apesar da comum finalidade a toda a Europa de as proibir (82,83). As sanções legais aplicáveis por posse de drogas na Europa para consumo próprio, nomeadamente a pena de prisão, variam em função do tipo de droga, da quantidade e do próprio país (Figura 7).

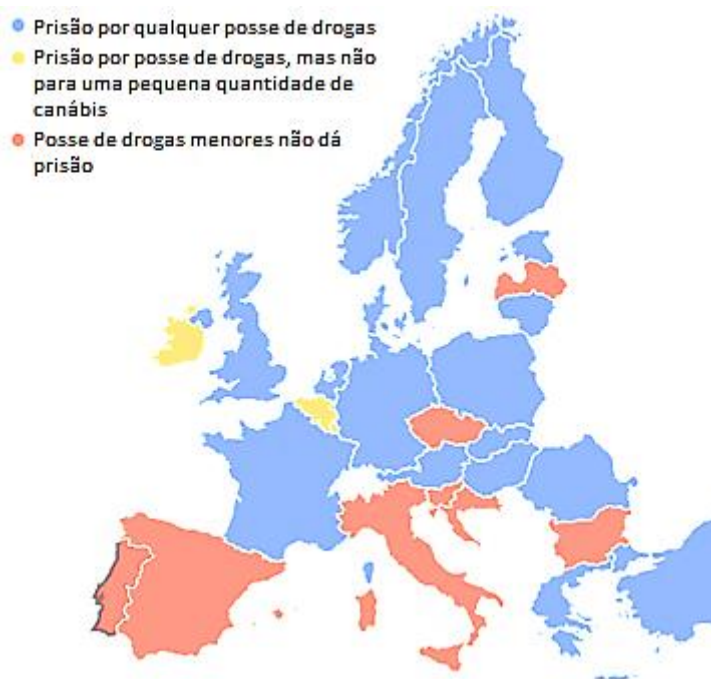


Figura 7 - Sanções legais: possibilidade de prisão por posse de drogas para uso pessoal (delito menor) (adaptado de (84))

Em 1997, o Conselho da Europa criou uma ação conjunta (*Joint Action*) com o objetivo de resolver a questão das NSP que não se enquadravam nas regras definidas pelas convenções internacionais sobre drogas. Em 2005, foi ampliado o âmbito da *Joint Action* e foi definido o conceito de NSP bem como o intercâmbio de informações, avaliação de

riscos associados ao consumo e de controlo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas, incluindo as NSP, através do EMCDDA, do Conselho da Europa e da EUROPOL. Ainda na mesma fase, foi criado o Mecanismo de Alerta Rápido (*Early Warning System* – EWS) que consiste num sistema europeu que permite o intercâmbio rápido de informações sobre as NSP entre os Estados-Membros, para a sinalização permanente e para a deteção e investigação do aparecimento de NSP. Este sistema permite a recolha e a análise de informação de forma rápida, relevante e fiável, para uma avaliação dos riscos associados ao consumo de NSP, de modo a sustentar a tomada de decisões quanto às medidas aplicáveis ao controlo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas que sejam também aplicáveis a estas novas substâncias (32,85).

O sistema EWS inclui três etapas fundamentais, sendo que a primeira consiste na emissão de um alerta para a identificação de novas drogas que sejam detetadas no mercado europeu, através da passagem de informação entre diferentes países. A segunda consiste num mecanismo para a avaliação dos riscos associados a estas drogas pelo EMCDDA, caso o tipo de alerta o permita e, a terceira num processo de tomada de decisão política colocando as substâncias em causa sob controlo dos Estados-Membros (32,85).

Na prática, cada vez que é detetada uma nova substância psicoativa no mercado europeu, os Estados Membros transmitem a informação da produção, do tráfico e do consumo dessa substância ao EMCDDA e à Europol através dos pontos focais nacionais da Rede Europeia de Informação sobre Droga e Toxicoddependência (REITOX) e das Unidades Nacionais da Europol (32,85).

A REITOX, criada no início dos anos 90, é constituída pelos Pontos Focais Nacionais (PFN) dos 27 Estados-Membros da União Europeia, pela Noruega, pelo país candidato Turquia e pela Comissão Europeia. Sob a responsabilidade dos seus governos, os Pontos Focais são as autoridades nacionais responsáveis pela recolha e envio de informações sobre drogas e toxicoddependência ao OEDT (32,85).

1.3.6.1.2. Em Portugal

Em Portugal, o Ponto Focal é o Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD) que, recebe e distribui os pedidos de informações sobre as novas substâncias psicoativas através da rede nacional constituída somente por parceiros institucionais, como o Instituto Nacional de Emergência Médica (INEM), o Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF), a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED), a Polícia de Segurança Pública (PSP), a Guarda Nacional Republicana (GNR), a Polícia Judiciária (PJ), entre outros. Quando o SICAD recebe informação de uma nova substância psicoativa, encaminha-a para o OEDT, que por sua vez partilha-a com a EUROPOL. Caso a EUROPOL tenha conhecimento acerca desta, partilha-a com o OEDT que posteriormente informa os Pontos Focais Nacionais, nomeadamente o SICAD em Portugal, que transmite a informação pela rede nacional (32,53,85).

Quando o OEDT e a EUROPOL consideram fundamental analisar com pormenor os riscos do consumo de uma nova substância, elaboram um relatório e encaminham-no para a Comissão Europeia e para a Agência Europeia do Medicamento. Por sua vez, o Conselho da União Europeia pode solicitar uma análise de risco a um Comité Científico que elabora um relatório sobre a temática e é com base neste que o Conselho decide se a substância deve ou não ser colocada sob medida de controlo. Existem essencialmente 2 premissas para que o Mecanismo de Alerta Rápido (EWS) funcione eficazmente, uma é a rapidez, em que os alertas nunca devem ser transmitidos pela rede nacional num prazo superior a 72 horas, e a outra é o alto grau de validade científica na recolha de dados e informações por profissionais, peritos e decisores políticos (85).

A primeira legislação que saiu em Portugal sobre as NSP foi a 22 de janeiro de 1993, o Decreto-lei n.º 15/93 que, posteriormente foi alterado pela Lei n.º 13/2012 que define o “regime jurídico do tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas”. No entanto, esta alteração não resolveu a problemática das “*smartshops*”, especialmente no arquipélago da Madeira onde houve um elevado número de ocorrências de comercialização de novas substâncias que não se enquadravam nas tabelas das substâncias proibidas. É nesta sequência que surge a primeira decisão legislativa ao nível da tutela penal, o Decreto Legislativo Regional n.º 28/2012, que aprova normas para a proteção dos cidadãos e para a redução da oferta destas substâncias, com a implementação de um regime contraordenacional de proibição de novas drogas, com base no mecanismo de alerta rápido e na avaliação dos riscos do consumo destas NSP, o que levou ao encerramento das 6 lojas existentes no arquipélago. Neste sentido, o Ministério da Saúde considerou extremamente preocupante o impacto da oferta das NSP e da sua ilegalidade, classificando-o como um problema de saúde pública. Deste modo, considerou-se indispensável estabelecer medidas sanitárias contra a produção, distribuição, venda, importação, exportação, publicidade, entrega ou posse de substâncias que surgissem no mercado, daí a implementação a 17 de Abril de 2013 do Decreto-Lei n.º 54/2013 (32,75).

Este decreto define o “regime jurídico da prevenção e proteção contra a publicidade e o comércio das novas substâncias psicoativas” classificando-as como substâncias que não se encontram classificadas nem controladas pela legislação que, em estado puro ou numa preparação, podem representar uma ameaça para a saúde pública comparável à das substâncias previstas na legislação, com perigo para a vida ou para a saúde e integridade física, devido aos efeitos no SNC. Estas podem eventualmente induzir alterações significativas a nível da função motora, como também ao nível das funções mentais, nomeadamente do raciocínio, juízo crítico e comportamento com regulares estados de delírio, alucinações ou extrema euforia, podendo causar dependência e, em determinados casos, produzir danos duradouros ou mesmo permanentes na saúde dos consumidores. Este Decreto-Lei ainda determina a proibição da produção, importação, exportação, publicidade, distribuição, venda, disponibilização ou posse de NSP, exceto quando destinadas para fins industriais ou para uso farmacêutico, desde que devidamente autorizadas pelo INFARMED. Prevê ainda a detenção e a possibilidade das autoridades competentes realizarem análises e perícias previstas no referido Decreto-Lei e determinarem o encerramento dos estabelecimentos onde as NSP são produzidas,

distribuídas, vendidas, disponibilizadas, armazenadas e/ou para exportação, ou a suspensão da atividade quando esta tem fins com risco para a saúde pública. Na sequência da entrada em vigor deste Decreto-Lei, as “*smartshops*” em Portugal foram encerradas pelas autoridades competentes, no entanto as NSP continuam a ser comercializadas e encontram-se disponíveis na *Internet* e no mercado ilícito.

Simultaneamente ao referido Decreto-Lei foi publicada a Portaria n.º 154/2013, que aprova a lista de Novas Substâncias Psicoativas a que se refere o artigo 3º do Decreto-Lei n.º 54/2013 (53,86).

1.4. Matrizes biológicas

A Toxicologia Forense pode separar-se em duas áreas distintas de acordo com o tipo de análises solicitadas: *ante* e *post-mortem*. Consequentemente, a variedade de matrizes biológicas passíveis de serem usadas na análise toxicológica varia em função da área de atuação. As matrizes preferenciais para colheita *in vivo* são o sangue, a urina, o cabelo e o conteúdo gástrico, enquanto *post mortem* são o sangue (periférico e cardíaco), a urina, o humor vítreo, o conteúdo gástrico, a bÍlis e órgãos (principalmente o fígado e rim). Em casos particulares podem ainda ser colhidas no decorrer da autópsia outras matrizes alternativas e adicionais como o líquido cefalorraquidiano, o líquido pericárdico, o cérebro, o baço e o músculo esquelético, bem como unhas, suor ou até mesmo pele, de forma a permitir e/ou complementar a investigação toxicológica (10,87–91).

A escolha da matriz é fundamental uma vez que a análise e os respetivos resultados dependem tanto do tipo de matriz como da sua quantidade, pelo que esta deve ser suficiente para que seja representativa e para que possa ser possível a obtenção de conclusões justificáveis. A escolha da matriz depende quase sempre do estudo a realizar, sendo que na análise de drogas de abuso o sangue, a urina e o humor vítreo são as matrizes biológicas mais comumente analisadas no SQTf-C. A utilização do sangue deve-se ao facto de este ser indicativo da exposição recente a substâncias tóxicas e à correlação entre os níveis sanguíneos do tóxico e os seus efeitos no organismo. Quanto à utilização da urina, esta apenas indica a exposição ao tóxico, sem evidência do tempo exato nem dos possíveis efeitos. Relativamente ao humor vítreo, este comumente é utilizado como matriz alternativa ao sangue em situações de trauma ou putrefação, uma vez que apresenta maior estabilidade quando comparado com outras matrizes e também pelo facto de algumas drogas apresentarem maior estabilidade nesta matriz do que no sangue, porém a interpretação dos resultados obtidos para a maioria das drogas é complicada devido à pouca literatura sobre as concentrações destas substâncias nesta matriz (10,92–94).

De seguida serão abordadas as principais características, assim como as vantagens e as desvantagens das matrizes biológicas supracitadas.

1.4.1. Sangue

O sangue é a matriz biológica de eleição em toxicologia forense, sendo considerada a mais apropriada para a identificação de compostos tóxicos, especialmente para análises quantitativas, visto que é a matriz que melhor representa a correlação entre a concentração do tóxico e os respetivos efeitos. Esta matriz permite detetar inúmeras substâncias, nomeadamente álcool, drogas de abuso, medicamentos, pesticidas e metais, tanto *in vivo* como *post mortem* (10,92–94).

O sangue apresenta distintas vantagens, nomeadamente o facto de apenas com uma única matriz ser possível identificar e quantificar compostos tóxicos, tanto na sua forma inalterada como na forma de metabolitos, ou seja, permite detetar tóxicos logo após a sua administração, antes ou durante o seu metabolismo e antes da sua eliminação. Para os exames de confirmação, o sangue é também considerado a melhor matriz, dado que a presença de compostos nesta é representativa da administração recente e do respetivo estado de influência. O sangue total é assim a matriz mais utilizada para a deteção de substâncias desconhecidas, sendo geralmente o sangue periférico a matriz de eleição para a análise quantitativa de substâncias confirmadas. O sangue também consiste numa amostra analítica útil na obtenção de resultados quantitativos devido à existência de uma extensa base de dados, a partir da qual é possível correlacionar as concentrações das substâncias tóxicas presentes no sangue de indivíduos antes e depois da morte com os seus efeitos tóxicos. Para além das referidas vantagens, o sangue pode ser colhido de diferentes locais anatómicos e pode ser analisado através de inúmeros métodos de análise. A deteção de substâncias tóxicas e seus metabolitos no sangue pode permitir a determinação do consumo crónico ou agudo, da via de administração e/ou da ocorrência ou não de redistribuição *post mortem* (RPM) (95). Apesar das inúmeras vantagens do sangue, esta matriz também apresenta desvantagens, nomeadamente o facto das concentrações de substâncias serem sujeitas a alterações *post mortem*, o local de colheita poder influenciar as concentrações das substâncias tóxicas, a existência de uma grande variação na correlação interpessoal das concentrações de substâncias com os efeitos, as amostras *post mortem* estarem frequentemente coaguladas ou hemolisadas e a possível distribuição desigual das substâncias entre o plasma e o sangue total (10,94,96). A utilização do sangue como matriz biológica para fins de triagem pode exigir uma preparação da amostra e apresenta uma janela de deteção relativamente baixa quando comparada com outras amostras, como a urina e o cabelo, ou seja, algumas substâncias são detetáveis por períodos de tempo relativamente curtos no sangue quando comparados com outras matrizes, pelo que nestas situações estas matrizes poderão ser uma escolha mais adequada para fins de triagem (95).

Apesar da complexidade do sangue e dos possíveis fenómenos de RPM que podem dificultar a sua análise, alguns critérios de interpretação de resultados permanecem válidos, nomeadamente quando é obtido um resultado analítico negativo, isto é, inferior ao limite de deteção definido pelo método utilizado, podendo ser interpretado como a inexistência de uma exposição aguda à substância em causa, enquanto a obtenção de concentrações do sangue que excedam 10 a 20 vezes a concentração terapêutica será coerente com uma situação de intoxicação ou de morte. Para além disso, quanto maior

for a razão da concentração substância/metabolito maior será a probabilidade de se tratar de um caso de intoxicação aguda (97).

A interpretação dos resultados é extremamente complexa nos casos em que as substâncias presentes nas amostras de sangue cardíaco sofrem RPM e se encontram presentes em concentrações que variam entre o limite máximo terapêutico e o limite mínimo para o qual foram reportados casos de intoxicação ou morte. Nestes casos, a análise de uma amostra de sangue periférico pode ser decisiva para avaliar o papel que a substância teve na vítima pelo que, sempre que possível, devem ser colhidas durante a autópsia amostras de sangue *post mortem* provenientes de dois locais distintos, do coração (sangue cardíaco) e dos vasos periféricos (sangue periférico) (97,98). Caso não seja realizada a autópsia, apenas o sangue periférico deve ser coletado. A concentração de uma substância deve, sempre que possível, ser determinada em duas ou mais amostras independentes, uma vez que o valor de um resultado de uma única amostra é limitado, a menos que a distribuição da substância seja conhecida, o que não acontece na maioria das substâncias (97).

O local de colheita de sangue *post mortem* é determinante, visto que as concentrações sanguíneas *post mortem* de muitas substâncias podem diferir intensamente quando colhidas de diferentes locais, podendo esta distribuição heterogênea de analitos dever-se à falta de equilíbrio da distribuição *ante mortem* ou a alterações *post mortem*, nomeadamente à RPM. O sangue periférico é um indicador mais confiável das concentrações *ante mortem* do que o sangue cardíaco, sendo este considerado adequado apenas para fins de triagem qualitativa inicial (95).

A colheita de sangue deve ser realizada de forma cautelosa para evitar a contaminação da amostra de órgãos adjacentes ou do conteúdo gástrico (98).

O local anatómico da colheita de sangue deve ser sempre registado no rótulo do tubo de colheita, sendo que este deve conter uma quantidade de fluoreto de sódio, responsável pela inibição da conversão de glucose em etanol e da oxidação do etanol, por ação dos microrganismos e a conversão *post mortem*, pela ação de colinesterases (93,97,99). O fluoreto de sódio também é responsável pela redução da perda, por ação enzimática, de alguns ésteres (10,100).

O sangue cardíaco deve ser colhido preferencialmente da cavidade direita, porém devido à ocorrência de fenómenos de RPM a utilização deste tipo de amostra em análises quantitativas deve ser evitada, sempre que seja possível (97). Dado o grande volume disponível, o sangue cardíaco é útil para a triagem e análises qualitativas (101).

Relativamente ao sangue periférico *post mortem*, este deve ser colhido através da veia femoral, ilíaca ou subclávia, uma vez que estes locais geralmente são menos afetados por alterações *post mortem* na concentração de substâncias (97). O sangue periférico é a amostra de eleição para a determinação de alcoolemia e quantificação de substâncias de interesse médico-legal. O sangue periférico encontra-se disponível em menor volume, devendo ser sempre colhido para a análise toxicológica. A colheita do sangue periférico *post mortem* na veia femoral deve-se ao facto de este se encontrar relativamente isolado dos órgãos internos do tórax e do abdómen e, portanto, menos influenciado pelo fenómeno de RPM (101). Recomenda-se a colheita para um recipiente de plástico contendo um anticoagulante como o fluoreto de sódio, no início da autópsia, de forma a

impedir eventuais contaminações. O tubo de colheita deve, se possível, ficar totalmente preenchido com a amostra, a fim de diminuir a perda de compostos voláteis, como o etanol, no momento da abertura do tubo no laboratório. A pesquisa de tóxicos voláteis no sangue periférico exige condições de colheita bastante rigorosas de modo a evitar a perda parcial ou total destes tóxicos. Para a análise de amostras de sangue *ante mortem* também se recomenda a colheita de sangue para um tubo com anticoagulante, nomeadamente o fluoreto de sódio (98,101).

A dose de uma substância está relacionada com a sua concentração no sangue em indivíduos vivos, motivo pelo qual o sangue é utilizado como a amostra preferencial em toxicologia *post mortem* (3).

Na colheita de sangue periférico *ante mortem* não se deve recorrer à utilização de zaragatoas antissépticas contendo álcoois ou iodo para desinfetar a pele antes da punção venosa, visto que estas podem provocar a sua contaminação (101).

1.4.2. Urina

A urina é o principal líquido de excreção do organismo e consiste numa das matrizes biológicas mais utilizadas em toxicologia forense na deteção de drogas de abuso, quer em casos *ante mortem*, quer em casos *post mortem*. Esta matriz permite a análise qualitativa tanto das substâncias tóxicas como também dos seus metabolitos, pelo que é uma importante ferramenta na análise toxicológica para verificar a exposição a substâncias tóxicas (102).

A urina é uma amostra biológica significativamente menos complexa que o sangue, uma vez que contém uma pequena quantidade de macromoléculas, devido ao processo de filtração renal, o que simplifica a preparação da amostra para análise (88,97). A urina é composta essencialmente por água (95-98%), ureia, ácido úrico, creatinina e iões, nomeadamente sódio, potássio, cloro e magnésio (3,88,102,103). O facto de a urina ser constituída maioritariamente por água e por pequenas quantidades de substâncias orgânicas e inorgânicas e, ainda por acumular as substâncias consumidas e os seus metabolitos em concentrações relativamente altas, esta amostra é particularmente indicada para a utilização em testes imunoenzimáticos (imunoensaios), que permite a triagem rápida de alguns grupos de substâncias com significativo interesse médico-legal e geralmente com pouca ou nenhuma preparação da amostra (95,97,98,104,105).

A urina consiste numa matriz biológica que apresenta inúmeras vantagens para a deteção de uma grande variedade de substâncias quando comparada com outras matrizes biológicas, nomeadamente pelo facto de estar prontamente disponível, a sua colheita é não invasiva, tem habitualmente um grande volume disponível e elevadas concentrações de substâncias tóxicas e/ou dos seus metabolitos (88,105). Esta matriz permite a determinação de concentrações detetáveis das substâncias tóxicas, mesmo quando estas são administradas em doses terapêuticas e, em alguns casos, determinar concentrações de substâncias tóxicas cem vezes superiores às determinadas no sangue (105). Para além das vantagens referidas, a urina também permite detetar a presença de diversas substâncias e seus metabolitos excretadas poucas horas após o seu consumo e podem continuar a ser

detetáveis durante vários dias ou semanas após o último consumo, sendo as concentrações de drogas e dos seus metabolitos geralmente maiores que no sangue (95).

A janela de detecção da urina é maior do que na maioria das outras matrizes, ou seja, as drogas geralmente podem ser detetadas na urina por um período de tempo maior do que no sangue e outras matrizes, porém depende de alguns fatores, como a dose, a via de administração, o metabolismo e a eliminação das substâncias, como também da especificidade e limite de detecção da metodologia analítica utilizada. O fator via de administração influencia na quantidade da substância que é absorvida e o metabolismo influencia no tipo e na quantidade de metabolitos que se formam, o que provoca o aumento ou a diminuição da janela de detecção. A janela de detecção de drogas de abuso na urina pode variar de 24 horas a um mês, dependendo maioritariamente da substância (3,97,106).

Apesar das inúmeras vantagens da urina como matriz biológica, esta também apresenta algumas desvantagens como a necessidade de supervisão durante a colheita, dado o elevado risco de adulteração da amostra, pelo que é fundamental garantir que a amostra realmente pertence ao indivíduo que está a ser examinado, como também a ausência de uma correlação com o estado de influenciado e o facto de raramente ser possível uma análise quantitativa (104,107).

Nos casos de colheita de urina *post mortem*, existem três desvantagens incluindo a possibilidade de inexistência de urina, uma vez que é comum que a bexiga se esvazie durante o processo de morte, a possibilidade de não se detetar a droga original, uma vez que muitas drogas são rapidamente metabolizadas ou estão presente em concentrações relativamente baixas e a dificuldade de interpretar as concentrações da maioria das drogas presentes na urina, uma vez que não existe uma correlação direta entre a concentração da droga na urina e o sangue. O facto de não existir uma correlação com os níveis sanguíneos está associada ao facto de a urina não ser um fluido circulante, mas sim um resíduo coletado na bexiga. As concentrações das drogas e seus metabolitos na urina dependem do tempo de formação da urina em relação à colheita e ingestão das drogas. A urina também não apresenta uma correlação com efeitos tóxicos no momento da colheita, sendo a bexiga um reservatório e, ao contrário do sangue, não está em equilíbrio com os tecidos (3,101).

A urina colhida durante a autópsia pode fornecer informações qualitativas sobre a exposição a determinada substância *ante mortem*, nomeadamente drogas de abuso, podendo a sua presença ser detetada entre algumas horas até várias semanas após a ingestão, em função da natureza da mesma. A acumulação nesta matriz de substâncias tóxicas e respetivos metabolitos resulta muitas vezes na ocorrência de concentrações elevadas, facilitando a detecção dos tóxicos (97).

Porém, em casos de morte devido ao consumo de drogas, em que o tempo de sobrevivência é inferior a uma hora, as drogas não são excretadas e, como tal, a urina não constitui uma matriz ideal para a detecção da substância consumida, ou seja, os resultados podem ser negativos se a morte ocorrer perto no momento da ingestão (97,101).

A identificação positiva de substâncias tóxicas na urina confirma o consumo dessas, porém não indica a quantidade ingerida e/ou a data de ingestão, e, no caso concreto das drogas de abuso, nada prevê quanto ao estado de influenciado, pelo que para

interpretar o contexto de consumo, o sangue deve ser testado para os analitos encontrados na urina (97). Nos casos em que existe a suspeita de que a morte terá ocorrido logo após o consumo da substância (presença de um recipiente suspeito ou de uma agulha com seringa no braço do cadáver), os achados negativos da substância na urina podem ser consistentes caso as concentrações sanguíneas dessa substância sejam elevadas (97).

De forma a evitar alterações nas concentrações dos analitos provocadas pela degradação bacteriana, as amostras de urina devem ser preservadas através da refrigeração e/ou congelação das amostras até à sua análise, uma vez que parece ser a melhor solução de preservação (88,104,107).

1.4.3. Humor vítreo

O humor vítreo é um fluido gelatinoso e viscoso, localizado no interior do globo ocular, e composto essencialmente por água (98-99%) e quantidades vestigiais de ácido hialurónico, glicose, iões, catiões, aniões e colagénio (95,98). Dada a sua localização, relativamente inacessível e protegida de trauma pelo osso orbital e pelo olho, e a sua composição, o humor vítreo encontra-se menos suscetível de contaminação, putrefação e redistribuição *post mortem* (95,98,101). Deste modo, as substâncias distribuídas nesta matriz sofrem pouca ou nenhuma síntese e/ou degradação, pelo que o humor vítreo é geralmente utilizado como matriz para a deteção de substâncias quando outras matrizes não estão disponíveis devido a trauma ou putrefação (95). Para além disso, o humor vítreo não é afetado pelo embalsamento, pelo que é uma excelente matriz alternativa ao sangue em casos de embalsamento (95,101). A composição relativamente simples do humor vítreo permite que seja analisado por métodos que requerem pouca ou nenhuma preparação de amostra (95).

O humor vítreo apresenta um papel importante na interpretação de alguns resultados toxicológicos como matriz alternativa ao sangue, particularmente em corpos em estado de decomposição. Pode permitir distinguir a ingestão de álcool *ante mortem* e a formação de álcool *post mortem*, pelo que esta matriz deve ser colhida sempre que possível (3,50,98,101).

Esta matriz tem sido cada vez mais utilizada na determinação de drogas, uma vez que algumas drogas e seus metabólitos, como a cocaína, a morfina e a 6-acetilmorfina são detetáveis no humor vítreo, porém outras drogas e seus metabólitos, como o THC e o seu metabólito THC-COOH, são menos detetáveis, mesmo quando presentes na urina e/ou no sangue (95,103).

Algumas drogas de abuso têm-se demonstrado mais estáveis no humor vítreo que no sangue, o que possivelmente pode ser explicado pela inexistência de esterases no olho. A ausência destas enzimas, responsáveis pela hidrólise de determinadas substâncias e metabólitos no sangue, torna o humor vítreo relevante para a deteção de algumas drogas e metabólitos, uma vez que não ocorre a redução de concentrações de determinadas substâncias (3,95,98,101,103,108).

Dada a localização do humor vítreo, existe uma demora na absorção de drogas e álcool nesta matriz, bem como uma demora no processo de excreção, pelo que as

concentrações de drogas presentes no humor vítreo refletem as concentrações sanguíneas circulantes 1 a 2 h antes da morte, ou seja, as concentrações presentes no humor vítreo ficam abaixo dos níveis sanguíneos aproximadamente 1 a 2 h (50,101).

O humor vítreo é uma matriz biológica de colheita acessível e que permanece estéril até três dias ou mais após a morte, pelo que apresenta maior estabilidade quando comparado com outras matrizes. Trata-se ainda de uma matriz com facilidade de análise e pouca ou nenhuma preparação da amostra. Porém apresenta um volume disponível limitado, motivo pelo qual é aconselhado que a amostra coletada de cada olho seja combinada num único recipiente, devidamente identificado (50,98,101). O humor vítreo apresenta também dificuldade de interpretação dos resultados para grande parte das drogas, uma vez que existe pouca informação literária sobre as concentrações de substâncias nesta matriz (3).

Como os analitos são transportados da corrente sanguínea por transporte ativo e passivo através da barreira sangue-retina, o humor vítreo está mais próximo do sangue do que da urina como material de amostra, o que o torna uma amostra similar ao sangue (106).

Na análise do humor vítreo, quando o resultado é positivo para etanol pode-se suspeitar o consumo *ante mortem* enquanto que se for negativo, com amostra de sangue positiva, pode-se suspeitar de produção de etanol *post mortem* no sangue devido aos processos de putrefação (101).

1.5. Cadeia de custódia

A cadeia de custódia consiste na documentação da história cronológica das amostras em todas as etapas desde a sua colheita até à sua destruição. O principal objetivo da cadeia de custódia é garantir a idoneidade e rastreabilidade das amostras utilizadas em processos judiciais de forma a evitar adulterações, nomeadamente alterações, substituições, contaminações ou destruições (97,108,109).

A cadeia de custódia envolve duas componentes, uma até chegar ao SQTf e outra dentro do SQTf. A primeira inclui as etapas de colheita, acondicionamento, transporte e entrega das amostras no laboratório e a segunda inclui a receção e armazenamento das amostras, manuseamento, análise e por fim a sua destruição, pelo que o laboratório apenas é responsável por esta segunda. Para garantir o cumprimento da cadeia de custódia, as amostras e as respetivas requisições toxicológicas devem ser colocadas nos diversos contentores de recolha e recipientes de envio ao SQTf.

1.5.1. Colheita, acondicionamento, transporte e entrega

A colheita das amostras biológicas deve obedecer a um conjunto de procedimentos standardizados e documentados para garantir a validade dos resultados.

Após colhidas e acondicionadas as amostras biológicas, estas devem ser transportadas o mais rapidamente possível até ao SQTf em condições de temperatura

apropriadas. Na receção, as amostras biológicas devem ser sempre acompanhadas das respetivas requisições das análises solicitadas ao SQTF.

1.5.2. Receção, registo e armazenamento

A receção das amostras e das respetivas requisições consiste na primeira etapa da cadeia de custódia intralaboratorial. É realizada a verificação das amostras recebidas com as informações descritas na requisição. Posteriormente as amostras são rotuladas, registadas e armazenadas em câmaras frigoríficas.

A requisição enviada com as amostras para o SQTF contém os seguintes campos: identificação da vítima; informações do caso; identificação da(s) amostra(s) colhida(s) e enviada(s); identificação das análises a realizar; identificação do remetente, auxiliando o toxicologista na condução das perícias toxicológicas.

Após a receção das amostras no laboratório, cada amostra deve ser rotulada com as seguintes informações: o número do processo, nome da vítima, o tipo de amostra a que corresponde o conteúdo do recipiente e o local anatómico da colheita, a assinatura do examinador, a data e hora da colheita.

Quando são recebidas amostras, nas quais se observe algum tipo de anomalia, isto é, com características inadequadas, como o volume insuficiente ou o acondicionamento incorreto, o laboratório regista todas as ocorrências.

1.5.3. Manuseamento e análise

1.5.3.1. Triagem ou exame de rastreio

A triagem no SQTF-C do INMLCF, I.P. é realizada num analisador automático (*Evolis Twin Plus System*), cujo funcionamento tem por base reações imuno-enzimáticas, nomeadamente no *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Este equipamento permite uma triagem de drogas de abuso e de benzodiazepinas.

Do procedimento de triagem obtém-se um resultado qualitativo e é com base nesse resultado que as amostras prosseguem ou não para confirmação, ou seja, se o resultado da triagem for positivo as amostras seguem para confirmação, se for negativo segue para relatório. A triagem permite assim, quando perante um resultado positivo, encaminhar a amostra para o procedimento de ensaio de confirmação do grupo de substâncias detetada no procedimento de triagem (110).

1.5.3.2. Exame de confirmação e quantificação

O exame de confirmação consiste num procedimento qualitativo para um determinado grupo de substâncias realizado numa amostra de sangue que se destina à identificação de uma ou mais substâncias.

A escolha do tipo de exame de confirmação a realizar depende do grupo de substâncias a confirmar. O exame de confirmação permite confirmar a presença de uma ou mais substâncias em amostras de sangue obtidas *in vivo* ou *post mortem*. As substâncias que forem confirmadas acima do limite de quantificação do método analítico são seguidamente quantificadas.

1.6. Escolha do padrão interno

O padrão interno consiste numa substância que deve ser diferente do analito, mas estruturalmente semelhante, ou seja, com propriedades físico-químicas semelhantes às do analito em estudo. Não deve reagir com o analito ou com outro qualquer componente da matriz e não deve estar presente na amostra para não interferir nos resultados (111,112).

O padrão interno deve ser suficientemente estável para que não se degrade durante a preparação da amostra e ao longo de todas as etapas do processo de análise.

O padrão interno ideal seria o análogo deuterado da substância em estudo, porém nem sempre é possível, dado o seu elevado custo e o facto de não existirem análogos deuterados disponíveis comercialmente para todas as substâncias (112,113). No SQTF todas as drogas de abuso são analisadas com recurso a padrões internos deuterados.

1.7. Preparação da amostra

A preparação da amostra consiste na primeira etapa do procedimento analítico e é uma das etapas mais importantes, se não a mais importante da análise toxicológica. Esta etapa tem como objetivo a purificação da amostra, isto é, a remoção de eventuais interferentes da matriz. A purificação permite não só que o analito em estudo seja analisado, impedindo que os interferentes da matriz afetem a análise, obtendo-se cromatogramas mais limpos, como também previne a degradação das colunas cromatográficas, aumentando o seu tempo de vida, dado que amostras mais limpas provocam menos danos no equipamento analítico (114,115). A preparação da amostra consiste assim na extração dos analitos de interesse presentes numa matriz biológica, composta por diferentes tipos de interferentes, como proteínas, lípidos, sais minerais, entre outros.

Existem diversas técnicas de preparação da amostra utilizadas na análise toxicológica que permitem extrair os analitos de interesse, bem como concentrá-los e purificá-los, no sentido de eliminar os interferentes e aumentar a sensibilidade e seletividade analítica, sendo as mais comuns a centrifugação, a precipitação, a extração líquido-líquido (LLE), a extração em fase sólida (SPE), a microextração em fase sólida (SPME) e a derivatização.

A qualidade da preparação da amostra é fundamental para o sucesso da análise de matrizes biológicas complexas, influenciando a capacidade de deteção do método analítico.

1.7.1. Técnica de extração em fase sólida (SPE)

A escolha do procedimento extrativo e do adsorvente é fundamental uma vez que os procedimentos extrativos podem variar muito em termos de especificidade, limpeza e eficiência de extração (116). A escolha entre a LLE e a SPE, depende essencialmente do tipo de amostra e das propriedades dos analitos a extrair (117).

A extração em fase sólida (SPE) é uma das técnicas de separação mais utilizadas desde os anos 80, uma vez que apresenta inúmeras vantagens que se destacam em relação às restantes técnicas, nomeadamente em relação à LLE, porém também apresenta desvantagens (116).

A SPE consiste numa técnica simples de extrema importância em análises toxicológicas e de grande versatilidade, uma vez que apresenta uma vasta aplicação, como a análise de drogas de abuso em diversas matrizes biológicas, análise de resíduos de poluentes em amostras ambientais, entre muitas outras (116,118). As principais vantagens da SPE incluem a retenção seletiva dos analitos de interesse, a realização simultânea dos processos de purificação e pré-concentração da amostra, o baixo consumo de solventes orgânicos, a facilidade de execução, a extração eficiente de medicamentos e drogas, a proteção da coluna analítica, a não formação de emulsões, a possibilidade de automação, bem como a utilização de pequenos volumes de amostra. Para além disso, a SPE não apresenta alguns dos problemas da LLE, especialmente as separações de fase incompleta, as reduzidas recuperações quantitativas e a recorrente utilização de material quebrável (119,120). A principal desvantagem da SPE coincide com o bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes da matriz. Outra desvantagem da SPE inclui a possibilidade de ocorrer adsorção irreversível dos analitos na coluna extratora, impedindo a sua recuperação.

Até então, a SPE tem sido considerada uma técnica mais eficiente e flexível que a LLE, apresentando um maior rendimento quantitativo de extração, de fácil e rápida execução e de baixo custo e, em casos de equipamentos mais sofisticados, permite a sua automatização (116,119–122). Para além disso, a SPE permite obter níveis de recuperação de analito mais elevados e produzir extratos mais limpos (120). A SPE tem-se demonstrado adequada para um pequeno volume de amostra e para que os analitos presentes em baixas concentrações sejam identificados na etapa de análise seguinte (104).

Esta técnica permite diversos tipos de interações, incluindo a adsorção, pontes de hidrogénio, interações polares (hidrofílicas) e apolares (hidrofóbicas), trocas iónicas (catiónicas e aniónicas) ou exclusão molecular, ao contrário da LLE que apenas permite equilíbrios de partição da fase líquida. Tal diversidade de interações e aplicações analíticas na SPE deve-se aos inúmeros tipos de adsorventes disponíveis para esta técnica de extração (121,123).

A SPE tem por base a utilização de pequenas colunas de extração descartáveis, que contêm a fase sólida (fase estacionária) imobilizada entre duas membranas de retenção. Estas colunas encontram-se disponíveis com diversos tipos de enchimento, sendo estes constituídos por diferentes grupos funcionais e escolhidos de acordo com a aplicação e o objetivo do estudo. Geralmente, estas colunas são de polipropileno e contêm cerca de 50 a 500 mg de fase estacionária com partículas de cerca de 40-60 µm e poros

com aproximadamente 60Å de diâmetro (116,119,122,124–126). Os analitos de interesse encontram-se dissolvidos ou suspensos numa solução sendo, posteriormente, separados dos restantes analitos presentes na mistura, de acordo com as suas propriedades físicas e químicas (104). A separação por SPE baseia-se na afinidade preferencial do analito ou da impureza pela fase estacionária (118).

O processo de SPE pode ser dividido teoricamente em quatro etapas, sendo elas: o acondicionamento da coluna, a aplicação da amostra, a lavagem da coluna e a eluição dos analitos (Figura 8). Para que ocorra uma melhor adsorção dos analitos na coluna, por vezes é necessário, antes da extração, na fase de tratamento da amostra, proceder a ajustes de pH, polaridade e/ou viscosidade (104,119).

O acondicionamento da coluna consiste na ativação da fase sólida presente na coluna, através da adição de um solvente apropriado, podendo este ser apolar, uma solução-tampão ou um solvente ligeiramente polar, seguido da adição de água, que embebe o material adsorvente da fase sólida e promove a solvatação dos grupos funcionais das partículas que a constituem, sendo o metanol o solvente mais utilizado para este efeito. O objetivo desta etapa é remover o ar que se encontra presente entre as partículas da fase sólida da coluna e substituí-lo pelo solvente, promovendo assim a ativação da coluna, ou seja, preparando a coluna para os mecanismos de adsorção (119,120,127,128). A seguir, a amostra centrifugada é adicionada à coluna, onde os analitos ao passar pela fase estacionária interagem com a coluna e ficam retidos. Esta etapa é de extrema importância devendo a amostra ser adicionada lentamente à coluna, para que os analitos tenham tempo suficiente para se ligarem ao adsorvente. A etapa seguinte consiste na lavagem da fase estacionária da coluna, com um tampão ou com um solvente adequado, de forma a remover eventuais impurezas da matriz que ficaram retidas no adsorvente, sem remover os analitos de interesse. Após a etapa de lavagem, segue-se a secagem completa das colunas (104). A etapa final da SPE é a eluição do analito de interesse, com recurso a um eluente que permita a quebra das ligações entre o analito e o adsorvente. Após a obtenção do extrato por SPE, este pode ser analisado diretamente por cromatografia de gases ou pode ser evaporado à secura sob uma corrente de gás inerte, com aquecimento controlado e reconstituído com um solvente orgânico adequado. A reconstituição do extrato com um solvente puro é mais adequada para a injeção no equipamento GC-MS.

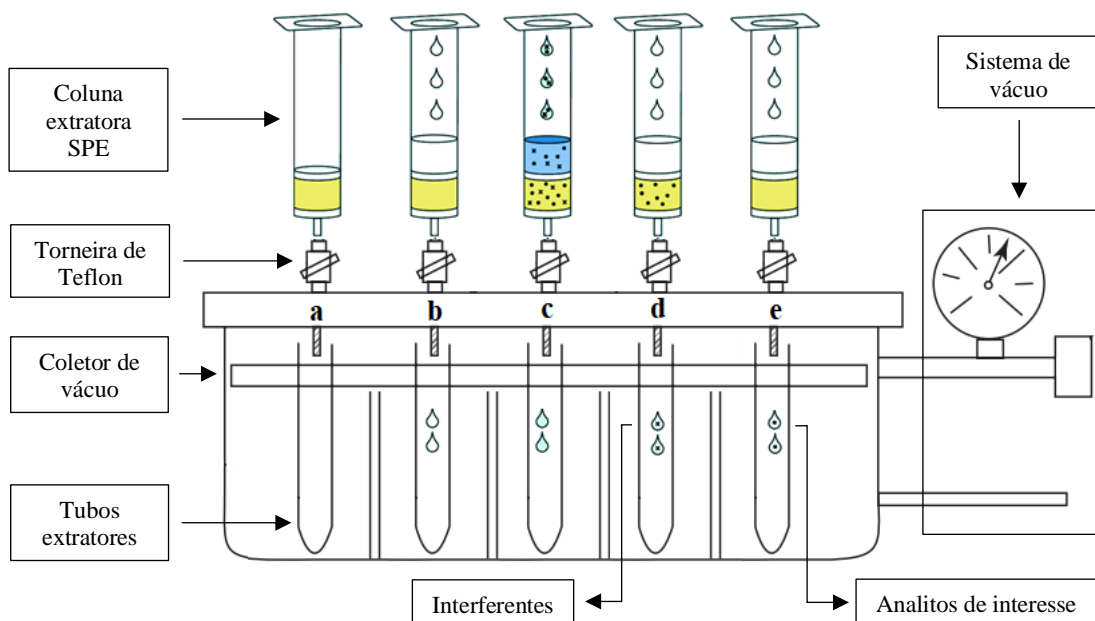


Figura 8 - Extração em fase sólida (SPE) a: Coluna - fase sólida compactada entre dois filtros; b: Acondicionamento – ativação da coluna com aplicação de um solvente apropriado; c: Aplicação da amostra – adsorção dos analitos de interesse; d: Lavagem da coluna – aplicação de um solvente apropriado para eluir impurezas e manter os analitos de interesse, e: Eluição dos analitos – recuperação dos analitos de interesse retidos na fase sólida (adaptado de (104))

1.7.2. Técnica de derivatização

A derivatização consiste na modificação química dos grupos funcionais de um composto, permitindo a análise cromatográfica de substâncias pouco voláteis, termolábeis e quimicamente instáveis (118,129–131).

A análise de compostos por GC e GC-MS requer que estes sejam voláteis a temperaturas abaixo de 350-400°C e termicamente estáveis, ou seja, que sejam rapidamente vaporizadas sem que se degradem ou que reajam com outras substâncias. Se a substância não apresentar estas características, é necessária uma etapa prévia de preparação da amostra, onde a substância será quimicamente modificada (derivatizada), para adquirir as propriedades físico-químicas adequadas para a análise cromatográfica por GC-MS (129,130).

Deste modo, a derivatização é usada na análise de substâncias com volatilidade ou estabilidade inadequadas e/ou para melhorar o comportamento cromatográfico ou a detetabilidade de um composto. Habitualmente, amostras derivatizadas apresentam maior volatilidade e melhor seletividade, estabilidade e detetabilidade. A derivatização permite assim melhorar/aumentar as características de volatilidade e estabilidade de uma determinada substância, diminuindo a sua polaridade, bem como melhorar a resolução e a simetria dos sinais cromatográficos (104,118,129–131).

A derivatização para que seja eficaz deve originar um único derivado para cada substância, devendo este ser estável nas condições de análise e que não interaja com a coluna analítica. Uma reação de derivatização deve ser rápida e completa, não causar rearranjos ou alterações estruturais na substância durante a formação do derivado, não

contribuir para a perda da substância durante a reação, bem como também deve ser reprodutível e, em análises quantitativas, a curva de calibração deve ser linear (129,131).

A escolha do reagente derivatizante depende do grupo funcional que se pretende derivatizar e dos outros grupos funcionais presentes na substância, bem como da estrutura química e das propriedades da substância (131).

As reações de derivatização mais utilizadas em cromatografia de gases são a sililação, a acilação e a alquilação. Estas reações, de uma forma geral, consistem na introdução de um grupo específico do reagente derivatizante na substância em estudo, isto é, ocorre a substituição do hidrogénio do grupo funcional, como -NH, -OH e -SH por grupos sililo, acilo e alquilo, respetivamente, o que provoca a sua modificação química e forma um derivado com propriedades físico-químicas apropriadas para a análise instrumental, nomeadamente o aumento significativo da volatilização das substâncias a analisar (118,129,130).

A sililação consiste na reação de derivatização mais utilizada na análise por GC-MS, com o intuito de aumentar a volatilidade do analito. A trimetilsililação é o procedimento de sililação mais comum, em que o hidrogénio ativo presente nos grupos -OH, -SH, -NH é substituído por grupos trimetilsilil (TMS), o que contribui para a estabilidade química e térmica assim como para o aumento da volatilidade do analito. Os reagentes N,O-bis-trimetilsilil-acetamida (BSA), o N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA) e N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) e o N-(ter-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) são os reagentes derivatizantes de sililação mais utilizados em métodos analíticos, devido ao seu elevado poder de sililação e à alta volatilidade desses reagentes e subprodutos da reação, demonstrando uma elevada eficácia na análise por GC-MS (118,129). Habitualmente é utilizado um catalisador para aumentar o poder de sililação dos reagentes de forma a derivatizar grupos funcionais estericamente impedidos ou para aumentar as taxas de reação, sendo o trimetilclorossilano (TMCS), um dos catalisadores mais utilizados. Na análise de drogas de abuso e dos seus metabolitos, o BSTFA com 1% de TMCS tem sido amplamente utilizado como o derivatizante e catalisador mais versátil, demonstrando-se a formação de produtos de reação mais voláteis e termicamente mais estáveis (118,129,130).

A acilação é uma reação de derivatização utilizada em GC-MS, nomeadamente para aminas primárias e secundárias, em que ocorre a modificação dos hidrogénios ativo existentes nos grupos -NH₂, -NH, -OH, -SH em ésteres, tioésteres e aminas através da introdução de um grupo acilo (COCH₃) por meio de reação com os reagentes derivatizantes como o anidrido acético (AA), o anidrido trifluoroacético (ATFA) ou o anidrido pentafluoropropiónico (PFPA), e catalisadas por calor, por meio ácido ou básico (118,129).

A alquilação é a reação de derivatização na qual ocorre a substituição de hidrogénios ativos de grupos polares por um grupo alquilo ou arilo, em que os ácidos carboxílicos, álcoois, tióis, fenóis, aminas primárias e secundárias e sulfonamidas são os grupos funcionais mais sujeitos a sofrer este tipo de reação (118,129). A alquilação e principalmente a metilação pode apresentar elevado interesse em diversas aplicações na

análise por GC-MS devido ao pequeno aumento na massa molecular e na volatilidade dos compostos formados (129).

A reação de derivatização realizada por ação de micro-ondas tem-se demonstrado significativamente eficaz na derivatização de substâncias identificadas e quantificadas por GC-MS. O aquecimento por micro-ondas ocorre diretamente na amostra, o que torna a reação mais rápida (132–134).

A derivatização acelerada por micro-ondas apresenta vantagens nas reações orgânicas, nomeadamente maior taxa de rendimento da reação, maior seletividade e menor decomposição térmica. O aquecimento por micro-ondas reduz significativamente o tempo necessário para a derivatização de um composto, podendo ser reduzido de uma hora para minutos. Conseguindo-se melhores resultados finais, uma vez que, também, permite a redução de produtos secundários não pretendidos, tendo ainda a capacidade de aquecer a amostra de uma forma uniforme (133–136).

1.8. Metodologia analítica

1.8.1. Cromatografia de gases acoplada à espetrometria de massa

A identificação das drogas de abuso, após serem detetadas por imunoensaios no procedimento de triagem, deve ser realizada através de uma técnica de cromatografia e/ou espetrometria de massa que permita distinguir substâncias com estruturas semelhantes e/ou isómeros. As técnicas hifenadas mais utilizadas para a identificação deste tipo de substâncias são a cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa (LC-MS) e cromatografia de gases acoplada à espetrometria de massa (GC-MS).

No SQTf do INMLCF, I.P. a técnica analítica utilizada na confirmação e quantificação de drogas de abuso é a cromatografia de gases acoplada à espetrometria de massa com ionização por impacto eletrónico (GC-MS-EI).

A cromatografia de gases acoplada à espetrometria de massa (GC-MS) consiste numa técnica hifenada, que associa a capacidade de separação da cromatografia de gases (GC) à deteção seletiva e sensível da espetrometria de massa (MS), o que permite não só realizar uma análise qualitativa como também quantitativa. Após a separação cromatográfica, as moléculas são ionizadas e fragmentadas, formando iões que posteriormente são separados num analisador de massas e detetados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). Cada composto sofre um processo de ionização e de fragmentação característico, obtendo-se o respetivo espetro de massa que permite identificar de forma inequívoca um composto, ou por comparação com bibliotecas de espetros, quando o analito é conhecido, ou por dedução da estrutura molecular para compostos desconhecidos (3,137–139). Esta técnica, indispensável em qualquer laboratório de análises toxicológicas, nomeadamente em laboratórios de toxicologia forense e clínica, é uma das mais utilizadas na análise confirmativa e quantitativa de misturas de compostos voláteis conhecidos e desconhecidos (140,141). A GC-MS comparativamente com outras técnicas cromatográficas hifenadas apresenta algumas vantagens, nomeadamente a sua elevada sensibilidade e especificidade bem como a

robustez, baixo custo, rapidez na análise e a caracterização de compostos desconhecidos (60,140,142–144). No entanto, esta técnica está limitada a substâncias voláteis e termicamente estáveis, e para alguns compostos é necessário recorrer à derivatização dos seus grupos funcionais (140,144).

A identificação dos compostos por parte dos detetores acoplados ao GC é geralmente baseada no tempo de retenção, porém muitos compostos possuem o mesmo tempo de retenção, pelo que a associação desta técnica com a espectrometria de massa permite distinguir os compostos através da obtenção dos respetivos espetros de massa. Desta forma, a combinação GC-MS é uma ferramenta de elevada eficácia na separação e identificação de compostos voláteis em misturas complexas, permitindo a análise qualitativa e quantitativa de cada um dos compostos em estudo (142,145).

A cromatografia de gases (GC) consiste numa técnica de separação de compostos que se encontram presentes numa amostra através da introdução da amostra num injetor com recurso a uma microseringa capilar graduada que injeta a mistura numa câmara de vaporização. Após a vaporização, a mistura atravessa o *liner* inerte de vidro e só depois é separada na coluna cromatográfica. Os componentes gasosos são transportados ao longo da fase estacionária por meio de uma fase móvel, um gás de arraste, sendo separados com base no ponto de ebulição e na afinidade dos componentes para com a coluna, geralmente apolar (3,142,146–149).

Relativamente aos sistemas de injeção que usam colunas capilares, estes atuam em modo *split* ou *splitless*, isto é, com ou sem partição de fluxo, respetivamente (146). Os modos de operação *split* ou *splitless* permitem controlar a quantidade de amostra que é introduzida na coluna, o que depende da concentração dos analitos de interesse presentes na amostra. O modo de *split* é recomendado para quando o analito constitui mais de 0,1% da amostra, sendo apenas uma pequena quantidade de amostra introduzida na coluna e analisada, sendo a restante amostra eliminada através de uma válvula, o que evita a saturação da coluna com elevadas concentrações de analitos e permite uma análise de alta resolução. O modo *splitless* é recomendado para quando o analito constitui menos de 0,01% da amostra, sendo a amostra introduzida na sua totalidade na coluna, o que torna a separação menos eficaz, todavia esta depende da variedade de compostos e respetivas concentrações presentes na amostra (3,138,147,148).

A fase estacionária consiste num líquido viscoso que se encontra ligado quimicamente à coluna cromatográfica e que deve ser selecionado com base em diversos critérios, nomeadamente o seu ponto de ebulição, que deve ser mais elevado que a temperatura máxima de operação da coluna (idealmente com ponto de ebulição 100°C acima), a sua estabilidade térmica, em que deve ser termicamente estável e não deve reagir quimicamente com a amostra (quimicamente inerte) e, a polaridade, pelo que os compostos têm que apresentar afinidade com a fase estacionária para que estes fiquem retidos na coluna de forma a ocorrer o processo de separação, motivo pelo qual os compostos polares requerem uma fase estacionária polar e os compostos apolares requerem uma fase estacionária apolar, originando desta forma separações mais eficientes (146,148). A fase apolar mais simples e mais comum é a de polidimetilsiloxano (PDMS), que apresenta vários grupos metilo, podendo alguns destes grupos ser substituídos por outros, variando assim a polaridade da fase estacionária, ou seja, ao substituir os grupos

metilo por substituintes mais polares, o caráter polar da fase estacionária vai aumentando (3,137,146,148,150). A espessura da fase estacionária também influencia a eficiência da coluna, pelo que se utilizam colunas com espessuras mais finas quando se pretendem separar compostos com baixas volatilidades e colunas com espessuras maiores para compostos muito voláteis (3,137,148,150). As colunas cromatográficas podem ser capilares ou empacotadas, sendo as capilares as mais usuais e as que apresentam maior eficiência de separação, promovendo separações com maior resolução, quando comparadas com as colunas empacotadas (3,137,146–148). A afinidade dos compostos com a fase estacionária influencia a ordem de eluição dos compostos, todavia os pontos de ebulição dos compostos são o critério que mais influencia a ordem de eluição, pelo que está diretamente relacionada com a variação da temperatura durante o tempo de eluição, ou seja, a temperatura a que se encontra a coluna também é um critério relevante na separação dos compostos, pelo que esta deve ser controlada. Deste modo, numa separação isotérmica a coluna é mantida a uma dada temperatura constante, enquanto um gradiente de temperaturas possibilita um aumento da temperatura de forma gradual ou por patamares (3,137,146–148). Quanto à seleção da fase móvel, como referido anteriormente, um gás de arraste, esta também depende de vários fatores, incluindo o custo, a segurança e a rapidez da análise. Dentro dos gases de arraste mais comuns estão o hidrogénio, o hélio e o azoto, devendo estes estar no seu estado puro e ser quimicamente inertes. O hélio é o gás mais utilizado (3,137,142,147–149).

A espectrometria de massa (MS) consiste numa técnica analítica de identificação, quantificação e caracterização molecular e estrutural de amostras com base na sua composição elementar, isto é, a partir do peso molecular, fórmula molecular e estrutura é possível identificar o composto. Esta técnica permite uma deteção sensível do analito de interesse e para tal produz iões das moléculas introduzidas no espectrómetro, para em seguida comparar a proporção da massa molecular com a carga líquida, permitindo a identificação do analito. Quando uma amostra é separada pela técnica GC e de seguida é introduzida na MS, a primeira coisa que ocorre é a ionização, em que o analito é convertido numa espécie carregada por um dos processos de ionização, pelo que é necessário escolher a técnica de ionização de acordo com a quantidade de energia interna transferida durante o processo de ionização e de acordo com as propriedades físico-químicas do analito de interesse (3,137–139,148,151). Existem essencialmente duas técnicas de ionização, a ionização por impacto eletrónico (EI) e a ionização química (CI). Na ionização por impacto eletrónico, o analito vaporizado interage com um feixe de eletrões enquanto na ionização química o analito também vaporizado reage com compostos químicos que promovem a sua fragmentação, porém em ambas as ionizações o fragmento caracteriza-se por um ião positivo, independentemente do tipo de técnica de ionização. A técnica de ionização mais utilizada é a EI uma vez que produz muitos iões, o que significa que ocorre uma elevada fragmentação permitindo assim uma maior seletividade, porém uma excessiva fragmentação pode prejudicar a identificação ou até mesmo impossibilitá-la, visto que o ião molecular pode ser completamente fragmentado, não sendo observado no espectro de massa, o que impede a determinação da massa molecular do composto (3,137–139,146). Cada composto apresenta uma fragmentação única em que são obtidos diferentes fragmentos e cada um é identificado através do seu

valor da razão massa/carga (m/z). A identificação destes geralmente resulta da comparação com base de dados de espectros ou por dedução da estrutura molecular inicial do composto, permitindo assim a identificação correta de cada um dos compostos presentes na mistura em análise (3,57,137–139,146,148).

Relativamente ao analisador de massa, responsável pela separação dos fragmentos com base nos valores da razão massa/carga (m/z), o mais utilizado neste tipo de separação e identificação é o quadrupolo simples. A análise dos iões no analisador de massa pode ser feita em varrimento contínuo (também conhecida por modo *full scan*), em que todos os iões são analisados dentro de um determinado intervalo de m/z selecionado, obtendo-se um registo completo da análise dos iões da amostra, ou pode ser feita em modo de monitorização seletiva de iões (*Selective Ion Monitoring*, SIM), em que apenas se obtém o espectro com os iões selecionados. O SIM apresenta maior sensibilidade que o *full scan*, uma vez que apenas são procurados iões específicos e assim é possível atingir limites de deteção mais baixos, dedicando mais tempo à análise de cada fragmento iónico de interesse (3,137–139,146,148,152,153).

Quanto aos detetores, estes podem ser distinguidos em detetores seletivos e detetores universais, sendo os seletivos os que apresentam uma resposta seletiva a determinados compostos e os universais os que apresentam resposta equivalente para todos os compostos. Os detetores, nomeadamente os detetores convencionais devem ser escolhidos em função da aplicação para a qual se pretende usar, sendo os mais comuns os apresentados na tabela 1. Os detetores seletivos mais utilizados são os detetores de captura eletrónica, que são adequados a analitos que tenham afinidade eletrónica e os detetores de azoto e fósforo, que são adequados aos compostos com azoto e fósforo, enquanto os detetores universais mais utilizados são os detetores de ionização de chama, os de condutividade térmica e os de massa (3,137,138,146).

Tabela 1 - Detetores utilizados em GC (adaptado de (137))

Detetor	Tipo	Aplicação
Ionização de chama	Universal	Compostos com cadeias carbonadas – Hidrocarbonetos
Condutividade térmica	Universal	Compostos gasosos
Espectrometria de massa	Universal	Ajustável a qualquer espécie
Captura eletrónica	Seletivo	Compostos com elevada afinidade eletrónica – Compostos halogenados
Azoto e Fósforo	Seletivo	Compostos com azoto e/ou fósforo

Para a determinação de drogas de abuso, e tendo em conta as baixas concentrações de analitos presentes em amostras biológicas, o detetor utilizado no SQTFC do INMLCF, I.P. é o detetor de espectrometria de massa de quadrupolo simples, em modo SIM. O modo *full scan* somente é usado para a análise de substâncias desconhecidas, uma vez que permite obter um espectro de massa completo, isto é, com todos os iões do composto analisado, possibilitando a identificação dos iões específicos deste e conseqüentemente a sua identificação.

Capítulo II – Objetivos

2. Objetivos

O presente estágio tem como objetivo a observação e o acompanhamento da análise de drogas de abuso desde a receção, armazenamento e conservação de amostras, até à aplicação dos procedimentos de ensaio acreditados utilizados nas análises de rotina dessas substâncias, no SQTf-C do INMLCF, I.P.. Trata-se de um trabalho de observação com o qual se pretende a aquisição e o desenvolvimento de conhecimentos práticos e teóricos associados à análise de drogas de abuso em amostras biológicas. O estágio permitirá proporcionar o contacto com a realidade do SQTf-C, através do acompanhamento do percurso das amostras desde a sua receção no serviço até à sua análise cromatográfica. Neste estágio, será também possível interagir com profissionais de excelência na área.

Capítulo III – Atividades realizadas

3. Atividades realizadas

A atividade no SQTF-C foi estruturada em quatro etapas, sendo elas: a observação da receção, registo e armazenamento de amostras; a observação do procedimento de triagem das amostras para a cocaína, opiáceos, canabinóides, anfetaminas e metanfetaminas; observação da aplicação dos procedimentos de ensaio de rotina de confirmação e de quantificação das diferentes drogas de abuso e metabolitos no sangue por GC-MS. Deste modo, o estágio iniciou-se com o acompanhamento da receção, registo e armazenamento de amostras. Seguidamente foi observada a realização do procedimento de triagem de drogas de abuso pela técnica de imunoensaios e posteriormente foi acompanhado o trabalho realizado na equipa 2, que é responsável pela confirmação e quantificação de drogas de abuso por cromatografia de gases acoplada à espetrometria de massa (GC-MS). Nesta equipa de trabalho foram observadas as metodologias analíticas, validadas e acreditadas, usadas na determinação de drogas de abuso em sangue: opiáceos, cocaína e metabolitos, anfetaminas e metanfetaminas e novas substâncias psicoativas.

3.1. Cadeia de custódia intralaboratorial

Como já foi referido, a cadeia de custódia intralaboratorial consiste no registo cronológico detalhado de todas as etapas das amostras dentro do SQTF-C, nomeadamente a receção e armazenamento das amostras e respetivas requisições, o registo das amostras recebidas e respetivas requisições, o manuseamento, a análise e por fim a sua destruição. No SQTF-C são realizados um conjunto de procedimentos e registos que permitem ao laboratório reconstruir todas as operações realizadas com a amostra, mesmo após a sua destruição e na ausência do colaborador que realizou a análise, como por exemplo quem retirou as amostras da câmara frigorífica, qual o volume utilizado, quais os reagentes e padrões utilizados, quais os equipamentos volumétricos e analíticos utilizados, como e quem realizou o tratamento de resultados, entre outros.

O manuseamento das amostras inclui o registo do analista, a data e a hora em que estas foram utilizadas.

3.2. Receção, registo e armazenamento das amostras

Nesta primeira etapa, foi possível observar a receção das amostras e das respetivas requisições que as acompanham, a verificação da integridade das mesmas e do respetivo material de transporte, assim como o seu armazenamento em câmaras frigoríficas a cerca de -8°C.

Após a verificação e avaliação da conformidade da amostra e garantida a sua integridade, as amostras são etiquetadas e codificadas com um código interno e posteriormente são inseridas no *software Laboratory Information Management System* (LIMS) disponível no SQTF do INMLCF, I.P., com os respetivos procedimentos a realizar para cada amostra recebida, de acordo com o solicitado na requisição de análises

toxicológicas forenses. O objetivo desta etapa foi conhecer o percurso das amostras no SQTF, desde a sua chegada ao serviço até ao procedimento de triagem para as substâncias de interesse, neste caso para as drogas de abuso, para posteriormente se proceder à sua análise de confirmação e quantificação.

3.3. Triagem

O procedimento de triagem inicia-se com a descongelação das amostras à temperatura ambiente e a etiquetagem dos tubos de ensaio com um código de barras. A preparação das amostras consiste na diluição do sangue com um diluente de referência adequado para o equipamento, uma vez que no procedimento de triagem não se procede a um processo de extração.

Para além da preparação das amostras de sangue, são ainda preparadas soluções de controlo baixo e alto, o branco de reagente (apenas com diluente), o branco 1, o branco 2, o controlo negativo e os respetivos calibradores para as substâncias em estudo. Todas estas soluções, à exceção do branco reagente, são preparadas através da diluição de uma amostra de sangue branco (isento das substâncias a analisar). Os controlos baixo e alto contêm a junção de todas as substâncias analisadas na triagem em igual volume.

Após a preparação das amostras nos tubos de ensaio, bem como dos calibradores e controlos, procede-se à colocação dos mesmos na raque do equipamento de forma adequada, isto é, que permita a leitura adequada do código de barras, bem como a verificação e colocação dos volumes de solventes necessários para a análise, destacando-se que dois dos solventes são comuns a todos os kits, nomeadamente o reagente *stop* e o substrato, que deve ser o último a ser colocado, uma vez que pode reagir com a luz, pelo que sendo dos solventes mais consumidos é necessário usar um maior volume. Os restantes solventes adicionados à raque consistem nos conjugados das substâncias em análise, nomeadamente o conjugado de opiáceos, cocaína, canabinóides (THC), anfetaminas e metanfetaminas. É ainda verificado o volume das soluções de lavagem, nomeadamente da água desionizada.

De seguida, programa-se o *software* do *Evolis* para posterior colocação das raques previamente preparadas, de forma a dar início à análise. Este equipamento permite uma triagem de drogas de abuso mais rápida bem como também permite economizar recursos e facilitar o processo de determinação de drogas de abuso. Primeiro são colocados os solventes, depois os calibradores e só depois são colocadas as raques com as amostras, na seguinte ordem: branco reagente, branco 1, controlo baixo, branco 2, sequência dos sangues, controlo alto. Para a curva de calibração, é colocado o controlo negativo e só depois os calibradores preparados pelo analista.

Do procedimento de triagem obtém-se um resultado qualitativo e é com base nesse resultado que as amostras prosseguem ou não para confirmação, ou seja, uma vez obtido um resultado positivo as amostras seguem para um ensaio de confirmação e caso se obtenha também um resultado positivo neste ensaio, a amostra segue posteriormente para um ensaio de quantificação. Se obtido um resultado negativo no processo de triagem, as amostras não seguem para qualquer tipo de ensaio e é enviado o resultado para relatório.

3.4. Metodologia analítica

A equipa 2 do SQTF-C, tal como referido anteriormente, é a equipa responsável pela realização de ensaios de confirmação e quantificação de drogas de abuso bem como também pela triagem e confirmação de medicamentos e pesticidas através da análise por GC-MS. Durante o estágio foi acompanhada maioritariamente esta equipa, nomeadamente na observação dos procedimentos de ensaio de confirmação e de quantificação de drogas de abuso no sangue, como a cocaína e metabolitos, os opiáceos, as anfetaminas e substâncias relacionadas e as NSP. O SQTF do INMLCF, I.P. consiste num serviço acreditado no qual todos os procedimentos de ensaio de confirmação e quantificação de drogas de abuso estão acreditados e durante toda a execução dos procedimentos são utilizados reagentes de pureza e qualidade certificadas, materiais certificados, bem como equipamentos calibrados.

As soluções de trabalho, inclusive as misturas de trabalho encontram-se armazenadas numa câmara frigorífica a cerca de 8°C e as soluções *stock* encontram-se armazenadas numa câmara congeladora a cerca de -18°C.

Todos os métodos analíticos utilizados na análise de rotina de drogas de abuso foram validados segundo a norma adotada pelo grupo de trabalho científico para toxicologia forense (*Scientific Working Group for Forensic Toxicology, SWGTOX*), que descreve os parâmetros de boas práticas para validar métodos analíticos em toxicologia forense.

Após a triagem das drogas de abuso segue-se a realização da confirmação dessas mesmas drogas através de um procedimento analítico que tem por base cinco etapas, as quais foram observadas: a diluição da alíquota da amostra de ensaio com uma solução aquosa (um tampão) e a adição de um padrão interno adequado ao tipo de substância em estudo; a preparação do controlo de qualidade interno; a extração em fase sólida (SPE) para isolar as substâncias em estudo; a derivatização química do extrato obtido da extração pela técnica de micro-ondas e, por fim, a análise instrumental do extrato obtido por GC-MS.

No procedimento de confirmação de drogas de abuso, depois da diluição das amostras de ensaio e a adição do padrão interno segue-se a preparação do controlo de qualidade interno, que consiste na preparação de um branco de reagentes (somente com água desionizada), de uma amostra branca e de amostras controlo positivas em diferentes concentrações, de acordo com o grupo de drogas de abuso em estudo, que são preparados e analisados em simultâneo com as amostras de rotina. O controlo de qualidade interno garante a qualidade dos resultados analitos obtidos.

As amostras controlo positivas permitem estimar a concentração das respetivas substâncias na amostra de rotina, de forma a orientar os respetivos ensaios quantitativos. As amostras controlo negativas (amostra branca e branco de reagentes) permitem avaliar o efeito da matriz e outros possíveis interferentes em cada uma das sequências analíticas efetuadas.

A extração em fase sólida de drogas de abuso analisadas no SQTF-C é realizada através de um sistema de SPE (*Vac Elut SPS 24 Manifold*) com colunas de extração *Oasis MCX*[®] (3mL), Waters. Terminado o processo de extração segue-se a etapa de secagem

num evaporador de solventes sob corrente de azoto a cerca de 40°C, com posterior etapa de derivatização química, com a adição de um agente derivatizante ao extrato seco, e aceleração da reação com aquecimento durante 90 segundos sob ação de micro-ondas. O agente derivatizante utilizado no SQTf-C varia de acordo com o grupo de drogas de abuso, sendo utilizado o MSTFA/TMCS para os opiáceos e para a cocaína e metabolitos e o MBTFA para as anfetaminas e substâncias relacionadas. Após transferido o extrato derivatizado para um *vial*, e devidamente identificado de forma a assegurar a integridades dos resultados, a amostra é injetada e analisada no instrumento analítico, o GC-MS-EI, no qual são previamente estabelecidos os parâmetros analíticos da análise instrumental.

Se o resultado obtido para o ensaio de confirmação for positivo, segue-se o ensaio de quantificação para a(s) substância(s) confirmada(s).

O procedimento de ensaio de quantificação de drogas abuso tem por base as mesmas cinco etapas, a diluição da alíquota da amostra de ensaio com uma solução aquosa e a adição de um padrão interno adequado; a preparação do controlo interno; a extração em fase sólida; a derivatização do extrato obtido e, por fim, a análise do extrato obtido por GC-MS. No entanto, para além da preparação do controlo de qualidade interno, onde são utilizados 3 níveis de concentração de amostras controlo positivas, em duplicado, e amostras controlo negativas, é também necessária a preparação de uma curva de calibração, a qual permite determinar a concentração das substâncias confirmadas no procedimento de ensaio de confirmação qualitativo. A curva de calibração surge da relação linear entre as áreas relativas, que corresponde à razão entre a área do pico cromatográfico da substância vs. a área do pico do respetivo padrão interno deuterado, obtidas para os diferentes calibradores utilizados, e a concentração da substância nos mesmos, pelo que para a construção da curva de calibração são geralmente utilizados seis a sete calibradores com diferentes concentrações de acordo com o grupo de drogas de abuso a quantificar (com concentrações crescentes dos analitos entre o limite de quantificação de 25 ng/mL e 1000 ng/mL). A concentração das substâncias confirmadas é calculada por interpolação na curva de calibração e as amostras são analisadas em duplicado (x_1 e x_2).

Todos os procedimentos analíticos utilizados na determinação de rotina de drogas de abuso no SQTf foram devidamente validados e estão acreditados.

Durante o período do estágio apenas foi possível observar o procedimento de ensaio de confirmação e quantificação referentes aos opiáceos, à cocaína e metabolitos e às anfetaminas e substâncias relacionadas. Relativamente ao procedimento validado para NSP (em sangue, urina, HV e LP), existente no SQTf-C, este apenas contempla 22 catinonas sintéticas. Assim, quando há suspeita da presença de uma nova substância não incluída no método existente é feita uma análise em *full scan* e posteriormente adquire-se o padrão para proceder à sua confirmação.

3.5. Análise de resultados

A análise dos resultados do procedimento de triagem tem por base a comparação das absorvâncias das amostras com as absorvâncias de amostras brancas fortificadas com

as substâncias de interesse e de acordo com o valor de *cut-off* definido pelo laboratório, que consiste na concentração da substância de interesse utilizada como critério para apresentar um determinado resultado.

O resultado do procedimento de triagem é expresso como positivo quando é a absorvância obtida para a amostra é inferior à média das absorvâncias obtidas para o calibrador de *cut-off*, e como negativo quando a absorvância obtida para a amostra é superior à média das absorvâncias obtidas para o calibrador de *cut-off*.

Para a realização da análise dos resultados qualitativos obtidos do procedimento de ensaio de confirmação de drogas de abuso utiliza-se um programa para a realização da integração dos sinais cromatográficos obtidos por GC-MS e após integração e determinação das áreas correspondentes ao pico cromatográfico da substância em estudo e do respetivo padrão interno (padrão de referência certificado), recorre-se a folhas de cálculo (folhas de *excel*) previamente validadas no SQTF para facilitar os cálculos e evitar erros. É feita a comparação das abundâncias relativas de três iões monitorizados nas amostras analisadas e numa amostra branca fortificada com a substância de interesse (amostra controlo de concentração próxima) que permite a confirmação da substância em estudo.

A identificação das substâncias presentes nas amostras biológicas em estudo por GC-MS tem por base os critérios da Agência Mundial Antidopagem (*World Anti-Doping Agency, WADA*), nos quais é recomendada a identificação de três iões presentes no espectro de massa de cada um dos compostos (razão sinal/ruído) bem como a determinação das suas abundâncias relativas e do tempo da retenção relativo (*TRr*).

A razão sinal/ruído (S/N) corresponde à razão entre o sinal do ião diagnóstico menos intenso e o sinal do ruído da linha de base devendo, de acordo com os critérios da WADA, o valor desta razão ser superior a 3, para os três iões diagnóstico de cada substância. A determinação desta razão é obtida através da comparação da abundância relativa do ião diagnóstico com a abundância relativa da linha de base adjacente ao pico do composto.

Os intervalos de tolerância permitidos para as abundâncias relativas dos iões monitorizados, utilizados na identificação dos compostos em estudo, estão evidenciados na tabela 2.

Tabela 2 – Intervalos de abundâncias relativas dos iões diagnóstico e respetiva tolerância máxima, a utilizar em ensaios de confirmação (adaptado de (154))

Abundância Relativa (%)	Tolerância
50 – 100	± 10
25 – 50	± 20 %
1 – 25	± 5

O tempo de retenção relativo (*TRr*) de uma substância pode ser determinado em relação ao tempo de retenção do padrão interno, uma vez que este é sujeito às mesmas

condições analíticas que as substâncias a analisar durante a separação cromatográfica, permitindo minimizar as diferenças no tempo de retenção que ocorrem em diferentes corridas (equação 1). Deste modo, e de acordo com os critérios da WADA, quando utilizado um análogo deuterado como padrão interno o tempo de retenção relativo do sinal cromatográfico da substância a analisar não deve diferir em mais de $\pm 0,5\%$ relativamente ao da mesma substância presente na amostra controlo. Ao invés, quando não utilizado um análogo deuterado como padrão interno, o tempo de retenção relativo do composto não deve diferir em mais de $\pm 1\%$.

$$TRr = \frac{TR_{Amostra}}{TR_{Padr\tilde{a}o\ Interno}} \quad (\text{equa\~{c}\~{a}o 1})$$

Onde:

TRr é o tempo de retenção relativo

$TR_{Amostra}$ é o tempo de retenção do analito

$TR_{Padr\tilde{a}o\ Interno}$ é o tempo de retenção do padrão interno

A variação do tempo de retenção relativo do analito na amostra ($TRr_{Amostra}$), segundo os critérios da WADA, deve ser inferior ou igual a 1% ou a $\pm 0,1$ minutos em relação ao tempo de retenção relativo do analito no controlo ($TRr_{Controlo}$) (154). A variação relativa do tempo de retenção relativo (ΔTRr) é calculada através da equação 2.

$$\Delta TRr = \frac{TRr_{Amostra} - TRr_{Controlo}}{TRr_{Controlo}} \quad (\text{equa\~{c}\~{a}o 2})$$

Onde:

ΔTRr é a variação relativa de TRr

$TRr_{Amostra}$ é o tempo de retenção relativo do analito na amostra

$TRr_{Controlo}$ é o tempo de retenção relativo do analito no controlo

O resultado do procedimento de ensaio de confirmação é reportado como positivo quando apresenta um sinal cujo tempo de retenção relativo é idêntico ao controlo, dentro de um intervalo previamente estabelecido pelo SQTF durante a validação do método analítico.

Os métodos utilizados para a confirmação qualitativa permitem estimar a concentração das substâncias de interesse através da comparação da razão da área do pico da substância de referência e a área do pico do padrão interno, dos picos presentes nas amostras controlo e as áreas das amostras analisadas, com o intuito de orientar a quantificação da substância de interesse. Nos casos em que o valor da concentração seja inferior à concentração do primeiro calibrador utilizado no respetivo procedimento de

ensaio de quantificação, a análise é dada por concluída e o resultado deve ser apresentado como inferior ao primeiro calibrador. Se exceder 5% do valor de concentração do último calibrador deverá proceder-se à diluição da amostra.

Após obtido o resultado qualitativo reportado como positivo, as amostras são submetidas ao procedimento de ensaio de quantificação, através do mesmo procedimento utilizado na confirmação, porém com a preparação da curva de calibração.

A análise dos resultados obtidos do procedimento de ensaio de quantificação é realizada, tal como a análise dos resultados obtidos do procedimento de ensaio de confirmação, recorrendo a folhas de cálculo (folhas *excel*) previamente construídas e validadas, nas quais as substâncias confirmadas são quantificadas através da curva de calibração, ou seja, nas quais é calculada a concentração de cada substância através de interpolação na respetiva curva de calibração. Dado que na análise quantitativa as amostras são analisadas em duplicado, nos casos em que a diferença absoluta entre os valores mais divergentes é inferior ao limite de repetibilidade o resultado final consiste na média aritmética dos dois valores, e nos casos em que essa diferença é superior ao limite de repetibilidade a análise deverá ser repetida. Tendo em conta o volume de amostra necessária para a análise de duas alíquotas independentes para obter um resultado quantitativo, nos casos em que não existe volume de amostra suficiente o analista pode escolher se utiliza somente uma alíquota ou se utiliza um volume de amostra inferior ao estabelecido no procedimento de ensaio.

Os resultados quantitativos provenientes da determinação de drogas de abuso devem ser expressos em nanogramas por mililitro (ng/mL) e somente devem ser reportados quando estejam dentro da gama de interpolação da curva de calibração. Após obtidos os resultados analíticos, o SQTF elabora um relatório denominado de “Relatório Final” onde devem constar os resultados qualitativos e/ou quantitativos obtidos no(s) ensaio(s), com as respetivas unidades de medida, bem como a identificação da entidade requisitante e do SQTF, identificação do procedimento de ensaio e o método analítico utilizados, a identificação das amostras analisadas, entre outras informações relevantes para o processo e, sempre que possível, o relatório deve apresentar ainda a incerteza associada ao método.

Capítulo IV – Conclusão

4. Conclusão

Dada a diversidade de drogas de abuso existentes no mundo, apenas foram abordados neste relatório de estágio os grupos de drogas de abuso analisados no SQTF-C e considerados pelo SICAD como os grupos de maior consumo e importância a nível nacional e pelo OEDT a nível europeu, destacando-se os opiáceos, cocaína e metabolitos, anfetaminas e derivados, canabinóides e novas substâncias psicoativas (NSP).

A determinação de drogas de abuso em amostras biológicas e não biológicas realizada no SQTF é maioritariamente solicitada no âmbito das perícias médico-legais e no âmbito Código da Estrada.

O sangue periférico é a matriz biológica de eleição para a determinação de drogas de abuso *in vivo* e *post mortem*, porém outras matrizes são utilizadas na análise toxicológica, nomeadamente como matrizes alternativas ao sangue periférico quando este não se encontra disponível, ou como matrizes auxiliares para orientar a análise toxicológica e contribuir para uma melhor interpretação dos resultados toxicológicos obtidos. Relativamente à técnica analítica aplicada na determinação e quantificação dos diferentes grupos de drogas de abuso no SQTF-C do INMLCF, I.P., a GC-MS é a técnica atualmente utilizada devido à sua elevada sensibilidade. Contudo, na análise toxicológica, antes da análise instrumental propriamente dita, nomeadamente na análise cromatográfica de amostras biológicas, é fundamental a etapa de preparação da amostra para uma adequada separação e/ou deteção, através da purificação e da concentração da substância em estudo. O procedimento de ensaio de confirmação e quantificação dos diferentes grupos de drogas de abuso tem por base as mesmas cinco etapas, sendo elas a diluição da amostra de ensaio e adição de padrão interno; a preparação do controlo de qualidade interno; a extração em fase sólida (SPE); a derivatização química do extrato obtido da extração e, por fim, a análise instrumental do extrato obtido por GC-MS, porém o procedimento de ensaio de quantificação apresenta uma etapa adicional em relação ao procedimento de confirmação, que consiste na preparação de uma curva de calibração, a qual permite determinar a concentração das substâncias confirmadas no procedimento de ensaio de confirmação.

O presente estágio consistiu na componente prática do mestrado, tendo sido acompanhada e orientada durante todo o percurso, o que permitiu adquirir e desenvolver conhecimentos práticos para a determinação de drogas de abuso em amostras biológicas e não biológicas em contexto forense, através das metodologias de rotina disponíveis no SQTF-C do INMLCF, I. P., nomeadamente através da técnica GC-MS.

No início do estágio apresentámos alguma insegurança relacionada com a falta de experiência na concretização das atividades estipuladas para o estágio. Contudo, gradualmente fomos ganhando confiança e autonomia na preparação e na realização das atividades definidas, tendo todas as atividades sido enriquecedoras e de aprendizagem.

Durante o estágio foi possível identificar e compreender as falhas existentes na nossa formação, o que permitiu desenvolver e melhorar os conhecimentos até então adquiridos, bem como aprender com as experiências menos positivas e com os erros cometidos, melhorando e crescendo enquanto futura profissional e enquanto ser humano. Durante toda a formação académica somos continuamente preparados a nível teórico para

a realidade da prática, que depende principalmente dos nossos conhecimentos e do nosso empenho, porém pouco ou nada aplicamos esses conhecimentos na prática durante a formação académica, salvo se realizarmos uma unidade curricular dedicada exclusivamente à componente prática, como é o caso do estágio. Contudo, no início do estágio confirmámos a utilidade e a necessidade de relembrar muitos dos conhecimentos previamente adquiridos, tendo-se prolongado essa necessidade ao longo do estágio, bem como também de adquirir novos conhecimentos.

O estágio foi sem dúvida uma das componentes fundamentais na nossa formação académica e consistiu num elemento de aprendizagem e de crescimento quer académico quer pessoal. Deste modo, o estágio contribuiu para a construção inicial da nossa experiência profissional e para o contacto com uma realidade prática concreta de toxicologia forense.

Em suma, o presente estágio permitiu aplicar e desenvolver os conhecimentos práticos adquiridos na nossa formação académica e contribuir para a construção da nossa formação e experiência profissional, proporcionando deste modo o desenvolvimento de inúmeras capacidades práticas que nos permitirão uma melhor preparação para os desafios do mercado de trabalho, com maior responsabilidade, autonomia e confiança e capaz de enfrentar e/ou contornar diversas situações.

Capítulo V – Bibliografía

5. Bibliografia

1. Dinis-Oliveira RJ, Magalhães T, Carvalho FD. Introdução à Toxicologia Forense. In: Dinis-Oliveira RJ, Carvalho FD, Bastos ML, editors. Toxicologia Forense. Pactor; 2015. p. 1–7.
2. Osselton MD, Moffat AC, Widdop B. Forensic Toxicology. In: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, editors. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 4^a ed. Pharmaceutical Press; 2011. p. 160–75.
3. Jickells S, Negrusz A. Clarke's Analytical Forensic Toxicology. 1^a ed. Jickells S, Negrusz A, editors. Pharmaceutical Press; 2008.
4. Gupta PK. Introduction and historical background. In: Gupta PK, editor. Fundamentals of Toxicology - Essential Concepts and Applications. Academic Press; 2016.
5. Dinis-Oliveira RJ, Magalhães T, Carvalho F. A Perícia em Toxicologia Forense: Da Suspeita à Interpretação dos Resultados. In: Pinheiro MF, editor. Ciências Forenses ao Serviço da Justiça. Pactor; 2013. p. 159–87.
6. Flanagan, Robert J.; Cypers, Eva; Maurer, Hans H.; Whelpton, Robin. Analytical Toxicology: overview. In: Fundamentals of analytical toxicology - Clinical and Forensic. 2^a ed. John Wiley & Sons, Ltd; 2020. p. 1–21.
7. Gupta PK. Definitions and scope of toxicology. In: Fundamentals of Toxicology - Essential Concepts and Applications. Elsevier Inc.; 2016.
8. Lappas NT, Lappas CM. The Development of Forensic Toxicology. In: Lappas NT, Lappas CM, editors. Forensic Toxicology - Principles and Concepts. Academic Press; 2016. p. 1–24.
9. Levine BS. Postmortem Forensic Toxicology. In: Barry S. Levine; Sarah Kerrigan, editor. Principles of Forensic Toxicology. 5^a ed. Springer; 2020. p. 3–13.
10. Kerrigan S, Goldberger BA. Forensic Toxicology. In: Virginia A. Lynch; Janet Barber Duval, editor. Forensic Nursing Science. 2^a ed. Mosby, Elsevier; 2011. p. 389–452.
11. Secretaria-Geral do Ministério da Justiça. Pedir exames toxicológicos [Internet]. justica.gov.pt. 2020. Available from: <https://justica.gov.pt/Servicos/Pedir-exames-toxicologicos>
12. Decreto-Lei n.º 166/2012, de 31 de julho. Diário da República, 1.^a série - N.º 147 p. 3951–7.

13. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF). Missão [Internet]. 2014. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=122&catid=29&Itemid=288
14. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF). Visão [Internet]. 2014. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=121&Itemid=287
15. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF). Valores [Internet]. 2014. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=123&Itemid=289
16. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF). Serviço de Química e Toxicologia Forense [Internet]. 2014. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=129:servico-de-quimica-e-toxicologia-forenses&catid=37&Itemid=292
17. Portaria n.º 19/2013, de 21 de janeiro. Diário da República, 1.ª série - N.º 14 p. 427–31.
18. Lei n.º 45/2004, de 19 de Agosto. Diário da República - I série-A, N.º 195 p. 5362–8.
19. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF). Serviços ao Cidadão - Vítimas de Crimes e Exames Particulares [Internet]. 2014. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=115&Itemid=283
20. Feng L-Y, Battulga A, Han E, Chung H, Li J-H. New psychoactive substances of natural origin: A brief review. *J Food Drug Anal* [Internet]. 2017 Jul;25(3):461–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949817300844>
21. Nunes LM, Jóluskin G. O uso de drogas: breve análise histórica e social. *Revista da Faculdade de Ciências Humanas e Sociais* [Internet]. 2007;4:230–7. Available from: <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/449/1/230-237FCHS04-15.pdf>
22. Hajar R. Intoxicants in society. *Hear Views*. 2016;17(1):42–8.
23. World Health Organization (WHO). *Lexicon of alcohol and drug terms* [Internet]. World Health Organization; 1994. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39461/9241544686_eng.pdf;jsessionid=72D0E85C3DF90C76B65FA7AF3172E7E5?sequence=1

24. Maldonado AL, Albornoz EOC. Drogas de abuso. In: Calabuig JAG, Cañadas EV, editors. *Medicina Legal y Toxicologia*. 6ª ed. Masson; 2004. p. 1014–34.
25. Richard D, Valleur M, Angel P. *Toxicomanias*. Climepsi Editores; 2002.
26. Oliveira SM. *Avaliação do Consumo de Drogas de Abuso por Estudantes Universitários: Experiência Profissionalizante na vertente Comunitária, Hospitalar e Investigação*. Universidade da Beira Interior; 2014.
27. Henriques S. Risco cultivado no consumo de novas drogas. *Sociologia, Problemas e Práticas*. 2002;40:63–85.
28. Balsa C, Vital C, Urbano C. III Inquérito Nacional ao Consumo de Substâncias Psicoativas na População Geral: Portugal 2012. 2012.
29. Brugal MT, Pulido J, Toro C, De La Fuente L, Bravo MJ, Ballesta R, et al. Injecting, sexual risk behaviors and HIV infection in young cocaine and heroin users in Spain. *Eur Addict Res*. 2009;15(3):171–8.
30. Filho MT, Yen CC, de Paula Santos U, Muñoz DR. Pulmonary alterations in cocaine users. *São Paulo Med J*. 2004;122(1):26–31.
31. Guevara JL, Pueyo VM. *Toxicologia Médica: Clínica y Laboral*. 1ª ed. Madrid: Interamericana McGraw-Hill, D.L.; 1995. 409–432; 585–641 p.
32. Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD). *Novas substâncias psicoativas* [Internet]. Available from: <http://www.sicad.pt/pt/cidadao/substanciaspsicoativas/Paginas/detalhe.aspx?itemId=19>
33. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). *The International Drug Control Conventions* [Internet]. 2013. Available from: https://www.unodc.org/documents/commissions/CND/Int_Drug_Control_Conventions/Ebook/The_International_Drug_Control_Conventions_E.pdf
34. Observatório Europeu de Droga e da Toxicodependência (OEDT). *Relatório Europeu sobre Drogas 2019: Tendências e evoluções*. 2019.
35. Oliveira A, Dinis-Oliveira RJ, Carvalho FD. Opioides. In: Dinis-Oliveira RJ, Carvalho FD, Bastos ML, editors. *Toxicologia Forense*. Pactor; 2015. p. 141–64.
36. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *European Drug Report: Trends and Developments 2020*. 1–82 p.
37. Vroegop MP, Franssen EJ, van der Voort PHJ, van den Berg TNA, Langeweg RJ, Kramers C. The emergency care of cocaine intoxications. *Neth J Med*. 2009;67(4):122–6.
38. Isenschmid DS. Cocaine. In: Levine BS., Kerrigan S, editors. *Principles of*

- Forensic Toxicology. 5^a ed. Springer; 2020. p. 371–87.
39. Mantovani C de C, Pego AMF, Yonamine M. Cocaína. In: Dinis-Oliveira RJ, Carvalho FD, Bastos ML, editors. Toxicologia Forense. Pactor; 2015. p. 217–28.
 40. Margalho C. Procedimento de ensaio de quantificação de opiáceos no sangue por GC/MS. 2018. (PE-SQTF-C-207).
 41. Kelleher C, Christie R, Lalor K, Fox J, Bowden M, O'Donnell C. An Overview of New Psychoactive Substances and the Outlets Supplying Them [Internet]. National Advisory Committee on Drugs (NACD); 2011. Available from: http://www.nacd.ie/publications/Head_Report2011_overview.pdf
 42. Margalho C. Procedimento de ensaio de confirmação de cocaína e metabolitos no sangue por GC/MS. 2018. (PE-SQTF-C-202).
 43. Karch SB. Karch's Pathology of Drug Abuse. 3^a ed. CRC Press - Taylor & Francis Group; 2001.
 44. Rosado T, Gonçalves A, Margalho C, Barroso M, Gallardo E. Rapid analysis of cocaine and metabolites in urine using microextraction in packed sorbent and GC/MS. Anal Bioanal Chem. 2017;409(8):2051–2063.
 45. Capela JP, Carvalho FD. Anfetaminas e Derivados. In: Dinis-Oliveira RJ, Carvalho FD, Bastos ML, editors. Toxicologia Forense. Pactor; 2015. p. 203–14.
 46. Tyrkkö E, Andersson M, Kronstrand R. The toxicology of new psychoactive substances: Synthetic cathinones and phenylethylamines. Ther Drug Monit. 2016;38(2):190–216.
 47. Teixeira HM. Canabinóides. In: Dinis-Oliveira RJ, Carvalho FD, Bastos ML, editors. Toxicologia Forense. Pactor; 2015. p. 187–98.
 48. Lindsay L, White ML. Herbal Marijuana Alternatives and Bath Salts - “Barely Legal” Toxic Highs. Clin Pediatr Emerg Med. 2012;13(4):283–91.
 49. Seely KA, Lapoint J, Moran JH, Fattore L. Spice drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry. 2012;39(2):234–43.
 50. Bono JP. Criminalistics - Introduction to Controlled Substances. In: Karch SB, editor. Drug Abuse Handbook. CRC Press; 1998.
 51. Auwärter V, Dresen S, Weinmann W, Müller M, Pütz M, Ferreirós N. ‘Spice’ and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? J Mass Spectrom. 2009;44(5):832–7.
 52. Liechti ME. Novel psychoactive substances (designer drugs): overview and

- pharmacology of modulators of monoamine signalling. *Swiss Med Wkly*. 2015;145:1–12.
53. Decreto-Lei n.º 54/2013, de 17 de abril. *Diário da República*, 1.ª série - N.º 75 p. 2250–4.
 54. Smith SW, Garlich FM. Availability and Supply of Novel Psychoactive Substances. In: Dargan PI, Wood DM, editors. *Novel Psychoactive Substances: Classification, Pharmacology and Toxicology*. 1ª ed. Academic Press; 2013. p. 55–77.
 55. Wohlfarth A, Weinmann W. Bioanalysis of new designer drugs. *Bioanalysis* [Internet]. 2010;2(5):965–79. Available from: <https://doi.org/10.4155/bio.10.32>
 56. Baumeister D, Tojo LM, Tracy DK. Legal highs: Staying on top of the flood of novel psychoactive substances. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2015;5(2):97–132.
 57. Karila L, Lafaye G, Scocard A, Cottencin O, Benyamina A. MDPV and α -PVP use in humans: The twisted sisters. *Neuropharmacology*. 2018;134:65–72.
 58. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). *World Drug Report 2013*. Vienna, Austria;
 59. Winstock A, Wilkins C. ‘Legal highs’: The challenge of new psychoactive substances [Internet]. *Legislative Reform of Drug Policies*. 2011. Available from: <https://www.tni.org/files/download/dlr16.pdf>
 60. Zuba D. Identification of cathinones and other active components of “legal highs” by mass spectrometric methods. *Trends Anal Chem*. 2012;32:15–30.
 61. Godinho J. “Ecstasy” (MDMA) e outras “Designer Drugs.” *Revista Toxicodependência (SICAD)* [Internet]. 1995;63–6. Available from: http://www.sicad.pt/BK/RevistaToxicodependencias/Lists/SICAD_Artigos/Attachments/428/artigo9.pdf
 62. Henderson GL. Designer Drugs: Past History and Future Prospects. *J Forensic*. 1988;33(2):569–575.
 63. Calado V. *Novas Substâncias Psicoativas. O caso da Salvia Divinorum*. 2013.
 64. Smith JP, Sutcliffe OB, Banks CE. An overview of recent developments in the analytical detection of new psychoactive substances (NPSs). *Analyst* [Internet]. 2015;140(15):4932–48. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5AN00797F>
 65. Johnson LA, Johnson RL, Portier R-B. Current “Legal Highs.” *J Emerg Med*. 2013;44(6):1108–15.
 66. Lanaro R, Costa JL, Filho LAZ, Cazenave SOS. Identificação química da clorofenilpiperazina (CPP) em comprimidos apreendidos. *Quim Nova*.

- 2010;33(3):725–9.
67. Coppola M, Mondola R. Synthetic cathinones: Chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as “bath salts” or “plant food.” *Toxicol Lett.* 2012;211(2):144–9.
 68. Helander A, Bäckberg M, Hultén P, Al-Saffar Y, Beck O. Detection of new psychoactive substance use among emergency room patients: Results from the Swedish STRIDA project. *Forensic Sci Int.* 2014;243:23–9.
 69. Musselman ME, Hampton JP. “Not for Human Consumption”: A Review of Emerging Designer Drugs. *Pharmacotherapy.* 2014;34(7):745–57.
 70. Olives TD, Orozco BS, Stellpflug SJ. Bath salts: The Ivory wave of trouble. *West J Emerg Med.* 2012;13(1):58–62.
 71. Prosser JM, Nelson LS. The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones. *J Med Toxicol.* 2012;8(1):33–42.
 72. Valente MJ, Pinho PG, Bastos MDL, Carvalho F, Carvalho M. Khat and synthetic cathinones: A review. *Arch Toxicol.* 2014;88(1):15–45.
 73. Zawilska JB, Wojcieszak J. Designer cathinones - An emerging class of novel recreational drugs. *Forensic Sci Int.* 2013;231(1–3):42–53.
 74. Alvarez JC, Etting I, Abe E, Villa A, Fabresse N. Identification and quantification of 4-methylethcathinone (4-MEC) and 3,4-methylenedioxypropylone (MDPV) in hair by LC–MS/MS after chronic administration. *Forensic Sci Int.* 2017;270:39–45.
 75. Lavado E, Leonardo J, Carapinha L, Torrado M, Frango P, Calado V. *Novas Substâncias Psicoativas em Portugal: Metodologia Trendspotter - Relatório Final.* 2018.
 76. Machado A. *Novas Drogas Sintéticas E As Smart-Shops – Realidade Nacional No Contexto Internacional.* 2014.
 77. Laar M van, Cruts G, Gageldonk A van, Ooyen-Houben M van, Croes E, Meijer R, et al. *The Netherlands Drug Situation 2007.*
 78. Lei n.º 15/2020, de 29 de maio. *Diário da República*, 1.ª série - N.º 105 p. 2–8.
 79. Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro. *Diário da República - I Série-A*, N.º 18 p. 234–52.
 80. Lei n.º 30/2000, de 29 de Novembro. *Diário da República - I Série-A*, N.º 276 p. 6829–33.
 81. Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências

- (SICAD). Descriminalização do Consumo [Internet]. Available from: <http://www.sicad.pt/PT/Cidadao/DesConsumo/Paginas/default.aspx>
82. Odoardi S, Romolo FS, Strano-Rossi S. A snapshot on NPS in Italy: Distribution of drugs in seized materials analysed in an Italian forensic laboratory in the period 2013-2015. *Forensic Sci Int.* 2016;265:116–20.
 83. Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT). Relatório Europeu sobre Drogas 2017: Tendências e evoluções. 2017.
 84. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Portugal, Country Drug Report 2019.
 85. Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD). Relações Internacionais - Mecanismo de Alerta Rápido [Internet]. Available from: http://www.sicad.pt/PT/RelacoesInternacionais/SitePages/detalhe.aspx?itemId=3&lista=SICAD_PONTOFOCAL&bkUrl=BK/RelacoesInternacionais/
 86. Portaria n.º 154/2013, de 17 de abril. *Diário da República*, 1.ª série - N.º 75 p. 2254–7.
 87. Huestis MA, Cone EJ. Alternative testing matrices. In: Karch SB, editor. *Drug Abuse Handbook*. CRC Press; 1998.
 88. Niu Z, Zhang W, Yu C, Zhang J, Wen Y. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *Trends Anal Chem.* 2018;102:123–46.
 89. Steven B. Karch. *Drug Abuse Handbook*. 2ª ed. Karch SB, editor. CRC Press - Taylor & Francis Group; 2007.
 90. Skopp G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int.* 2004;142(2–3):75–100.
 91. Beresford P. Guidance for Obtaining Post Mortem Samples for Toxicology Analysis [Internet]. Vol. BS/CB/TOX/, North Bristol NHS Trust. 2019. p. 1–5. Available from: <https://www.nbt.nhs.uk/severn-pathology/pathology-services/clinical-biochemistry/toxicology>
 92. Chamberlain J. *The Analysis of Drugs in Biological Fluids*. 2ª ed. CRC Press; 1995.
 93. Jones AW. Alcohol, its analysis in blood and breath for forensic purposes, impairment effects, and acute toxicity. *Wiley Interdiscip Rev Forensic Sci.* 2019;1.
 94. Osborn, M; Howard, M; Morley, S; McCarthy H. Guidelines on autopsy practice: Autopsy when drugs or poisoning may be involved. 2018.

95. Lappas NT, Lappas CM. Analytical Samples. In: Lappas NT, Lappas CM, editors. *Forensic Toxicology - Principles and Concepts*. Academic Press; 2016. p. 113–42.
96. Saukko P, Knight B. *Knight's Forensic Pathology*. 4^a ed. CRC Press; 2016.
97. Hepler BR., Isenschmid DS. Specimen selection, collection, preservation, and security. In: S.Karch, editor. *Drug Abuse Handbook*. CRC Press. 1998.
98. Franco JM. Norma Procedimental: Recomendações para a colheita e acondicionamento de amostras em Toxicologia Forense [Internet]. NP-INMLCF-009. 2013. Available from: <https://www.inmlcf.mj.pt/wdinmlWebsite/Data/file/OutrasInformacoes/PareceresOrientacoesServico/Normas/NP-INMLCF-009-Rev01.pdf?fbclid=IwAR02BQObolDS6MJEVKwPDurK8o-V-ytGSFMDxNb760Kwpv7UX9ITG1HOyiE>
99. Castle JW, Butzbach DM, Walker GS, Lenehan CE, Reith F, Kirkbride KP. Microbial impacts in postmortem toxicology. In: Carter DO, Tomberlin JK, Benbow ME, Metcalf JL, editors. *Forensic Microbiology*. 1^a ed. John Wiley & Sons, Ltd; 2017. p. 212–44.
100. Steven B. Karch. *Postmortem Toxicology of Abused Drugs*. Steven B. Karch, editor. Vol. 110, *Journal of Chemical Information and Modeling*. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group; 2008.
101. Dinis-Oliveira RJ, Vieira DN, Magalhães T. Guidelines for Collection of Biological Samples for Clinical and Forensic Toxicological Analysis. *Forensic Sci Res*. 2016;1(1):42–51.
102. Guyton AC. *Fisiologia Humana e Mecanismo das Doenças*. 5^a ed. Ganabara Koogan SA; 1991. 175–187 e 210–220 p.
103. Jenkins AJ. *Drug Testing in Alternate Biological Specimens*. 2^a ed. Jenkins AJ, editor. Human Press; 2008.
104. György Vas; Kornél Nagy; Károly Vékey. Biomedical sampling. In: Vékey K, Telekes A, Vertes A, editors. *Medical Applications of Mass Spectrometry*. 1^a ed. Elsevier Science; 2008. p. 37–59.
105. Gisbert Calabuig JA., Villanueva Cañadas E. Intoxicaciones por plaguicidas. In: Villanueva Cañadas E, editor. *Medicina Legal y Toxicología*. 6^a ed. Masson; 2004.
106. Pelander A, Ristimaa J, Ojanperä I. Vitreous humor as an alternative matrix for comprehensive drug screening in postmortem toxicology by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 2010;34(6):312–8.
107. Abraham TT, Lowe RH, Pirnay SO, Darwin WD, Huestis MA. Simultaneous GC-

- EI-MS Determination of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, 11-Hydroxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, and 11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Human Urine Following Tandem Enzyme-Alkaline Hydrolysis. *J Anal Toxicol*. 2007;31(8):477–85.
108. Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, Duarte JA, Remião F, Marques A, Santos A, et al. Collection of biological samples in forensic toxicology. *Toxicol Mech Methods*. 2010;20(7):363–414.
 109. Lappas NT, Lappas CM. Sample Handling. In: Lappas NT, Lappas CM, editors. *Forensic Toxicology - Principles and Concepts*. Academic Press; 2016. p. 77–94.
 110. Portaria n.º 902-B/2007, de 13 de Agosto. *Diário da República*, 1.ª série - N.º 155 p. 5266-(2)-5266-(8).
 111. Garcia AR, Cavaco I. Manual de boas práticas de laboratório e tratamento de resultados em Química Analítica. 2013.
 112. Dolan JW. When should an Internal Standard be used? *LCGC Eur* [Internet]. 2012;30(6):474–80. Available from: <http://www.chromatographyonline.com/when-should-internal-standard-be-used-0?id=&sk=&date=&pageID=4>
 113. Ermer J, Miller JHM. Performance Parameters, Calculations and Tests. In: Ermer J, Miller JHM, editors. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis A Guide to Best Practice*. 1ª ed. WILEY-VCH; 2005. p. 21–194.
 114. Almeida C, Rosário P, Serôdio P, Nogueira JMF. Novas Perspectivas na Preparação de Amostras para Análise Cromatográfica. *Sociedade Portuguesa de Química*. 2004;95:69–77.
 115. Waters Corporation. *Sample Preparation: Solid-Phase Extraction*. 2004.
 116. Kyle PB. Toxicology: GCMS. In: Nair H, Clarke W, editors. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. 1ª ed. Academic Press; 2017. p. 131–63.
 117. Wiergowski M, Aszyk J, Kaliszan M, Wilczewska K, Anand JS, Kot-wasik A, et al. Identification of novel psychoactive substances 25B-NBOMe and 4-CMC in biological material using HPLC-Q-TOF-MS and their quantification in blood using UPLC – MS / MS in case of severe intoxications. *J Chromatogr B*. 2017;1041–1042:1–10.
 118. Mariotti, K.C ; Ortiz, R. S.; Limberger RP. Sequência Analítica em Toxicologia Forense. In: Dinis-Oliveira RJ., Carvalho F., Bastos ML, editors. *Toxicologia Forense*. Fator; 2015. p. 109–22.
 119. Thurman EM, Mills MS. *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. John Wiley & Sons, Inc.; 1998.

120. Sigma-Aldrich. Guide to Solid Phase Extraction. Bulletin 910. 1998.
121. Mariano AC. Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para a Determinação de Metadona, Buprenorfina e seus Principais Metabolitos em Amostras Biológicas. Aplicações em Contexto Forense. Universidade de Coimbra; 2010.
122. Su Y, Xia S, Wang R, Xiao L. Phytohormonal quantification based on biological principles. In: Li J, Li C, Smith SM, editors. Hormone Metabolism and Signaling in Plants. 1^a ed. ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING CO INC: Academic Press; 2017. p. 431–70.
123. McDowall RD. Sample Preparation for Biomedical Analysis. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1989;492:3–58.
124. Rossi DT, Miller KG. Sample preparation methods for the analysis of pharmaceutical materials (Volume 5). In: Ahuja S, Alsante KM, editors. Handbook of Isolation Characterization of Impurities in Pharmaceuticals. 1^a ed. Academic Press; 2003. p. 165–201.
125. Walker V, Mills GA. Solid-phase extraction in clinical biochemistry. Ann Clin Biochem. 2002;39(Pt 5):464–77.
126. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quim Nova. 2004;27(5):771–80.
127. Matsuta S, Nakanishi K, Miki A, Zaitu K, Shima N, Kamata T, et al. Development of a simple one-pot extraction method for various drugs and metabolites of forensic interest in blood by modifying the QuEChERS method. Forensic Sci Int. 2013;232(1–3):40–5.
128. Huck CW, Bonn GK. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. J Chromatogr A. 2000;885(1–2):51–72.
129. Segura J, Ventura R, Jurado C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1998;713(1):61–90.
130. Sigma-Aldrich. Derivatization Reagents - For Selective Response and Detection in Complex Matrices. 2011.
131. Sigma-Aldrich. Guide to Derivatization Reagents for GC. Bulletin 909A. 1997.
132. Sanseverino AM. Microondas em Síntese Orgânica. Quim Nova. 2002;25(4):660–7.
133. Margalho C, Castanheira A, Corte Real F, Gallardo E, López-Rivadulla M. Determination of “new psychoactive substances” in postmortem matrices using microwave derivatization and gas chromatography–mass spectrometry. J

- Chromatogr B. 2016;1020:14–23.
134. Margalho C, Almeida P, Rosado T, Corte Real F, Gallardo E. Determination of New Psychoactive Substances in Whole Blood Using Microwave Fast Derivatization and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2019;1–11.
 135. Söderholm SL, Damm M, Kappe CO. Microwave-assisted derivatization procedures for gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Mol Divers.* 2010;14(4):869–88.
 136. Damm M, Rechberger G, Kollroser M, Kappe CO. Microwave-assisted high-throughput derivatization techniques utilizing silicon carbide microtiter platforms. *J Chromatogr A.* 2010;1217(1):167–70.
 137. Skoog DA, Holler JF, Crouch SR. *Principles of Instrumental Analysis.* 6^a ed. Skoog DA, Holler JF, Crouch SR, editors. Thomson Brooks/Cole; 2007.
 138. Grobs RL, Barry EF. *Modern Practice of Gas Chromatography.* 4^a ed. Grobs RL, Barry EF, editors. John Wiley & Sons, Inc.; 2004.
 139. Hoffmann E de, Stroobant V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications.* 3^a ed. Hoffmann E de, Stroobant V, editors. John Wiley & Sons, Ltd; 2007.
 140. Peters FT, Wissenbach DK, Busardò FP, Marchei E, Pichini S. Method Development in Forensic Toxicology. *Curr Pharm Des.* 2017;23(36):1–13.
 141. Khan JI, Kennedy TJ, Christian, Jr DR. *Basic Principles of Forensic Chemistry.* Humana Press; 2012.
 142. McMaster MC. *GC/MS: A Practical User's Guide.* 2^a ed. McMaster MC, editor. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2008.
 143. Glicksberg L, Bryand K, Kerrigan S. Identification and quantification of synthetic cathinones in blood and urine using liquid chromatography-quadrupole/time of flight (LC-Q/TOF) mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2016;1035:91–103.
 144. Hsu M-C, Chen D, Liu RH. Detection of abused drugs in urine by GC-MS. *J Food Drug Anal.* 2009;17(4):233–45.
 145. HimaBindu M.R L, Parameswari A, C. G. A Review on GC-MS and Method Development and Validation. *Int J Pharm Qual Assur.* 2013;4(3):42–51.
 146. Hübschmann H-J. *Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications.* 3^a ed. Hübschmann H-J, editor. Wiley-VCH; 2015.
 147. Harvey D. Chromatographic and Electrophoretic Methods. In: *Modern Analytical Chemistry.* The McGraw-Hill Companies; 2000. p. 543–621.

148. Harris DC. Quantitative Chemical Analysis. 8^a Ed. W. H. Freeman and Company, editor. New York; 2010.
149. Braithwaite A, Smith FJ. Chromatographic Methods. 5^a ed. Kluwer Academic Publishers; 1999.
150. Harvey RA, Champe PC, Finkel R, Cubeddu LX, Clark MA. Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology. 4^a ed. Finkel R, Clark MA, Cubeddu LX, editors. Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
151. Skoog DA, West DM, Holler JF, Crouch SR. Fundamentos de Química Analítica. 8^a ed. Skoog DA, West DM, Holler JF, Crouch SR, editors. Thomson Learning; 2006.
152. Murray KK, Boyd RK, Eberlin MN, Langley GJ, Li L, Naito Y. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). Pure Appl Chem. 2013;85(7):1515–609.
153. Batey JH. The physics and technology of quadrupole mass spectrometers. Vacuum. 2014;101:410–5.
154. World Anti-Doping Agency (WADA). Minimum Criteria for Chromatographic Mass-Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes. WADA Technical Document - TD2015DCR [Internet]. 2015. Available from: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2015idcr_-_eng.pdf