



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Pedro Alexandre Dias Dinis

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Alexandra Albuquerque e da Dra. Paula Monsanto e Monografia intitulada “Imunoensaios em Toxicologia Forense” sob a orientação da Professora Doutora, Isabel Rita Rebelo Ferreira Barbosa referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Pedro Alexandre Dias Dinis

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Alexandra Albuquerque e da Dra. Paula Monsanto e Monografia intitulada “Imunoensaios em Toxicologia Forense” sob a orientação da Professora Doutora, Isabel Rita Rebelo Ferreira Barbosa referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023

Eu, **Pedro Alexandre Dias Dinis**, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º **2018283134**, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Imunoensaios em Toxicologia Forense” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 06 de setembro de 2023,

Pedro Alexandre Dias Dinis

(Pedro Alexandre Dias Dinis)

AGRADECIMENTOS

Aos **meus pais, irmãos e avó** por toda a força, paciência e apoio incondicional.

Nunca conseguirei agradecer por todos os momentos passados!

Aos **meus amigos** que adquiri ao longo deste percurso, em especial Mateus, Cisco, Simões, Pascoal, Eduardo e Miguel por todas as memórias que me proporcionaram.

Ao **meu padrinho de faculdade**, Hugo, pela amizade e por todos os ensinamentos e conselhos transmitidos.

À **Imperial TAFFUC**, por ter sido um abrigo e mais que uma família.

Foram 5 anos de muito espírito e convívio!

A **toda a equipa da Farmácia Bairro São Miguel**, em especial à minha orientadora, Dra. Alexandra Albuquerque, pela amizade, profissionalismo, espírito de entreajuda e confiança depositada!

À **equipa do SQTF-DC** e ao **Dr. João Miguel Franco**, pela oportunidade, integração e ensinamentos transmitidos. Um agradecimento especial à minha orientadora, Dra. Paula Monsanto, pelo acompanhamento, amizade e sabedoria!

À **Dra. Sandra Curado**, por toda a informação cedida e pela rapidez na sua disponibilização!

À **Professora Doutora Isabel Rita Rebelo Ferreira Barbosa**, pela orientação, disponibilidade e paciência!

À **Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**, por todas as amizades e momentos que me proporcionou. Será sempre uma segunda casa!

A ti, **Coimbra**, cidade de fitas, cores, sorrisos e amores que avivas em mim! Um sincero obrigado pelos melhores 5 anos da minha vida e só não te digo adeus porque te levo sempre comigo!

Uma vez Coimbra, para sempre Coimbra!

CAPÍTULO I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. FARMÁCIA BAIRRO SÃO MIGUEL	9
3. ANÁLISE SWOT	10
3.1. Pontos Fortes	11
3.1.1. Integração na equipa.....	11
3.1.2. Comunicação e proximidade com os utentes	11
3.2. Pontos Fracos	11
3.2.1. Diversidade de produtos dermocosméticos	11
3.3. Oportunidades	12
3.3.1. Heterogeneidade de utentes.....	12
3.3.2. Preparação de Manipulados.....	12
3.3.3. Formações	12
3.4. Ameaças	13
3.4.1. MNSRM.....	13
3.4.2. Medicamentos esgotados e rateados	13
4. CASOS PRÁTICOS	14
4.1. Caso Prático 1	14
4.2. Caso Prático 2.....	14
4.3. Caso Prático 3.....	15
4.4. Caso Prático 4.....	15
4.5. Caso Prático 5.....	16
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

CAPÍTULO II – Relatório de Estágio no Serviço de Química e Toxicologia Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	20
1. INTRODUÇÃO	21
2. INMLCF, I.P.	22
3. ANÁLISE SWOT	24
3.1. Pontos Fortes	24
3.1.1. Integração no serviço.....	24
3.1.2. Percurso interno	25
3.2. Pontos Fracos	25
3.2.1. Formação académica.....	25
3.2.2. Manuseamento de amostras biológicas	26
3.3. Oportunidades	26
3.3.1. Realização de trabalhos extracurriculares	26
3.3.2. Fonte de bibliografia.....	26

3.4. Ameaças	27
3.4.1. Insegurança na execução laboratorial.....	27
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

CAPÍTULO III – Imunoensaios em Toxicologia Forense

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	31
RESUMO	33
ABSTRACT	34
1. Introdução	35
2. Breve história da Toxicologia Forense.....	36
3. Princípios e Objetivos da Toxicologia Forense.....	40
4. Imunoensaios em Toxicologia Forense.....	41
4.1. Amostras.....	41
4.1.1. Percurso dentro do SQTf.....	41
4.1.2. Matrizes Convencionais.....	44
4.1.3. Matrizes Alternativas.....	46
4.1.4. Outras Amostras	48
4.2. Técnicas Analíticas de Imunoensaios	48
4.2.1. Introdução e Contextualização Forense	48
4.2.2. ELISA.....	50
4.2.3. RIA.....	50
4.2.4. EMIT	51
4.2.5. CEDIA.....	52
4.2.6. BAT	52
5. Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF, I.P..	53
5.1. Equipamento do SQTf.....	53
5.1.1. Kits analíticos.....	54
5.1.2. Preparação de amostras e soluções.....	59
5.1.3. Procedimento experimental.....	59
5.1.4. Resultados Analíticos	61
5.1.5. Interferências Analíticas.....	62
6. Conclusão.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXOS.....	69

CAPÍTULO I

Relatório de estágio em Farmácia Comunitária



LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AINE – Anti-Inflamatório Não Esteroide

ANF – Associação Nacional de Farmácias

ARSC – Administração Regional de Saúde do Centro, I.P.

EC – Estágio Curricular

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de dispensa Exclusiva em Farmácia

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

PCHC – Produtos de Cosmética e de Higiene Corporal

I. INTRODUÇÃO

A farmácia comunitária é o local mais procurado pelas pessoas quando se está perante questões de saúde, pelo que é considerada a primeira linha de prestação de cuidados de saúde à sociedade. Desde 1449 que existem farmacêuticos em Portugal, na altura designados de boticários, que apenas eram responsáveis pela preparação oficial de medicamentos ou substâncias medicamentosas. Ao longo do tempo, a atividade farmacêutica foi evoluindo e centrando-se cada vez mais no utente e, atualmente, o farmacêutico abrange diversas funções, como a promoção da literacia em saúde, a gestão da terapêutica individualizada, administração de medicamentos, identificação precoce de doenças e de pessoas em risco e sensibilização da população para a adoção de estilos de vida saudáveis. Cada vez mais o farmacêutico é considerado um agente ativo promotor de saúde pública e, cada vez mais os utentes depositam a sua confiança no farmacêutico tanto na vertente preventiva, como na vertente terapêutica. Sendo assim, o farmacêutico tem de estar em constante atualização, devido à enorme diversidade de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) e medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) que o mercado farmacêutico dispõe, a fim de poder responder a todas as necessidades da sociedade¹.

A possibilidade da realização de Estágio Curricular (EC) no último ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) é uma mais-valia para todos os estudantes, dado que é tanto um momento de implementação e consolidação de conceitos teóricos assimilados durante todo o MICF, como um período de grande aprendizagem, pois deparamo-nos com a realidade do mercado de trabalho e a influência que o farmacêutico pode exercer nos dias de hoje.

O presente relatório tem por objetivo mostrar o balanço de quatro meses de estágio em farmácia comunitária, compreendido entre 10 de janeiro de 2023 e 24 de abril de 2023, apresentando uma pequena introdução da Farmácia Bairro São Miguel e destacando aspetos que considero relevantes para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, através da Análise SWOT, que abrange os pontos fortes (*Strengths*), os pontos fracos (*Weaknesses*), as oportunidades (*Opportunities*) e as ameaças (*Threats*).

2. FARMÁCIA BAIRO SÃO MIGUEL

A Farmácia Bairro São Miguel situa-se na Rua do Vale de São Miguel n.º9, com o código postal 3020-113, em Coimbra. O seu horário laboral é das 9h às 20h nos dias úteis, pelo que aos sábados funciona das 9h às 19h, estando encerrada das 13h às 15h para almoço. Pode se encontrar de serviço de acordo com os mapas de turnos das farmácias, fornecidos pela Administração Regional de Saúde do Centro, I.P. (ARSC). A farmácia integra-se na rede das Farmácias Portuguesas da Associação Nacional de Farmácias (ANF), da qual usufrui de alguns dos seus serviços, tais como o Sifarma2000® e o Cartão Saúde, e também na rede Elo Farma, onde consegue lograr com benefícios financeiros.

Quanto ao espaço físico (Fig. 1), a farmácia é composta por 4 balcões de atendimento e, atrás destes, estão expostos suplementos alimentares, MNSR, medicamentos não sujeitos a receita médica de dispensa exclusiva em farmácia (MNSRM-EF) e ao longo de toda a farmácia estão expostos variados produtos de acordo com a sua utilidade, como produtos cosméticos e de higiene corporal (PCHC), ortopédicos, veterinários, produtos para recém-nascidos, entre outros. Ainda na zona de atendimento, existe uma máquina para a medição do peso corporal e percentagem de gordura corporal, altura e pressão arterial, e inclui também um gabinete destinado à medição de parâmetros bioquímicos, à administração de injetáveis e vacinas e à privacidade entre utente e farmacêutico consoante o caso clínico. Relativamente ao *backoffice* da farmácia, este é composto por um gabinete para consultas de nutrição, um escritório, um laboratório, um espaço de descanso, uma casa de banho, uma zona de receção de encomendas e um armazém.

A Farmácia Bairro São Miguel tem como fornecedores a Alliance HealthCare, a Plural+Udifar que faz uma entrega a meio do dia, e o Botelho e a Empifarma, que são os fornecedores principais, fazendo duas entregas diárias. Ademais, a farmácia realiza encomendas diretamente aos laboratórios ou a fornecedores mais específicos, quando são pretendidos PCHC, medicamentos de uso veterinário, produtos ortopédicos e outros produtos necessários.



Figura I. Interior da Farmácia Bairro São Miguel.

3. ANÁLISE SWOT

O presente relatório conta com a Análise SWOT, onde estão incluídos os pontos fortes e fracos, oportunidade e fraquezas que considere relevantes retirar da experiência de EC, encontrando-se todos estes sumariamente reunidos na tabela I.

Tabela I. Síntese da Análise SWOT.

ANÁLISE SWOT			
Pontos Fortes (Strengths)	Pontos Fracos (Weaknesses)	Oportunidades (Opportunities)	Ameaças (Threats)
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Integração na equipa ➤ Comunicação e proximidade com os utentes 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Diversidade de produtos dermocosméticos 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Heterogeneidade de utentes ➤ Preparação de manipulados ➤ Formações 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ MNSRM ➤ Medicamentos esgotados e rateados

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Integração na equipa

Um dos aspetos que considero mais importante foi a excelente integração na equipa da Farmácia Bairro São Miguel. Esta é composta pela diretora técnica Filomena Oliveira, pela farmacêutica substituta e orientadora do EC, Alexandra Albuquerque, pelos técnicos de farmácia, Tiago Simões e Sílvio Marques, pelo farmacêutico, André Maia, e pelo gestor, Victor Oliveira. De notar que o excelente ambiente entre todos os profissionais facilitou a minha integração e, por conseguinte, o meu desenvolvimento de conhecimentos, uma vez que estavam sempre disponíveis e aptos para me auxiliar em todos os momentos necessários, desde pormenores no *backoffice* aos atendimentos de aconselhamento farmacêutico mais complexos. Neste sentido, posso testemunhar que é uma equipa que se gere pelo profissionalismo e excelência no seu dia a dia, prestando os melhores serviços aos mais variados utentes.

Em jeito de conclusão, a equipa que me acompanhou nesta etapa contribuiu para a máxima rentabilização do EC e, conseqüentemente, para a minha formação profissional, que certamente me possibilitará ter um melhor desempenho enquanto futuro farmacêutico.

3.1.2. Comunicação e proximidade com os utentes

Outro aspeto que considero positivo na experiência de EC é o facto de existir uma panóplia de utentes fidelizados à Farmácia Bairro São Miguel, dada a sua localização. A farmácia encontra-se inserida no Bairro de São Miguel, pelo que nas proximidades tem o Bairro Camarário do Ingote e o Bairro do Loreto. Assim, os frequentadores mais assíduos da farmácia potenciaram o estabelecimento de uma relação mais próxima e um acompanhamento mais contínuo, incluindo reparos de medicação desatualizada. Conseqüentemente, isto desenvolve uma maior confiança no utente ao se deslocar à farmácia e no estagiário ao realizar aconselhamentos.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Diversidade de produtos dermocosméticos

A Farmácia Bairro São Miguel trabalha diretamente com diversos laboratórios de dermocosmética, tais como a *L'Oréal* e *Pierre Fabre*, e, devido a isso, dispõe de uma grande variedade desses produtos na zona de atendimento, pelo que muitas vezes não sabia o que aconselhar aos utentes. Por outro lado, a lacuna de conhecimentos na área dos PCHC

contribuiu também para considerar este aspeto uma fraqueza na experiência de EC. Neste seguimento, surgiram situações em que não me senti na melhor capacidade para realizar um aconselhamento farmacêutico adequado e necessitei de ajuda. De certa forma, esta diversidade de produtos acoplada à lacuna do saber proporcionou também o interesse por querer estar mais envolvido nesta vasta área dos PCHC.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Heterogeneidade de utentes

Relativamente aos utentes que frequentavam a farmácia, constatei que, para além dos mais assíduos, havia uma grande heterogeneidade de utentes. Ou seja, contactei com uma população com diversas faixas etárias, diferentes escalões socioeconómicos e etnias. Assim sendo, considero essa variedade uma mais-valia na minha experiência de EC, visto que senti a oportunidade de adaptar a minha forma de comunicação de utente para utente, de realizar variados aconselhamentos farmacêuticos e de atender a diferentes necessidades. Neste sentido, concluo que o contacto com todos os utentes enalteceu o meu crescimento a nível pessoal e sentimental.

3.3.2. Preparação de manipulados

Como anteriormente referido, a farmácia detém um laboratório para preparação de manipulados, desde pomadas a soluções orais. Durante todo o estágio, poucos foram os momentos de preparação de manipulados, à exceção da preparação de antibióticos (Clavamox® e Clamoxyl®) que era mais recorrente. Contudo, considero que é uma excelente oportunidade para todos os estagiários que passam pela farmácia comunitária, uma vez que é a aplicação prática de uma das grandes componentes do MICF, a parte pratico-laboratorial. Nesse seguimento, a equipa deu-me liberdade para realizar duas pomadas, uma de ácido salicílico para a psoríase e uma de enxofre para a sarna, sempre com o supervisionamento de um profissional.

3.3.3. Formações

O farmacêutico comunitário, dada a constante evolução do mercado e a conseqüente panóplia de produtos que nele se inserem, é indispensável a sua atualização, recapitulação e aquisição sobre diversos conceitos com o propósito de cada vez mais proporcionar um aconselhamento mais completo e racional. Assim, outra oportunidade que mais valorizei

durante este período, foi a oferta de formações à farmácia, por parte dos laboratórios, a fim de promoverem os seus produtos, incluindo as suas indicações terapêuticas, ingredientes e estudos clínicos. Várias foram as formações em que comparecemos e, para além de todo o conhecimento colmatado, de certa forma, as mesmas contribuíram para exponenciar o espírito de equipa entre estagiário(s) e profissionais. Por fim, é indubitavelmente uma das maiores oportunidades que a Farmácia Bairro São Miguel me ofereceu, pois enquanto estagiário auxiliou-me a adquirir mais fundamentos científicos e a fortalecer laços com a equipa.

3.4. Ameaças

3.4.1. MNSRM

Os MNSRM podem ser comercializados fora do contexto da farmácia, tanto em plataformas *online*, como em cadeias de supermercados. Esta comercialização vai despoletar uma problemática a nível económico, na medida em que como estas cadeias apresentam um elevado poder de compra, os preços que praticam são incompatíveis com os que são aplicados pelas farmácias. Paralelamente, a venda online ou nesses estabelecimentos pode também acarretar graves problemas de saúde devido à falta de aconselhamento farmacêutico aquando da compra e, conseqüentemente, podem ocorrer interações medicamentosas graves entre medicação habitual e os MNSRM, que com a presença do farmacêutico, o risco reduziria em grande parte. Por conseguinte, negligencia o papel do farmacêutico e o estabelecimento que ele representa, constituindo uma ameaça ao farmacêutico e ao meu EC.

3.4.2. Medicamentos esgotados e rateados

Um fator preponderante que considero uma ameaça ao estágio e ao desempenho da profissão é a vasta lista de medicamentos tanto esgotados, como rateados. Efetivamente, nos dias que correm, a Indústria Farmacêutica encontra-se numa fase de rutura de *stock* de alguns medicamentos, motivada por obstáculos à produção dos mesmos. O esgotamento e rateamento de medicamentos despoleta um efeito negativo não só no utente, que necessita da medicação, mas também no farmacêutico que o está a atender, uma vez que é descredibilizado no seu aconselhamento, pois não consegue assegurar a adesão à terapêutica e, conseqüentemente, transmitir confiança ao utente. Na qualidade de estagiário, pude assistir e presenciar diversos casos de utentes que se indignavam com esta problemática, sendo então uma ameaça ao meu estágio e aos princípios da profissão desempenhada pelo farmacêutico, mas também a toda a instituição que é uma farmácia.

4. CASOS PRÁTICOS

Adiante no meu relatório de estágio, apresento cinco casos prático-clínicos com que me deparei na qualidade de farmacêutico estagiário, e os respetivos aconselhamentos que realizei. De notar que em todas as situações estive acompanhado por um farmacêutico e que questionei sempre o utente sobre a existência de reações alérgicas conhecidas às mais diversas substâncias medicamentosas.

4.1. Caso Prático 1

Uma senhora, com idade compreendida entre os 45 e 50 anos, dirige-se à Farmácia Bairro São Miguel afirmando que tem tosse há cerca de 3 semanas. Questionei então de que tipo de tosse se tratava, ao qual a senhora me responde que quando tossia sentia “algo” que queria libertar, mas que não conseguia, pelo que pude suspeitar que apresentava uma tosse produtiva. Referiu também que andava com dificuldades em dormir há 3 dias devido à irritação de tosse e que em casa já tinha experimentado chá com mel, uma vez que este último tem propriedades mucolíticas, ou seja, dissolve o muco das vias respiratórias e facilita a sua excreção. Disse também que já tinha adquirido, na farmácia, o xarope Bisolnatural[®], que contém mel, tanchagem, que cria um filme protegendo as mucosas, e tomilho que promove a fluidificação do muco, pelo que apenas aliviava-lhe a tosse durante 1 hora, aproximadamente². Neste sentido, aconselhei o Fluimucil[®] em comprimidos efervescentes, que, contrastando com o Bisolnatural[®], contém um princípio ativo, a acetilcisteína, que atua como mucolítico, adjuvando então a secreção do muco espesso e viscoso³. Recomendei duas tomas diárias durante 3 dias, uma de manhã e a outra à noite, afastadas das refeições devido ao facto de ter a necessidade de excretar o máximo de muco possível, e uma toma diária a partir do quarto dia até melhoria dos sintomas. De notar que, como este atendimento se sucedeu ao final da tarde, referi à senhora para apenas tomar um comprimido efervescente, a fim de alívio da sintomatologia e, apenas no dia a seguir começar com a toma dupla.

4.2. Caso Prático 2

Uma senhora, na casa dos 60 anos, dirige-se à Farmácia Bairro São Miguel, queixando-se que anda obstipada há 2 semanas e que apenas consegue, raramente, defecar umas “bolas pretas” e só através do auxílio da mão. Questionei a utente relativamente à quantidade de água que ingeria, à qual respondeu muito pouca. Alertei a utente para o facto de que é fundamental beber entre 1,5 L e 3 L diários de água para prevenir a obstipação, na medida em que despoleta o amolecimento das fezes e auxilia no evacuamento das mesmas, tendo sido

essa a medida não farmacológica que recomendei. Por outro lado, para lhe poder ceder um laxante, perguntei se tomava alguma medicação para a hipertensão, nomeadamente algum diurético, pois assim aumentaria o risco de ocorrer desequilíbrio eletrolítico, pelo que a senhora respondeu negativamente. Sendo assim, aconselhei a toma de 15 gotas orais de Dulcogotas[®], que contém picossulfato de sódio, um laxante de contacto que aumenta o peristaltismo do cólon e que, conseqüentemente, ajuda a libertar as fezes. Referi também que deve ser tomado à noite para haver defecação na manhã seguinte, ou seja, perdura 6 a 12 horas até fazer o efeito pretendido, não devendo ser tomado de forma contínua, tal como todos os laxantes, uma vez que pode provocar um desequilíbrio hidroelétrico e hipocaliémia, especificamente para a população idosa que tem mais propensão para tal⁴.

4.3. Caso Prático 3

Um senhor, com aproximadamente 55 anos, dirige-se à Farmácia Bairro São Miguel, queixando-se de uma dor forte na zona lombar, caracterizada por inflamação e inchaço desse local das costas. Afirmou que já tinha experimentado as faixas lombares ThermaCare[®], que tinha lá em casa devido à utilização por parte da sua mulher, e aliviava mas a dor voltava a surgir. As faixas ThermaCare[®] utilizadas são emplastros térmicos, sem propriedade farmacológica, indicada para o alívio da dor e tensão muscular, neste caso, na região lombar⁵. Neste sentido, recomendei a aplicação de Dimobil[®], 3 vezes por dia. O Dimobil[®] é um gel composto por diclofenac de sódio, um anti-inflamatório não esteroide (AINE), que atua a fim de aliviar a dor, inflamação e tumefação dos músculos, tendões, ligamentos e articulações⁶.

Posteriormente, o utente voltou à farmácia para agradecer o meu aconselhamento e que o gel tinha sido eficaz no tratamento da sua dor de costas.

4.4. Caso Prático 4

Uma utente, na casa dos 70 anos, dirige-se à Farmácia Bairro São Miguel com queixas de desconforto urinário, um pesar na bexiga e ardor aquando do ato de micção, e que urinava com muita frequência, pelo que pude suspeitar que apresentava um quadro de infeção urinária. A senhora perguntou se lhe poderia ceder um medicamento para tratamento da sintomatologia associada. Assim, expliquei à utente que para tratar a possível infeção era necessário um antibiótico e que apenas com prescrição médica é que o poderia ceder. Contudo, recomendei algumas medidas não farmacológicas, tais como, a ingestão abundante de água, evitar a utilização de roupa interior sintética e/ou justa, ingestão de alimentos ricos em vitamina C a fim de potenciar a acidificação da urina e desfavorecer a proliferação de algumas bactérias causadoras da infeção. Aconselhei também uma adequada higienização da

zona, pelo que recomendei a compra do Lactacyd[®], que corresponde a um gel íntimo para higiene diária que não contém sabão e apresenta na sua composição o ácido láctico que contribui para o equilíbrio do pH vaginal, tendo a senhora aceite este conselho⁷. Adicionalmente, aconselhei também o Systelle[®], que é um MNSRM com uma formulação à base de uva-ursina, ingrediente que exerce uma ação antisséptica com destabilização das membranas e consequente destruição da parede bacteriana⁸. Por fim, reforcei o facto de o Systelle[®] ser um medicamento para prevenção e apenas alívio dos sintomas, e que era necessário a senhora se deslocar ao médico.

4.5. Caso Prático 5

Um senhor, entre os 25 e 30 anos de idade, dirige-se à Farmácia Bairro São Miguel, queixando-se de dores de cabeça e corporais, febre e intensa congestão nasal. Afirmou também que já tinha realizado um teste rápido de deteção de antigénio de COVID-19 e que tinha testado negativo. Sendo assim, questionei o utente relativamente à toma de medicação e a problemas de saúde, que rapidamente me respondeu negativamente às duas perguntas. Neste sentido, aconselhei o Antigrippine[®] Trieffect, que contém paracetamol, com ação antipirética, para baixar a febre, e ação analgésica, para aliviar as dores de cabeça e no corpo, contendo também o cloridrato de fenilefrina, que é um descongestionante nasal⁹. Recomendei então a toma de 2 comprimidos 3 vezes por dia, ou seja, 2 comprimidos de 8 em 8 horas. Por outro lado, devido à intensa congestão nasal, aconselhei também o Vibrocil[®] Actilong em solução para nebulização, que contém o cloridrato de xilometazolina (descongestionante nasal), tendo recomendado 1 pulverização em cada narina 3 vezes por dia¹⁰.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluída aquela que foi a minha experiência enquanto farmacêutico comunitário, posso retirar um balanço bastante positivo, tanto a nível de consolidação de conhecimentos já adquiridos, como obtenção de novas valências técnico-científicas e de comunicação, e de uma visão do papel atual do farmacêutico na comunidade, proporcionando-me uma ideia mais abrangente da profissão do farmacêutico. Efetivamente, realço a importância deste peão no sistema de saúde, na medida em que na maior parte dos casos é o profissional que constitui a primeira linha de cuidados de saúde e, também devido a esse facto, destaco a relevância de o farmacêutico comunitário estar em constante atualização e evolução para servir de uma maneira cada vez mais completa e em prol da saúde do utente. Paralelamente, o farmacêutico também representa a última linha dos cuidados de saúde, na medida em que os utentes recorrem à farmácia para levantar os seus medicamentos prescritos e é este profissional que os cede, sensibilizando-os relativamente à questão da adesão à terapêutica e ao uso correto dos mesmos.

Em jeito de conclusão, resta-me agradecer a toda a equipa da Farmácia Bairro São Miguel que me acompanhou, desde os profissionais às duas estagiárias, pois todos facilitaram a minha integração na equipa e despoletaram em mim o enaltecimento de aspetos pessoais e profissionais. Devo-lhes um agradecimento muito especial, uma vez que nunca ponderei exercer como farmacêutico comunitário e, findada esta minha experiência de EC, posso afirmar que considero desempenhar futuramente esta profissão, pondo em prática todos os ensinamentos que retive durante este estágio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **A Farmácia Comunitária** [Consult. 5 abr. 2023]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
2. SANOFI – **Bisolnatural** [Consult. 15 abr. 2023]. Disponível em: <https://www.bisolvon.pt/bisolnatural-2-em-1>
3. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento: Fluimucil** [Consult. 22 abr. 2023]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
4. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento: Dulcogotas** [Consult. 22 abr. 2023]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medimento.xhtml>
5. ANGELINI PHARMA - **Thermacare** [Consult. 15 abr. 2023]. Disponível em: <https://www.thermacare.pt/produtos/thermacare-para-dores-musculares/para-a-dor-lombar/>
6. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento: Dimobil** [Consult. 22 abr. 2023]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medimento.xhtml>
7. PERRIGO - **Lactacyd íntimo** [Consult. 15 abr. 2023]. Disponível em: [//www.lactacyd.pt/product/lactacydr-intimo](http://www.lactacyd.pt/product/lactacydr-intimo)
8. TILMAN - **Systemelle** [Consult. 22 abr. 2023]. Disponível em: <https://tilmanportugal.com.pt/systemelle/>
9. **Resumo das Características do Medicamento: Antigrippine Trieffect** - [Consult. 7 abr. 2023]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
10. **Resumo das Características do Medicamento: Vibrocil Actilong** - [Consult. 7 abr. 2023]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

Capítulo II

Relatório de Estágio no
Serviço de Química e Toxicologia Forenses do
Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.



LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

EC – Estágio Curricular

GC-FID – Cromatografia de gases associada ao detetor de ionização por chama

GC-MS – Cromatografia de gases associada à espectrometria de massa

INMLCF, I.P. – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

LC-MS-MS – Cromatografia líquida associada à espectrometria de massa

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SQTF – Serviço de Química e Toxicologia Forenses

SQTF-DC – Serviço de Química e Toxicologia Forenses - Delegação do Centro

I. INTRODUÇÃO

O artigo 75º, do capítulo VII, da Lei nº131/2015 do Diário da República, referente às atividades abrangentes do ato farmacêutico, inclui a execução, interpretação e validação de análises toxicológicas¹. A toxicologia forense é uma área multidisciplinar da Toxicologia, que se move pela elucidação de questões judiciais e judiciárias, com base nos domínios do Direito, podendo estas relacionar-se com intoxicações devido a substâncias disponíveis no mercado lícito e/ou ilícito, e possíveis consequências². Assim, o Farmacêutico pode desempenhar um papel fulcral dentro da área da toxicologia forense, na medida em que pode executar ensaios de cariz toxicológico, tais como a determinação de etanol e/ou produtos voláteis, de drogas de abuso, de medicamentos, de pesticidas, de monóxido de carbono e de metais ou metalóides em amostras biológicas e/ou não biológicas. Posteriormente, pode interpretar os resultados obtidos em cada ensaio e na avaliação aprofundada do caso após a realização de todas as análises necessárias, mas também atuar na inovação de metodologias analíticas, face à evolução dos equipamentos e das novas substâncias comercializadas no mercado lícito ou ilícito.

Em Portugal, a toxicologia forense atua através de duas principais vertentes, da Polícia Judiciária, com o Laboratório de Polícia Científica, e do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF, I.P.), através do Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF). Perante o meu interesse na área da toxicologia forense, foi-me dada a oportunidade de realizar um estágio curricular (EC), integrante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), no Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro (SQTF-DC) do INMLCF, I.P., compreendido entre 2 de maio de 2023 e 28 de julho de 2023.

O presente relatório de estágio pretende fazer uma breve e sintética introdução ao INMLCF, I.P., abordando aspetos como a sua estrutura e organização, a sua missão e valores, e dando especial enfoque ao SQTF. Para além disso, tem como objetivo mostrar o balanço dos três meses de estágio curricular realizado, sob a forma de análise SWOT. Nesta incluem os pontos fortes (*Strengths*), englobando os aspetos que considero que foram uma mais-valia para o meu estágio, e os pontos fracos (*Weaknesses*), ou seja, fraquezas e debilidades que senti enquanto estagiário do SQTF. Menciono também as oportunidades (*Opportunities*) que o estágio me ofereceu e as ameaças (*Threats*), onde incorporo aspetos que me testaram, de forma a superar as minhas dificuldades.

2. INMLCF, I.P.

No final do século XIX, através da Carta da Lei de 17 de agosto de 1899 e do Regulamento dos Serviços Médico-Legais, nasceram os primeiros serviços médico-legais organizados e foram criadas três morgues, uma em Coimbra, outra em Lisboa e outra no Porto. As morgues mantiveram esta estrutura até ao ano de 1918, pois nesse ano foram criados três Institutos de Medicina Legal (de Coimbra, de Lisboa e do Porto), integrando estes as respetivas faculdades de medicina. Já no século XXI, na sequência da publicação da Lei Orgânica do Ministério da Justiça, surgiu o Decreto-Lei n.º 96/2001 de 26 de março que transformou a organização médico-legal portuguesa e os Institutos de Medicina Legal foram extintos. Consequentemente, foi concebido o Instituto Nacional de Medicina Legal, uma instituição pública autónoma, administrativa e financeiramente, sujeita à tutela e gerência por parte do Ministério da Justiça³. A sede do INMLCF, I.P. é em Coimbra e integra três delegações (Centro, Norte e Sul), bem como uma vasta rede de Gabinetes Médico-Legais e Forenses, que asseguram a realização de autópsias a nível nacional. Por último, através da publicação do Decreto-Lei n.º 166/2012 de 31 de julho, o Instituto de Medicina Legal passou a designar-se por Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., o qual inclui serviços nas diversas áreas das ciências forenses^{3; 4}. Por conseguinte, surgiu o Serviço de Química e Toxicologia Forenses, que tem sede na delegação do Sul e extensões funcionais nas delegações do Centro e do Norte, substituindo os três Serviços de Toxicologia Forenses existentes em cada delegação.



Figura 2. Delegação do Centro e sede do INMLCF, I.P..

O SQTF-DC está dividido em três setores, o setor administrativo, o setor de receção de amostras, que inclui também a preparação do material de laboratório, e o setor das análises químicas e toxicológicas propriamente dito. Este último está subdividido em cinco equipas de acordo com as técnicas usadas, tal como ilustra a tabela seguinte.

Tabela 2. Equipas de trabalho do SQTF-DC.

Equipa	Técnica	Descrição
I	Ensaio Imunoenzimáticos	Ensaio de triagem de drogas de abuso e benzodiazepinas, com recurso a um equipamento semiautomático de reações imunoenzimáticas, <i>EVOLIS</i> .
II	GC-MS	Ensaio de confirmação e quantificação de drogas de abuso, e triagem/confirmação de medicamentos e de pesticidas através da cromatografia de gases associada à espectrometria de massa.
III	LC-MS-MS	Ensaio de triagem, confirmação e quantificação de medicamentos e de drogas de abuso por cromatografia líquida associada à espectrometria de massa.
IV	GC-FID	Ensaio de deteção, confirmação e quantificação de substâncias voláteis (mais frequentemente do etanol) através da cromatografia de gases com detetor de ionização por chama.
V	Espectrofotometria de absorção molecular e de absorção atómica	Ensaio de triagem, confirmação e quantificação de monóxido de carbono por espectrofotometria de absorção molecular, e de confirmação e quantificação de metais/metalóides por espectrofotometria de absorção atómica.

O SQTF é considerado um laboratório do Estado e detém um estatuto de acreditação, de acordo com a norma NP EN ISO/IEC 17025:2018, pelo Instituto Português de Acreditação, I.P., que tem o objetivo de reconhecer a competência técnica através da avaliação da conformidade dos laboratórios pela realização de ensaios e calibrações^{3; 5; 6}. Assim o INMLCF, I.P., é uma instituição nacional de referência na área da medicina legal e ciências forenses, movendo-se pelo rigor, imparcialidade e qualidade⁷.

3. ANÁLISE SWOT

A seguinte tabela faz o balanço do meu EC na modalidade de análise SWOT.

Tabela 3. Síntese da Análise SWOT.

ANÁLISE SWOT			
Pontos Fortes (Strengths)	Pontos Fracos (Weaknesses)	Oportunidades (Opportunities)	Ameaças (Threats)
<ul style="list-style-type: none">➤ Integração no serviço➤ Percurso interno	<ul style="list-style-type: none">➤ Formação Académica➤ Manuseamento de amostras biológicas	<ul style="list-style-type: none">➤ Realização de trabalhos extracurriculares➤ Fonte de bibliografia	<ul style="list-style-type: none">➤ Insegurança na execução laboratorial

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Integração no serviço

O primeiro ponto forte que destaco da minha experiência de EC foi a integração no SQTf-DC por todos os profissionais pertencentes a este, especialmente pelos integrantes da Equipa I. Nesta equipa tive a oportunidade de trabalhar com Dra. Paula Monsanto e a D. Eugénia Frias, que são excelentes profissionais e mostraram-se sempre disponíveis a auxiliar e a elucidar-me nos diversos aspetos que envolve a triagem de drogas de abuso e benzodiazepinas, desde o preparo das amostras, ao funcionamento do equipamento analítico e obtenção de resultados. Ambas foram cruciais no desenvolvimento pessoal de competências ao longo do estágio, pelo que pude testemunhar que o SQTf se gere pela excelência no seu dia a dia.

O espírito de entajuda e profissionalismo despoletaram em mim, tanto uma maior facilidade na integração no serviço, como uma completa aquisição de conhecimentos, na medida em que o meu nível de aprendizagem na prática laboratorial e relativa aos equipamentos analíticos exponenciou-se, durante a realização deste estágio.

3.1.2. Percurso interno

Outro aspeto que considero positivo corresponde ao percurso de rotatividade que experienciei e à posterior fixação numa só equipa. Isto é, tive a oportunidade de passar por todas as equipas e acompanhar o trabalho de cada profissional do serviço nas respetivas equipas de análises toxicológicas. Iniciei o meu percurso na aceitação e receção das amostras, seguido de uma introdução dos procedimentos relativos à equipa I e rotação pelas outras equipas. Nas restantes equipas do SQTF-DC tive contacto com todo o procedimento de cada uma num contexto observacional, pelo que auxiliava sempre que possível. Na generalidade, os procedimentos incluem uma fase de seleção das amostras a analisar, uma de extração com solventes adequados, a de manuseamento do equipamento analítico e uma de interpretação de resultados. Posteriormente, fixei-me na Equipa I, onde se realizam os ensaios de triagem de drogas de abuso (opiáceos, metabolitos da cocaína, canabinóides, anfetaminas e metanfetaminas) e de medicamentos (benzodiazepinas) por imunoensaios enzimáticos. Todos os resultados positivos, relativos aos grupos mencionados, seguem para as equipas II e/ou III, para confirmação e quantificação. Dentro da Equipa I, não foi possível realizar um trabalho autónomo nas análises de rotina, em amostras de sangue, uma vez que se trata da execução de ensaios acreditados, com exigências bem definidas relativamente à formação de colaboradores, contudo pude ajudar em alguns aspetos dos procedimentos da equipa. Após a fase de aprendizagem e acompanhamento executei estes ensaios de forma autónoma, apenas sob supervisão, em amostras de urina, humor vítreo e de biliar.

Assim sendo, o meu percurso dentro do SQTF-DC foi crucial para a minha experiência de EC, na medida em que, devido à rotação pelas equipas, consegui ter uma noção das práticas laboratoriais toxicológicas e da organização interna do Serviço, e também pude estar em contacto, num período mais extenso, com a triagem por imunoensaios.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Formação Académica

O programa curricular do MICEF contempla a unidade curricular, Toxicologia e Análises Toxicológicas, contudo esta abrange pouco o tema da Toxicologia Forense e, sendo esta a área de atuação do SQTF, considero que a falta de conhecimentos legais e forenses integra uma das fraquezas relativas à minha experiência de EC. Assim, a fim de colmatar essa lacuna relativamente a assuntos legais e forenses, pesquisei informação em artigos publicados e documentos internos. Por outro lado, o MICEF contempla também duas unidades curriculares sobre metodologias analíticas, Métodos Instrumentais de Análise I e II, pelo que me

proporcionaram uma base para entender conceitos básicos dos procedimentos analíticos e do funcionamento dos equipamentos do SQTF.

3.2.2. Manuseamento de amostras biológicas

Outro aspeto que considero ser um ponto fraco no meu estágio, foi a inexperiência no manuseamento de amostras biológicas. Durante a minha experiência de EC pude contactar com algumas amostras biológicas, tais como sangue, da cavidade cardíaca e periférico, urina, humor vítreo e bÍlis. De todas estas, o sangue apresenta uma grande variabilidade no que concerne ao estado da amostra, uma vez que, aquando da colheita em autópsia, já apresenta uma visível putrefação (em estados muito variáveis), e também devido ao facto de poder coagular. Estes fatores dificultam muito a pipetagem do volume a analisar. Assim, a prática e experiência ao longo do estágio contribuíram para compreender a abordagem necessária a cada estado da amostra e para a superação de dificuldades relacionadas com o manuseamento das matrizes biológicas.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Realização de trabalhos extracurriculares

Durante o meu período de EC no SQTF-DC, por iniciativa da minha orientadora, Dra. Paula Monsanto, surgiu a oportunidade de realizar um estudo analítico para fins de apresentação no XXI Congresso Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, organizado pelo INMLCF, I.P.. O estudo consistiu na análise de amostras de bÍlis por imunoensaios para opiáceos, metabolitos da cocaína, canabinóides, anfetaminas, metanfetaminas e benzodiazepinas. Assim, a ideia foi verificar a utilidade da bÍlis como amostra alternativa ou complementar às outras matrizes, na triagem de drogas de abuso e benzodiazepinas, pelo que consegui realizar dois trabalhos para levar ao congresso.

A realização deste estudo fez-me adquirir conhecimentos e experiência na área da investigação em toxicologia forense, bem como despoletou o meu interesse para querer saber mais sobre esta ciência e as suas metodologias. Por outro lado, uma vez que era um estudo não acreditado, foi possível executar os ensaios de forma autónoma e contribuir assim para uma futura implementação da análise de amostras de bÍlis na rotina do SQTF.

3.3.2. Fonte de bibliografia

Este estágio proporcionou-me também a vantagem de ter acesso a uma variedade de artigos bloqueados e a diversos livros, relativos à toxicologia forense, tanto através da extensa bibliografia do SQTF-DC, como da própria biblioteca do INMLCF, I.P.. Adicionalmente, o facto

de ter ficado alocado na equipa I, ajudou bastante na compreensão de conceitos teóricos e práticos sobre os imunoensaios enzimáticos, uma vez que a Dra. Paula Monsanto e a D. Eugénia Frias me transmitiram todos os conhecimentos necessários. Assim, todos esses conhecimentos facilitaram bastante na escrita da minha monografia, intitulada por Imunoensaios em Toxicologia Forense.

3.4. Ameaças

3.4.1. Insegurança na execução laboratorial

A única ameaça que destaco da minha experiência de EC foi a insegurança na execução laboratorial que senti no início do estágio. O programa curricular do MICF oferece boas bases de pipetagem, porém o manuseamento de amostras biológicas necessita de prática e experiência, o que, numa fase inicial do EC, despoletou alguma insegurança na realização dos procedimentos. Para além disso, também senti uma certa insegurança no manuseamento dos equipamentos analíticos presentes no SQTF-DC. Assim, a prática levou ao desenvolvimento de experiência nas metodologias e fui ganhando confiança tanto na prática laboratorial, como na utilização dos equipamentos, tendo essas dificuldades sido superadas ao longo do tempo de estágio.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluída a minha experiência de EC no SQTf-DC do INMLCF, I.P., faço um balanço bastante positivo, não só ao nível da consolidação de conhecimentos apreendidos durante o MICF, mas também da aquisição de novas competências teóricas e prático-analíticas. Ambos os aspetos contribuíram para o meu desenvolvimento curricular, tendo uma visão mais abrangente do funcionamento de um laboratório de toxicologia forense. O SQTf pauta-se pela excelência e profissionalismo, pelo que posso testemunhar que em todo o trabalho desenvolvido pelos seus profissionais estão sempre implícitos valores como a imparcialidade, rigor e qualidade.

Em jeito de conclusão, resta-me agradecer, ao Dr. João Miguel Franco, pela oportunidade de estágio, à minha orientadora de estágio, a Dra. Paula Monsanto, e a toda a equipa do SQTf-DC que me recebeu calorosamente. Independentemente dos seus trabalhos de rotina, estavam sempre dispostos a ajudar-me em todas as circunstâncias, despoletando em mim um nítido desenvolvimento profissional e pessoal. Este estágio foi fundamental para mim, na medida em que colmatei as minhas dúvidas em relação à toxicologia forense e me deu a certeza de que é a área que quero seguir no futuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DIÁRIO DA REPÚBLICA - **Lei nº131/2015, de 4 de setembro** [Consult. 12 ago. 2023]. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/doc9992_29465282759230d567eeeb.pdf
2. DINIS-OLIVEIRA, Ricardo Jorge; CARVALHO, Félix Dias; BASTOS, Maria De Lourdes - **Toxicologia Forense**. [S.l.] : PACTOR, 2015.
3. Manual da Qualidade (MQ-SQTF-C_Rev07) – Documento interno aprovado para o Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. [s.d.].
4. Decreto-Lei n.º 166/2012, de 31 de julho - [s.d.].
5. **IPAC - Instituto Português de Acreditação** - [Consult. 9 ago. 2023]. Disponível em: <http://www.ipac.pt/ipac/funciao.asp>
6. Manual do Sistema de Gestão (MSG-SQTF-C_Rev05) – Documento interno aprovado para o Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. [s.d.].
7. **INMLCF, I.P. - Missão, Visão e Valores** - [Consult. 30 mai. 2023]. Disponível em: <https://inmlcf.justica.gov.pt/Sobre-o-INMLCF/Missao-visao-e-valores>

CAPÍTULO III

Imunoensaios em
Toxicologia Forense

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.c. – Antes de Cristo

AM – *Ante-mortem*

ANSR – Autoridade Nacional de Segurança Rodoviária

BAT – Ensaio Tecnológico por *Biochip*

CCD – Dispositivo de Câmara Acoplada

CEDIA – Imunoensaio por Doação de Enzima Clonada

d.c. – Depois de Cristo

EA – Aceitador de Enzima

ED – Dador de Enzima

EIA – Imunoensaio Enzimático

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EMIT – Técnica de Imunoensaio de Multiplicação Enzimática

FPIA – Imunoensaio por Fluorescência Polarizada

G6PD – Glucose-6-Fosfato Desidrogenase

GC-MS – Cromatografia de gases associada à espetrometria de massa

GMLF – Gabinetes Médico-Legais e Forenses

GNR – Guarda Nacional Republicana

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

INMLCF, I.P. – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

IPST – Instituto Português do Sangue e Transplantação

KIMS – Interação Cinética de Micropartículas em Solução

LC-MS – Cromatografia líquida associada à espetrometria de massa

NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleósido

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleósido Fosfato

PM – *Pos-mortem*

PSP – Polícia de Segurança Pública

RIA – Radioimunoensaio

RPM – Redistribuição *Pos-mortem*

SQTF – Serviço de Química e Toxicologia Forenses

TDM – Monitorização terapêutica medicamentosa

TF – Toxicologia Forense

THC – Tetrahydrocannabinol

THC-COOH – 11-nor-9-carboxi- Δ -9-tetrahydrocannabinol

THC-OH – 11-hidro- Δ -9-tetrahydrocannabinol

TIAFT – Associação Internacional de Toxicologistas Forenses

TLC – Cromatografia em Camada Fina

UPF – Unidade de Patologia Forense do Serviço de Patologia e Clínica Forenses

RESUMO

A Toxicologia Forense é uma área multidisciplinar proveniente da toxicologia, à qual incumbe o esclarecimento de questões relacionadas com intoxicações por substâncias, e suas possíveis consequências ao abrigo da lei. Pode atuar em duas componentes, *ante-mortem* e *post-mortem*, na medida em que o seu campo de ação compreende a deteção, identificação e isolamento de drogas, medicamentos e outros xenobióticos em matrizes biológicas e não biológicas e, a consequente interpretação de resultados. Nesta ciência incluem-se os imunoensaios que são técnicas qualitativas e semiquantitativas baseadas na interação entre antigénios e anticorpos, podendo ser divididos em dois grupos, homogéneos e heterogéneos. Em contexto nacional, no SQTF do INMLCF, I.P., é utilizada a técnica ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática), através de um equipamento semiautomático, para a triagem de drogas de abuso (opiáceos, metabolitos da cocaína, canabinóides, anfetaminas e metanfetaminas) e de medicamentos (benzodiazepinas), sendo todos os resultados positivos posteriormente confirmados por técnicas mais sensíveis e específicas. Os imunoensaios desempenham um papel preponderante nos laboratórios de toxicologia forense, especialmente em Portugal, uma vez que proporcionam uma rápida e eficiente triagem de um elevado número de amostras ao mesmo tempo, para uma panóplia de substâncias, poupando tempo e recursos comparativamente a outros procedimentos.

Palavras-chave: Toxicologia forense; Imunoensaios; ELISA; SQTF.

ABSTRACT

Forensic Toxicology is a multidisciplinary area that stems from toxicology, to which is responsible for understanding issues related to substances intoxication and its possible consequences under the law. It can work in two areas, *ante-mortem* and *post-mortem*, according its activities include the detection, identification and isolation of drugs, medicines and other xenobiotics in biological and non biological matrices, and the interpretation of their results. This science includes immunoassays, which are qualitative and semi-quantitative techniques based on the interaction of antigens and antibodies, and can be divided in two groups, homogeneous and heterogeneous. In Portugal, the SQTF at INMLCF, I.P., uses the ELISA (Enzyme Immunosorbent Assay) technique, through a semi-automatic equipment, to screen drugs of abuse (opiates, cocaine metabolites, cannabinoids, amphetamines and methamphetamines) and medicines (benzodiazepines), with each positive result requiring confirmation by more sensitive and specific techniques. Immunoassays have an important role in toxicological laboratories, particularly in Portugal, because they can enable rapid and efficient screening of large number of samples, at the same time, for numerous substances, saving resources and time when compared to other methods.

Keywords: Forensic toxicology; Immunoassay; ELISA; SQTF.

I. Introdução

A Toxicologia é uma ciência multidisciplinar que se dedica ao estudo dos consequentes efeitos tóxicos de um agente químico, tendo em conta a sua interação com o sistema biológico. Dada a vasta área de conhecimento que esta ciência abrange, bem como as suas diferentes áreas de atuação, a Toxicologia Forense, como área especializada da toxicologia, tem por objetivo principal a procura de uma evidência que permita a identificação da presença de uma substância química (agente tóxico) na investigação criminal, como em causas de morte, danos à saúde ou ao património.

Desta forma, a presente monografia inicia-se com uma sinopse da história da Toxicologia Forense, apresentando os seus principais marcos desde a sua génese ao presente e evidenciando figuras e técnicas consideradas fulcrais ao seu desenvolvimento. Incluem-se Hipócrates e Dioscórides, duas figuras gregas que aprofundaram conhecimentos relativamente aos venenos, Mathieu Orfila, o pai da toxicologia forense, James Marsh, o responsável pelo término de uma época marcada por envenenamentos com arsénio, entre outros^{1;2}. Assim, o desenvolvimento da Toxicologia Forense, esteve sempre acompanhado de uma evolução do equipamento analítico, o que permitiu melhorar a sensibilidade e precisão na deteção de tóxicos¹. É notória a progressão analítica desde o teste de Marsh, passando pelas diversas técnicas cromatográficas e finalizando nos imunoensaios.

Em Portugal, o Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF, I.P.) é a instituição de referência nas áreas científicas da medicina legal e ciências forenses, que realiza exames e perícias de medicina legal e forenses solicitados ao abrigo da lei³. Assim, sendo pedida uma perícia e/ou exame laboratorial químico e toxicológico, este será reencaminhada(o) para o Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF) para a sua realização.

Efetivamente, em situações *post-mortem* (PM) podem ser utilizadas diversas matrizes, pelo que a sua colheita encontra-se sempre dependente do que se pretende com as análises toxicológicas e do estado de putrefação do cadáver. Em contexto de imunoensaio, as matrizes mais convencionais a utilizar são o sangue (da cavidade cardíaca ou periférico) e a urina, contudo também podem ser analisadas matrizes alternativas como humor vítreo, bÍlis, entre outras amostras⁴. Os imunoensaios são métodos bioanalíticos, que surgiram em 1959, baseados na interação imunológica entre antigénio e anticorpo e que, mundialmente são utilizados para a análise qualitativa e semiquantitativa de drogas de abuso e medicamentos⁵. Assim sendo, esta monografia visa dar ênfase à utilidade dos imunoensaios a nível nacional, no

SQTF, em particular ao Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), competitivo, para a triagem de drogas de abuso e de benzodiazepinas, mostrando a sua importância, aplicação e abrangência na área da Toxicologia Forense.

2. Breve história da Toxicologia Forense

A Toxicologia Forense tem vindo a despertar muito interesse, também pela sua parte histórica e, curiosamente, apenas engrenou o seu percurso como ciência nos inícios do séc. XIX¹.

A história da toxicologia remonta desde há milhares de anos e sempre acompanhou a própria história da humanidade (Fig. 3). Efetivamente, existem vestígios antropológicos, entre 100 000 e 5 000 a.c., relacionados com a toxicologia, na medida em que o homem pré-histórico já teria conhecimentos relativos às diversas substâncias animais, vegetais e minerais, e ao risco que algumas lhe poderiam causar. A primeira experiência do homem com a toxicologia consistiu no revestimento da ponta das lanças de caça com sucos de produtos animais e de plantas venenosas, para acelerar a morte dos animais. Este facto pode não se enquadrar com a toxicologia forense, mas podemos constatar que, já em tempos antigos, as pessoas utilizavam venenos^{2; 6}.

A história dos venenos, isto é, da toxicologia e conseqüentemente da toxicologia forense está, de certa forma, relacionada com as civilizações antigas, uma vez que as substâncias tóxicas eram utilizadas para fins medicinais, mas também para envenenamento e assassinio. Por volta de 1500 a.c., surgiu o papiro de *Ebers*, que é considerado o documento escrito mais antigo que contém mais de 800 receitas medicamentosas, plantas venenosas como cicuta, acónito e ópio, e também alguns metais pesados, tais como chumbo, cobre e antimónio^{2; 6; 7}.

Uma das figuras gregas mais marcantes neste ramo da ciência, foi Hipócrates (460-370 a.c.), um médico que, para além de mencionar alguns venenos vegetais e alimentares, acrescentou princípios de toxicologia clínica, relativos à biodisponibilidade das substâncias na terapêutica e à sobredosagem^{1; 7}. Paralelamente, Dioscórides (40-90 a.c.), classificou os venenos em vegetais, animais e minerais, sendo esta classificação ainda atualmente conveniente².

Antes do Renascimento, destaca-se uma importante figura, Maimonides (1135-1204 d.c.), na medida em que realizou, um tratado onde incluiu o tratamento do envenenamento

por cobras, insetos e cães raivosos, o *Treatise on poisons and their antidotes*^{2;7}. Já no início do Renascimento evidencia-se, em Itália, o apogeu da arte do envenenamento, principalmente em contextos políticos².

No século XVI, Paracelsus (1493-1541), um físico alquimista, formulou o conceito de “toxicon”, ou seja, o agente tóxico primário, como uma entidade química, tendo articulado, mais formalmente, que o veneno depende da dose^{2;7}.

Embora as civilizações Grega, Egípcia, Hindu e Romana tenham deixado valiosos contributos ao desenvolvimento da toxicologia como ciência, apenas no século XIX é que o campo da toxicologia forense começou a emergir como uma disciplina distinta. Assim, uma nova abordagem para o estudo dos efeitos tóxicos de químicos e drogas nos animais foi desenvolvida por Mathieu Joseph Bonaventure Orfila¹. Foi o primeiro toxicologista a utilizar material de autópsia e aplicar química analítica sistemática a fim de comprovar, cientificamente e legalmente, o envenenamento, ficando conhecido como o pai da toxicologia forense^{1;2}. Em 1814, publica o livro, *Traite des poisons ou Toxicologie Generale* (Anexo I), onde classificou os venenos em seis classes: corrosivos, adstringentes, acres, estupefacientes/narcóticos, narcótico-acres e sépticos/putrefatos, baseando-se principalmente nos seus efeitos tóxicos¹.

Na mesma época, surge outra importante figura, o químico inglês, James Marsh (1794-1846), com o método de deteção de arsénio, denominado por teste de Marsh, que despoletou a possibilidade de deteção facilitada de arsénio, dando assim término à “*age of arsenic*”¹. Por outro lado, em 1856, Otto estabeleceu uma técnica de extração de alcalóides em matrizes biológicas, o método de Stas-Otto, que já tinha sido proposto por Stas em 1851. Em 1874, Selmi descreveu, pela primeira vez, a ptomaína, ou alcalóides cadavéricos, que são moléculas de natureza básica resultantes de processos de decomposição putrefativa de órgãos e líquidos biológicos⁸.

Sucessivamente, também o século XX, ficou marcado pela contribuição de importantes figuras no progresso de variados aspetos da toxicologia. O método de Stas-Otto, foi sofrendo diversas alterações e, no ano de 1905, Autenrieth utiliza o clorofórmio ou uma mistura de éter e clorofórmio, como solventes de extração, publicando o livro, *The Detection of Poisons and Strong Drugs*. Por sua vez, Homburger e Munch (1916) utilizaram o método, modificado por Autenrieth, para procederem à quantificação de morfina em diversos órgãos¹.

Após a 2ª Guerra Mundial verificou-se um maior desenvolvimento na história da toxicologia forense devido à formação das sociedades forenses¹. A Academia Americana de Ciências Forenses foi fundada em 1950, por um grupo de cientistas forenses, dedicando-se a

todas as áreas abrangentes das ciências forenses, de entre estas a toxicologia. Paralelamente, 1963 foi um ano marcado pela inauguração da Associação Internacional de Toxicologistas Forenses (TIAFT) aquando do Encontro Internacional de Ciências Forenses, em Londres. O primeiro *newsletter*, foi editado em novembro do mesmo ano pelo Dr. Rieders, e desde o início permaneceu com o nome de *Bulletin of the International Association of Forensic Toxicologists*⁹.

Paralelamente, a determinação do álcool em matrizes biológicas iniciou-se em 1906, dado que Nicloux, nesse mesmo ano, desenvolveu, na Europa, um micro método para a determinação do álcool no sangue e em outros tecidos. De notar que o primeiro método relativo à quantificação sanguínea de álcool foi elaborado por Bogen em 1927. E, ao longo do tempo foram surgindo atualizações e métodos baseados no álcool, destacando-se alguns, tais como a cromatografia gasosa em 1960, por Cadman e Johns, e a cromatografia gasosa *headspace* em 1971, por Coldwell e seus associados¹.

Ao longo do século XX, a toxicologia forense continuou a evoluir e a expandir-se, com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas e a identificação de novas substâncias tóxicas. O aparecimento de instrumentos analíticos sofisticados despoletou mudanças nas metodologias clássicas da ciência toxicológica. Em 1930 surgiu a cromatografia em papel, que rapidamente foi substituída pela cromatografia em camada fina em 1938, e acoplada à espectrometria de massa em 1977¹⁰. A partir de 1938, apareceu também a cromatografia gasosa e a cromatografia de alta eficiência (HPLC), utilizando novos e mais aperfeiçoados detetores como a espectrofotometria de ultravioleta, de infravermelhos e a difração de raios-X^{1; 10}.

No final dos anos 50, foi desenvolvido por Berson e Yallow o primeiro imunoensaio, o Radioimunoensaio (RIA), para quantificação de insulina, e que representa um marco na história da aplicação da metodologia de radionuclídeos na biologia e na investigação e prática médica¹¹. Desde então, o aparecimento desta técnica despoletou o crescimento dos imunoensaios e, assim, surgiram outros métodos, como o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) em 1971, a Técnica de Imunoensaio de Multiplicação Enzimática (EMIT) em 1972, o Imunoensaio por Fluorescência Polarizada (FPIA) em 1981, o Imunoensaio por Doação de Enzima Clonada (CEDIA) em 1986, entre outras^{12; 13}.

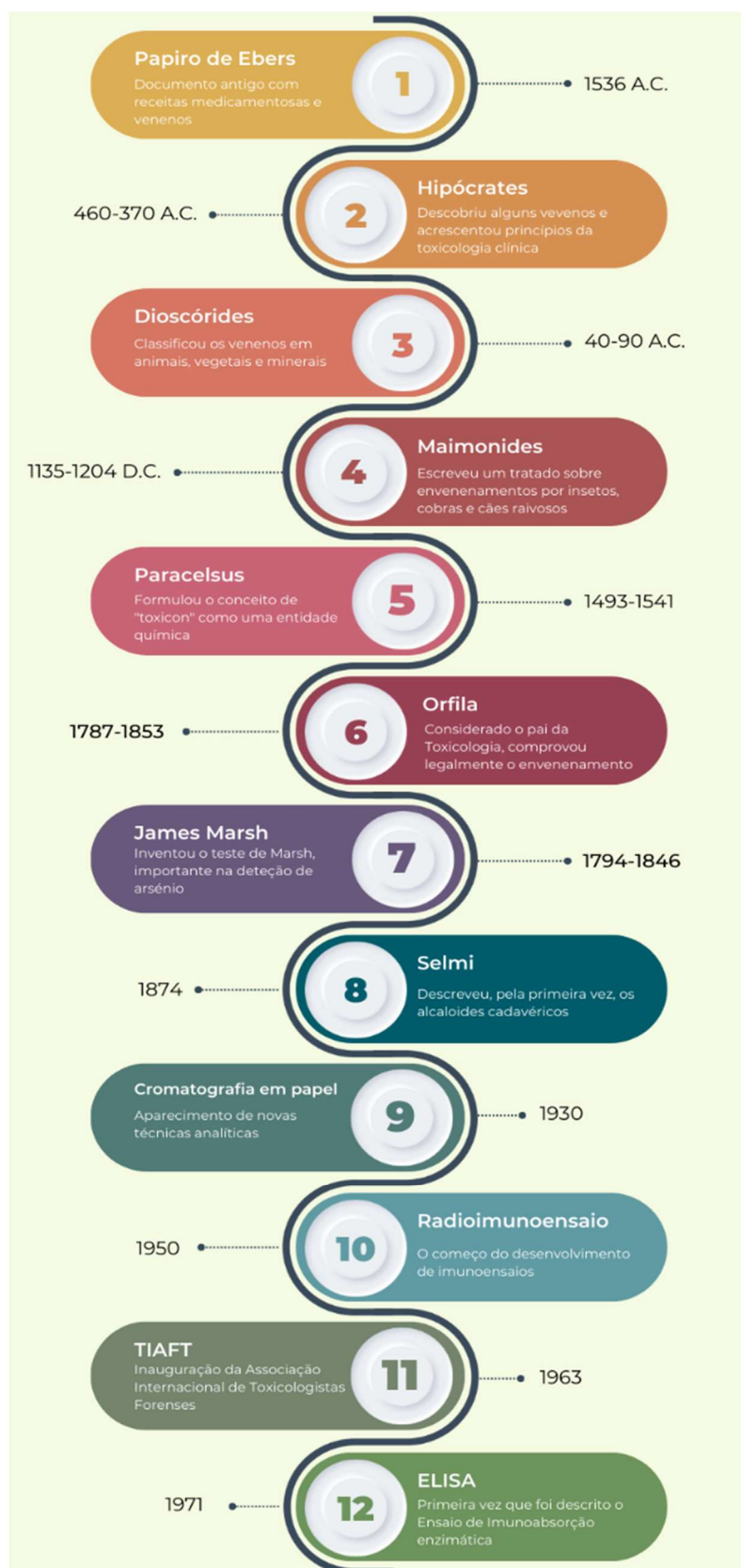


Figura 3. Representação esquemática da história e evolução da Toxicologia Forense até ao aparecimento dos imunoenaios.

A toxicologia e a toxicologia forense, em particular, têm uma história vasta com vários desafios e estão em constante evolução, tanto ao nível analítico como interpretativo, especialmente em relação a um aumento do número de potenciais drogas de interesse. O desenvolvimento de técnicas de deteção altamente sensíveis e o tratamento adequado dos dados permitiram a análise de uma vasta gama de compostos e o estabelecimento dos seus intervalos toxicológicos, numa variedade de matrizes. Por último, é evidente que o futuro da toxicologia será sempre multidisciplinar e utilizará os desenvolvimentos da tecnologia da informação, juntamente com a estatística, a fim de fornecer possíveis soluções para uma melhor interpretação de resultados em benefício de decisões médicas ou judiciais¹⁴.

3. Princípios e Objetivos da Toxicologia Forense

A Toxicologia Forense (TF) é um ramo da ciência que inclui a deteção, identificação e isolamento de drogas, medicamentos e outros xenobióticos em espécies biológicas e não biológicas, lidando também com a interpretação de resultados, para fins relacionados com investigações médico-legais¹⁵. Por outras palavras, a TF envolve o estudo e a aplicação da toxicologia na lei, uma vez que abrange a análise de uma panóplia de amostras biológicas provenientes do ser vivo ou do cadáver em função de parâmetros legais^{15; 16}.

Efetivamente, um dos maiores propósitos desta área consiste na aplicação de interpelações de Química Analítica, Toxicologia e Farmacologia, e outras vertentes científicas e tecnológicas, tendo em vista a investigação de compostos, novos e/ou comuns, de interesse forense¹⁷. Assim, a TF pode ser dividida em duas componentes: a toxicologia forense *post-mortem* (PM) e a *ante-mortem* (AM). Na toxicologia forense PM, o toxicologista auxilia na compreensão da cause de morte, através da análise de amostras, podendo ser fluídos e/ou tecidos obtidos na autópsia médico-legal¹⁸. Na toxicologia forense AM, o profissional tem a responsabilidade de avaliar e entender as alterações do comportamento humano despoletadas por xenobióticos, englobando os crimes de condução sob o efeito de drogas e/ou álcool, o uso de *doping* no desporto, a monitorização do uso de drogas no trabalho, entre outras^{15; 18}.

Nesta ciência multidisciplinar, os toxicologistas forenses têm de ser altamente capacitados em química analítica e em conhecimentos relativos aos possíveis contactos e consequentes efeitos tóxicos que as substâncias podem exercer ao nível do corpo humano. Assim, em adição à boa prática profissional, todos os métodos analíticos usados nos processos de deteção, confirmação e quantificação devem ser os mais exatos, precisos e específicos

possíveis, uma vez que só assim se podem obter resultados fidedignos que, após serem analisados pelo toxicologista forense, têm preponderância médico-legal¹⁸.

4. Imunoensaios em Toxicologia Forense

4.1. Amostras

A TF, como descrito anteriormente, pode atuar em duas componentes, em situações de PM e AM sendo que para cada área, o tipo de amostra depende do objetivo a alcançar, da sua possibilidade e disponibilidade de colheita, e da tecnologia a utilizar. Para a análise por imunoensaios, não só podemos usar matrizes convencionais, sangue e urina, como matrizes alternativas, humor vítreo e biliar. Nas autópsias médico-legais, efetuadas na Unidade de Patologia Forense (UPF) do Serviço de Patologia e Clínica Forenses de cada Delegação e nos Gabinetes Médico-Legais e Forenses (GMLF) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF, I.P.), são normalmente colhidas várias amostras destinadas às análises toxicológicas. As amostras AM são na sua maioria amostras de sangue associadas à fiscalização rodoviária, sendo colhidas nos vários Hospitais e Centros de Saúde autorizados para o efeito.

A responsabilidade do Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF) do INMLCF, I.P. relativamente a cada amostra, inicia-se aquando da entrada das mesmas no Serviço, não sendo responsável pela colheita, acondicionamento e transporte adequados. O SQTF é responsável pelo fornecimento dos *kits*, destinados à colheita de amostras no decorrer das autópsias realizadas pelo INMLCF, I.P. e dos *kits* destinados às colheitas no âmbito da clínica forense. Os *kits* são constituídos por tubos com capacidade de 10 mL e de 30 mL, com fluoreto de sódio (conservante e anticoagulante do sangue), para que sejam colhidas as amostras necessárias e/ou possíveis. Por outro lado, relativamente às amostras do âmbito do código da estrada, há responsabilidades partilhadas: incumbe à Autoridade Nacional de Segurança Rodoviária (ANSR) o fornecimento dos sacos dos *kits* para que o SQTF os prepare, associando um tubo de 6 mL com anticoagulante (EDTA) e envie os *kits* para os Comandos da Polícia de Segurança Pública (PSP) e GNR (Guarda Nacional Republicana), onde estas Instituições ficam responsáveis pela sua distribuição por todo o território nacional, de forma a serem usados nas colheitas hospitalares.

4.1.1. Percurso dentro do SQTF

De acordo com o artigo 6.º da Portaria n.º 19/2013 de 21 de janeiro, referente aos estatutos do INMLCF, I.P., ao SQTF compete assegurar, a nível nacional, a realização de

perícias e exames laboratoriais químicos e toxicológicos, no âmbito das atividades das Delegações e dos GMLF, bem como a solicitação das autoridades e entidades para o efeito competentes, ou do presidente do conselho diretivo¹⁹.

4.1.1.1. Aceitação e Receção das Amostras

Independentemente da proveniência, quando as amostras ingressam no SQTF passam a ser responsabilidade do mesmo. Inicialmente, as amostras recém-chegadas ao SQTF, passam por uma fase de aceitação, na qual é preenchido o documento do Auto de Entrada de Amostras (Anexo 2), que contém informação da origem, do número da bolsa, do transporte, do portador e do recetor, e respetivas assinaturas. Após a aceitação das amostras, segue-se a receção das amostras, onde também se verificam os documentos associados (cadeia de custódia e requisição de análises). As requisições provenientes da patologia, ou seja, provenientes de autópsias, são submetidas numa plataforma tendo-se acesso eletrónico; as que são do âmbito da fiscalização rodoviária, encontram-se dentro do próprio *kit* das amostras. Nesta mesma etapa, também é conferido e editado o documento do Auto da Cadeia de Custódia (Anexo 3), que acompanha as amostras no transporte dos GMLF para o SQTF. Por fim, na plataforma interna do INMLCF, I.P., o responsável pela receção, realiza o preenchimento de diversos parâmetros relacionados com as amostras presentes nos *kits*, como o tipo e a quantidade de amostra(s), e a verificação do número de processo, do nome, idade, entre outros indicadores necessários ao processo. Consequentemente, para cada tubo de amostra rececionado, é gerada uma determinada posição num suporte, auxiliando na organização interna de amostras do SQTF.

4.1.1.2. Cadeia de Custódia

Todo o tipo de amostras que se inserem no circuito do SQTF, têm de estar documentadas quanto ao seu percurso até à entrada no Serviço, sendo este documento designado por cadeia de custódia. Depois, já no SQTF, a sua localização e manuseamento são sempre registados aquando da realização das análises, com o propósito de não comprometer a sua integridade. Esta documentação é necessária, na medida em que previne a adulteração e vulnerabilidade da amostra em causa. Assim sendo, a cadeia de custódia insere-se em dois parâmetros essenciais, o externo e interno ao INMLCF, I.P.. No parâmetro externo, a cadeia de custódia consiste na documentação de responsabilidades por parte de entidades externas ao INMLCF, I.P., desde GMLF, Hospitais a transportadoras. Ou seja, estas são responsáveis pelas amostras e, até ao ingresso das mesmas no SQTF, essas entidades têm de garantir a manutenção do seu valor médico-legal. Quanto ao parâmetro interno, a amostra, assim que é

recebida no INMLCF, I.P., passa a ser da total responsabilidade do SQTf, na medida em que, sempre que um profissional manuseia uma amostra, este processo tem de estar documentado, assegurando a proteção da mesma. A cadeia de custódia tem a capacidade de responder a questões tais como, quem manuseou a amostra, quando foi utilizada, que ciclos de descongelamento teve e onde é que se encontra. Esta documentação é importante, uma vez que o seu procedimento assegura a confidencialidade e ética, onde poderão estar envolvidas atividades ilícitas⁴, promovendo um circuito de amostra seguro e, por conseguinte, um bom funcionamento do serviço.

4.1.1.3. Acondicionamento e Conservação das Amostras

Aquando da recolha das amostras em contexto de autópsia, estas são armazenadas em tubos específicos, consoante o tipo de amostra a transportar. Utilizam-se tubos de colheita de 10 mL para o sangue periférico, tubos de colheita de 30 mL para sangue cardíaco, urina, conteúdo gástrico, bÍlis e tecidos. Os médicos legistas têm também ao seu dispor seringas com capacidade de 2 mL, para colher e armazenar sangue periférico, com o propósito de pesquisa de produtos muito voláteis, e humor vítreo^{4,20}. Por fim, quanto às amostras relativas ao código da estrada, estas são colhidas e acondicionadas no interior de tubos de 6 mL. Na Figura 4, ilustram-se os diferentes tubos e seringa de colheita, e respetivos contentores, pertencentes ao INMLCF, I.P., a fim da recolha das amostras pretendidas.

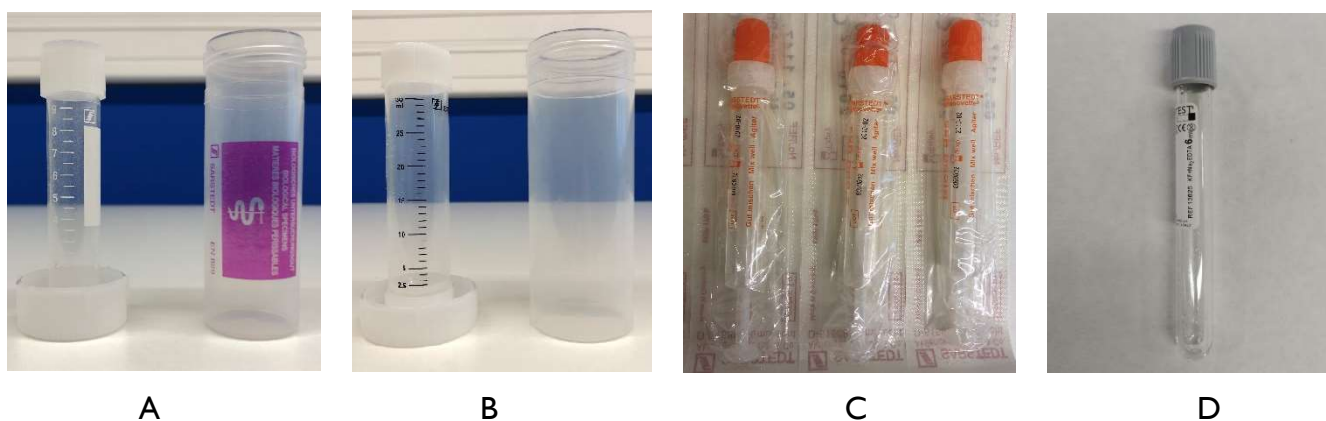


Figura 4. Tubos e seringas de colheita, e respetivos contentores usados no INMLCF, I.P.: (A) Tubo de colheita de 10 mL e respetivo contentor. (B) Tubo de colheita de 30 mL e respetivo contentor. (C) Seringa de 2 mL e tubo de colheita. (D) Tubo de colheita de 6 mL.

O serviço é responsável pela preparação de três tipos de kits: o kit A, que apresenta 2 tubos de 30 mL e 1 de 10 mL; o kit B, com 1 tubo de 10 mL e 4 de 30 mL, ambos destinados à patologia forense; e o kit C, direcionado para a clínica forense, com 1 tubo de 10 mL e outro de 30 mL. Os kits para colheita AM do código da estrada, têm apenas 1 tubo de 6 mL em cada.

De notar que, após a colheita das amostras necessárias, todos os tubos têm de ser etiquetados, com informações básicas como o número do processo, o nome, o tipo de amostra, data e responsável pela colheita^{4;20}. Estas etiquetas devem ser inseridas nos tubos de colheita e não nos respetivos contentores²⁰.

Paralelamente, no que concerne à conservação das amostras, estas devem dar entrada no laboratório no mínimo intervalo de tempo possível. Caso não seja possível a sua entrega num espaço temporal de 48 horas, as mesmas devem ser congeladas²⁰. Para a conservação a curto prazo, as amostras biológicas têm de estar refrigeradas entre 2 e 8°C e, a longo prazo, a -20°C ou, preferencialmente, a -80°C^{4; 20}. Excecionalmente, existem amostras, nomeadamente o cabelo e unhas, que permanecem estáveis à temperatura ambiente⁴.

4.1.2. Matrizes Convencionais

4.1.2.1. Sangue

De todas as amostras possíveis, o sangue é a amostra preferencial no que toca à recolha AM e PM de matrizes para análises toxicológicas. Num contexto PM, normalmente é colhido sangue da cavidade cardíaca e periférico, contudo na sua impossibilidade, pode-se colher sangue de outra parte do cadáver. Os tubos destinados às amostras de sangue são previamente preparados, no SQTF, com uma pequena quantidade de anticoagulante para a obtenção de uma concentração final de 1-2% m/v. O anticoagulante atualmente mais utilizado no SQTF é o fluoreto de sódio e tem o intuito de reduzir a conversão de glucose em etanol, por parte de microrganismos, da cocaína em éster metílico da ecgonina em situações de PM, e reduz também a perda de alguns ésteres como a 6-acetilmorfina, despoletando assim a não adulteração dos resultados das análises²⁰.

4.1.2.1.1. Sangue da Cavidade Cardíaca

A amostra de sangue cardíaco deve ser aspirada da cavidade direita do coração, através de uma seringa com tamanho adequado, após abertura do saco pericárdico e remoção do pericárdio. Contudo, tendo em conta a Redistribuição *Post-mortem* (RPM), esta matriz deve ser utilizada para análises qualitativas de xenobióticas, evitando as quantitativas, uma vez que pode haver contaminação da amostra de sangue cardíaco com conteúdo gástrico e/ou com pequenos pedaços de tecido(s). Por outro lado, o sangue proveniente do coração é, geralmente, mais abundante em relação ao periférico, e os níveis de xenobióticos tendem a encontrar-se em maiores concentrações, quando comparado com o sangue não cardíaco. Assim, o sangue cardíaco é possivelmente uma das amostras mais heterogêneas que se pode colher do cadáver, uma vez que pode conter sangue de uma ou mais cavidades cardíacas e

sangue que é drenado da artéria e veia pulmonar, da veia cava inferior, da artéria aorta e das veias subclávias^{4:20}.

4.1.2.1.2. Sangue Periférico

O sangue periférico pode ser obtido através da inserção de uma agulha hipodérmica, e posterior aspiração, a partir da veia femoral ou subclávia. Este tipo de amostra é preferencialmente destinado à determinação de substâncias voláteis e para a confirmação e quantificação de drogas e substâncias medicamentosas de cariz médico-legal. Ao nível PM, é recomendado que a amostra de sangue periférico seja colhida aquando do começo da autópsia, na medida em que, assim, consegue-se prevenir possíveis contaminações, mesmo esta sendo menos propensa à RPM⁴. Nas análises AM utiliza-se uma seringa, de forma a colher 6 mL de sangue, para preencher totalmente o tubo de amostra, contribuindo para a diminuição da perda de compostos voláteis, nos ciclos de descongelação e aquando da abertura do mesmo no SQTF²⁰.

4.1.2.2. Urina

A urina representa uma das maiores fontes de eliminação de xenobióticos, sendo utilizada tanto em situações de AM, como de PM²⁰. Durante a autópsia, a amostra de urina deve ser retirada através de uma agulha hipodérmica limpa, diretamente na bexiga^{4:20}. Quando disponível, permite a análise qualitativa de substâncias de interesse médico-legal, dado que a maior parte dos xenobióticos e dos seus metabolitos se encontram em altas concentrações devido à sua acumulação na urina, auxiliando assim a sua deteção²⁰. Na ausência desta amostra PM, pode-se optar pela lavagem da bexiga com um pequeno volume de água destilada ou soro, indicando sempre o volume final utilizado⁴. Por outro lado, a facilidade de análise da urina também se deve à ausência de proteínas séricas, lípidos e outras moléculas de grande peso molecular, devido ao processo de filtração glomerular que ocorre nos rins. Porém, num óbito rápido devido a uma exposição a um determinado xenobiótico, este, presumivelmente, não se encontrará disponível na urina, pois não foi metabolizado para tal, pelo que a janela de deteção pode variar desde 24 horas até 1 mês. Neste tipo de amostra não se realizam análises quantitativas, uma vez que diversos fatores podem afetar a concentração da substância a analisar, tais como a ingestão de fluídos, o metabolismo, a *clearance* renal, o pH (bases fracas como anfetaminas, são excretadas mais eficientemente na urina ácida, enquanto que os ácidos fracos como barbitúricos, são excretados mais eficientemente na urina básica) e o número de micções em relação à toma⁴. Portanto, a identificação de determinada substância na urina apenas confirma o uso da mesma, não permitindo saber a quantidade ingerida, data da toma

ou a influência no corpo humano, pelo que a amostra de urina é indicada para os métodos imunoenzimáticos devido à sua composição de 98% de água²⁰.

4.1.3. Matrizes Alternativas

4.1.3.1. Humor Vítreo

O humor vítreo é uma amostra biológica alternativa, apenas disponível nos casos PM, que se introduziu nas análises forenses na década de 60¹⁷. Usualmente, apenas é de interesse médico-legal quando as matrizes tradicionais não estão disponíveis em diversos casos, como por exemplo, em cadáveres queimados, embalsamados ou em fase avançada de decomposição⁴. O humor vítreo é um hidrogel viscoelástico homogêneo que se localiza no interior do globo ocular, entre a lente cristalina e a retina, e que preenche o núcleo do olho, conferindo a manutenção da sua forma (Fig. 5)²¹.

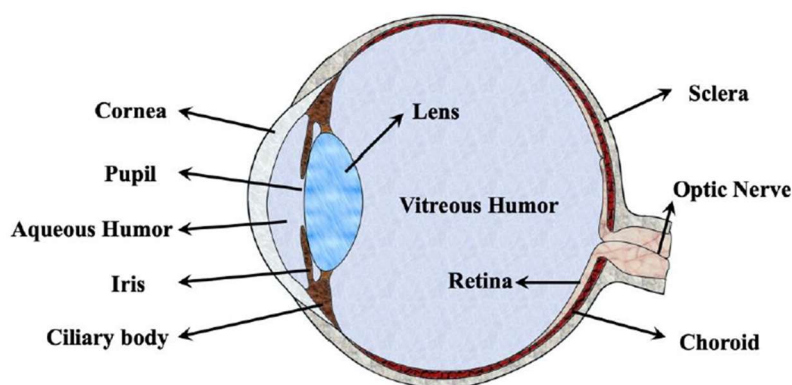


Figura 5. Anatomia ocular²¹.

É composto por cerca de 98% de água, contendo também fibras de colagénio (proteína estrutural mais abundante), glicoproteínas, eletrólitos, lípidos, glicosaminoglicanos (predominantemente o ácido hialurónico), entre outras substâncias^{4; 17; 21; 22}. A amostra de humor vítreo é obtida através da inserção de uma seringa de 5/10 mL, no canto exterior entre a pálpebra superior e inferior, até a ponta se posicionar centrada no globo ocular e posterior aspiração delicada⁴. O humor vítreo constitui 80% do olho e com uma execução adequada da técnica, num adulto é possível extrair 2 a 3 mL de cada globo ocular e cerca de 1 mL num recém-nascido^{4; 20}. Tendo em conta a sua localização, o humor vítreo tem uma menor probabilidade de contaminação, uma vez que apresenta um número reduzido de células e a supressão de vasos sanguíneos, ainda que as bactérias presentes nos diversos microbiomas, internos e externos ao corpo humano, infetem os tecidos e fluídos em redor⁴. Este facto foi comprovado no estudo de Harper em que não se encontraram quantidades significativas de bactérias ou fungos em 51 amostras de humor vítreo, mas, em contrapartida, revelou-se uma

alta variedade de microorganismos em 32 amostras de sangue PM²³. Por outro lado, o humor vítreo apresenta uma reduzida atividade enzimática e é desprovido de esterases que degradam substâncias como a cocaína, heroína e 6-acetilmorfina, contribuindo para a estabilidade dos seus compostos²⁴. Porém, esta matriz não é ideal para a detecção de canabinóides, uma vez que, de acordo com o estudo de Saenz e seus colaboradores, o tetrahydrocannabinol (THC) e o hidroxi-tetrahydrocannabinol (THCOOH), foram detetados no sangue e/ou na urina e não no humor vítreo, devido à sua grande afinidade proteica²⁵.

4.1.3.2. BÍLIS

A bÍlis é um fluído amarelo-esverdeado complexo, que inicia o seu percurso nos hepatócitos. Este fluído, denominado de bÍlis hepática, abandona os hepatócitos, células do fígado, para os canalículos biliares, que são drenados em ductos, pelo que esta árvore biliar se congrega no ducto hepático comum. Por sua vez, este ducto divide-se no ducto biliar comum e no ducto cístico, que transporta bÍlis para o duodeno e que abastece a vesícula biliar, respetivamente. A bÍlis é constituída maioritariamente por água (cerca de 95%), encontrando-se alguns compostos em solução ou suspensão, tais como sais e pigmentos biliares, eletrólitos, fosfolípidos, colesterol e proteínas²⁶. Fisiologicamente, esta matriz, ligeiramente alcalina,²⁷ é libertada da vesícula biliar devido a estímulos neuronais e hormonais (pela colecistocinina) aquando da ingestão alimentar, deslocando-se, através de contrações musculares, para o intestino, facilitando a absorção de lípidos e de substâncias lipofílicas²⁶. Por outro lado, fora dos momentos prandiais, a bÍlis permanece armazenada na vesícula biliar, sofrendo modificações devido à reabsorção de água, eletrólitos e outros componentes, pelo que a sua concentração é 5 a 20 vezes superior relativamente à bÍlis hepática^{26; 28}. Esta matriz alternativa corresponde a um reservatório e arquivo de diversos xenobióticos e seus metabolitos, que são submetidos a excreção biliar e a circulação entero-hepática. A bÍlis vai da vesícula biliar para o intestino e, neste órgão, os xenobióticos podem sofrer reabsorção e entrar, novamente, na circulação sistémica através da veia hepática ou então podem também regressar à bÍlis (circulação entero-hepática), exponenciando a concentração e o tempo de detecção dos mesmos²⁷. Paralelamente, a bÍlis pode ser classificada como uma amostra alternativa válida, na medida em que a colheita é um processo simples e obtém-se na maioria dos casos um volume considerável. Apresenta uma ampla janela de detecção comparativamente com o sangue e altas concentrações de xenobióticos e respetivos metabolitos²⁶. Assim sendo, o rácio de concentrações, bÍlis-sangue, de drogas e medicamentos, permite depreender que as concentrações na bÍlis e no sangue não estão correlacionadas, devendo-se a fatores fisiológicos e farmacológicos, como a variabilidade da composição da bÍlis, as propriedades físico-químicas

dos xenobióticos e a circulação entero-hepática; e a fatores patológicos, como o intervalo PM, a RPM e as mudanças PM da bÍlis e do sangue²⁹. Contudo, devido às concentrações de xenobióticos usualmente mais altas, relativamente ao sangue, a amostra de bÍlis, aquando da ausência de urina, é preferencialmente utilizada em ensaios qualitativos^{4; 29}. Por fim, a colheita da bÍlis deve ser feita diretamente na vesícula biliar através de uma seringa hipodérmica ou de um corte na mesma e posterior compressão para o recipiente de armazenamento, no caso de se encontrar num estado mais viscoso^{4; 26; 27}.

4.1.4. Outras Amostras

Relativamente aos diferentes tipos de imunoensaios, desde a sua gÉnese, têm sido analisadas diferentes tipos de amostras, na medida em que por vezes as amostras disponÍveis, tanto AM como PM, podem ser limitadas, mas a resposta da TF deve ser sempre o mais completa e racional possÍvel. Especificamente por ELISA, podem ser analisadas algumas matrizes alternativas, tais como o soro, suor, mecÓnio e Órgãos³⁰. Através da técnica RIA, já se testou o fluÍdo oral, suor, fluÍdo menstrual, conteúdo gÁstrico, sémen, mecÓnio, fÍgado, baço, cabelo e unhas. Já com a técnica EMIT, conseguiu-se testar saliva, leite materno, mecÓnio, fÍgado, rim e cérebro³¹. Para serem analisados, as vísceras e o cabelo necessitam de ser tratadas. Quanto às vísceras procede-se à sua destruição por ultrassons, adicionando água destilada ou um tampão adequado. Adiante, executa-se uma centrifugação do extrato resultante desse processo, utilizando-se o sobrenadante para a análise. Por outro lado, o cabelo necessita de sofrer um passo de descontaminação, através da sua lavagem com champô ou um fluÍdo adequado, sendo posteriormente digerido com ácidos e o líquido resultante é utilizado para análise.

4.2. Técnicas Analíticas de Imunoensaios

4.2.1. IntroduçÓo e ContextualizaçÓo Forense

Os imunoensaios sÓo ensaios bioanalíticos baseados na interaçÓo entre antigénios e anticorpos, na medida em que a verificaçÓo da presença do analito é baseada na reaçÓo que se sucede entre os antigénios e anticorpos³². Estes tipos de metodologias surgiram no inÍcio da década de 70 e, a sua introduçÓo no ramo da toxicologia forense, despoletou um aumento da rapidez e eficácia na identificaçÓo de certas classes de drogas presentes em fluÍdos biológicos ou outras matrizes. Nesses casos especificamente, os imunoensaios sÓo usados como métodos de *screening*, ou seja, qualitativos, na medida em que apenas detetam a presença de um determinado grupo de drogas de abuso^{31; 32}. Contudo, também podem ter a finalidade, através

da análise semiquantitativa, de auxiliar na monitorização da terapêutica medicamentosa (TDM), tendo-se tornado a sua técnica de eleição^{33; 34}. Assim sendo, os Imunoensaios podem ser distinguidos em dois grupos, os homogéneos e os heterogéneos. Nos Imunoensaios homogéneos não é requerida a separação do conjugado anticorpo-antigénio e do antigénio livre, antes da medição³³. E, para além desta propriedade, estes são mais propensos à automatização total e, conseqüentemente, apresentam com maior rapidez os resultados. Nesta classe estão incluídos o *Enzyme Immunoassay* (EIA), que engloba a *Enzyme Multiplied Immunoassay Technique* (EMIT) e o *Cloned Enzyme Donor Immunoassay* (CEDIA), o *Fluorescent Polarization Immunoassay* (FPIA), e o *Kinetic Interaction of Microparticles in Solution* (KIMS)³¹. Por outro lado, nos imunoensaios heterogéneos é necessária a separação dos antigénios ligados e dos livres, antes da medição do sinal, ou seja, requer pelo menos uma etapa de lavagem. Este grupo de ensaios, considerados os mais específicos e sensíveis, não é tão suscetível a interferências de matriz, havendo uma maior versatilidade na utilização de outras matrizes para a realização destes ensaios, em relação à urina, que é a matriz base^{31; 33}. Assim sendo, fazem parte deste grupo o *Radiolimmunoassay* (RIA), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e *Biochip Array Technology* (BAT)³¹. Na tabela seguinte apresentam-se sistematizados os Imunoensaios mais comuns na prática analítica da TF.

Tabela 4. Imunoensaios mais usados na Toxicologia Forense.

IMUNOENSAIOS	
Homogéneos	Heterogéneos
<ul style="list-style-type: none"> ➤ EIA <ul style="list-style-type: none"> · EMIT · CEDIA ➤ FPIA ➤ KIMS 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ELISA ➤ BAT ➤ RIA

Por fim, os imunoensaios apresentam baixos limites de deteção de substâncias, obtendo-se rapidamente os resultados destinados às finalidades previamente estabelecidas e, de uma forma geral, sem a necessidade de se proceder à etapa de extração prévia³⁴. Desta forma, especificamente nas análises de TF, consegue-se realizar o *screening* de um elevado número de amostras ao mesmo tempo para o mesmo grupo de substâncias³¹. Porém, devido ao facto da sua baixa especificidade, os resultados obtidos podem ser, por vezes, questionáveis, sendo necessária a confirmação dos resultados positivos através de métodos analíticos mais específicos e sensíveis, como GC-MS e LC-MS^{5; 31; 34}.

4.2.2. ELISA

O *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* é um ensaio imunológico que, na atualidade, é adotado por diversas ciências, estando a TF integrada nessa panóplia de aplicações. Este método é o mais usado, comparativamente aos restantes imunoensaios, apresentando várias vantagens, como ser semiautomático (p.e. pipetagem e lavagem), reduzidas interferências de matriz, boa sensibilidade e alcance, mas também algumas desvantagens, tais como maiores custos, etapas mais prolongadas e momento da adição de alguns reagentes mais rigoroso⁵. A técnica ELISA consiste na interação antígeno-anticorpo, e utiliza como marcador uma enzima acoplada ao antígeno específico do anticorpo³². Existem diversos testes derivados deste imunoensaio, tais como o ELISA direto, indireto, em *sandwich* e competitivo. Na toxicologia forense, o mais utilizado é método competitivo, que consiste na competição pela ligação ao anticorpo específico, fixado nos poços da placa, entre o antígeno do xenobiótico presente na amostra e o conjugado, que consiste no antígeno, específico da substância a ser analisada, acoplado a uma enzima⁵.

4.2.3. RIA

Para além do ELISA, a nível mundial, são utilizadas outras técnicas de imunoensaios, como por exemplo o Radioimunoensaio (RIA), tendo sido o primeiro método a surgir³¹. O Radioimunoensaio consiste num método heterogéneo que envolve a competição, para a ligação ao anticorpo fixado no tubo, entre um antígeno conjugado com um radioisótopo e o antígeno correspondente do xenobiótico presente na amostra (Fig. 6)^{31; 33}. O radioisótopo desempenha um papel fundamental para obtenção dos resultados, pelo que o mais recorrente para este ensaio é o Iodo-125 (¹²⁵I), sendo necessário um contador de radiação gama para medir a reatividade presente em cada tubo. Assim, quanto menor for a radiação medida, maior é a concentração do xenobiótico presente na amostra. De notar que, é uma técnica que requer um passo simples de lavagem, a fim da separação da fração livre da acoplada, e assim, permitir a quantificação desta última⁵. Contudo, o RIA apresenta algumas limitações maiores, em comparação com outros imunoensaios, tais como a utilização de material radioativo que, por si só, requer condições laboratoriais especiais, na medida em que é árduo o seu manuseamento, armazenamento e disponibilidade³¹. Acarreta também custos elevados, perigo na sua utilização e o tempo de semivida do radioisótopo, que corresponde ao seu “tempo de prateleira”, é curto, aproximando-se dos 60 dias^{5; 31}. Assim sendo, devido às limitações explanadas anteriormente, esta técnica não é das mais utilizadas nos tempos que correm⁵.

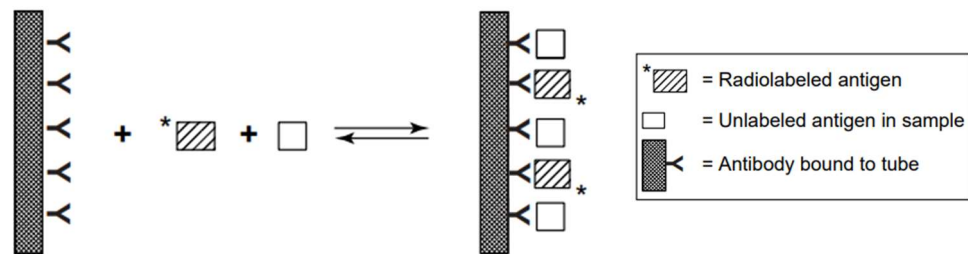


Figura 6. Ilustração do princípio de Radioimunoensaio (Adaptado de³¹).

4.2.4. EMIT

A EMIT foi o primeiro imunoensaio homogêneo a ser produzido e é bastante usado laboratorialmente, tanto em contexto clínico, como em contexto forense, uma vez que é uma técnica relativamente simples, precisa e específica^{5; 35}. Esta técnica baseia-se na competição entre o xenobiótico, presente na amostra, e o xenobiótico conjugado com uma enzima, glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), para a ligação aos anticorpos. Também é necessária a adição de nicotinamida adenina dinucleósido fosfato (NADPH), uma vez que a G6PD bacteriana usa, como coenzima, a nicotinamida adenina dinucleósido (NAD). Assim, com a reação enzimática há produção de gluconolactona-6-fosfato, acompanhada pela redução de NAD^+ a NADH, podendo esta ser monitorizada a 340 nm. Conseqüentemente, se o xenobiótico se ligar ao anticorpo, a atividade da enzima vai ser inibida e esta irá interagir com o substrato (Fig. 7). Portanto, sendo a atividade da enzima equivalente à absorvância, esta é diretamente proporcional à concentração de xenobiótico presente na amostra testada⁵. O EMIT, para além da propriedade qualitativa valiosa para identificação de overdoses de diversas drogas e medicamentos, pode providenciar um quadro quantitativo ou de monitorização na parte da clínica, na medida em que é uma técnica ideal para os pacientes de terapia prolongada, particularmente em situações de reajuste da dose de certas substâncias medicamentosas. Por último, o EMIT é uma técnica segura de análise que confere um rápido *screening* de drogas de abuso e uma quantificação de diversas drogas e medicamentos³⁵.

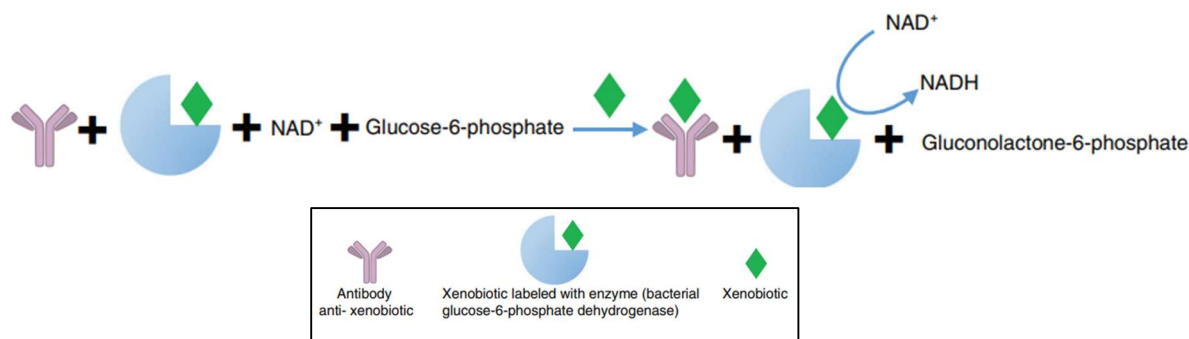


Figura 7. Ilustração do princípio da Técnica de Imunoensaio de Multiplicação Enzimática⁵.

4.2.5. CEDIA

O CEDIA, foi descrito em 1986 como uma novidade relativamente aos imunoenaios homogêneos e é baseado numa tecnologia de DNA recombinante³⁶. Esta técnica assenta no princípio da complementaridade entre dois fragmentos inativos da enzima β -galactosidade, provenientes da *Escherichia coli*, geneticamente modificados³³. São eles, o dador de enzima (ED), que é o fragmento com menores dimensões que está conjugado com o xenobiótico específico para o anticorpo fixado, e o aceitador de enzima (EA), que, aproximadamente, representa 95% da totalidade da enzima. Assim, após a introdução da amostra a analisar, haverá competição com o ED para os mesmos locais de ligação do anticorpo⁵. Portanto, quanto maior for a quantidade de xenobiótico presente na amostra, menor vai ser a quantidade de conjugado que se acopla ao anticorpo, despoletando uma união entre os fragmentos ED e EA, ou seja, uma maior atividade enzimática, podendo esta ser monitorizada a 570 nm por espectrofotometria^{5; 36}. Subsequentemente, com a adição do substrato, a enzima produz o clorofenol β -D-galactopiranosídeo vermelho, que posteriormente, é hidrolisado, também pela enzima, a clorofenol vermelho (Fig. 8)^{5; 31}. Assim, a taxa de formação desse produto é tanto maior, quanto maior for a taxa de xenobiótico e, por isso, a absorvância do produto final é diretamente proporcional à quantidade de xenobiótico presente na amostra^{5; 31; 36}.

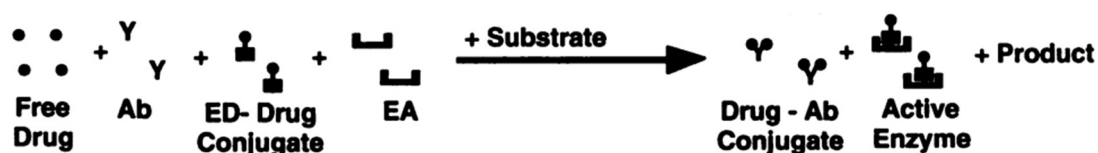


Figura 8. Ilustração do princípio de Imunoensaio por Doação de Enzima Clonada³⁶.

4.2.6. BAT

A técnica considerada mais emergente, atualmente, é a *Biochip Array Technology* (BAT), que surgiu em 1992, pela RANDOX[®], que investiu com a finalidade de revolucionar as análises laboratoriais, providenciando informação analítica mais abrangente e eficientemente. Esta tecnologia abrange múltiplas áreas, uma vez que pode atuar ao nível de laboratórios clínicos, hospitalares, veterinários, de investigação, e de toxicologia clínica e forense. A BAT consiste num método de testagem multi-analítica, que permite a deteção qualitativa e quantitativa de uma grande abrangência de analitos presentes em apenas uma amostra. É composta por *biochips* de 9x9 mm (Anexo 4), que representam a fase sólida e que, por outras palavras, são os locais onde ocorre a reação. Em cada *biochip* está presente uma amostra a analisar, sendo

que o equipamento consegue analisar 49 simultaneamente³⁷. Os mesmos são introduzidos numa placa, com o intuito de serem conduzidos por uma rota, esta que abrange a adição das amostras e reagentes, incubação, lavagem, detecção de sinal e captura de imagem³⁸. Ou seja, o passo de detecção do BAT assenta num sinal de quimiluminescência, que apenas emite luz, resultante da reacção ocorrida em cada *biochip*³⁷. Posteriormente, na detecção e quantificação deste sinal é usado um dispositivo de carga acoplada (CCD), que grava a luz que é emitida (Anexo 5)^{37; 38}. Paralelamente, entre todos os ensaios disponíveis neste equipamento, destacam-se os imunoenaios, como o ELISA competitivo e em *sandwich* (Fig. 9)³⁷. Por fim, os ensaios relativos a esta tecnologia são totalmente automatizados, sendo necessária uma reduzida intervenção do operador, apenas na introdução das instruções no equipamento, das amostras e reagentes, e das placas³⁸.

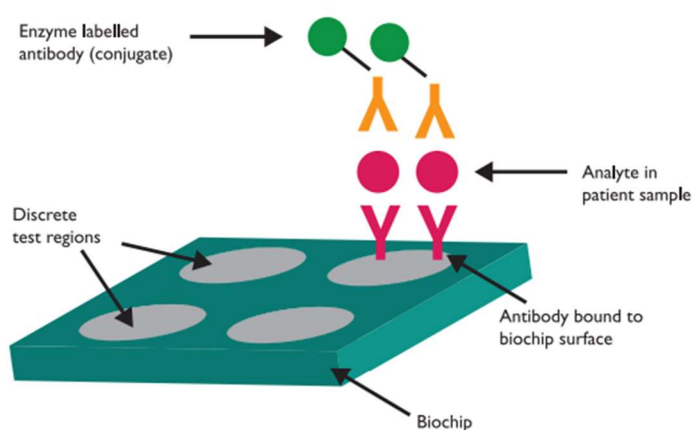


Figura 9. Ilustração do princípio de ELISA em *sandwich* pelo BAT³⁷.

5. Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF, I.P.

5.1. Equipamento do SQTF

A técnica usada a nível nacional para triagem de drogas de abuso (opiáceos, metabolitos da cocaína, canabinóides, anfetaminas e metanfetaminas) e medicamentos (benzodiazepinas), no SQTF, é o ELISA competitivo, recorrendo ao *EVOLIS™ TWIN PLUS SYSTEM* (Anexo 6), um analisador automático com capacidade de realizar as pipetagens das amostras e das soluções necessárias, a incubação e a leitura ótica.

5.1.1. Kits analíticos

Ao equipamento são associados os *kits* da OraSure Technologies, Inc. dos testes indicados, que incluem as placas de poliestireno (Anexo 7), compostas por 96 poços, que correspondem aos locais onde ocorre a reação imunológica. Em cada poço estão fixados anticorpos específicos para o grupo das substâncias a ser testado. Isto é possível, na medida em que é adicionada, à solução de anticorpos purificados, uma solução-tampão de bicarbonato, de pH 9, seguida de uma incubação, uma lavagem e, por fim, uma secagem, despoletando a fixação dos anticorpos ao poço³³.

5.1.1.1. Opiáceos

Os opiáceos são constituídos por analgésicos narcóticos naturais, que derivam do látex presente na planta *Papaver somniferum* e, através da obtenção do exsudato do mesmo, conseguem-se obter diversos alcalóides, como a codeína, morfina, papaverina e noscapina, que se incluem na sua composição. A morfina é o principal alcalóide do ópio e a partir desta, sintetizou-se a heroína, através de uma dupla acetilação, que, inicialmente esteve disponível no mercado para fins terapêuticos, mas que rapidamente foi retirada devido à dependência que induzia. Através de processos metabólicos alguns opiáceos podem-se transformar em morfina, como é o caso da heroína (diacetilmorfina) que, quando é desacetilada, é convertida a 6-monoacetilmorfina, metabolito este que pode ser detetado e inferido para o uso de heroína. Outro opiáceo, bastante usado, é a codeína que é um componente natural do ópio, mas também pode ser sintetizado através de morfina. A codeína, devido a processos de metabolização, é transformada em morfina e norcodeína, pelo que, três dias após o consumo, apenas a morfina pode ser detetada. Isto pode constituir implicações ao nível da triagem, uma vez que, através da deteção isolada de morfina, pode-se depreender a utilização de heroína. Assim, na ausência do metabolito, 6-monoacetilmorfina, a presença de morfina e codeína, tanto pode ser considerada como uso terapêutico de codeína, como consumo ilícito de heroína. Os opiáceos e seus metabolitos, acima referidos, estão ilustrados no anexo 8³⁹.

Efetivamente, para se proceder ao ensaio ELISA de triagem de opiáceos usa-se a morfina, como substância de preparação de controlos e calibradores. A concentração *cut-off*, é de 50 ng/mL, sendo esta a concentração fixada a partir da qual os resultados são positivos³⁹. Por outro lado, os anticorpos fixados nos poços são também específicos da morfina, pelo que apresentam reatividade cruzada com substâncias de estrutura semelhante, como a 6-acetilcodeína, codeína, dihidrocodeína, hidrocodona, entre outras^{39; 40}. Assim sendo, devido à reatividade cruzada, todos os resultados positivos devem, obrigatoriamente, ser confirmados

por um método mais específico e capaz de apresentar informações à cerca da estrutura molecular da substância em causa, como a GC-MS e a LC-MS³⁹.

5.1.1.2. Cocaína

A cocaína é um alcalóide proveniente da extração de uma espécie vegetal, *Erythroxylon coca*, sendo uma droga psicotrópica utilizada há mais de 2000 anos e, atualmente, apresenta-se limitada a anestésico local, por exemplo, em oftalmologia. Quimicamente, a metilbenzoilecgonina (cocaína) corresponde a um éster do ácido benzóico e da metilecgonina, pelo que é sintetizada a partir da ecgonina, na presença de metanol e ácido benzóico, após hidrólise dos ésteres presentes nos alcalóides extraídos da planta⁴¹. A cocaína sofre uma rápida metabolização através da hidrólise das suas ligações éster, dando origem à benzoilecgonina e ao éster metílico da ecgonina^{34; 41}. A benzoilecgonina é o principal produto desta biotransformação, produzida através de uma hidrólise espontânea, a um pH fisiológico, ou através da ação das carboxilesterases. Relativamente ao éster metílico da ecgonina, este metabolito é formado pela hidrólise do grupo benzoato da metilbenzoilecgonina, esta catalisada por carboxiesterases e pseudocolinesterases. Consequentemente, ambos os metabolitos, a benzoilecgonina e o éster metílico da ecgonina, posteriormente originam a ecgonina³⁴. Apenas 5% da metilbenzoilecgonina sofre N-desmetilação através das enzimas do citocromo P-450 hepático, dando origem ao metabolito, norcocaína, responsável por hepatotoxicidade^{34; 41}. Por outro lado, a formação de cocaetileno, resulta da ingestão simultânea de cocaína e bebidas alcoólicas, sendo então um marcador para esse tipo de consumo⁴¹. Assim sendo, entre 64 e 69% de cocaína pode ser eliminada na urina através de filtração simples, até três dias após a administração, sendo esta a principal via de eliminação desta droga de abuso. Pode ser eliminada na sua forma inalterada (1-9%), em benzoilecgonina (35-54%) e em éster metílico da ecgonina (32-49%)^{34; 41}. No sangue é considerado um período de deteção entre 4 a 12 horas, pelo que a sua conservação a temperaturas baixas e na presença de fluoreto de sódio, consegue-se reduzir a velocidade de degradação da cocaína³⁴. No anexo 9 está ilustrado o mecanismo da cocaína.

Efetivamente, para a realização da triagem relativamente à presença de cocaína nas amostras, no *EVOLIS*, usa-se a benzoilecgonina, como substância de preparação de controlos e calibradores, com uma concentração *cut-off* de 50 ng/mL⁴¹. Na microplaca, todos os poços, relativos à testagem de cocaína, contêm fixados anticorpos específicos para a benzoilecgonina, apresentando também reatividade cruzada com substâncias estruturalmente semelhantes, como por exemplo, a cocaína, cocaetileno, entre outras^{41; 42}. Por este motivo, todos os resultados positivos têm de ser, obrigatoriamente, confirmados por CG-MS ou LC-MS⁴¹.

5.1.1.3. Canabinóides

Os canabinóides são drogas ilícitas, obtidas a partir da planta *Cannabis sativa*, sendo consideradas as mais produzidas, traficadas e consumidas por todo o mundo^{34; 43}. A *Cannabis* é constituída por cerca de 421 compostos químicos, 61 dos quais correspondem a canabinóides³⁴. Efetivamente, o Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC), é o principal canabinóide que exerce efeitos psicoativos, podendo este ser encontrado nas flores, folhas e resina da planta⁴³. Outro constituinte é o canabidiol (CBD), que é caracterizado por ser um canabinóide, que praticamente carece de propriedades psicoativas, devido ao facto de apresentarem baixa afinidade para os recetores CB1 e CB2. Estes recetores são responsáveis pela interação com os canabinóides a fim de despoletarem o seu efeito. Assim, devido ao facto de se tratar de uma substância não psicoativa, o CBD foi incluído em estudos clínicos com possíveis efeitos terapêuticos e, por isso não se inclui a sua deteção no *screening* de drogas de abuso³⁴. O Δ -9-THC é maioritariamente metabolizado no fígado, primeiramente, por enzimas hepáticas do citocromo P450, que originam um composto hidroxilado, o 11-hidro- Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC-OH), apresentando uma atividade farmacológica e potência semelhantes ao metabolito inicial^{34; 43}. Posteriormente, este metabolito, por oxidação, origina o composto carboxílico inativo, 11-nor-9-carboxi- Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH), podendo ainda sofrer conjugação e produzir o seu glucorono-conjugado. Ao nível da eliminação dos canabinóides, menos de 1% de Δ -9-THC inalterado é excretado na urina, e na forma de metabolitos em cerca de 68% nas fezes e 13% na urina³⁴. Cerca de 70% do total de uma dose consegue ser eliminado em 72 horas, sendo que entre 80 e 90% pode ser excretado em 5 dias, na forma de metabolitos hidroxilados e carboxilados. Contudo, a vida média de metabolitos inativos corresponde a 7 dias, tendo uma persistência de 30 dias no organismo^{34; 43}.

Efetivamente, utiliza-se o metabolito carboxilado, o THC-COOH, como substância de preparação de calibradores e controlos, com uma concentração *cut-off* de 50 ng/mL⁴³. Os anticorpos fixados nos poços são específicos do THC, mas apresentam reatividade cruzada com substâncias de estrutura semelhante, como o THC-OH, THC-COOH, entre outros, sendo então necessária a confirmação, por GC-MS ou LC-MS, de todos os resultados positivos^{43; 44}.

5.1.1.4. Anfetaminas

Os derivados anfetamínicos integram o segundo grupo, de drogas de abuso mais consumidas em contexto mundial. Entre todos os derivados podemos destacar a anfetamina, a metanfetamina, a 3,4-metilenodiximetanfetamina (MDMA) e o metilfenidato, apresentando a

estrutura base da molécula de feniletilamina (Anexo 10). As anfetaminas são bases fracas que se caracterizam por um elevado volume de distribuição e uma reduzida ligação às proteínas plasmáticas. O tempo de semivida pode variar entre 6 e 12 horas, dado que a excreção renal e hepática, exponenciam a sua metabolização. De facto, as anfetaminas são metabolizadas, fundamentalmente, pela via hepática através das enzimas do citocromo P450, dependendo sempre do derivado anfetamínico em causa. Relativamente às vias metabólicas da anfetamina, esta pode ser transformada pela desaminação por ação da CYP2C, por hidroxilação aromática via CYP2D6, e também por uma hidroxilação alifática, sendo esta última a menos recorrente. Sabe-se que, ao fim de 24 horas, entre 35 e 44% da anfetamina pode ser excretada na urina³⁴. Esta substância encontra-se disponível na forma de dois tipos de isómeros, D e L, sendo que o isómero D, comparativamente com o L, desempenha cerca de três a quatro vezes uma maior atividade no Sistema Nervoso Central (SNC). Por outro lado, a 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) pode derivar da anfetamina, sendo também um composto estimulante do SNC, podendo ser alucinogénio quando administrado em elevadas doses⁴⁵.

Efetivamente, a fim de se realizar a triagem de anfetaminas, usa-se como substância de preparação de controlos e calibradores, a D-Anfetamina, com uma concentração *cut-off* de 100 ng/mL⁴⁵. As microplacas, a inserir no *EVOLIS*, contém anticorpos específicos da anfetamina, apresentando reatividade cruzada com substâncias de estrutura semelhante, tais como, a feniletilamina, a MDA e a parametoxianfetamina^{45: 46}. Assim, todos os resultados positivos devem ser, obrigatoriamente, confirmados por outro método mais específico, como a GC-MS ou a LC-MS⁴⁵.

5.1.1.5. Metanfetaminas

A metanfetamina, tal como a anfetamina, é um derivado anfetamínico em que o seu abuso provoca problemas a nível comportamentais e, quando comparada à anfetamina, esta apresenta uma ação mais duradoura, despoletando também uma maior toxicidade ao nível do SNC^{47: 48}. Este composto apresenta também dois isómeros, o D e o L, sendo ambos relevantes na análise toxicológica⁴⁸. O isómero D é preferencialmente utilizado, pois é responsável pelos efeitos pretendidos pelos seus consumidores, na medida em que os efeitos gerados pela L-metanfetamina têm menor duração^{47: 48}. Porém, a D-metanfetamina exibe um reduzido tempo de semivida e uma metabolização mais extensa⁴⁸. Por outro lado, uma das substâncias derivadas da anfetamina, que apresenta maior utilização para fins recreativos é a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA)⁴⁷. À semelhança da anfetamina, a metabolização da metanfetamina inicia-se devido à atividade do citocromo P450, especificamente da CYP2D6 e

da CYP3A4, estimando-se que 50% seja excretado na forma inalterada pela urina, 15% sob 4-hidroximetanfetamina e 10% como anfetamina^{34; 48}.

Efetivamente, é utilizado, como substância para preparação de controlos e calibradores, a D-Metanfetamina, com uma concentração *cut-off* de 100 ng/mL⁴⁷. Os anticorpos fixados na microplaca são específicos para a metanfetamina, podendo ocorrer fenómenos de reatividade cruzada com substâncias estruturalmente semelhantes, tais como MDMA, metildietanolamina (MDEA) e parametoximetanfetamina (PMMA)^{47; 49}. Sendo assim, é necessária a confirmação de todos os casos positivos por GC-MS ou LC-MS⁴⁷.

5.1.1.6. Benzodiazepinas

As benzodiazepinas consistem em substâncias depressoras do SNC e incluem-se no grupo farmacológico dos ansiolíticos e hipnóticos, podendo também ser consideradas como anestésicos e anticonvulsivantes⁵⁰. São fármacos que, na generalidade, apresentam uma alta lipossolubilidade e, devido a este motivo, atravessam as barreiras biológicas por difusão simples, facilitando a redistribuição do fármaco e exponenciando a sua duração de ação⁵⁰. Consequentemente, as benzodiazepinas podem provocar tolerância e dependência, física e psíquica, sendo as de menor duração de ação as causadoras de maior dependência⁵⁰. Estes fármacos podem induzir sonolência e incoordenação motora, entre outros efeitos, mas raramente provocam perda de consciência, depressão respiratória aguda e anestesia. Contudo, a associação de benzodiazepinas a outros depressores do SNC e álcool, pode despoletar acontecimentos fatais devido à potenciação de efeitos^{34; 50}. Relativamente à metabolização das benzodiazepinas, pode-se inferir que a etapa final da biotransformação corresponde a reações de conjugação por glucuronidação, para a formação de um metabolito inativo⁵¹. Algumas apenas necessitam desta última etapa, tais como o oxazepam e o lorazepam, mas por outro lado, a maior parte das benzodiazepinas são hepaticamente metabolizadas através de uma oxidação ou desmetilação, para formarem metabolitos intermédios, onde a maioria são ativos, e por fim sofrerem conjugação por glucoronidação^{50; 51}.

Efetivamente, com o intuito de se realizar a triagem de benzodiazepinas, utiliza-se o nordiazepam como substância para preparação de controlos e calibradores com uma concentração *cut-off* de 10 ng/mL⁵⁰. As microplacas devem conter, fixados nos poços, anticorpos específicos do nordiazepam, ocorrendo reatividade cruzada com substâncias de estrutura semelhante, tais como alprazolam, diazepam, estazolam, prazepam, entre outras^{50; 52}. Assim sendo, é obrigatório a confirmação, por GC-MS ou LC-MS, dos resultados positivos provenientes deste *screening*⁵⁰.

5.1.2. Preparação de amostras e soluções

Antecedendo a análise instrumental de todas as amostras, é necessária a preparação das mesmas, do controlo baixo e alto, dos calibradores *cut-off*, do calibrador negativo, das amostras brancas e do branco de reagentes. À exceção das amostras, as soluções são preparadas em sangue branco, cedido ao INMLCF, I.P., pelo Instituto Português do Sangue e Transplantação (IPST), tendo sido testadas e obtidos resultados negativos para opiáceos, cocaína, canabinóides, anfetaminas, metanfetaminas e benzodiazepinas. Assim sendo, o controlo baixo consiste numa amostra de sangue branco fortificado com as soluções de referência de cada grupo de substâncias a testar, a uma concentração mais reduzida, enquanto que o controlo alto é preparado a uma concentração superior. Os calibradores *cut-off*, de cada grupo de substâncias a testar, equivalem a sangue branco fortificado com a solução de referência específica para cada analito, a uma determinada concentração, e a sua utilidade reflete-se no estabelecimento da absorvância de referência para determinar a positividade de cada amostra. O calibrador negativo e as duas amostras brancas constam apenas de sangue branco, servindo para avaliar o efeito matriz, ou seja, a influência que a matriz pode exercer sobre a obtenção de resultados. Relativamente às amostras a serem analisadas, estas são diluídas, numa proporção de 1:4, com um diluente forense, tendo o propósito de se tornarem mais líquidas. O branco de reagentes é composto apenas por diluente forense e tem a finalidade de confirmar que não interfere com os componentes presentes nas amostras. Assim, o diluente forense confere a diluição de todas as amostras acima descritas, à exceção do branco de reagentes, tentando minimizar possíveis interferências no equipamento e contribuindo para o seu bom funcionamento.

5.1.3. Procedimento experimental

Posteriormente à preparação das amostras, executam-se os seguintes passos, de seguida explanados, relativos ao procedimento analítico do *EVOLIS*:

1. Adição de 25 µL de amostra a cada poço;
2. Adição 100 µL de Conjugado;
3. Incubação à temperatura ambiente por 30 minutos;
4. Lavagem;
5. Adição de 100 µL de substrato cromogénico;
6. Incubação à temperatura ambiente por 30 minutos;
7. Adição de 100 µL de reagente *Stop*;
8. Leitura ótica de cada poço.

Primeiramente, são pipetados, automaticamente para os poços, 25 μL das amostras (Fig. 10), já diluídas, tal como descrito em cima, pelo que o equipamento utiliza uma ponta diferente para cada amostra, evitando contaminações. O segundo passo consiste na adição de 100 μL

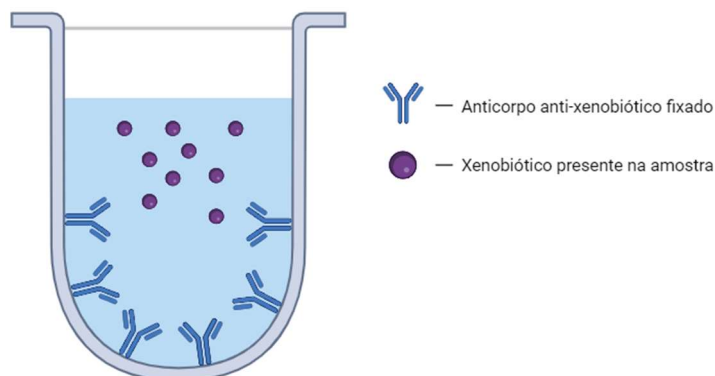


Figura 10. Adição da amostra ao poço revestido por anticorpos.

de conjugado e, posterior, incubação por 30 minutos numa estufa à temperatura ambiente. O Conjugado consiste numa solução tampão que contém um antigénio, específico do xenobiótico a ser testado, conjugado com uma enzima, a peroxidase. Este antigénio vai competir, pela ligação ao anticorpo fixado nos poços, com a substância presente na amostra, tal como ilustrado na figura seguinte (Fig. 11).

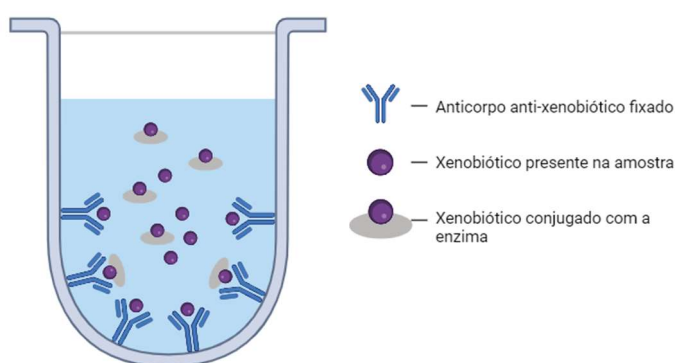


Figura 11. Adição do Conjugado e consequente competição com o analito da amostra.

Adiante, prossegue-se com o passo da lavagem, através de um tampão adequado, sendo que neste procedimento é utilizada água, destilada e desionizada, com a finalidade de separar os imunocomplexos, que se formam, dos reagentes não ligados³⁹. De seguida, são adicionados 100 μL de substrato cromogénico, também específico para o xenobiótico a testar, que reage com a enzima peroxidase, adicionada no segundo passo, despoletando a formação de um produto corado azul. A microplaca vai novamente a incubar, também por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, é adicionado o reagente *Stop*, uma solução de ácido sulfúrico a 2N, com intuito de estagnar a reação imunoenzimática, desenvolvendo-se uma coloração amarela (Anexo 11)^{5;39}. Por fim, o equipamento procede à leitura ótica de cada um dos poços a um comprimento de onda de 450 nm⁵.

5.1.4. Resultados Analíticos

Aquando do término da sequência de procedimento experimental, anteriormente explanada, o *EVOLIS* apresenta os resultados qualitativos em função da comparação das absorvâncias de cada amostra, das amostras brancas e dos controlos alto e baixo, com as absorvâncias dos calibradores negativos, tendo em conta a absorvância do respetivo valor de *cut-off* estabelecido para o grupo de substâncias a ser testado (Anexo 12). Tendo conhecimento de que o valor da absorvância obtida é inversamente proporcional à concentração do analito, quando o valor da absorvância da amostra é inferior ao valor da absorvância do calibrador *cut-off* do analito, considera-se um resultado positivo (Fig. 12A). Por outro lado, considera-se um resultado negativo, quando a absorvância da amostra é superior ao valor da absorvância do calibrador *cut-off* do analito (Fig. 12B).

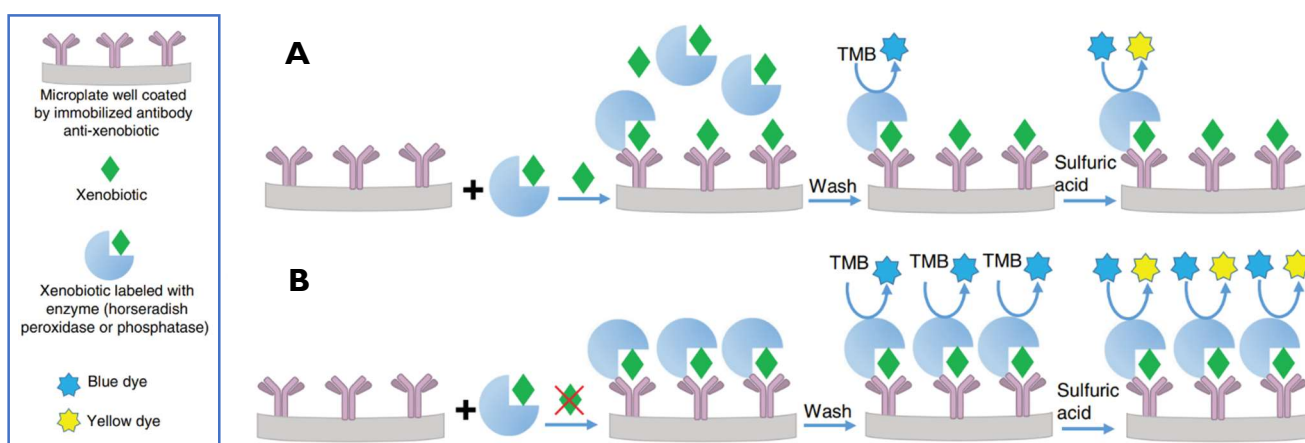


Figura 12. Princípio do método ELISA competitivo: **A** – resultado positivo; **B** – resultado negativo (Adaptado de⁵).

Contudo, todos os valores de absorvância das amostras correspondentes que sejam superiores a 15% do valor da absorvância da amostra *cut-off* são também considerados positivos. Por fim, como referido anteriormente, todos os resultados positivos obtidos nesta etapa de triagem têm de ser confirmados e eventualmente quantificados através de técnicas mais específicas, tais como a GC-MS e a LC-MS. De notar que, como em todos os restantes procedimentos de ensaio executados no SQTf, existem normas próprias para a aceitação dos resultados. O coeficiente de variação dos calibradores tem de ser inferior a 20% e é avaliado o desvio percentual que equivale à diferença entre os valores de absorvância dos calibradores *cut-off*, de cada grupo a ser testado e o calibrador negativo^{39; 41; 43; 45; 47; 50}.

5.1.5. Interferências Analíticas

Todo o procedimento analítico associado à triagem de drogas de abuso e benzodiazepinas apresenta uma certa vulnerabilidade, na medida em que podem ocorrer interferências. Estas interferências devem-se fundamentalmente a questões relacionadas com as matrizes utilizadas para se proceder à análise por imunoensaio. Primeiramente, tanto o tempo decorrido entre a colheita e a análise toxicológica da amostra, como a conservação da mesma, são fatores preponderantes para o surgimento de interferências, uma vez que pode ocorrer degradação da matriz o que despoleta por um lado, o aparecimento de novas moléculas que contaminam a amostra e por outro, o desaparecimento de outras devido à instabilidade intrínseca das mesmas. Assim, o estado físico da matriz também pode ser comprometido, afetando por isso a análise semiautomática realizada pelo *EVOLIS*, na medida em que se a amostra apresentar coágulos ou bolhas de ar, o equipamento não consegue realizar a sua pipetagem de forma correta, não sendo analisada. Por fim, outra das interferências que pode ocorrer trata-se da reatividade cruzada, ou seja, a habilidade que os anticorpos, fixados nos poços da microplaca, apresentam, ao interagirem com outro antigénio para além do seu específico, podendo então surgir falsos-positivos.

6. Conclusão

A Toxicologia Forense é uma ciência multidisciplinar, que envolve a análise de todo o tipo de amostras, sejam elas biológicas ou não biológicas, a fim de confirmar a presença ou ausência de xenobióticos e de determinar a sua concentração e dos respetivos metabolitos, interpretando os resultados obtidos, estes com um impacto legal. Este ramo da toxicologia, pode atuar em duas vertentes, AM, abrangendo incidentes rodoviários, abuso de drogas para fins criminais, TDM, entre outras, e PM, para perceber se o cadáver foi sujeito a xenobióticos antes do óbito e se as suas concentrações são preponderantes para estabelecer a causa de morte ou uma causa de influência de morte.

Os imunoensaios, são técnicas imunológicas que consistem na reação entre antigénios e anticorpos, e apresentam resultados qualitativos, na medida em que verificam a presença ou ausência da substância na amostra. Existem diversos tipos de imunoensaios, pelo que, em contexto nacional, no SQTf do INMLCF, I.P., utiliza-se o método de ELISA competitivo. Esta técnica exprime os resultados em função da absorvância, sendo que esta é inversamente proporcional à concentração do analito na amostra analisada. Por outras palavras, quanto maior for o valor da absorvância de um poço da microplaca, menor é o valor da concentração

do xenobiótico da amostra, presente naquele poço. Por conseguinte, todos os resultados positivos são confirmados, e se necessário quantificados, por técnicas mais sensíveis e específicas, como a GC-MS e a LC-MS.

Na verdade, os imunoensaios são relevantes e importantes na toxicologia forense, na medida em que são métodos rápidos e eficientes na determinação da presença de determinadas classes de compostos em amostras. São também técnicas que apresentam uma boa sensibilidade e que podem realizar um *screening* rápido de um número elevado de amostras ao mesmo tempo, sendo consideradas uma mais-valia em toxicologia forense. Adicionalmente, as amostras não necessitam de passar por um método de extração para serem analisadas por imunoensaio, tais como as que são analisadas por GC-MS e LC-MS, enfrentando apenas um passo de diluição para tornar a amostra mais líquida. Assim, o imunoensaio consegue, de certa forma, reduzir os gastos de recursos e de tempo, sendo fiável nos resultados que apresenta. Contudo, apresentam certas limitações, tais como a reatividade cruzada, que pode despoletar falsos-positivos, e interferências da matriz, uma vez que o estado da amostra pode interferir com a automaticidade do equipamento.

Em suma, na toxicologia forense em Portugal, os imunoensaios são métodos fundamentais que proporcionam uma triagem rápida e fidedigna de drogas de abuso e benzodiazepinas, na medida em que reduzem muito o número de amostras a serem analisadas por GC-MS e LC-MS, proporcionando maior eficiência no trabalho desenvolvido e poupando recursos, dentro do SQTF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NIYOGI, Sunil K. - Historical Overview of Forensic Toxicology. Em ROBERT H. CRAVEY; RANDALL C. BASELT (Eds.) - **INTRODUCTION TO FORENSIC TOXICOLOGY**. Davis, California : Biomedical Publications, 1981. p. 7–24.
2. GALLO, Michael - History and Scope of Toxicology. Em KLAASSEN, CURTIS (Ed.) - **CASARETT AND DOULL'S TOXICOLOGY THE BASIC SCIENCE OF POISONS**. 7. ed. [S.l.] : McGraw-Hill, 2008. p. 3–10.
3. **INMLCF, I.P.** - **Missão, Visão e Valores** - [Consult. 30 mai. 2023]. Disponível em: <https://inmlcf.justica.gov.pt/Sobre-o-INMLCF/Missao-visao-e-valores>.
4. DINIS-OLIVEIRA, R. J. *et al.* - Collection of biological samples in forensic toxicology. **Toxicology Mechanisms and Methods**. ISSN 15376516. 20:7 (2010) 363–414. doi: 10.3109/15376516.2010.497976.
5. DINIS-OLIVEIRA, Ricardo Jorge - Heterogeneous and homogeneous immunoassays for drug analysis. **Bioanalysis**. ISSN 17576199. 6:21 (2014) 2877–2896. doi: 10.4155/bio.14.208.
6. AGRAWAL, A. - History of toxicology. Em PAYNE-JAMES, JASON (Ed.) - **ENCYCLOPEDIA OF FORENSIC & LEGAL MEDICINE**. Amsterdam : Elsevier Ltd., 2005v. Vol. 2. p. 525–538.
7. WEXLER, PHILIP - **TOXICOLOGY IN ANTIQUITY**. 2. ed. [S.l.] : Elsevier, 2019. ISBN 978-0-12-815339-0.
8. ELISABETTA BERTOL *et al.* (EDS.) - Storia della Tossicologia forense. Em **TRATTATO DI TOSSICOLOGIA FORENSE**. 2. ed. [S.l.] : Casa Editrice Dott. Antonio Milani, 2000. p. 3–6.
9. **The International Association of Forensic Toxicologists** - [Consult. 3 mai. 2023]. Disponível em: <https://www.tiaft.org/tiaft-association.html>.
10. SIOUFFI, Antoine Michel - From paper to planar: 60 Years of thin layer chromatography. **Separation and Purification Reviews**. ISSN 15422119. 34:2 (2005) 155–180. doi: 10.1080/15422110500322990.
11. GOLDSMITH, Stanley J. - **Radioimmunoassay: Review of Basic Principles**
12. WU, Alan H. B. - A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**. ISSN 00098981. 369:2 (2006) 119–124. doi: 10.1016/j.cca.2006.02.045.

13. HOSSEINI, Samira *et al.* - Fundamentals and history of ELISA: The evolution of the immunoassays until invention of ELISA. Em **SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology**. [S.l.] : Springer Verlag, 2018. p. 1–18.
14. WILLE, Sarah M. R.; ELLIOTT, Simon - The Future of Analytical and Interpretative Toxicology: Where are We Going and How Do We Get There? **Journal of Analytical Toxicology**. ISSN 19452403. 45:7 (2021) 619–632. doi: 10.1093/jat/bkaa133.
15. JONES, Alan - Introduction to Forensic Toxicology and the Value of a Nationwide Database. Em DAVIES, SUSANNAH; JOHNSTON, ATHOLL; HOLT, DAVID (Eds.) - **FORENSIC TOXICOLOGY: DRUG USE AND MISUSE** [S.l.] : The Royal Society of Chemistry, 2016 Disponível em: <http://books.rsc.org/books/edited-volume/chapter-pdf/1530040/bk9781782621560-00001.pdf>. p. 1–2.
16. CARVALHO, Jefferson Lemes - Toxicological analyzes and its use in forensic science. **Foresic Research & Criminology International Journal**. 6:5 (2018) 376–381. doi: 10.15406/frcij.2018.06.00232.
17. CAMPOS, Eduardo Geraldo DE *et al.* - Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. **Forensic Toxicology**. ISSN 18608973. 40:1 (2022). doi: 10.1007/s11419-021-00596-5.
18. WYMAN, John F. - Principles and procedures in forensic toxicology. **Clinics in Laboratory Medicine**. ISSN 02722712. 32:3 (2012) 493–507. doi: 10.1016/j.cll.2012.06.005.
19. Portaria n°. 19/2013, de 21 de janeiro. [Consult. 29 mai. 2023]. Disponível em: https://sgmj.justica.gov.pt/Portals/14/Documentos/Documentos%20de%20apoio/Leis%20organicas%20MJ/INMLCF/INMLCF_P_19_2013.pdf.
20. Norma Procedimental – Recomendações para colheita e acondicionamento de amostras em toxicologia forense (NP-INMLCF-009_Rev01) – Documento interno aprovado para os serviços do INMLCF, I.P. e GML - [s.d.].
21. PIGAIANI, Nicola *et al.* - Vitreous humor endogenous compounds analysis for post-mortem forensic investigation. **Forensic Science International**. ISSN 18726283. 310:2020). doi: 10.1016/j.forsciint.2020.110235.
22. MISHRA, Deepakkumar *et al.* - Vitreous Humor: Composition, Characteristics and Implication on Intravitreal Drug Delivery. **Current Eye Research**. ISSN 14602202. 48:2 (2023) 208–218. doi: 10.1080/02713683.2022.2119254.

23. HARPER, D. R. - A COMPARATIVE STUDY OF THE MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF POSTMORTEM BLOOD AND VITREOUS HUMOUR SAMPLES TAKEN FOR ETHANOL DETERMINATION. **Forensic Science International**. 43:1989) 7–44.
24. BORDIN, Dayanne Cristiane Mozaner *et al.* - Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**. 7:2 (2015) 125–143. doi: 10.4322/sc.2015.022.
25. SAENZ, Sunday R. *et al.* - Postmortem fluid and tissue concentrations of THC, 11-OH-THC and THC-COOH. **Journal of Analytical Toxicology**. ISSN 19452403. 41:6 (2017) 508–516. doi: 10.1093/jat/bkx033.
26. BÉVALOT, F. *et al.* - State of the art in bile analysis in forensic toxicology. **Forensic Science International**. ISSN 18726283. 259:2016) 133–154. doi: 10.1016/j.forsciint.2015.10.034.
27. BIERLY, Jolene; LABAY, Laura M. - The Utility of Bile in Postmortem Forensic Toxicology. **Academic Forensic Pathology**. ISSN 19253621. 8:2 (2018) 324–327. doi: 10.1177/1925362118782073.
28. TURUMIN, J. L.; SHANTUROV, V. A.; TURUMINA, H. E. - The role of the gallbladder in humans. **Revista de Gastroenterologia de Mexico**. ISSN 03750906. 78:3 (2013) 177–187. doi: 10.1016/j.rgmx.2013.02.003.
29. FERNER, Robin E.; ARONSON, Jeffrey K. - The toxicological significance of post-mortem drug concentrations in bile. **Clinical Toxicology**. ISSN 15569519. 56:1 (2018) 7–14. doi: 10.1080/15563650.2017.1339886.
30. SMITH, Frederick - **Handbook of Forensic Drug Analysis**. [S.l.] : Elsevier, 2004
31. MOODY, David E. - Immunoassays in Forensic Toxicology. Em **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. [S.l.] : John Wiley & Sons, Ltd, 2006
32. OTITOJU, Olawale *et al.* - Forensic Toxicology; a Probe into the Future. **Asian Journal of Research in Biosciences**. 4:2 (2022) 942.
33. HAND, C.; BALDWIN, D. - Immunoassays. Em MOFFAT, ANTHONY; OSSELTON, M.; WIDDOP, BRIAN (Eds.) - **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 3. ed. [S.l.] : Pharmaceutical Press, 2004v. 1. p. 301–312.
34. DINIS-OLIVEIRA, Ricardo Jorge; CARVALHO, Félix Dias; BASTOS, Maria De Lourdes - **Toxicologia Forense**. [S.l.] : PACTOR, 2015.

35. CURTIS, Elvin G. *et al.* - ENZYME MULTIPLIED IMMUNOASSAY TECHNIQUE: A REVIEW. 1978).
36. ARMBRUSTER, David A. *et al.* - Cloned Enzyme Donor Immunoassay (CEDIA) for Drugs-of-Abuse Screening. **CLIN. CHEM.** 41. 1:1 (1995) 92–98.
37. **Biochip Array Technology explained The «Gold Standard» in multiplex testing.**
38. MOLLOY, Roisin M. *et al.* - Automation of Biochip Array Technology for Quality Results. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.** ISSN 14374331. 43:12 (2005) 1303–1313. doi: 10.1515/CCLM.2005.224.
39. Procedimento experimental - Triagem de opiáceos no sangue por ELISA (PE-SQTF-C-101_Rev02) – Documento interno aprovado para o Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. [s.d.]).
40. **OPIATES MICRO-PLATE EIA** - Bethlehem, USA : [s.n.] [Consult. 16 jul. 2023]. Disponível em: <https://www.orasure.com/>.
41. Procedimento experimental - Triagem de cocaína no sangue por ELISA (PE-SQTF-C-102_Rev02) - Documento interno aprovado para o Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. [s.d.]).
42. **COCAINE METABOLITE INTERCEPT MICRO-PLATE EIA** - Bethlehem, USA : [s.n.] [Consult. 16 jul. 2023]. Disponível em: <https://www.orasure.com/>.
43. Procedimento experimental - Triagem de canabinoides no sangue por ELISA (PE-SQTF-C-103_Rev02) - Documento interno aprovado para o Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. [s.d.]).
44. **CANNABINOIDS INTERCEPT MICRO-PLATE EIA** - Bethlehem, USA : [s.n.] [Consult. 16 jul. 2023]. Disponível em: <https://www.orasure.com/>.
45. Procedimento experimental - Triagem de anfetaminas no sangue por ELISA (PE-SQTF-C-104_Rev02) - Documento interno aprovado para o Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. [s.d.]).
46. **AMPHETAMINE-SPECIFIC MICRO-PLATE EIA** - Bethlehem, USA : [s.n.] [Consult. 16 jul. 2023]. Disponível em: <https://www.orasure.com/>.
47. Procedimento experimental - Triagem de metanfetaminas no sangue por ELISA (PE-SQTF-C-105_Rev02) - Documento interno aprovado para o Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. [s.d.]).

48. LEWIS, Daniel *et al.* - Methamphetamine deaths: Changing trends and diagnostic issues. **Medicine, Science and the Law**. ISSN 20421818. 61:2 (2021) 130–137. doi: 10.1177/0025802420986707.
49. **METHAMPHETAMINES MICRO-PLATE EIA** - Bethlehem, USA : [s.n.] [Consult. 16 jul. 2023]. Disponível em: <https://www.orasure.com/>.
50. Procedimento experimental – Triagem de benzodiazepinas no sangue por ELISA (PE-SQTF-C-108_Rev02) - Documento interno aprovado para o Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. [s.d.].
51. PENG, Linda; MORFORD, Kenneth L.; LEVANDER, Ximena A. - Benzodiazepines and Related Sedatives. **Medical Clinics of North America**. ISSN 15579859. 106:1 (2022) 113–129. doi: 10.1016/j.mcna.2021.08.012.
52. **BENZODIAZEPINES INTERCEPT MICRO-PLATE EIA** - Bethlehem, USA : [s.n.] [Consult. 16 jul. 2023]. Disponível em: <https://www.orasure.com/>

ANEXOS

Anexo I- Traite des poisons ou Toxicologie Generale¹.

TRAITÉ DES POISONS

TIRÉS

DES RÈGNES MINÉRAL, VÉGÉTAL ET ANIMAL,

OU

TOXICOLOGIE GÉNÉRALE,

Considérée sous les rapports de la Physiologie, de la
Pathologie et de la Médecine légale;

PAR M. P. ORFILA,

Naturaliste pensionnaire d'Espagne, Docteur en Médecine de
la Faculté de Paris, Professeur de Chimie et de Physique;

Précédé du Rapport fait à la Classe des Sciences physiques et mathématiques
de l'Institut de France.

*Unicum signum certum dati veneni est notitia botanica inventi veneni vegetabilis,
et criterium chemicum dati veneni mineralis. PLANCK, Toxicologia.*

TOME PREMIER — I^{re} PARTIE.



A PARIS,

Chez CROCHARD, Libraire, rue de l'École-de-Médecine, n^o. 5.

1814.

Anexo 2 – Auto de Entrada de Amostras.

	SERVIÇO DE QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES
	AUTO DE ENTRADA DE AMOSTRAS

1. Identificação da(s) amostra(s) recebida(s)

Origem	N.º da bolsa	Origem	N.º da bolsa	Observações (apenas se aplicável)
-		-		
-		-		
-		-		
-		-		
-		-		
-		-		
-		-		
-		-		
-		-		
-		-		
-		-		
-		-		
-		-		
-		-		
-		-		

2. Proveniência da(s) amostra(s)

Hospital (ou outra)	Indique qual	
---------------------	--------------	--

3. Modo de entrega da(s) amostra(s)

<input type="radio"/> Entregue em mão	<input type="radio"/> Por transportadora
<input checked="" type="radio"/> Através de CTT	<input type="radio"/> Outro	

Embalagem		Estado	Acondicionamento	
<input type="checkbox"/> Saco/caixa térmica	<input type="checkbox"/> Envelope	<input type="checkbox"/> Fechado(s)	<input type="checkbox"/> T. ambiente	<input type="checkbox"/> Refrigerado
<input type="checkbox"/> Bolsa(s) AR	<input type="checkbox"/> Caixa	<input type="checkbox"/> Aberto(s)		
<input type="checkbox"/> Bolsa(s) INMLCF				

4. Identificação do portador

Nome legível	
Função/Cargo	
Data e hora	11/08/2023 15:10

Assinatura (portador): ()

5. Receção no Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF)

Função/Cargo	Escolha um item.
Data e hora	

Assinatura (responsável pela receção no SQTF) ()

Anexo 3 – Auto de Cadeia de Custódia.



**AUTO DE CADEIA DE CUSTÓDIA
DAS AMOSTRAS PARA EXAMES COMPLEMENTARES DE TOXICOLOGIA**

Vai(ão) ser entregue(s) no Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P., remetido(s) pelo Gabinete Médico-legal de _____, o(s) saco(s) selado(s) com o(s) selo(s) n.º _____ e n.º _____ contendo amostras referentes ao(s) seguinte(s) processo(s) destinadas à realização de exames complementares toxicológicos.

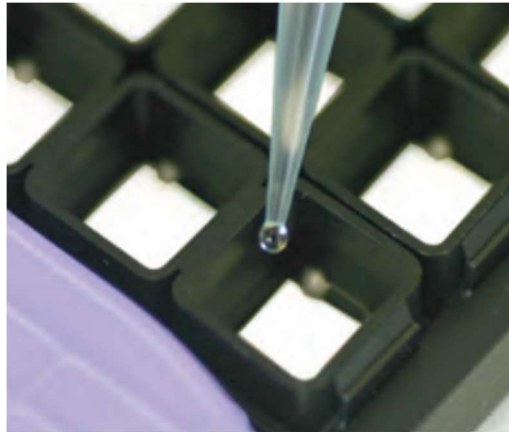
Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF	Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF
Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF	Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF
Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF	Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF
Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF	Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF
Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF	Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF
Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF	Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF
Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF	Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF
Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF	Proc. 20 _____/_____/_____-P-TF

No GML, o saco devidamente selado, foi entregue por _____ (assinatura) e recebido por _____ (assinatura) que o irá transportar para a DCINML, I.P..
Data: _____/_____/_____ Hora: _____h _____m

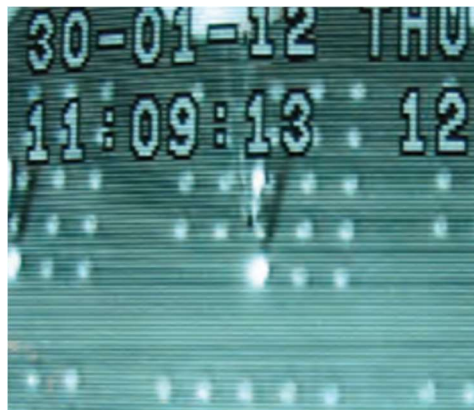
Na DCINML, I.P., o saco devidamente selado, foi colocado na câmara refrigeradora por _____ (assinatura).
Data: _____/_____/_____ Hora: _____h _____m

No STF, o saco devidamente selado, foi entregue por _____ (assinatura) e recebido por _____ (assinatura).
Data: _____/_____/_____ Hora: _____h _____m

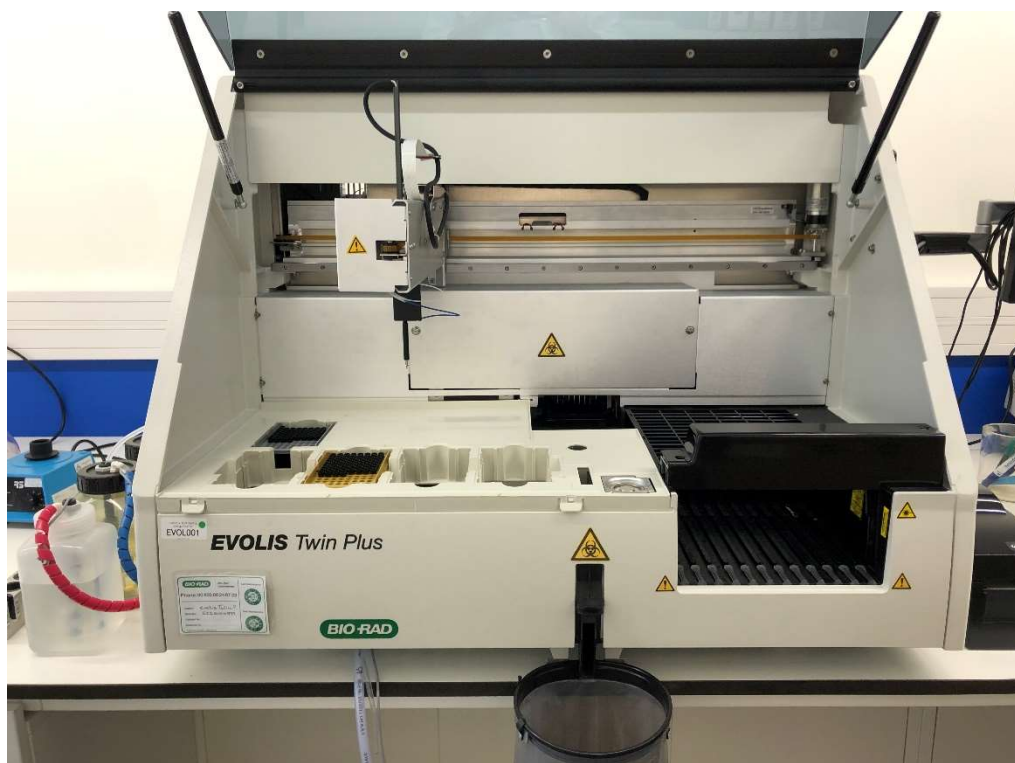
Anexo 4 – Biochip de 9x9 mm³⁷.



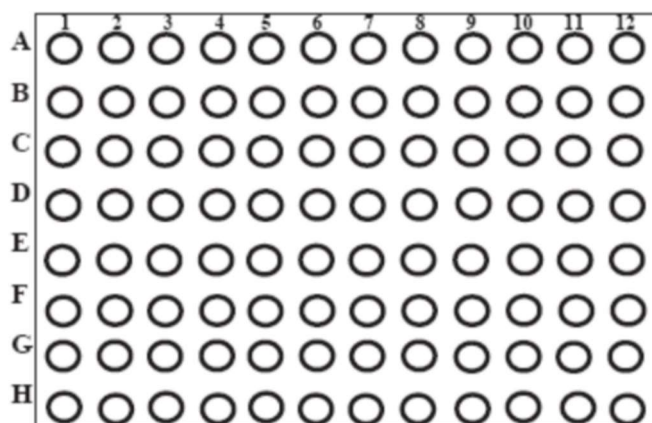
Anexo 5 – CCD a capturar a imagem de cada Biochip³⁷.



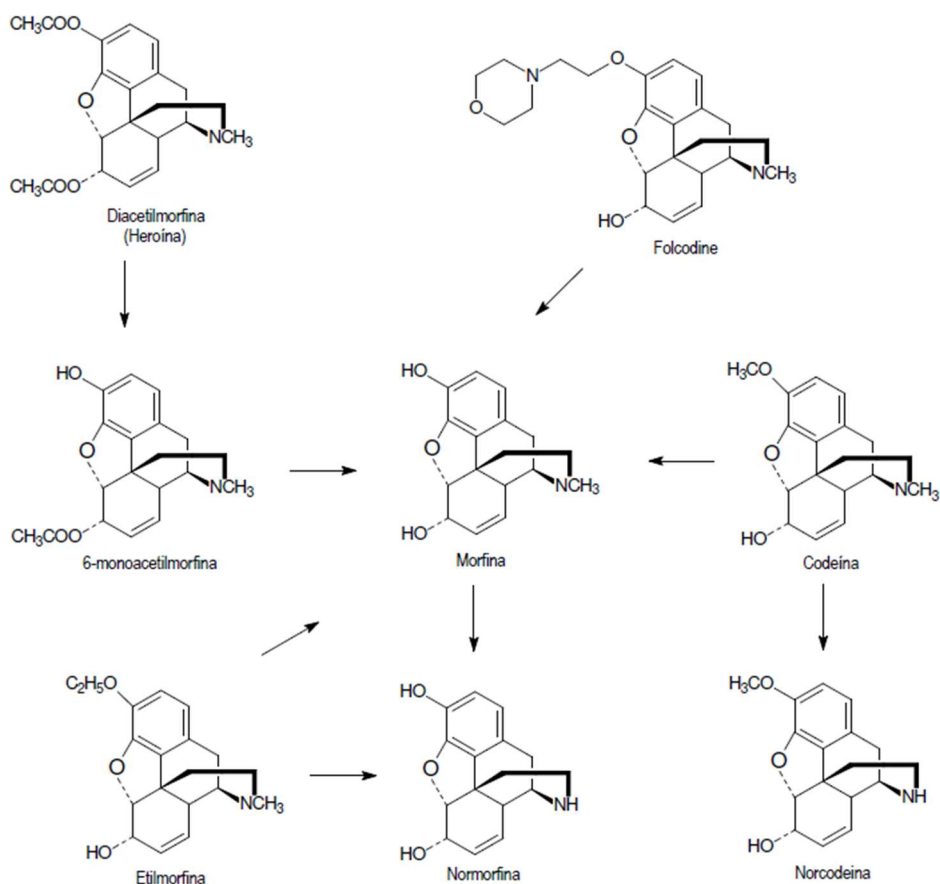
Anexo 6 – EVOLIS™ TWIN PLUS SYSTEM.



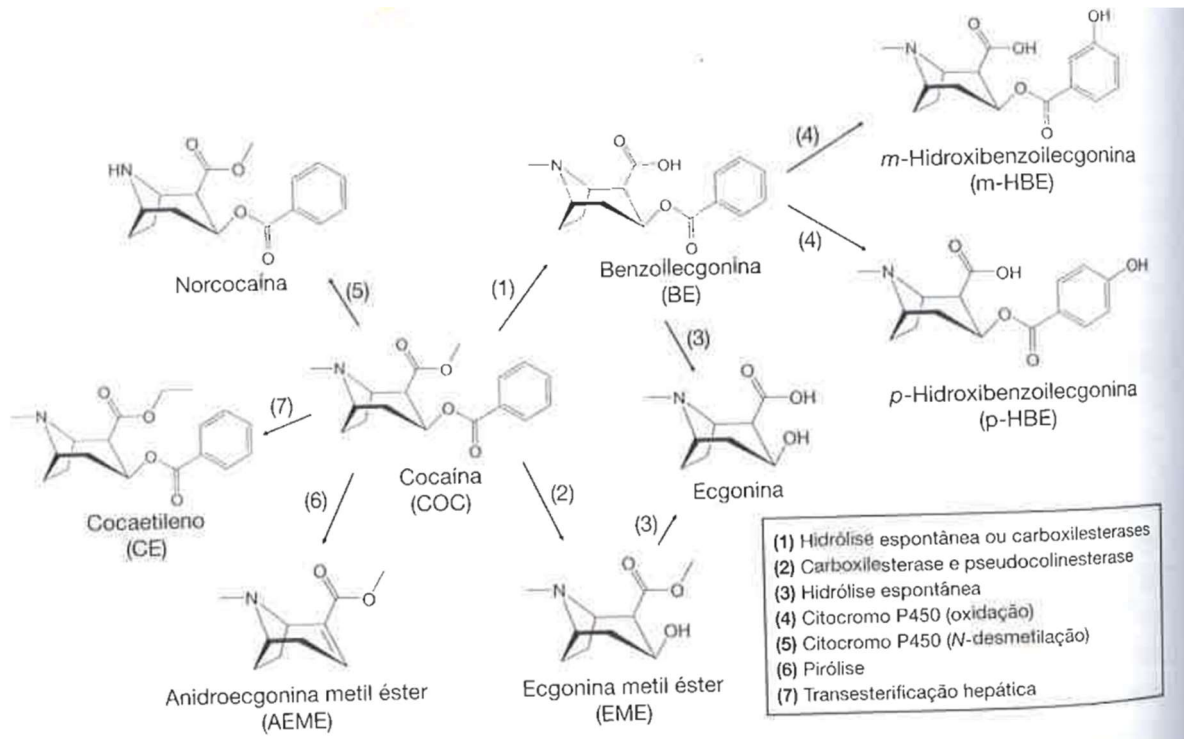
Anexo 7 – Desenho de uma placa de poliestireno para a realização do ELISA³⁹.



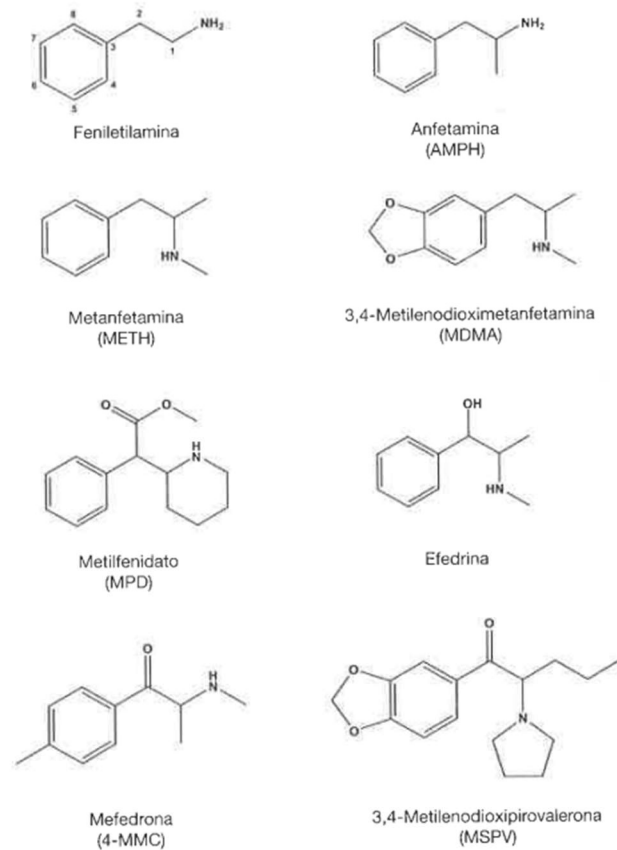
Anexo 8 – Morfina e seus derivados³⁹.



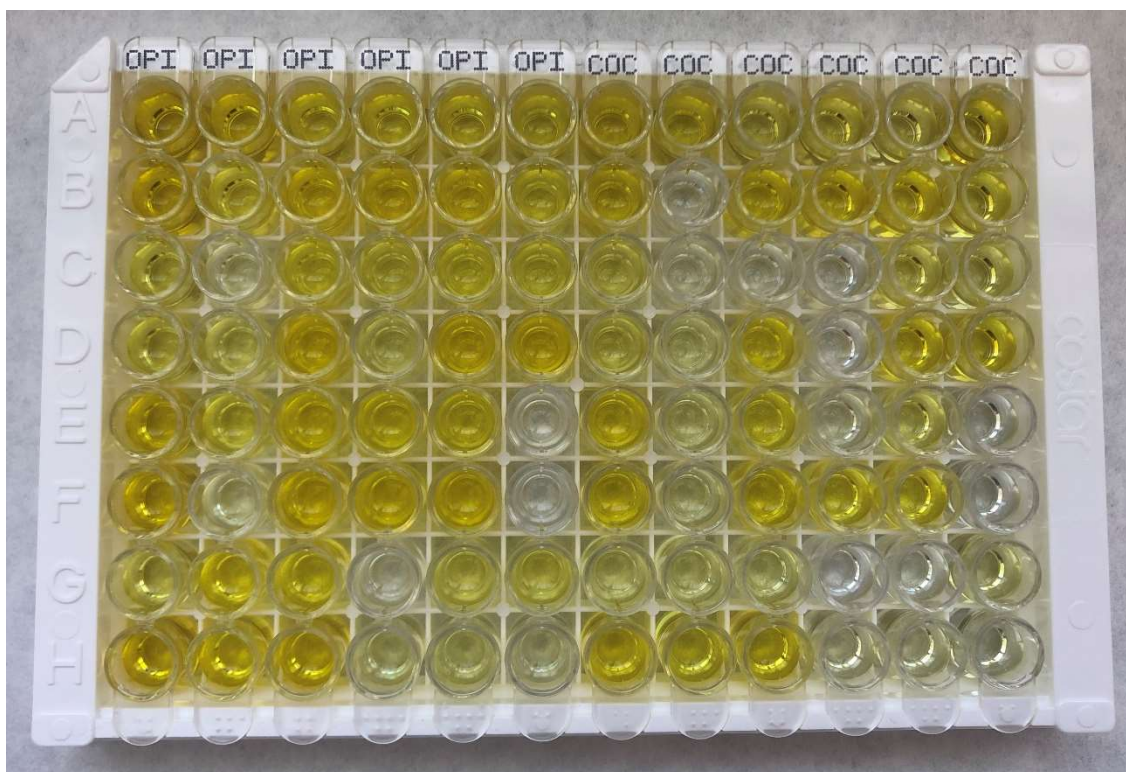
Anexo 9 – Biotransformação da cocaína³⁴.



Anexo 10 – Anfetaminas e derivados³⁴.



Anexo II – Microplaca com resultados já adquiridos.



Anexo I2 – Resultados do EVOLIS.

Plate ID: XXXXXXXXXX Time: 2:47:29 PM OVER limit: 3.500
 Operator: admin Date: 7/7/2023 Wavelengths: 450nm/620nm
 Assay: C:\BioRad\2PS\Resources\Apf1.Opiaceos.asy (9fcd)

WARNING! This plate has been stored in a heated incubator (37.01 °C) after reading. Do not re-read!

Expected Kit Components:
 1.Opiaceos 6701799 240228
 Neg Ctrl
 Conjugado opiaceos
 Cut off opiaceos
 SUBSTRATO
 STOP
 DEST. WATER

Qualitative Results

If 'Y>=1.15*CO' Then Result:='-'
 If 'CO*0.85<=Y<CO*1.15' Then Result:='+/-'
 If 'Y<CO*0.85' Then Result:='-'
 Default result := *****

+ Indicates a reactive result
 +/- Indicates an equivocal result
 - Indicates a negative result

Combined Report

Opiaceos

Patient ID	#	Well	O.D. Value	Result	O.D. Reader mean	Reader CV
NC1	NC1	A1	2.0940	NC1	2.1435	3.2659
		B1	2.1930	NC1		

Patient ID	#	Well	O.D. Value	Result	O.D. Reader mean	Reader CV
CO1	CO1	C1	0.6750	CO1	0.6855	2.1662
		D1	0.6960	CO1		

Patient ID	#	Well	O.D. Value	Result	O.D. Reader mean	Reader CV
Diluyente	T1	E1	1.8420	-	1.8420	*****
1Branco	T2	F1	2.1550	-	2.1550	*****
Cbaixo	T3	G1	0.5610	+	0.5610	*****
Branco2	T4	H1	2.1550	-	2.1550	*****
XXXXXXXXXX	T5	A2	1.7970	-	1.7970	*****
	T6	B2	0.8440	-	0.8440	*****
	T7	C2	0.1370	+	0.1370	*****
	T8	D2	0.4650	+	0.4650	*****
	T9	E2	0.7890	-	0.7890	*****
	T10	F2	0.1550	+	0.1550	*****
	T11	G2	1.2910	-	1.2910	*****
	T12	H2	1.5090	-	1.5090	*****
	T13	A3	1.1990	-	1.1990	*****
	T14	B3	1.6970	-	1.6970	*****
	T15	C3	0.9430	-	0.9430	*****
	T16	D3	2.0110	-	2.0110	*****
	T17	E3	1.5210	-	1.5210	*****
	T18	F3	2.0470	-	2.0470	*****
	T19	G3	1.2450	-	1.2450	*****
	T20	H3	1.9320	-	1.9320	*****
T21	A4	1.1120	-	1.1120	*****	
T22	B4	1.8200	-	1.8200	*****	
T23	C4	0.6560	+/-	0.6560	*****	
T24	D4	0.4160	+	0.4160	*****	