



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Manuel Moreira Tavares Dos Santos Silva

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Ana Sofia Sousa e da Dra. Suzel Costa e Monografia intitulada “Ciências Forenses: Limitações do DNA e Procura de Novos Gold Standard “sob a orientação do Professor Doutor Saul Campos Pereira Costa, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023

1 2 9 0



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Manuel Moreira Tavares Dos Santos Silva

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Ana Sofia Sousa e da Dra. Suzel Costa e Monografia intitulada “Ciências Forenses: Limitações do DNA e Procura de Novos Gold Standard” sob a orientação do Professor Doutor Saul Campos Pereira Costa, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2023

Eu, Manuel Moreira Tavares Dos Santos Silva, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas com o n.º 2018290398, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Ciências Forenses: Limitações do DNA e Procura de Novos Gold Standard” apresentado 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, 4 de setembro de 2023.

Manuel Moreira Tavares Dos Santos Silva

(Manuel Moreira Tavares Dos Santos Silva)

Agradecimentos

À minha família, pela confiança e apoio incondicional ao longo deste percurso, além do acompanhamento nos vários desafios.

Ao meu orientador, Professor Doutor Saul Campos Pereira Costa, pelo seu interesse e atenção ao longo da realização da presente monografia.

A toda a equipa da Farmácia Gaspar, pela transmissão de conhecimentos, em especial à Dra. Ana Sofia Sousa pela disposição e ajuda.

A toda a equipa do Serviço de Química e Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, pelo esforço incomparável na minha aprendizagem. Agradeço em destaque, à Dra. Suzel Costa pela oportunidade e dedicação dada nos últimos meses.

A todos aqueles que durante estes últimos anos foram amigos inesquecíveis, o meu agradecimento.

Índice

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Abreviaturas.....	8
1. Introdução.....	9
2. Farmácia Gaspar	9
3. Análise SWOT	10
3.1. Forças	10
3.1.1. Reuniões <i>Kaizen</i>	10
3.1.2. <i>Marketing</i>	11
3.1.3. Proximidade ao Cliente	11
3.1.4. Organização do <i>Stock</i>	11
3.2. Fraquezas	11
3.2.1. Equipa Reduzida.....	11
3.2.2. Plano de Estágio.....	12
3.3. Oportunidades	12
3.3.1. Localização	12
3.3.2. Prestação de Serviços.....	12
3.3.2.1. MAPA.....	12
3.3.2.2. PIM	13
3.3.3. Sistema Informático	13
3.4. Ameaças.....	13
3.4.1. Parafarmácias e Vendas <i>Online</i>	13
3.4.2. Vendas Sem Receita.....	14
3.4.3. Medicamentos Esgotados	14
4. Casos Práticos.....	14
5. Considerações Finais.....	18
Bibliografia	19

Parte II – Relatório de Estágio em Química e Toxicologia Forense

Abreviaturas.....	22
1. Introdução.....	24
2. INMLCF – SQTF	24
2.1. Contextualização	24
2.2. Estruturação e Descrição do Estágio	26
3. Análise SWOT	30
3.1. Forças	30
3.1.1. Familiarização de Conteúdos.....	30
3.1.2. SG	31
3.2. Fraquezas	31
3.2.1. Equipa Reduzida.....	31
3.2.2. A Transição para o Digital.....	32
3.3. Ameaças.....	32
3.3.1. Rotatividade com periodicidade alargada.....	32
3.3.2. Manutenção de Equipamento	32

3.4. Oportunidades	33
3.4.1. LC-MS	33
3.4.2. Setores do SQTf e Serviço de Genética e Biologia Forense (SGBF).....	33
3.4.3. Ensaio Interlaboratoriais	33
3.4.4. Metodologia Prática	33
4. Considerações Finais	34
Bibliografia	35
Parte III – Monografia "Ciências Forenses: Limitações do DNA e Procura de Novos Gold Standard"	
Abreviaturas.....	37
Resumo	39
Abstract	40
1. Introdução.....	41
2. Provas Forenses.....	41
3. DNA.....	43
3.1. Revolução Científica.....	43
3.2. Genoma Humano	43
3.3. Impressão Digital	45
3.3.1. Contextualização na Área Forense	45
3.3.2. Metodologia.....	46
3.3.3. Entidades Jurídicas e Interpretação de Provas.....	47
3.3.4. Mistura e Degradação de DNA	48
3.3.5. Análise Estatística	49
3.3.5.1. Dados e Estudos	49
3.3.5.2. GTP.....	50
3.2.6. MPS	51
4. Novas Técnicas de Aplicação Forense	53
4.1. Proteómica Forense.....	53
4.1.1. Espectrometria de Massa Proteómica	54
4.1.1.1. HPLC	54
4.1.1.2. ESI.....	54
4.1.1.3. MS com detetor otimizado.....	54
4.1.1.4. PSM.....	55
4.1.1.5. <i>Shotgun</i> Proteómica	55
4.1.2. Principais Aplicações.....	56
4.1.2.1. Ossos.....	56
4.1.2.2. Identificação proteica de fluido e tecido corporal.....	57
4.2. Comunidade Microbiana	57
4.2.1. Aplicações	58
4.2.1.1. Identificação do Suspeito.....	58
4.2.1.2. Estudos do Projeto do Microbioma Humano	58
4.2.1.3. Origem da Amostra	59
4.2.1.4. Microbioma Ambiental	60
4.2.1.5. Abusos Sexuais	60
4.2.1.6. Métodos de Análise do Metagenoma	60

4.2.1.6.1. Análise de fusão de alta resolução (HRM).....	60
4.2.1.6.2. <i>Shotgun</i> acoplado a hidSkinPlex®	61
4.2.1.6.3. Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR)	61
4.2.1.7. IPM	62
4.2.1.8. Localização Geográfica	62
4.2.2. DNA VS Microbioma	63
5. Conclusão e Considerações Finais.....	63
Bibliografia	66

PARTE I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

FARMÁCIA GASPAR

Sob orientação da Dra. Ana Sofia Sousa

Abreviaturas

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

BCC - Bloqueadores dos Canais de Cálcio

COE - Contracetivo Oral de Emergência

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

FC - Farmácia Comunitária

FG - Farmácia Gaspar

IECA - Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina

MAPA - Monitorização Ambulatória da Pressão Arterial

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM - Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM - Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

OTC - *Over The Counter*

PIM - Preparação Individualizada da Medicação

SA - Substância Ativa

SNS - Serviço Nacional da Saúde

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. Introdução

O relatório proposto foi redigido no âmbito do Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), durante o período de 9 de janeiro a 28 de abril de 2023 na Farmácia Gaspar (FG), sob a orientação da Dra. Ana Sofia Sousa e completando 670 horas. A Farmácia Comunitária (FC), devido à sua proximidade com a população, desempenha um contributo fundamental como uma das principais entradas para o Sistema de Saúde, daí revelar-se fulcral para a aprendizagem do estudante, inserção no mundo profissional da FC e compreender o papel do farmacêutico. Na FC são realizadas atividades direcionadas para os medicamentos e os produtos de saúde, bem como atividades dirigidas aos utentes. Cabe ao farmacêutico aplicar o seu conhecimento teórico e teórico-prático previamente adquirido, de forma ética, competente, eficaz, autónoma e responsável.

O objetivo do presente relatório de estágio destina-se a descrever os conhecimentos retidos, as tarefas realizadas, os desafios enfrentados e descrever alguns casos práticos experienciados durante o estágio curricular que destacaram o meu percurso na FG. A avaliação do estágio estrutura-se em Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats - SWOT*), dividido por aspetos positivos (Forças e Oportunidades) e negativos (Fraquezas e Ameaças)

2. Farmácia Gaspar

A FG localiza-se na Rua Carlos Seixas, n.º102, Coimbra, Portugal. Próxima do Vale das Flores, do Coimbra Shopping e do bairro Norton de Matos, a FG interage sensivelmente com estas zonas da cidade de Coimbra, moradores da rua da FG e vizinhança. A diretora técnica é a Dra. Ana Filipa Couto, responsável por dirigir, coordenar e planear todas as atividades da FG. A farmácia possui dois gabinetes, entrada, balcões e zona de atendimento, onde se encontram alguns produtos *Over The Counter* (OTC), casa de banho, espaço comum do *backoffice*, onde são guardados os Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM), dispositivos médicos e os excessos dos OTCs. O horário de funcionamento da farmácia é das 8:30 às 20:30 horas, de segunda a sábado, efetuando serviço permanente de 20 em 20 dias, definido pela Administração Regional de Saúde do Centro, I.P. (ARSC). Além do mais, esta farmácia de oficina trabalha, maioritariamente, com os fornecedores diários Alliance Healthcare, S.A., Empifarma, Plural – Cooperativa Farmacêutica, CRL, Botelho & Rodrigues, LDA e pontualmente com encomendas diretas aos laboratórios, como por exemplo os produtos de cosmética.

A nível de plano de estágio, a cada estagiário é associado um orientador que se encontra responsável pela sua aprendizagem, correspondendo no meu caso à orientadora do estágio curricular. Apesar de não ter um protocolo de estágio escrito, foi objetivo do estágio aprender primeiramente como funciona a farmácia por de trás do balcão, nomeadamente na receção de encomendas, arrumação das mesmas, devoluções, entregas ao domicílio e atendimento telefónico, entre outras atividades típicas de *backoffice*. Mais tarde, numa fase posterior quando o estagiário se encontra preparado, o estagiário avança para o atendimento ao balcão. Este sistema apresenta ao estagiário a oportunidade de se familiarizar com os métodos de funcionamento da farmácia, como por exemplo a disposição dos medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), dos MNSRM, mas de venda exclusiva em farmácia e dos MSRM, o *software* de computador SIFARMA®, através das atividades de *backoffice* efetuadas neste programa e observação do atendimento sem intervenção do estagiário.

3. Análise SWOT

No seguinte esquema, resumiram-se os aspetos destacados na Análise SWOT.

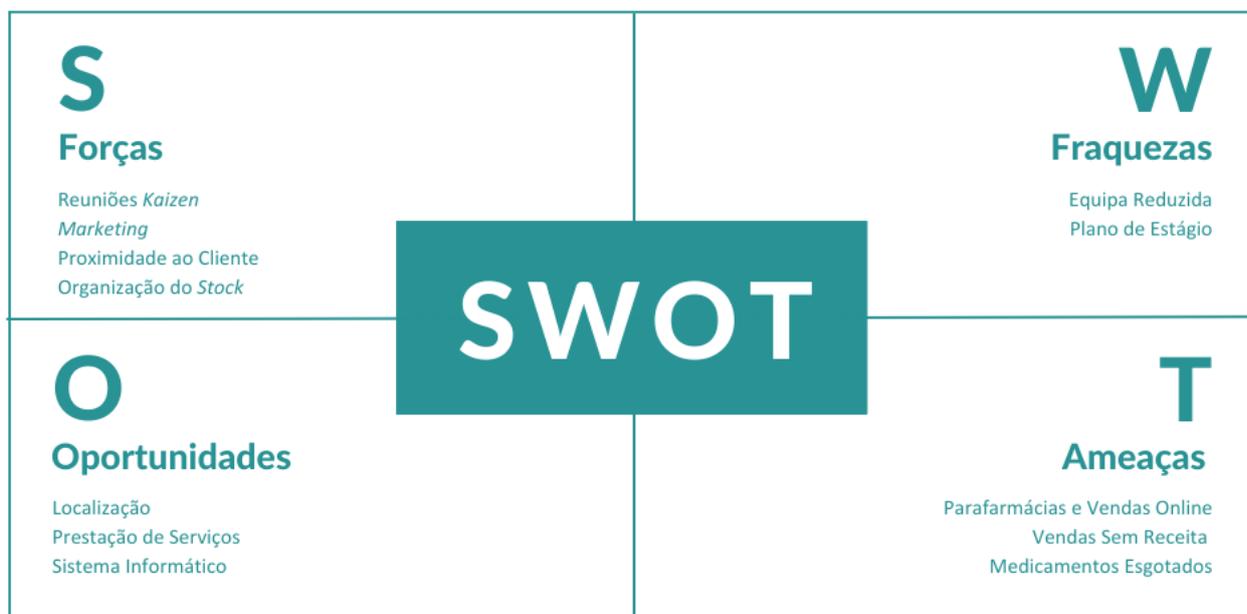


Figura I - Diagrama da análise SWOT referente ao estágio na FG

3.1. Forças

3.1.1. Reuniões Kaizen

A palavra japonesa *kaizen* semanticamente significa mudar(kai) para melhor(zen) e filosoficamente expressa-se de acordo com o lema “Hoje melhor do que ontem, amanhã melhor do que hoje”. A ideologia nasceu no Japão depois da II Guerra Mundial, de modo a

reerguer a economia. A sua evolução dinamizou o mundo como o pilar do sucesso para a gestão de qualquer negócio, não surpreendendo que este método esteja a ganhar popularidade na FC. Na FG as reuniões semanais de equipa regem-se pelos princípios *kaizen* de organização, produtividade, eficiência operacional e melhoria contínua. O objetivo das reuniões é discutir problemas, procurar soluções, ouvir opiniões, definir metas, analisar o progresso das vendas, com o propósito de melhorar o rendimento e a qualidade do atendimento. Este ambiente de crítica construtiva e de evolução é claramente um bom modelo a seguir^{1;2}.

3.1.2. Marketing

No âmbito das atividades da FC, a vertente de comunicação e *marketing* mereceu destaque em várias reuniões *kaizen*, convergindo-se na importância da discussão de ideias sobre a promoção de eventos, comemoração de feriados e festividades, através de decorações alusivas aos mesmos ou de uma interação nas redes sociais da farmácia, a fim de aumentar a afluência da FG.

3.1.3. Proximidade ao Cliente

Ao contrário das grandes farmácias, as farmácias de bairro procuram manter a fidelidade dos seus utentes, conhecendo o seu nome e estilo de vida. Esta afinidade com utente possibilita assegurar a sua confiança e fidelização. Avalio de forma positiva esta experiência porque pude adquirir e melhorar competências sociais no contacto com os utentes.

3.1.4. Organização do Stock

O sucesso de uma farmácia é regido pela sua eficiência e, aplicando a metodologia *kaizen*, conclui-se que a organização dos produtos de uma farmácia é um fator crucial de eficiência. A organização do *stock* prossegue-se pela regra *first expired, first out*, uma medida que prioriza a saída da farmácia de produtos por ordem de validade a expirar, unido à exposição dos artigos, de modo a atrair o cliente e facilitar o acesso do farmacêutico aos mesmos.

3.2. Fraquezas

3.2.1. Equipa Reduzida

A FG possui um número reduzido de colaboradores. Em situações de férias e de baixas, por exemplo por doença, a carga de trabalho é extenuante, dificultando a rotina na farmácia.

3.2.2. Plano de Estágio

A reduzida oportunidade dada ao estagiário para atendimento de forma independente impactou negativamente o percurso do estágio. A gestão de atividades do estagiário é maioritariamente realizada pela orientadora, tal como o atendimento. Em situações de falta de colaboradores, a atenção da orientadora de estágio centrou-se essencialmente no pedido de encomendas, penalizando a minha aprendizagem. Para futuros períodos de estágio constituiria uma substancial melhoria ter toda a equipa mais disponível para acompanhar o estagiário, não havendo um foco tão direcionado num único orientador.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Localização

A proximidade ao centro de saúde comunitário Norton de Matos favorece a FG, promovendo a sua atividade. Num atendimento ao balcão um utente da farmácia que requer apoio complementar de serviços médicos pode ser direcionado ao centro de saúde e o mesmo pode acontecer em sentido inverso.

3.3.2. Prestação de Serviços

Os serviços da FG incluem a medição de pressão arterial, glicémia, colesterol e uricemia e sessões de podologia, fisioterapia e nutrição EasySlim[®], Preparação Individualizada da Medicação (PIM) e Monitorização Ambulatória da Pressão Arterial (MAPA). Os serviços mencionados são atividades relevantes associadas à proximidade ao cliente, na qual considere o PIM e o MAPA particularmente importantes no meu estágio na FG.

3.3.2.1. MAPA

A MAPA destina-se a medir a pressão arterial do utente de hora a hora durante um período de 48 horas. Esta ferramenta para além de garantir uma medição mais rigorosa da tensão arterial, permite avaliar possíveis riscos para a saúde no quotidiano do doente, mais concretamente o estudo do tratamento anti-hipertensivo e respetivos sintomas, suspeitas de hipertensão arterial da “bata branca” (pressão arterial elevada apenas no consultório) e normotensão da “bata branca” (pressão arterial normal no consultório e elevada fora deste)³; ⁴. Para a farmácia é uma oportunidade de fidelizar o utente, através de um cuidado mais personalizado do mesmo.

3.3.2.2. PIM

A PIM é um serviço que integra a organização de formas farmacêuticas sólidas, soluções orais e selos transdérmicos para a sua administração consoante a posologia prescrita. A sua estrutura enquadra múltiplos compartimentos posteriormente selados por estanque na farmácia. O facto de a medicação ser preparada semanalmente por um farmacêutico assegura a sua qualidade e segurança, além de facilitar a identificação das tomas e do transporte. A tarefa referida, embora seja um trabalho que acarreta uma responsabilidade suplementar à FG, simplifica o processo da toma terapêutica do utente, por vezes debilitado e polimedicado. Os benefícios da PIM na redução do esquecimento ou de consumo incorreto da medicação, melhor organização, controlo de doenças crónicas e comunicação entre o farmacêutico, utente e outros profissionais de saúde promovem um serviço mais interveniente e específico que permite um acompanhamento aprimorado do utente, inclusive na revisão e identificação de interações relacionadas à medicação.

3.3.3. Sistema Informático

O SIFARMA[®] é um software de gestão desenvolvido pela Glintt - Global Intelligent Technologies amplamente implementado na FC. Na FG, grande parte das tarefas de atendimento e receção de encomendas que realizei foram praticadas no *software* SIFARMA[®] atualizado, mais concretamente nos novos módulos de atendimento e encomendas. No domínio mais recente da plataforma SIFARMA[®], o último módulo mencionado, em comparação a outras FCs, é relativamente pouco reconhecido no panorama atual da FC, sendo um ponto diferenciador do meu estágio curricular.

3.4. Ameaças

3.4.1. Parafarmácias e Vendas Online

O progresso de vendas *online* por meio de plataformas digitais e a emersão de parafarmácias são meios de saúde cada vez mais populares. Os benefícios associados a preços mais baixos e melhor acessibilidade aos MNSRM e outros produtos ligados à saúde são mais atraentes em relação à FC. A vertente empreendedora da FC é afetada, pois parte dos lucros de uma FC provem dos artigos mencionados acima, onde a margem de lucro é, na maioria das vezes, flexível. Afora este assunto, a FC emprega uma missão de informar o utente sobre os aspetos do produto, saúde e outras dúvidas que possam surgir no desenrolar do atendimento, díspar das plataformas de saúde destacadas.

3.4.2. Vendas Sem Receita

No decorrer de um atendimento, de vez em quando, ouve-se o utente afirmar “na outra farmácia davam-me sem receita” ou outra frase semelhante, procurando pressionar o farmacêutico. No entanto, uma farmácia, antes da sua vertente comercial, é um estabelecimento de saúde e deve ter essa diretriz profissional como primordial. O crescimento exponencial do marketing farmacêutico deve progredir concomitantemente com a ética profissional farmacêutica e conciliar a satisfação do cliente com estes valores, como decorre da sua função principal de serviço de saúde. Esse equilíbrio é um desafio que um bom farmacêutico deve gerir e que exige a perseverança dos colaboradores da FG de modo a cumprir o seu dever profissional e ético, onde a influência negativa de outras FC impacta consideravelmente a relação com os utentes.

3.4.3. Medicamentos Esgotados

Corolário da recente pandemia e do período de guerra atual, episódios de uma extensa quebra de *stock* na FC revelaram-se uma preocupação predominante do utente. Situações extremas como pandemias e guerras alteram drasticamente fatores sociais, políticos e económicos. A inflação e o aumento do custo das matérias-primas adjacentes a esses fatores aumentam o custo de produção do medicamento que limita a sua aquisição. A preocupação do utente sobre estes assuntos gera receio de falha de *stock* da sua medicação causando a alteração da sua frequência na compra de medicamentos e procura de alternativas. De facto, um efeito “bola de neve”, no qual o receio de falta de *stock* de um género de produto ou marca impulsiona a aquisição de bens de forma alarmada que, apesar dos limites impostos de unidades adquiridas, continua a contribuir para o seu défice.

4. Casos Práticos

Caso I

Utente masculino de 60 anos entra na farmácia com uma criança de 7 anos, referindo que o seu filho apresenta tosse persistente e, portanto, solicita um xarope para resolver a situação. Perante o caso apresentado questionei se tinha tosse seca ou produtiva, se apresentava dor de garganta, cefaleias ou febre, a duração da presente tosse e, também, o peso do menor. O utente declarou tratar-se de uma criança de cerca de 30kg, não observar expetoração ou similar, que a tosse surgiu há dois dias, expressou haver uma leve dor de garganta e negou outros sintomas associados. Posteriormente, inquiri se a criança apresentava

antecedentes patológicos nomeadamente diabetes ou asma, tendo o pai negado. Através do questionário anterior, pude concluir que a tosse era seca e irritativa, não associada a crises de asma. Em seguimento, dispensei Levotuss[®], um antitússico de ação periférica próprio para o tratamento da tosse seca e irritativa com princípio ativo levodropropizina, na posologia de 5ml de xarope três vezes ao dia⁵. Mais aconselhei que a duração da terapêutica fosse de 3 a 5 dias e após esse período deveria consultar o médico se não houvesse melhoria ou ocorresse agravamento dos sintomas. Aliado à medicação, sugeri a prática de medidas não farmacológicas, tais como consumo de líquidos para promover a hidratação e de bebidas quentes como chá de camomila com limão e mel para um efeito anti-inflamatório e lubrificante da garganta, aliviadores da irritação.

Os pontos abordados na segunda pergunta são pertinentes porque a tosse no contexto de asma ou Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) requer adequada avaliação e tratamento destas doenças. Por outro lado, sendo a sacarose um dos excipientes da formulação do xarope Levotuss[®] será desaconselhável a sua utilização em doentes com *Diabete Mellitus*, devendo recorrer-se em alternativa a medicação sem açúcares⁵.

Caso 2

Mulher de 63 anos chegou à farmácia e comunicou que não se sentia bem. Ofereci-lhe uma cadeira para se sentar. No desenrolar da situação decidi medir a pressão arterial da senhora, estando com os valores de 160/100mmHg, apesar de se tratar de uma utente hipertensa medicada. Segundo as *Guidelines* de Hipertensão Arterial de 2018 da Sociedade Europeia de Hipertensão/Sociedade Europeia de Cardiologia, a utente apresenta valores no limiar do grau 2 de hipertensão⁴, sugerindo uma hipertensão não controlada.

Alertado por estes valores altos aconselhei que a utente contactasse o seu médico. Passado uma semana a família da utente entrou em contacto com a FG e constatou-se que andava a esquecer-se de tomar a medicação para a pressão arterial, Coveram[®] de dosagem 10mg + 5mg de comprimidos de perindopril arginina (Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina - IECA) e besilato de amlodipina (Bloqueadores dos Canais de Cálcio - BCC), respetivamente⁶. Além do mais, verificou-se, mais tarde, a troca de Coveram[®] pela prescrição anterior Coversyl[®] 10mg de comprimidos revestidos por película de Substância Ativa (SA) perindopril arginina, um IECA⁷. Para esclarecer o assunto, a senhora fez uma consulta com o seu médico e chegou-se à conclusão que tinha indícios de Alzheimer, explicando a confusão

na toma de medicamentos e as alterações de memória. De modo a evitar recorrências, a farmácia passou a estar responsável pela PIM.

Caso 3

Utente do género feminino de 31 anos vai à farmácia com um bebé no carrinho e pede um comprimido anti-histamínico para aliviar o pingo do nariz. De modo a confirmar a origem da rinorreia da senhora pergunto se apresenta secreções nasais líquidas de cor ténue. Após um retorno positivo, declarou tratar-se de uma alergia sazonal e sucessivamente interroguei se apresentava dores de cabeça, congestão nasal ou tosse, tendo negado esses sintomas. Perante a situação, questiono se amamenta e, tendo-o confirmado, questiono se o bebé tem uma alimentação praticamente exclusiva de leite materno. A senhora afirma que o bebé tem 7 meses e, por essa razão, faz já uma alimentação variada complementar ao leite materno.

No aconselhamento, visto corresponder a uma rinorreia alérgica, indiquei a Cetirizina Aurobindo® 10mg de comprimidos revestidos por película, um anti-histamínico HI não sedativo. A posologia proposta à utente foi um comprimido por dia até 5 a 7 dias⁸. No caso de mulher a amamentar, os fármacos de primeira escolha são os anti-histamínicos de segunda geração, como a cetirizina. Apesar da informação publicada ser limitada, este composto demonstra uma excreção no leite materno relativamente reduzida, um perfil de efeitos adversos aprimorado e uma vasta experiência de administração durante a amamentação, tendo sempre em conta uma dispensa ponderada. Portanto, nas doses terapêuticas normais, que neste caso são reduzidas (10mg/dia), é improvável que os anti-histamínicos afetem a produção de leite materno e, aliado a uma alimentação diversificada e ao peso considerável de um bebé de 7 meses, a segurança na administração da Cetirizina Aurobindo® é substancial⁹.

Caso 4

Uma jovem de 21 anos aproximou-se do balcão afirmando ter tido relações sexuais no dia anterior e que gostaria de adquirir a pílula do dia seguinte. No decorrer da entrevista foi estabelecido que a pílula Azalia® (Desogestrel 0,075mg) era a única medicação que tomava, mas, no entanto, estava incerta de ter efetuado a última toma e que o ato sexual tinha decorrido, aproximadamente, há 3 dias (72h) atrás, ausente de qualquer meio contraceptivo de barreira. Inclusive, a utente afirmou que o seu ciclo menstrual é regular e estar no 14º dia do mesmo na altura da atividade sexual de risco, além de negar possuir algum problema de saúde como tabagismo, trombozes e problemas cardiovasculares e ser a primeira vez a pedir o Contraceptivo Oral de Emergência (COE). Diante de um risco considerável de gravidez

indesejada, o mais indicado é um COE. Em Portugal, existem dois mecanismos COE acessíveis na FC, o comprimido contendo 1,5mg de Levonorgestrel na forma farmacêutica de comprimido e o comprimido de SA de Acetato de Ulipristal na dosagem de 30mg. O Acetato de Ulipristal atua na fase pré-ovulatória precoce e tardia por meio do bloqueio temporário da ovulação, abrangendo em média 5 dias. Já o Levonorgestrel somente atua na fase precoce, compreendendo em média 3 dias¹⁰. Face à incerteza observada no testemunho da utente, recomendei a opção mais segura de Acetato de Ulipristal (EllaOne[®]) indicado até 120 horas (5 dias)¹¹. Além do mais, notifiquei a utente que nas 3 horas seguintes à ingestão do comprimido único, no caso de vômito, se torna necessário tomar outro comprimido e, também, informei sobre a eventualidade de atraso ou adiantamento da menstruação, ocasionalmente, associado à medicação. Adicionalmente, dado que o método contraceptivo oral habitual não apresenta a SA levonorgestrel possivelmente redutora da eficácia do COE, indiquei que poderia continuar o consumo de Azalia[®] concomitante a métodos barreira até à próxima menstruação, e, assim que a menstruação ocorresse, a utente poderia utilizar singularmente a pílula^{10; 11}.

Caso 5

Senhor de 55 anos vem à farmácia e queixa-se de uma dor moderada no estômago, sensação de estômago pesado e diarreia ligeira. Mediante estes sintomas, aferi se o utente tinha vômitos, fezes negras e febre e, além disso, se estes sintomas eram recorrentes. Resultante da interação farmacêutico/utente, pude determinar não serem estes últimos sintomas habituais e estar omisso de indícios fortes de outras complicações como gastroenterite, intoxicação alimentar, gastrite, refluxo gástrico, úlcera no estômago, entre outros. Face ao problema representado de dispepsia e possível disbiose intestinal, recomendei um dispositivo médico, o NeoBianacid[®] Acidez e Refluxo, um a três comprimidos por dia, para tomar depois das refeições e uma cápsula por dia, durante pelo menos um mês, do suplemento probiótico Symbiosys Alflorex[®] ^{12; 13}.

O NeoBianacid[®] Acidez e Refluxo é um dispositivo médico à base de complexos moleculares vegetais e minerais que forma uma película protetora da mucosa. Esta barreira é constituída pelo Poliprotect, um complexo molecular com propriedades mucoadesivas. A molécula inovadora mimetiza o efeito protetor do muco fisiológico protegendo do contacto de sucos gástricos e de substâncias irritantes¹³. Além do NeoBianacid[®] para gerir o desconforto do estômago e auxiliar na dispepsia, o suplemento alimentar contém probióticos que são microrganismos vivos que ajudam na digestão e protegem o organismo contra as

bactérias nocivas, nomeadamente promoção do trânsito intestinal regular, prevenção e tratamento da diarreia e da prisão de ventre. O suplemento Symbiosys Alflorex® apresenta várias células bacterianas, inclusive do género *Bifidobacterium*, um probiótico típico na suplementação alimentar intestinal^{12; 14}.

Por fim, salientei o consumo de alimentos mais leves e baixos em gorduras para facilitar a digestão no estômago e, ainda, se confrontado com o agravamento dos sintomas atuais ou desenvolvimento dos outros sintomas já mencionados, deveria consultar um médico.

5. Considerações Finais

Atualmente, o espectro de atividades exercidas pela FC é, efetivamente, muito amplo. As competências técnico-científicas obtidas e tarefas cumpridas na vigência do estágio demonstram a importância do papel do farmacêutico para o nosso Serviço Nacional da Saúde (SNS) na acessibilidade ao medicamento e equidade na prestação de cuidados de saúde. A FC é deveras um meio de saúde alargado que confere um contacto com os utentes singular, aliviando a sobrecarga existente no SNS, através da abordagem de transtornos de saúde de menor gravidade, reforço da literacia em saúde e compreensão do sistema de saúde numa configuração mais personalizada e próxima.

A minha experiência na FG permitiu aprofundar competências profissionais de comunicação e de interação com os utentes, bem como desenvolver aptidões de organização e pensamento crítico durante as várias componentes de trabalho do *backoffice*, especialmente em contexto de atendimento. O trabalho dinâmico na FG inclui várias vertentes de saúde para prevenir e tratar doenças, com intervenção mínima de outros serviços de saúde e, por conseguinte, expandiu o meu domínio de *multitasking* e versatilidade para aprender e implementar de forma correta os vários serviços inseridos na FG. São estes importantes fatores da minha realização e desenvolvimento pessoal, enquanto futuro profissional de saúde.

Bibliografia

1. REVISTA SAÚDA - **Kaizen**. 2016. [Acedido a 20 de maio de 2023]. Disponível na Internet: <https://www.revistasauda.pt/noticias/Pages/Kaizen.aspx>.
2. Kaizen Institute™ - **O que é KAIZEN™**. [Acedido a 20 de maio 2023]. Disponível na Internet: <https://pt.kaizen.com/o-que-e-kaizen>.
3. CUF - **MAPA - Monitorização Ambulatória da Pressão Arterial**. [Acedido a 30 de maio 2023]. Disponível na Internet: <https://www.cuf.pt/marcacoes/exames/cardiologia-mapa-monitorizacao-ambulatoria-da-pressao-arterial>.
4. STERGIOU, George S. *et al.* - 2021 European Society of Hypertension practice guidelines for office and out-of-office blood pressure measurement. **Journal of hypertension**. ISSN 1473-5598. 39:7 (2021) 1293–1302. doi: 10.1097/HJH.0000000000002843.
5. Infarmed - **RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO: Levotuss® 6 mg/ml xarope**. 2022. [Acedido a 30 de junho 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>.
6. Infarmed - **RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO: Coveram® 10 mg/ 5 mg comprimidos**. 2022. [Acedido a 23 de junho 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>.
7. Infarmed - **RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO: Coversyl® 10 mg comprimido revestido por película**. 2021. [Acedido a 23 de junho 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>.
8. Infarmed - **RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO: Cetirizina Aurobindo® 10 mg comprimidos revestidos por película**. 2018. [Acedido a 3 de julho 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>.
9. Ordem dos Farmacêuticos - **Quais os anti-histamínicos orais mais adequados durante a amamentação?**. 2022. [Acedido a 3 de julho 2023]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/artigos/quais-os-anti-histaminicos-orais-mais-adequados-durante-a-amamentacao/>.
10. Ordem dos Farmacêuticos - **BOAS PRÁTICAS DE FARMÁCIA COMUNITÁRIA: Norma específica sobre a intervenção farmacêutica na**

Contraceção de Emergência. 2015. [Acedido a 12 de julho 2023]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma_especifica_sobre_a_intervenc_ao_farmaceutica_na_contracecao_de_emergencia_7929677925ab147ce85c39.pdf.

11. Infarmed - **RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO: ellaOne® 30 mg comprimido.** [Acedido a 5 de julho 2023]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>.

12. SYMBIOSYS - **SYMBIOSYS ALFLOREX®.** [Acedido a 22 de julho 2023]. Disponível na Internet: <https://pt.symbiosys.com/symbiosys-alflorex-46225.html>.

13. Infarmed - **Folheto Informativo: NeoBianacid® Acidez e Refluxo - Comprimidos.** COOPROFAR - COOPERATIVA DOS PROPRIETÁRIOS DE FARMÁCIA, C.R.L. [Acedido a 20 de julho 2023]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/pesquisa-dispositivos>.

14. Farmácias Portuguesas - **Prebióticos e Probióticos.** [Acedido a 22 de julho 2023]. Disponível na Internet: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/blog/prebioticos-e-probioticos>.

PARTE II

Relatório de Estágio em Química e Toxicologia Forense

**Serviço de Química e Toxicologia Forense do Instituto
Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses**

Sob orientação da Dra. Suzel Costa

Abreviaturas

AL - Amostra Laboratorial

ANSR - Autoridade Nacional de Segurança Rodoviária

BR - Branco de Reagentes

CQ - Controlo de Qualidade

CQI - Controlo de Qualidade Interna

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EN - *European Norm*

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FID - *Flame Ionization Detector*

GC - *Gas Chromatography*

GNR - Guarda Nacional Republicana

HS - *Headspace*

IEC - International Electrotechnical Commission

INMLCF - Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

IPAC - Instituto Português de Acreditação

ISO - International Organization for Standardization

LC - *Liquid Chromatography*

LD - Limite de Deteção

LQ - Limite de Quantificação

MCX - *Mixed-Mode Cation eXchange*

MICF - Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas

MS - *Mass Spectrometry*

NP - Norma Portuguesa

PE - Procedimento de Ensaio

PI - Padrão Interno

PSP - Polícia de Segurança Pública

S/R - Razão Sinal/Ruído

SG - Sistema de Gestão

SGBF - Serviço de Genética e Biologia Forense

SIM - Monitorização Seletiva dos Fragmentos Iónicos

SNC - Sistema Nervoso Central

SPE - *Solid Phase Extration*

SQTF - Serviço de Química e Toxicologia Forense

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

TE - Toma de Ensaio

TR - Tempo de Retenção

TRR -Tempo de Retenção Relativo

WADA - World Anti-Doping Agency

I. Introdução

O presente relatório expõe e avalia sucintamente as atividades praticadas durante o estágio curricular realizado no Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF) no Serviço de Química e Toxicologia Forense (SQTF) inserido no plano de estudos do Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC). O estágio referido foi orientado pela Dra. Suzel Costa e compreendeu o período 2 de maio a 28 de julho de 2023, com a duração total de 420 horas. A estruturação do documento engloba a apresentação do tema, a contextualização do INMLCF, SQTF, estrutura do estágio e a apreciação do estágio efetuado no modelo Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats - SWOT*) dividido por aspetos positivos (Forças e Oportunidades) e negativos (Fraquezas e Ameaças).

A área das ciências farmacêuticas abrange diversas disciplinas como a toxicologia. Na área das ciências forenses, denominamos de investigação toxicológica o conjunto de processos analíticos que visam o isolamento, identificação e, quando possível, a determinação quantitativa de substâncias tóxicas, tanto no vivo como no cadáver, permitindo assim o diagnóstico da intoxicação e o esclarecimento dos factos. A toxicologia forense, uma ciência multidisciplinar, dispõe de várias aplicações analíticas para pesquisa de inúmeras substâncias químicas diversas tais como medicamentos, pesticidas e drogas de abuso, em diversas matrizes biológicas *post mortem* e *in vivo*, como por exemplo sangue, urina e cabelo. A componente analítica incluída no SQTF é uma oportunidade importante no meu percurso académico como estudante de ciências farmacêuticas, na medida em que a disciplina mencionada exerce e lida com práticas de laboratório e de instrumentação analítica equiparável ao praticado em MICF, incorporando-se adequadamente no meu estágio curricular.

2. INMLCF – SQTF

2.1. Contextualização

O INMLCF, reconhecido como uma instituição de destaque a nível nacional, apresenta o carácter de laboratório do Estado. Esta instituição encontra-se integrada na administração indireta do Estado, dotada de autonomia tanto administrativa quanto financeira, além de possuir um património próprio. A sua missão compreende o desempenho de funções e responsabilidades inseridas no escopo do Ministério da Justiça¹.

Ao Serviço de Química e Toxicologia Forenses compete assegurar, a nível nacional, a realização de perícias e exames laboratoriais químicos e toxicológicos, no âmbito das atividades das delegações

e dos gabinetes médico-legais, bem como a solicitação das autoridades e entidades para o efeito competentes (e.g. Tribunais, Polícia de Segurança Pública - PSP, a Autoridade Nacional de Segurança Rodoviária - ANSR e a Guarda Nacional Republicana – GNR), ou do presidente do conselho diretivo, de acordo com a Portaria n.º 19/2013, de 21 de janeiro².

O SQTF do INMLCF, Delegação Sul, situa-se na Rua Manuel Bento de Sousa 3, 1169-201, Lisboa. O SQTF é constituído pelo serviço administrativo, Controlo de Qualidade (CQ), receção e armazenamento de amostras, setor analítico constituído por quatro equipas laboratoriais e o diretor do serviço, o Dr. João Miguel Franco. Os grupos de trabalho distribuem-se em: (1) triagem de drogas de abuso por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), (2) Confirmação e Quantificação de drogas de ação no Sistema Nervoso Central (SNC) por *Gas Chromatography* (GC) e *Mass Spectrometry* (MS), (3) Triagem, Confirmação e Quantificação de medicamentos e drogas de ação do SNC via *Liquid Chromatography* (LC) acoplado a MS, (4) quantificação de álcool do sangue por GC/ *Headspace* (HS) com *Flame Ionization Detector* (FID) e determinação de carboxihemoglobina por método espectrofotométrico.

A receção, o primeiro interveniente na cadeia de custódia interna do SQTF, dá a entrada dos kits de recolha de amostras biológicas assegurando que todos os procedimentos são cumpridos segundo as normas do INMLCF e, posteriormente, o(s) processo(s) analítico(s) solicitados(s) é/são adicionado(s) à plataforma STARLIMS[®], um *software* de gerenciamento de dados que garante a logística do SQTF no registo de amostras, armazenamento e conhecimento do tipo de amostra biológica e volume de trabalho. Aliás, a plataforma é crucial para atribuir os resultados analíticos, emitir relatórios e obter dados estatísticos sobre o funcionamento do laboratório. Por fim, as amostras rotuladas são armazenadas no congelador a -10°C.

O serviço administrativo verifica a conformidade dos vários documentos e reencaminha, via STARLIMS[®], os procedimentos analíticos a efetuar consoante os requisitos específicos, como pesquisa de drogas de abuso, álcool, medicamentos, pesticidas e carboxihemoglobina, entre outros. Por fim, são emitidos os relatórios para as entidades requisitantes.

Associado a cada processo é-lhe atribuído um código com a seguinte formatação 2023/001969/LX-T, ou seja, dividido por ano, número sequencial do processo, região (área metropolitana de Lisboa e gabinetes médico-legais da sua área de atuação) e tipo de processo (Toxicologia). Concomitantemente, para cada amostra é associado o(s) processo(s) de análise da amostra, com um ou mais códigos específicos, por exemplo PE-STF-S-403 de determinação

espectrométrica de carboxihemoglobina, descrevendo o tipo de procedimento (Procedimento de Ensaio - PE), departamento do instituto (Serviço de Toxicologia Forense), delegação do INMLCF (Sul) e género de pedido analítico, respetivamente.

2.2. Estruturação e Descrição do Estágio

A organização do estágio curricular foi separada em duas partes. A primeira parte consistiu numa abordagem teórica e observacional das componentes abordadas anteriormente do SQTF, bem como, leitura de bibliografia e da drive do Sistema de Gestão (SG) de qualidade incluindo PE, procedimentos gerais, procedimentos operacionais e registos técnicos, lista de padrões, instruções de kits, equipamento analíticos, entre outros. O objetivo previa fornecer conhecimento preliminar dos métodos de análise e entender melhor o funcionamento geral do SQTF e, inclusive, visava a interpretação de resultados de casos práticos.

A segunda parte, envolvia a componente prática, nomeadamente extração do analito da amostra através de PE distintos. Os PE realizados de confirmação por GC/MS compreenderam a pesquisa de opiáceos e cocaína. A descrição sucinta do procedimento laboratorial de confirmação de drogas de abuso no sangue por GC/MS pode ser visualizada na Figura 2, desde a remoção da Amostra Laboratorial (AL) e do sangue branco do congelador até à transferência do(s) analito(s) de interesse para o *vial*.

No decorrer da atividade laboratorial, vários erros podem acontecer, quer sejam erros sistemáticos ou aleatórios. O procedimento analítico possui Controlo de Qualidade Interno (CQI) que confere melhor desempenho do mesmo e é composto por: controlos positivos, controlo negativo e o Branco de Reagentes (BR). O controlo negativo de branco de sangue avalia, em cada sequência analítica, o efeito da matriz e o BR que deteta contaminações provenientes dos reagentes utilizados, entre outros. Nos procedimentos de confirmação são definidos 3 controlos positivos: um controlo baixo no Limite de Deteção (LD) do PE que permite confirmar a sensibilidade do método e dois controlos na gama baixa e alta de concentrações que permitiu confirmar a presença do analito na amostra, através da confirmação dos rácios iónicos conforme os critérios da World Anti-Doping Agency (WADA), Tempo de Retenção (TR) e Tempo de Retenção Relativo (TRR) do analito e Padrão Interno (PI) e, ainda, permite uma estimativa da concentração do analito na amostra. Por outro lado, nos PE quantitativos são definidos quatro controlos positivos na gama de trabalho, alta, média e baixa concentrações e no Limite de Quantificação (LQ) do PE. Deste modo, é assegurada a exatidão do método. A precisão do método analítico é avaliada em cada série analítica mediante a análise de replicados ou mesmo triplicados dos controlos.

A extração dos analitos de interesse da amostra biológica mais especificamente da Toma de Ensaio (TE), ou seja, a alíquota obtida a partir de uma AL e sobre a qual se realiza o ensaio, foi efetuada por colunas da WATERS® de Extração de Fase Sólida (Solid Phase Extraction - SPE) que contêm partículas monodispersas de resina de poliestireno-divinilbenzeno ligadas a grupos de ácido sulfônico aromático, designadas por Oasis MCX (Mixed-Mode Cation eXchange) como representado na Figura 1. Este adsorvente polimérico de caráter misto incorpora os princípios da retenção de fase reversa (fase estacionária apolar) e da permuta catiônica forte (MCX), o que resulta numa capacidade superior para reter compostos de maneira eficiente³.

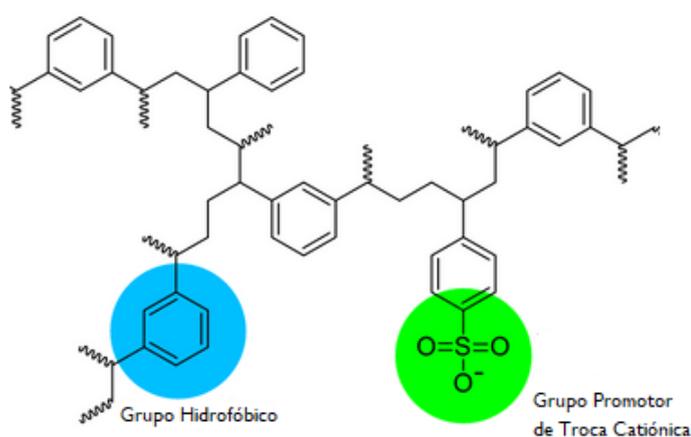


Figura 1- Molécula constituinte das Colunas MCX de poliestireno-divinilbenzeno, representando a azul um grupo hidrofóbico e a verde uma ligação de ácido sulfônico aromático promotora de trocas catiônicas, adaptado de (3).

O passo final engloba a derivatização química que é um passo crucial à GC-MS dado à capacidade do agente derivatizante de transformar as substâncias químicas de interesse em compostos mais voláteis e de polaridade distinta inerentes a uma melhor resposta do detetor e eficiência cromatográfica que se reflete na separação dos picos cromatográficos mais apropriados aos critérios pré-definidos do SQTf.

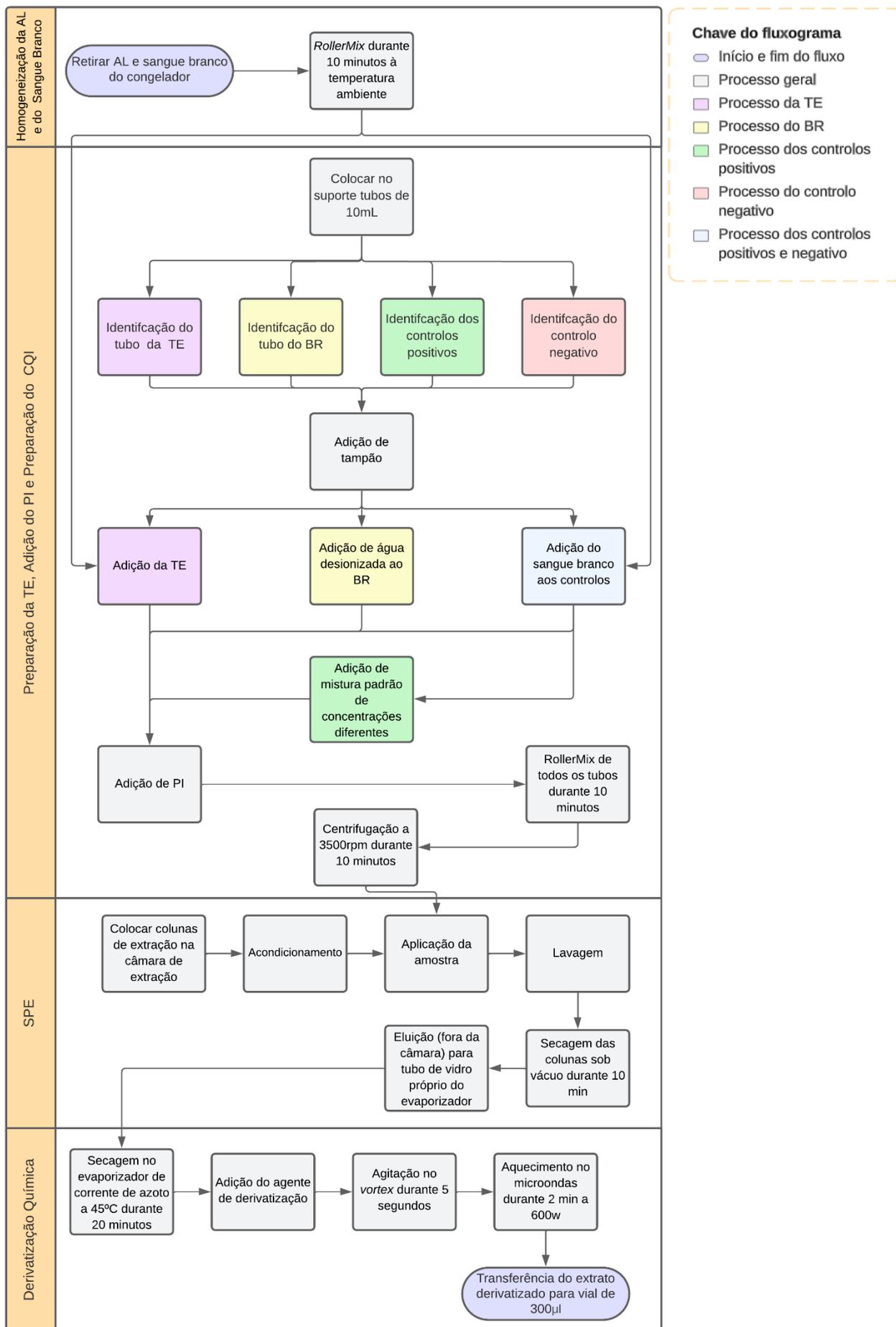


Figura 2 – Diagrama de fluxo de trabalho do procedimento de um PE de confirmação de drogas de abuso no sangue por GC/MS separado por: homogeneização da AL e do sangue branco; preparação da TE, adição do PI e Preparação do CQI; SPE e derivatização química.

A seguir ao procedimento laboratorial ocorre a análise instrumental por GC-MS, em modo SIM (monitorização seletiva dos fragmentos iónicos) e *split* (1:5) cujas condições cromatográficas se ilustram na Figura 3.

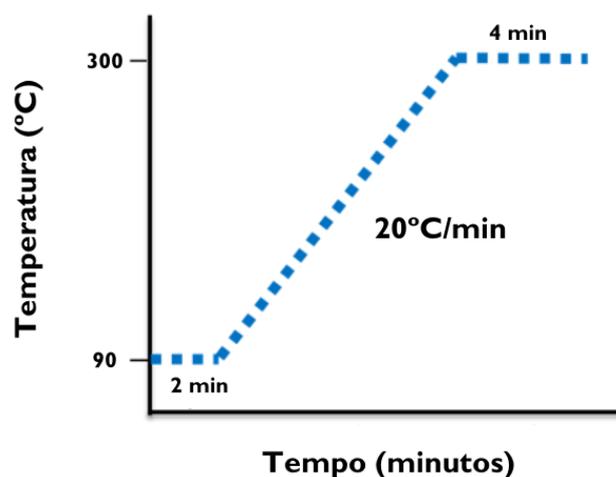


Figura 3 - Representação gráfica das condições do forno do GC

O cumprimento dos critérios previamente estabelecidos é crucial durante a obtenção dos dados e na avaliação dos resultados analíticos, por exemplo, durante a confirmação qualitativa, na identificação do composto na amostra, a razão Sinal/Ruído (S/R) para picos cromatográficos de baixa intensidade ou com elevado ruído nas proximidades, o TR e o TRR do analito por comparação com o PI, a presença dos 3 fragmentos iónicos definidos, e os critérios de aceitação admitidos para as suas intensidades relativas.

No plano de estágio também foi introduzido o PE de quantificação de cocaína e metabolitos por GC/MS que é um procedimento laboratorial mais complexo, devido à elaboração de uma curva de calibração com 6 pontos e a exigência de duplicados nos controlos e amostras biológicas para aferir a precisão e exatidão do PE. Estes critérios associados a cartas de CQ são pormenores a ter na avaliação da qualidade dos resultados para chegar a conclusões válidas, com elevado grau de confiança.

3. Análise SWOT

A análise SWOT é uma ferramenta de gestão útil para identificar as características e fatores que influenciaram a minha experiência no estágio no SQTF. A sua representação é ilustrada na Figura 4.

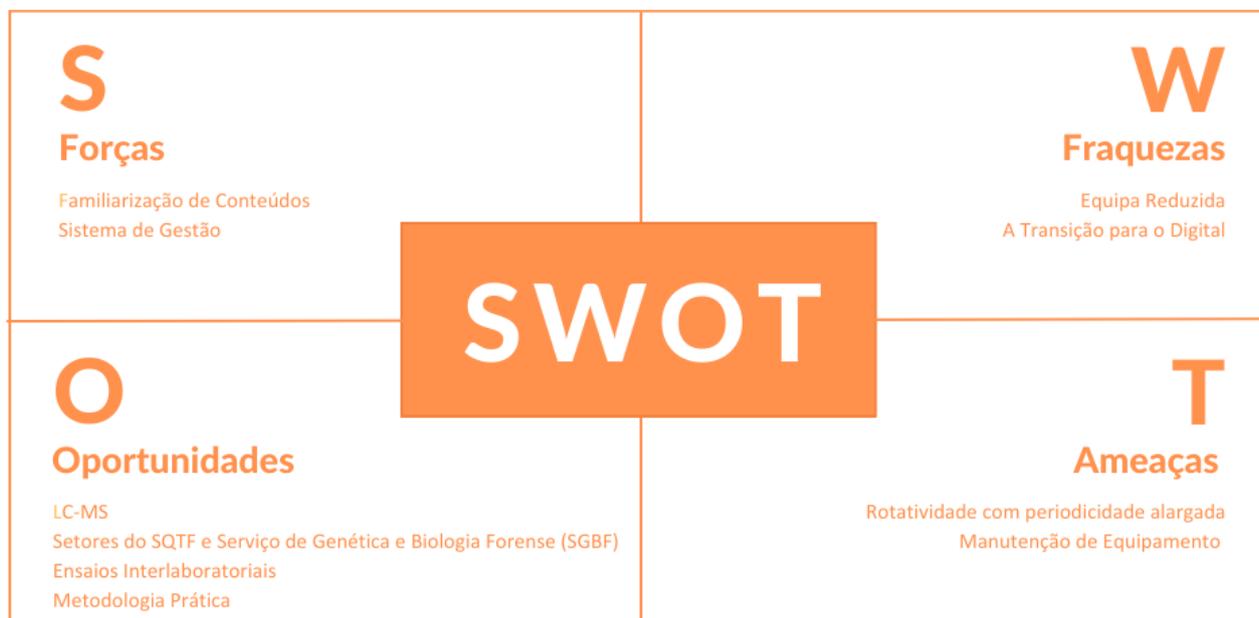


Figura 4 - Diagrama da análise SWOT referente ao estágio no SQTF do INMLCF

3.1. Forças

3.1.1. Familiarização de Conteúdos

O contacto com as disciplinas do MICF centradas em métodos instrumentais analíticos (Métodos Instrumentais de Análise I e II), de contexto laboratorial de isolamento de compostos, identificação e quantificação (Química Analítica I, Química Farmacêutica I e II, Farmacognosia, Química Orgânica I e II) facilitaram o acompanhamento da rotina do SQTF, desde o manuseamento preciso de pipetas, cálculos de diluição, concentração e interpretação gráfica, como curvas de calibração. Uma área importante a destacar é a Estatística, importante na validação e controlo de resultados e métodos analíticos. A sua aplicação na avaliação da linearidade das curvas de calibração, CQI e determinação da incerteza da concentração dos analitos é fundamental na área das perícias toxicológicas.

3.1.2. SG

Ao longo do curso no MICEF, aprendi através de cadeiras como Assuntos Regulamentares do Medicamento e Gestão de Processos Regulamentares, a importância do CQ para garantir a segurança e qualidade do medicamento. Os mesmos princípios são aplicados no INMLCF no formato de SG. O SG reúne um conjunto de elementos relacionados entre si, com o fim de estabelecer objetivos, políticas e processos para alcançar as metas definidas e em última instância, a satisfação do Cliente, a Justiça. O SG implementado no SQTf integra as normas do INMLCF e, também, considera os requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, inseridos na Norma Portuguesa (NP) já adotada na *European Norm* (EN) e essa norma, por sua vez, foi aprovada previamente pela International Organization for Standardization (ISO) e a International Electrotechnical Commission (IEC), ou seja, a NP EN ISO/IEC 17025. A NP EN ISO/IEC 17025 estabelece regras pelas quais os laboratórios podem demonstrar a sua competência técnica para a realização dos PE e evidenciar a garantia de qualidade dos resultados analíticos fornecidos. A nível internacional, facilita a colaboração entre laboratórios e outras entidades, o que contribui para uma maior harmonização dos resultados analíticos entre diferentes países, legitimando-os em territórios estrangeiros, eliminando a necessidade de os refazer⁴.

Além disso, o laboratório do SQTf segue os critérios de confirmação qualitativa da organização WADA nos métodos de confirmação de drogas de abuso, medicamentos e pesticidas. As auditorias internas e externas ao SQTf, asseguram boas práticas laboratoriais compatíveis com as agências de acreditação, tal como o Instituto Português de Acreditação (IPAC), garantem ainda conformidade com a NP EN ISO/IEC 17025, comunicando os resultados das auditorias a toda a equipa, de forma proativa, e estabelecendo as correções e ações corretivas consideradas apropriadas, num sistema de melhoria contínua dos processos.

3.2. Fraquezas

3.2.1. Equipa Reduzida

O SQTf apresenta uma quantidade elevada de pedidos de análises toxicológicas em amostras biológicas diversas para o número de elementos inseridos nas equipas laboratoriais e há limitação diária no número de análises efetuadas imposta pela capacidade de resposta dos instrumentos analíticos utilizados. Estas limitações são responsáveis por atrasos nos tempos de resposta do SQTf.

3.2.2. A Transição para o Digital

A Implementação do SG Documental no INMLCF, visando a desmaterialização e a tramitação eletrónica de sistemas e procedimentos baseados em papel é recente. Deste modo, numa fase inicial, o acesso à drive do SG de qualidade foi difícil. A primeira fase do meu estágio requeria a leitura da documentação existente no SG, o que atrasou a aprendizagem das bases de operações do SQTF importantes para o meu estágio.

3.3. Ameaças

3.3.1. Rotatividade com periodicidade alargada

O SQTF faz a rotação dos Especialistas Superiores nas quatro equipas laboratoriais para garantir a versatilidade da equipa na execução dos PE, porém, com uma periodicidade alargada. A introdução de um novo instrumento analítico ou novo método analítico exige a sua validação, como sucedido com a introdução do LC-MS há 14 anos para a confirmação e quantificação de canabinoides e benzodiazepinas. No entanto, procedimentos como a triagem de medicamentos e drogas de abuso utilizando esta tecnologia apenas começaram há um ano, primeiro no grupo dos medicamentos e mais tarde no grupo das drogas de abuso, não tendo ainda alcançado todos os membros da equipa nestas duas vertentes. O problema exposto revela a necessidade de períodos de rotação mais curtos que permitem ao analista estar mais ciente de todo o trabalho praticado no SQTF.

3.3.2. Manutenção de Equipamento

Um atributo importante de um toxicologista forense é a análise crítica dos resultados analíticos. Durante o período de estágio, foi possível constatar a rejeição de alguns controlos de qualidade dos PE por falha humana e ou problemas técnicos nos equipamentos analíticos. Este género de problemas instrumentais atrasam o fluxo de trabalho, obrigando à repetição de todo o PE, e exigem, por vezes, manutenção corretiva externa que requer técnicos especializados no equipamento, o que pode demorar algum tempo até o equipamento analítico voltar a estar operacional.

Nas minhas próprias atividades laboratoriais a ausência na troca do *liner* (câmara de aquecimento para injeção GC-MS) foi um fator limitante da qualidade do meu resultado. O plano de manutenção preventiva interna do GC-MS define que o *liner* deve ser trocado após cerca de cem análises, por causa de acumulação de resíduos, ou sempre que haja mudança do

reagente de derivatização química, para não haver misturas e contaminação de uma pesquisa prévia no GC-MS.

3.4. Oportunidades

3.4.1. LC-MS

O LC-MS fornece, em comparação ao GC-MS, melhor sensibilidade, seletividade e simplicidade do procedimento de extração (precipitação proteica *versus* SPE) e é mais vantajoso para análise de substâncias termolábeis. Aliás, PE requer pouco volume de amostra (100uL) devido ao seu potente LD. A introdução desta tecnologia requer validação. Durante o meu estágio, os procedimentos de triagem de drogas de abuso e medicamentos por LC-MS estavam sob validação do PE e, por isso, tive a oportunidade de compreender a sua importância para garantir a veracidade, linearidade e precisão do método analítico.

3.4.2. Setores do SQTf e Serviço de Genética e Biologia Forense (SGBF)

A passagem pelos diferentes setores do SQTf, em particular a visualização dos vários PE praticados pelas quatro equipas de trabalho e a oportunidade de visitar o SGBF deram-me uma perspetiva mais abrangente do INMLCF e da área forense.

3.4.3. Ensaio Interlaboratoriais

Na periodicidade de um ano são realizados vários ensaios interlaboratoriais, com o intuito de avaliar o desempenho dos métodos analíticos, dos participantes e comparar com outros laboratórios, evidenciando a capacidade do SQTf em fornecer resultados analíticos fiáveis e o estabelecimento de ações corretivas, num sistema de melhoria contínua do Serviço. Este ensaio pode ainda auxiliar a estimar parâmetros laboratoriais, como a incerteza da medição associada a um resultado analítico.

3.4.4. Metodologia Prática

No decorrer do estágio pude fortalecer estratégias para prevenir erros sistemáticos, bem como analisar diferentes perspetivas de trabalho. Cada funcionário do serviço possui diferentes formas de melhorar a performance. Os procedimentos do SQTf recorrem muitas vezes a várias amostras em série no mesmo suporte em eppendorfs/tubos, ligado a um trabalho, por vezes, monótono, que aumenta o risco de cometer lapsos na pipetagem e troca na ordem das diversas amostras. A prevenção desses erros evita contaminação, perda de

soluções e confusão na origem das amostras. Por outro lado, os pormenores críticos observados no decorrer do procedimento laboratorial assim como bolhas na ponta da pipeta ou no *vial*, inconsistência de medição na pipeta e micropipeta e a perspicácia na validação, confirmação e quantificação de resultados, tais como integração correta e uniforme das curvas gaussianas e uso do controlo apropriado para apreciar a conformidade de determinado analito, foram habilidades difíceis de regular e que só pela repetição fui capaz de melhorar. A junção de todas estas competências permitiu alcançar resultados mais fiáveis e consistentes.

4. Considerações Finais

O âmbito das atividades do INMLCF, SQTf abrange o seu relevante serviço de perícia forense química e toxicológica em cooperação com tribunais, órgãos de polícia criminal e outros serviços e entidades intervenientes nos sistemas de administração da justiça. O apoio prestado a estas autoridades judiciárias e judiciais deve respeitar as normas éticas e legais, salvaguardando os direitos do cidadão e a segurança pública. O correto exercício da função de um toxicologista forense permite esclarecer a causa e o efeito de um determinado evento, no contexto atual dos comportamentos aditivos e dependências de substâncias psicoativas de uso ilícito, alcoolismo, distúrbios mentais e polimedicação. A elevada mortalidade associada a acidentes rodoviários, mortes por *overdose*, suicídios e violência em geral, atestam a enorme importância social da toxicologia forense. Além disso, o conhecimento adquirido no estágio em análise toxicológica de drogas de abuso, álcool, pesticidas e medicamentos e o seu enquadramento histórico tornaram-se essenciais no meu percurso académico, pelo seu interesse farmacológico, toxicológico e extensão laboratorial.

A minha integração no SQTf do INMLCF expandiu o meu domínio laboratorial, químico e toxicológico, permitindo-me o contacto com práticas e conhecimentos numa grande variedade de PE e interpretações de dados analíticos. A partir deste estágio consegui experienciar e captar a importância de boas práticas laboratoriais consequentes a um excelente CQ, agilidade laboratorial e pensamento crítico durante todos os procedimentos e análises de resultados executados, especialmente numa área tão ligada à justiça e à saúde pública. Deste modo, praticando e repetindo métodos analíticos validados submetidos a um bom CQ interno e externo, consegui implementar corretamente boas práticas de laboratório e expandir as minhas bases no ramo da toxicologia e química, determinantes para a boa formação de um toxicologista forense.

Bibliografia

1. INMLCF - **Sobre o INMLCF: Quem somos**. [Acedido a 30 de agosto 2023]. Disponível na Internet: <https://inmlcf.justica.gov.pt/Sobre-o-INMLCF/Quem-somos>.
2. Ministérios das Finanças e da Justiça. (2013). Portaria n.º 19/2013, 21 de janeiro. Diário da República, 1.ª série - n.º 14. Estatutos do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I. P. Disponível em: https://sgmj.justica.gov.pt/Portals/14/Documentos/Documentos%20de%20apoio/Leis%20organicas%20MJ/INMLCF/INMLCF_P_19_2013.pdf.
3. Finetech - **MCX SPE Cartridge**. [Acedido a 15 de agosto 2023]. Disponível na Internet: <https://www.finetech-filters.com/mcx-spe>.
4. ISO - **ISO/IEC 17025: Testing and calibration laboratories**. [Acedido a 15 de julho 2023]. Disponível na Internet: <https://www.iso.org/ISO-IEC-17025-testing-and-calibration-laboratories.html>.

PARTE III

Monografia

“Ciências Forenses: Limitações do DNA e Procura de Novos Gold Standard”

Sob orientação do Professor Doutor Saul Campos Pereira Costa

Abreviaturas

Cas9 - Endonuclease 9

CE - *Capillary Electrophoresis*

CPI - Combined Probability of Inclusion

CRISPR - Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas

crRNA - RNA-CRISPR

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ESI - *ElectroSpray Ionization*

FBI - Federal Bureau of Investigation

GPS - *Global Positioning System*

GS - *Gold Standard*

GTP - Genotipagem Probabilística

HMP - *Human Microbiome Project*

HPLC - *High-Pressure Liquid Chromatography*

HRM - *High Resolution Melting*

IPM - Intervalo Post-Mortem

LLN - *Law of Large Numbers*

Loci - Locais Genéticos

LR - *Likelihood Ratio*

M/Z - Rácio massa/carga

MPS - Massively Parallel Sequencing

MS - *Mass Spectrometry*

NGS - *Next Generation Sequencing*

NIST - National Institute of Standards and Technology

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PSM - *Peptide Spectral Matching*

Q1 - Quadrupolo 1

Q2 - Quadrupolo 2

Q3 - Quadrupolo 3

QQQ - Triplo Quadrupolo

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA - Ácido ribonucleico

RNAg - RNA guia

RNAr - RNA ribossômico

SAAPs - *Single Amino Acid Polymorphisms*

SNPs - Single-Nucleotide Polymorphisms

STR - *Short Tandem Repeats*

tracrRNA - RNA de CRISPR de ativação em trans

VNTR - *Variable Number of Tandem Repeats*

Resumo

A Ciência Forense é uma área interdisciplinar que desempenha um papel-chave no sistema legal. As tecnologias forenses crescem em passos consideráveis e, cada vez mais, conseguem oferecer resultados mais precisos. A ciência aliada à investigação pericial, por meio da evidência de DNA (ácido desoxirribonucleico), contribui com a Justiça para esclarecer a verdade. Atualmente, a recolha e análise de provas vestigiais é muito mais acessível e frequente, levantando várias questões e incertezas sobre a fiabilidade dos resultados, visto que os dados obtidos, por vezes, provêm de amostras de qualidade reduzida. Na história do DNA num contexto forense houve inúmeros casos de injustiças associadas à sua aplicação desadequada para a identificação humana. Face às limitações do DNA e às consequências provenientes das mesmas, torna-se imperativa a procura e investimento de soluções dentro da genética forense como a Genotipagem Probabilística (GTP) e o sequenciamento paralelo massivo (*Massively Parallel Sequencing* - MPS), mas também fora, tal como a Proteómica e Comunidades Microbianas. A evolução recente da tecnologia permitiu vários avanços nessas áreas, possibilitando o desenvolvimento de métodos com valores de repetibilidade, veracidade e incerteza aprimorados, com o intuito de alcançar os critérios de conformidade exigidos na vertente judicial. O estudo da Proteómica, que oferece múltiplas aplicações úteis, em particular na identificação da origem de um fluido ou tecido corporal, e da Comunidade Microbiana, promissora em várias vertentes, nomeadamente na identificação humana, apresentam uma relevância substancial. A abordagem deste tema tem o fim de melhorar a perceção comum sobre a perícia forense, além de apresentar tecnologias emergentes muito promissoras nas Ciências Forenses e de indiscutível pertinência em sociedades contemporâneas.

Palavras-chave: Ciência Forense, Impressão Digital de DNA, Misturas de DNA, Erros Forenses, Microbioma Forense, Proteómica Forense, Espectrometria de Massa.

Abstract

The discipline of Forensic Sciences plays an important role in the legal system and the deoxyribonucleic acid (DNA) is a fundamental Gold Standard (GS) criminal expertise tool in this field. Nowadays, the collection and analysis of trace evidence is much more accessible and frequent, raising various questions and uncertainties about the reliability of the results, since the data obtained sometimes comes from samples of reduced quality. In the history of DNA in a forensic context, there have been numerous cases of injustice associated with its inappropriate application for human identification. Faced with the limitations of DNA and the consequences they entail, it has become imperative to look for and invest in solutions within forensic genetics such as Probabilistic Genotyping (GTP) and Massively Parallel Sequencing (MPS), but also beyond it, such as Proteomics and Microbial Communities. The recent evolution of technology has led to several advances in these areas, making it possible to develop methods with improved repeatability, veracity and uncertainty values, in order to achieve the compliance criteria required in the judicial practice. The study of Proteomics, which offers multiple useful applications, particularly in identifying the origin of a body fluid or tissue, and of the Microbial Community, which is promising in several areas, particularly in human identification, that is of substantial relevance. Addressing this topic is intended to improve the common perception of forensics, as well as presenting promising emerging technologies in Forensic Sciences relevant to the modern society.

Keywords: Forensic Science, DNA Fingerprinting, DNA Mixtures, Forensic Errors, Forensic Microbiome, Forensic Proteomics, Mass Spectrometry.

1. Introdução

O DNA e justiça são uma conformidade recorrente na medicina legal, nas autoridades criminais e no sistema judicial, inerente à sua aptidão para libertar os inocentes e condenar os culpados. A técnica de impressão digital de DNA revolucionou o campo das ciências forenses desde a sua descoberta em 1984¹ e o seu primeiro caso criminal em 1987^{2; 3; 4; 5}. Ao longo das últimas três décadas, a genética forense tem testemunhado avanços significativos em termos de poder de discriminação, velocidade e sensibilidade dos métodos de perfil de DNA^{2; 3; 4; 5}. Desde há muito instituído com o estatuto de GS, a sua credibilidade acarreta muita influência na decisão das entidades jurídicas, especialmente quando associado a um perfil presente no banco de dados de DNA ou gerado a partir de um suspeito^{2; 3; 4; 5; 6}. No entanto, muitas vezes as provas forenses e de DNA são caracterizadas como infalíveis, ou de simples análise, associadas aos dramas policiais de televisão, também conhecido como o efeito “CSI”^{7; 8}.

Díspar das evidências biológicas preliminares, a nova geração consegue chegar ao resultado, empregando DNA demasiado degradado, amostras de quantidade reduzida e misturas complexas de DNA, onde o perfil *Short Tandem Repeats* (STR) tradicional pode sofrer limitações^{2; 3; 4; 5}. Os analistas face a amostras de baixa qualidade, difícil interpretação e danificadas são suscetíveis a uma leitura e perceção por vezes duvidosas que aumentam a incerteza relacionada às conclusões tiradas pelo perito forense⁶. Ligado a estes desafios, o desenvolvimento de novas tecnologias, como é o caso de microbioma e proteomas, para o auxílio da investigação criminal, bem como, dentro do DNA, compreender as suas limitações e procurar soluções, tornam-se áreas de interesse. Nas situações em que o DNA isoladamente não é suficiente para aplicar uma sentença sem a mínima dúvida, deve-se assegurar a justiça no tribunal e ir além do GS atual e promover outros GS, para, assim, obter um nível de confiança inquestionável.

2. Provas Forenses

A manipulação, transferência e análise de provas biológicas são elementos essenciais na ciência forense, e garantir um registo preciso e completo da cadeia de custódia assegura que as provas apresentadas em tribunal são exatamente aquelas coletadas no local do crime⁹. A análise dessas provas desempenha um papel fundamental no processo, pois tem o poder de identificar um indivíduo, estabelecer o seu paradeiro e associá-lo a um objeto. Essas evidências da ação criminal são geralmente classificadas em três componentes principais: engenharia informática, física e química, e identificação humana e biologia (Figura 1). As provas físicas são

frequentemente cruciais para as investigações criminais, complementando os depoimentos das testemunhas, vítimas e suspeitos ¹⁰.

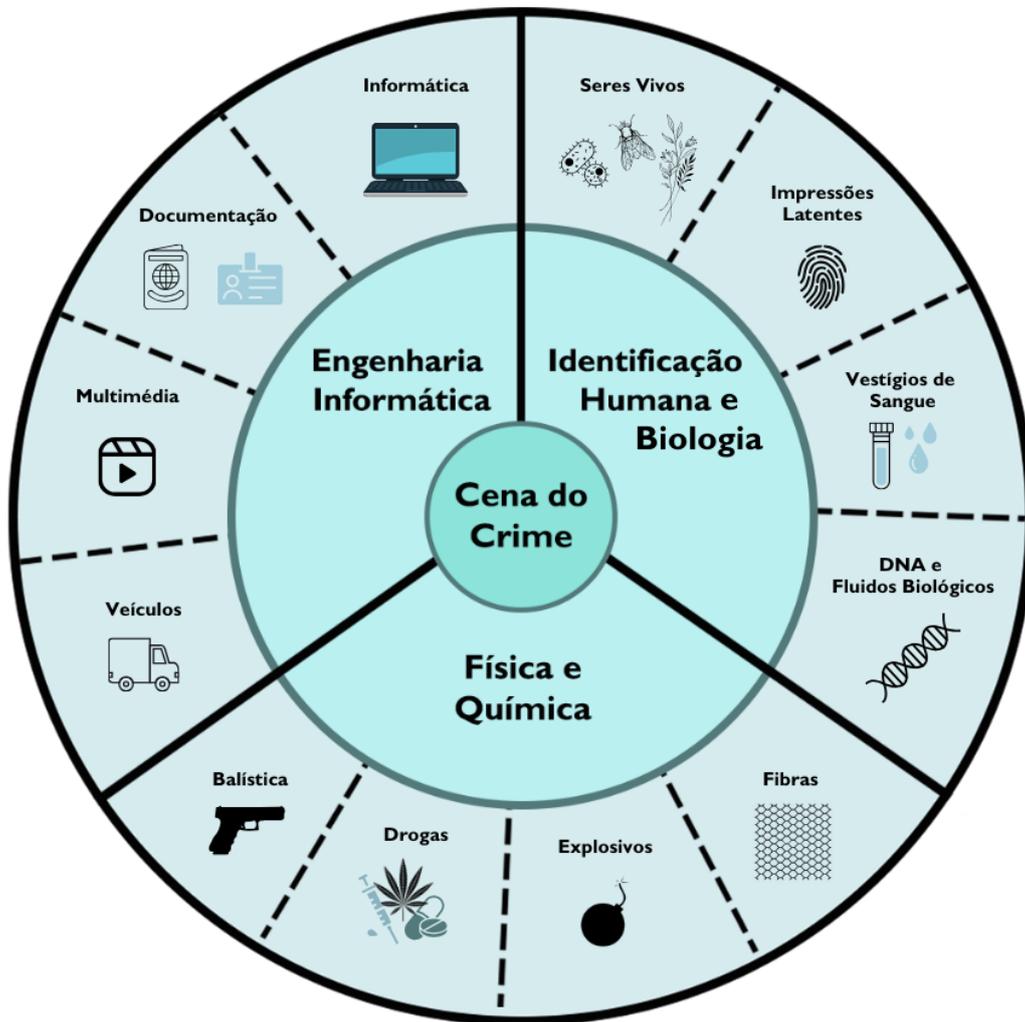


Figura 2- Gráfico circular representando algumas provas físicas do âmbito da física química e biologia e provas digitais possíveis recolhidas da cena do crime.

Vestígios são a prova residual de uma ocorrência ou ação anterior de algum acontecimento ou agente e, também, se definem como uma quantidade muito reduzida de substâncias que incluem ordens de grandeza muito baixas para serem medidas ¹¹. Este género de prova é, atualmente, muito comum, e é bem justificado pelo crescimento da indústria tecnológica analítica. O DNA e as impressões digitais têm a vantagem de poderem ser recolhidos em muitos suportes diferentes ¹⁰, no entanto a gama vestigial de provas abordada acima pode complicar o processo subsequente de análise forense de DNA.

3. DNA

3.1. Revolução Científica

A 28 de fevereiro de 1953 Francis Crick disse “We have discovered the secret of life”¹² e, de facto, essa descoberta mudou a perspectiva científica para gerações futuras. O DNA envolve quatro propriedades essenciais, segundo o modelo *Watson–Crick*: DNA é uma macromolécula informativa, explica a replicação do material genético, clarifica a especificidade genética do DNA e elucida a sua capacidade de modificação, como as mutações¹². Em 1958, o modelo de replicação semiconservativa foi comprovado pelos americanos Matthew Meselson e Franklin W. Stahl, demonstrando que o DNA é uma estrutura de dupla hélice e que o processo de replicação surge com a separação das duas fitas que formam a molécula de DNA. Em seguida, verifica-se a ligação dos nucleotídeos livres no núcleo a um nucleotídeo correspondente em uma das fitas. Concretamente, duas moléculas de DNA constituídas por uma fita antiga, pertencente à molécula original, e uma fita nova sintetizada^{12; 13}.

3.2. Genoma Humano

O genoma humano é a sequência completa de moléculas de DNA dentro dos 23 pares de cromossomos nos núcleos das células humanas, descrito num “alfabeto” de ácidos nucleicos A, C, G e T. A codificação deste sistema permite rastrear ancestrais, distinguir indivíduos e mapear doenças⁸. Além disso, o genoma humano é constituído por 95% de DNA não codificante e 5% codifica regiões proteicas. Dentro da região não codificante, está o segredo da elevada variabilidade genética. Disperso por todo o genoma humano existem locais genéticos (loci) constituídos de curtas secções de DNA repetidas várias vezes no gene. No âmbito forense há dois géneros de sequências principais a ter em consideração, os minissatélites e os microssatélites. Os minissatélites são sequências curtas de 10 a 60 pares de bases de DNA repetidas, enquanto os microssatélites, ou STRs, são mais curtos que os minissatélites, geralmente com dois a cinco pares de bases de comprimento. Ambas as sequências se repetem muitas vezes no genoma humano, por exemplo 'TATATATATATATA'. Esses polimorfismos de DNA alteram o comprimento dos fragmentos de DNA produzidos através de enzimas de restrição^{1; 8; 14}, um processo crucial para a descoberta do perfil de DNA.

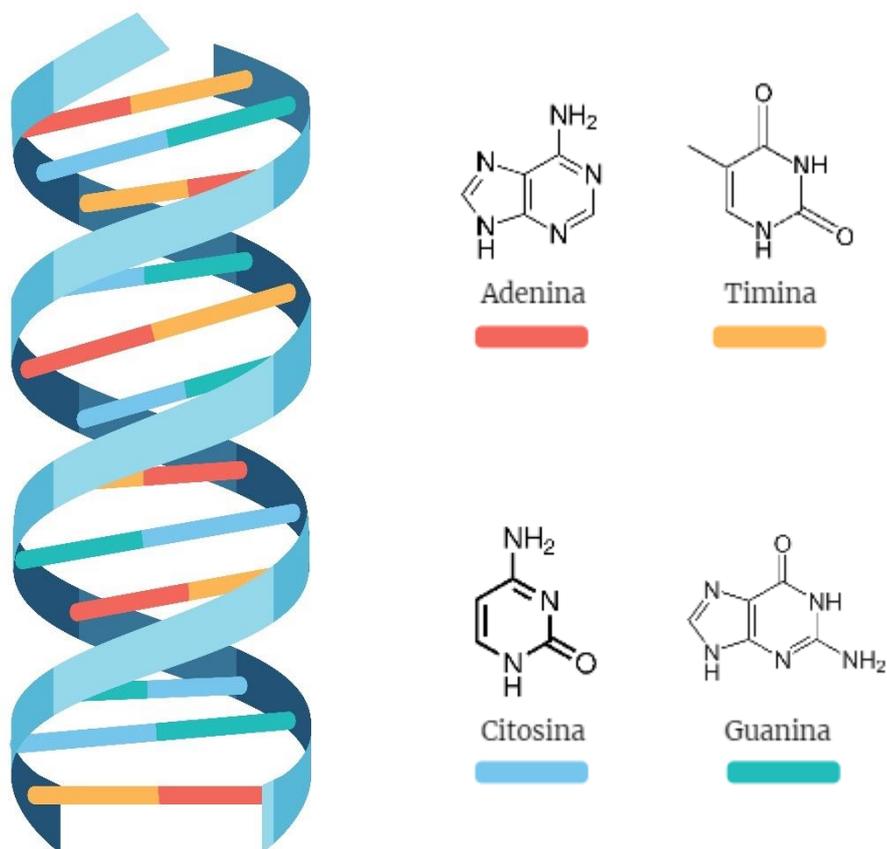


Figura 2 - Ilustração da dupla hélice de DNA e estrutura molecular de quatro tipos de bases nitrogenadas de Adenina a vermelho, Timina a laranja, Citosina a azul e Guanina a verde. Adaptado de freepick.com.

Diante das quatro variedades de ácidos nucleicos, o número de combinações seria limitado, mas, por causa de sequências como o STR é, assim, explicada a extensa variabilidade genética humana. O segmento STR, inserido no locus, varia de comprimento na população, obtendo alelos diferentes no gene determinantes na expressão genética do indivíduo, ou genótipo e, assim, identificá-lo. Quanto maior for a diversidade de alelos num locus STR, maior serão as possibilidades de combinações de pares de alelos de genótipos. Realmente, a probabilidade de existirem duas pessoas com a mesma impressão digital de DNA, perante uma população aleatória e diversificada, poucos gémeos idênticos, baixo grau de parentesco e poucas situações de consanguinidade, é muito reduzida^{1; 8; 15}.

Portanto, é possível gerar um perfil genético único para cada indivíduo, altamente improvável de ser compartilhado por outra pessoa, a menos que haja um vínculo familiar próximo, corroborando a legitimidade do uso de DNA para a identificação de suspeitos em casos criminais.

3.3. Impressão Digital

3.3.1. Contextualização na Área Forense

A impressão digital, conhecida também por perfil de DNA ou genética forense, é a base das ciências forenses para a deteção do contribuidor de uma amostra biológica¹⁶. Aliás, o DNA fornece, mais do que uma impressão digital física latente, um perfil único e específico¹⁷. Sobretudo, é um método que extrai o DNA do genoma de um indivíduo e reconhece os sinais únicos do mesmo^{1: 14}. Via esta estratégia, é possível identificar o contribuidor das provas recolhidas no local do crime, resolver disputas jurídicas como testes de paternidade e questões de herança e, ainda, confirmar vítimas de catástrofes e pessoas desaparecidas a partir de restos mortais^{14: 16}.

Ao longo do tempo, os métodos de análise de polimorfismos genéticos para fins forenses têm passado por constantes alterações e aprimoramentos, chegando a alcançar alta sensibilidade^{2: 16}. Exemplo disso é a reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), um procedimento automatizado que gera várias cópias de uma sequência específica de DNA, quer seja DNA parcialmente degradado, ou uma pequena porção^{1: 2}. O progresso da indústria destaca-se, igualmente, pela mudança da técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) pelo STR. No início da década de 1990 os métodos de colheita de impressões digitais de DNA usando RFLP foram gradualmente substituídos por métodos baseados no PCR, devido à maior sensibilidade, rapidez e precisão da genotipagem^{3: 18}. O RFLP comparativamente aos outros métodos, revelou-se limitado pela qualidade e quantidade de DNA disponível e com dificuldades em comparar de forma fidedigna perfis genéticos de diferentes fontes, técnicas e laboratórios. A alteração de minissatélites do RFLP para microsatélites do STR, mostrou-se tão adequada para estudos forenses que o STR é uma das técnicas mais utilizadas em casos criminais, definitivamente, um GS. Os atributos que frisam o seu estatuto são a sua sensibilidade suplementar, retenção bonificada quando confrontado com sistemas de número variável de repetições tandem (*Variable Number of Tandem Repeats* - VNTR) e mais discriminante que outros meios de tipagem para PCR^{3: 19: 20}.

De facto, o nível de qualidade de recolha de provas é tão eficiente que deteta as mais pequenas quantidades de DNA, levantando questões de: transferência secundária de DNA da natureza sujeito para objeto, sujeito para sujeito e objeto para objeto; momento de deposição de DNA e sua contaminação que põe em perspetiva o que é realmente necessário para chegar à origem cronológica e biológica de uma amostra de DNA vestigial. Perante estes problemas,

é necessário compreender as complexas implicações causa/efeito presentes que a impressão digital traz ao panorama forense^{21; 22}.

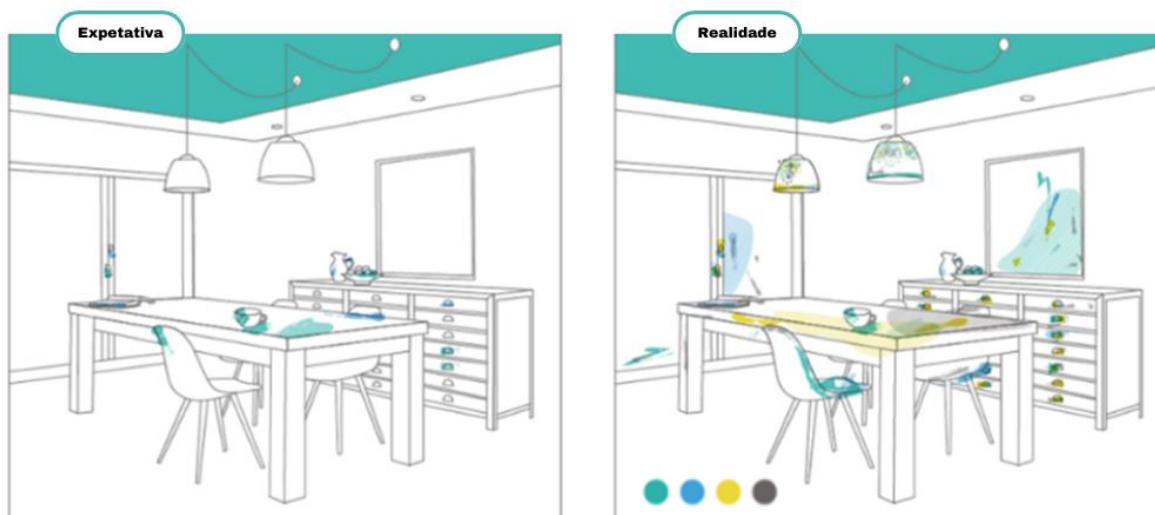


Figura 3 - Modelo de uma sala comparando os vestígios de DNA expectável de uma cena do crime com a realidade. A verde estão representados os vestígios provocados pelo residente habitual da sala. As restantes cores (azul, amarelo e cinzento) marcam os vestígios de DNA de entidades estranhas a este ambiente. A transferência de DNA por meio de fluidos corporais, descamação de células mortas da pele, tosse, conversa, espirros e transferência secundária de DNA são eventuais fontes de contaminação e dispersão de partículas de DNA causadores da discrepância observada entre a expetativa e a realidade. Adaptado de (21).

3.3.2. Metodologia

Contrariamente ao método antigo que exigia enzimas de restrição para cortar o DNA, marcação de minissatélites com sondas e a exposição a uma película de raios X¹⁴, neste momento, usam-se processos mais automáticos e eficientes. Primeiramente, (1) o DNA é retirado de uma amostra biológica, como saliva, sangue e cabelo. De seguida, (2) utiliza a PCR para produzir muitas cópias de sequências STR específicas através de *primers* (pequenos fragmentos de DNA marcados por fluorescência). Isto facilita a identificação e o registo das sequências STR após a PCR que se ligam a sequências complementares de DNA de interesse, neste caso STR. Posteriormente, (3) é aplicado eletroforese capilar (*Capillary Electrophoresis - CE*) para separar os fragmentos por tamanho. Após a fragmentação, (4) cada fração de DNA passa por um *laser* obtendo fluorescência que brilha num espectro específico, (5) visível no formato de uma série de picos coloridos que expressam a cor e o comprimento de cada sequência STR. Por fim, o sinal obtido permite determinar o perfil genético, aferir a qualidade do teste e as características observadas. Os alelos de um locus fazem parte desse perfil que é

guardado numa base de dados. A precisão deste procedimento é proporcional ao número de STR testadas, influenciando a identificação de um determinado sujeito^{1; 23; 24; 25}.

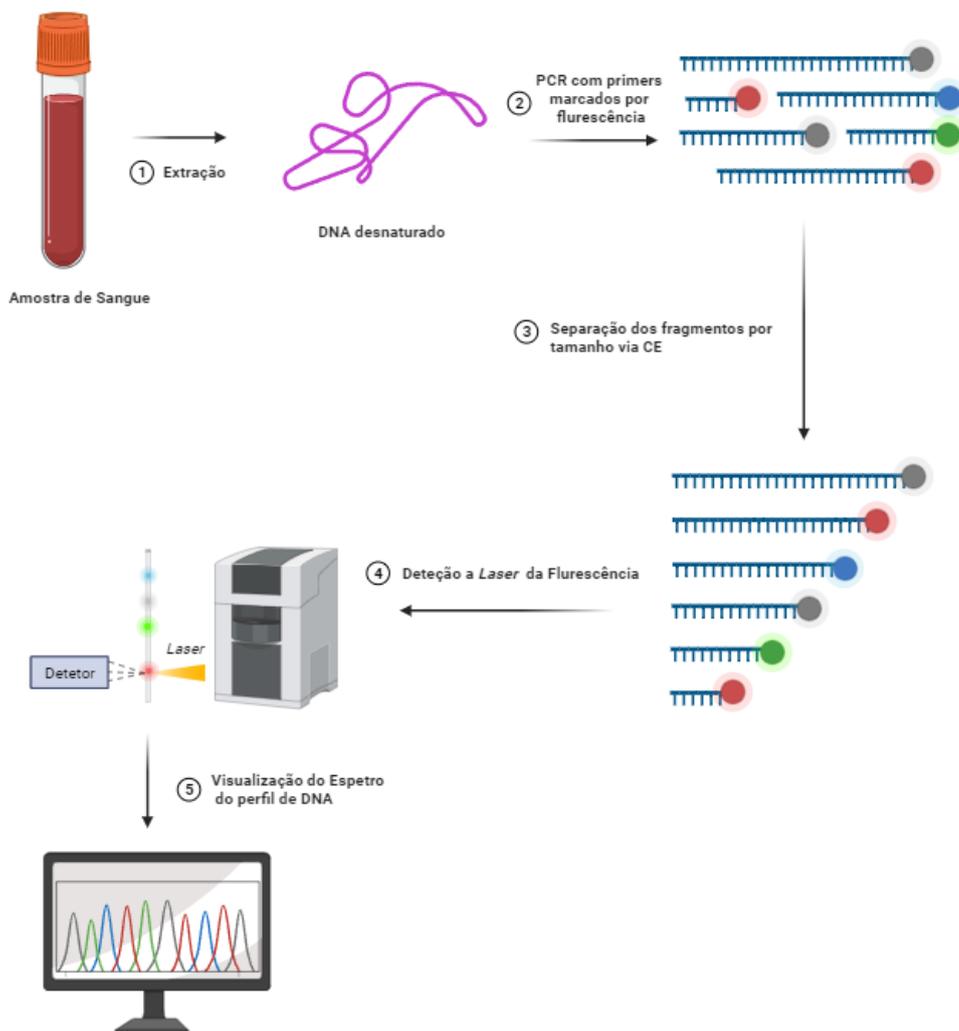


Figura 4 - Ilustração sucinta dos passos a seguir durante o procedimento de perfil de DNA via STR, PCR e CE.

3.3.3. Entidades Jurídicas e Interpretação de Provas

Nos últimos anos da genética forense, a análise de DNA está cada vez mais complexa. A compreensão de provas por parte das entidades jurídicas, desde correlações de deposição de DNA com a hora de ocorrência do crime, probabilidade de falsos positivos e transporte de DNA do local encontrado para uma origem distinta, são importantes para ter uma opinião bem fundamentada sobre o caso. Um estudo da Universidade da Califórnia avaliou como os estudantes universitários interpretavam dados estatísticos na forma que seriam apresentados em tribunal pelos advogados de acusação e de defesa e concluíram que a maioria é incapaz de detetar erros nos argumentos, aceitando falácias para fundamentar as suas decisões²⁶. O conhecimento que temos sobre a tecnologia associada ao DNA tem sempre evoluído, mas é necessário um pensamento crítico sobre a veracidade de todos os dados apresentados em

tribunal²⁷. De facto, o conceito de realidade e ficção é muitas vezes distorcido pela dramatização em notícias e policiais, iludindo a população geral, nomeadamente pelo efeito “CSI”. Numa investigação criminal, o DNA não é um detetive, pode estar no local mesmo que o arguido nunca tenha estado, por isso, relacionado ao DNA, tem de haver um caso corroborado por outras evidências independentes das provas de DNA^{7; 8; 21}.

3.3.4. Mistura e Degradação de DNA

A interpretação de misturas de DNA é um desafio para qualquer perito. O mesmo perito pode ter conclusões opostas de outros analistas forenses qualificados e, até, dentro do mesmo laboratório²⁸. Em circunstâncias de recolha de amostras de tamanho reduzido, aliado ao aumento exponencial da sensibilidade dos instrumentos analíticos, a probabilidade de encontrar misturas de DNA e/ou degradadas é substancial. A examinação do perfil de DNA com múltiplas origens é mais complexa do que a análise de perfis de fonte única (Figura 5), onde ocasionalmente, nenhuma correspondência é encontrada na mistura^{2; 29}. Esta dificuldade depende do número de fatores associados, como perfis de baixa qualidade, artefactos e características cromossómicas, mais concretamente, amplificação adicional de alelos, alelos nulos ou não detetados e outros fatores que possam afetar o equilíbrio cromossómico².

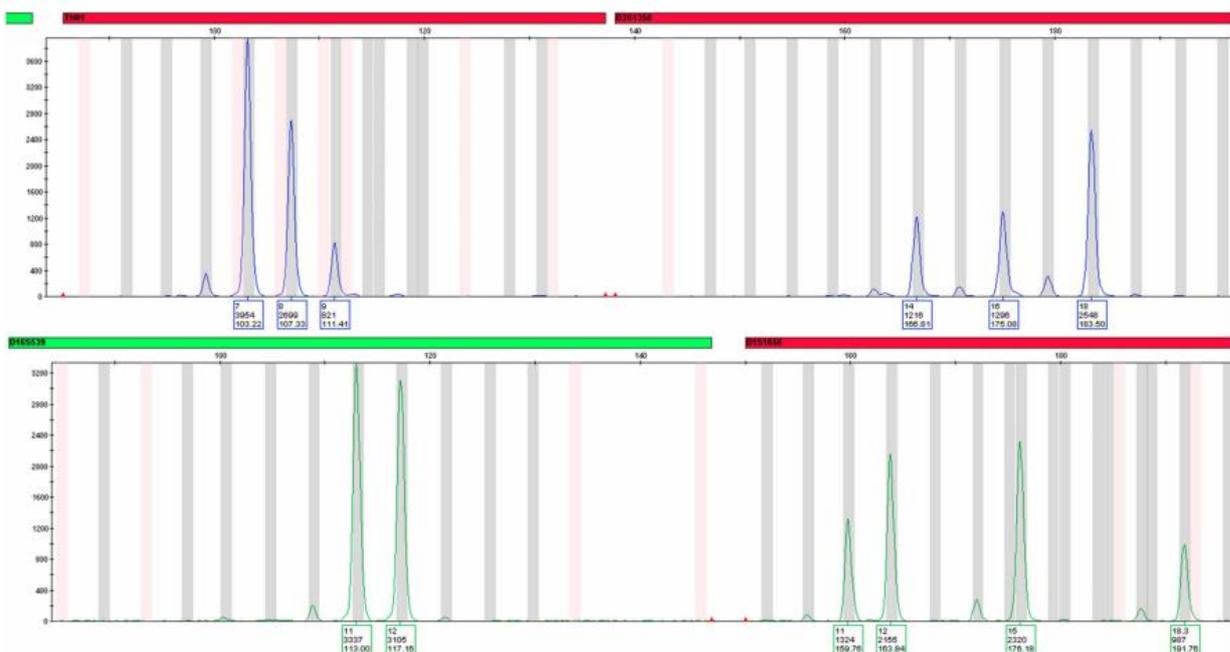


Figura 5 - Eletroferograma de um perfil de DNA misto de quatro loci STR. Adaptado de Haddrill. (2021).

Um exemplo de mistura de amostras biológicas são os casos que envolvem abuso sexual. Por meio de PCR seguido de CE, foi provado o quão desafiante é a separação/extração, resultando às vezes numa separação incompleta. Os rácios quantitativos de uma amostra biológica correspondem a concentrações de DNA distintas, resultando em diferentes áreas de picos obtidos a laser do loci do alelo distribuído segundo um determinado marcador. A extrapolação de resultados de picos sobrepostos de alelos idênticos é difícil quando os produtos do PCR têm as mesmas características de eletroforese, limitando uma leitura clara do perfil de DNA ^{24; 30}.

Por conseguinte, num ambiente exposto a temperaturas extremas, a humidade, acrescido de misturas de DNA, entre outras condicionantes, restringindo o número de marcadores viáveis, os peritos forenses geram um perfil parcial. Os riscos desses perfis criam situações de enquadramento estatístico desadequadas que podem afetar a fiabilidade dos resultados apresentados em tribunal.

3.3.5. Análise Estatística

3.3.5.1. Dados e Estudos

O estudo estatístico de perfis parciais de DNA e da probabilidade do DNA em análise obter um resultado exato deve ser bem validado e comprovado. Estatisticamente, a própria sequência de DNA é 99,9% idêntica e 0,1% é única para cada indivíduo. A probabilidade de duas pessoas não relacionadas por sangue terem o mesmo perfil de DNA é de 1 em 594.1 bilhões ($\times 10^{12}$) ^{1; 22; 31}. Coincidentemente, a 15 novembro de 2022 a população mundial atingiu os 8 mil milhões ($\times 10^9$) de pessoas e é espectável 9 mil milhões em 2037 ³². Ao alargar a perspectiva para um espectro mundial, fica evidente a singularidade do DNA e a sua relevância no uso forense.

Em 1999 o ramo da cibernética começou a desenvolver programas de estatística para decifrar misturas de DNA ³³. Desde métodos relativamente simples, que consistiam em determinar se um indivíduo podia ser excluído como o potencial contribuinte para uma mistura, por exemplo a Probabilidade Combinada de Inclusão (*Combined Probability of Inclusion* - CPI), até à utilização de fórmulas mais complexas de rácio de probabilidade (*Likelihood Ratio* - LR). Assim sendo, o LR estima as combinações genotípicas mais prováveis dos contribuintes para uma mistura. Modelos LR mais avançados incluem informações da altura dos picos dos perfis, número presumido e conhecido de fontes de DNA ^{2; 26; 34; 35}.

O LR é das equações estatísticas binárias com mais sucesso e comparado com o seu precedente, a CPI, é mais informativo e relevante³⁶. De um estudo com o objetivo de testar o sistema TrueAllele[®], um software de GTP, e o método FBI não validado CPI, foi concluído ter uma falha de informação colossal³⁷. A CPI demonstra seguir a *Law of Large Numbers* (LLN) que indica que com o aumento do tamanho de uma amostra vai tender cada vez mais para a média populacional, em vez de medir a informação para identificação de um suspeito. Portanto, em média, quanto mais loci houver maior será a estatística CPI, independentemente do conteúdo na amostra³⁸. Outro estudo do National Institute of Standards and Technology (NIST) envolvendo 109 laboratórios criminais norte-americanos, apoia estudos anteriores que mostram que métodos comuns, como a CPI, incluíram injustamente pessoas inocentes como uma das fontes das misturas de DNA, e inclusivamente apenas um único laboratório, que utilizou GTP, a TrueAllele[®] da Cybergenetics, chegou à conclusão correta²⁸. Por fim, o relatório de 2016 dos EUA do Conselho de Conselheiros do Presidente para a Ciência e Tecnologia afirmou: “Em resumo, a interpretação de misturas complexas de DNA com a estatística CPI tem sido um método inadequadamente especificado e, portanto, inapropriadamente subjetivo. Como tal, o método não é claramente válido em termos de fundamentos”³⁹. A partir destes recursos podemos articular a desadequação do método CPI para auxiliar na determinação de correspondência de DNA, e a relevância da GTP no ofício de ciências forenses²⁸.

3.3.5.2. GTP

Diante da necessidade de usar quadros probabilistas mais avançados para analisar dados complexos, iniciou-se o desenvolvimento de software de interpretação de misturas de GTP semicontínua, que não consideram a altura do pico, nem artefactos e contínua, que o faz. No entanto, há dúvida quanto à variação dos resultados nos métodos, decorrente de decisões subjetivas como escolher o loci depois de ter observado o genótipo do réu, e do próprio método²:⁴⁰. Diversos debates sobre o uso da GTP em tribunal questionam a sua admissibilidade, mas a implementação mundial em laboratórios forenses apoia esta técnica². A GTP é, evidentemente, uma ferramenta chave para corrigir erros do passado. Através do novo software é possível rever facilmente casos antigos, e uma vez que são recomendados por comissões internacionais, torna-se imprescindível os laboratórios adotarem novas políticas para remediar a situação²⁸.

Apesar das questões apresentadas, a GTP reflete uma importância considerável na área forense, ao revelar-se bastante promissora para a avaliação de dados de MPS, uma tecnologia pertinente para perfis mistos complexos e para diferenças de sequências entre alelos indistinguíveis pelo comprimento (Figura 6) ².

Locus vWA														
Alelo 14	TCTA	TCTG	TCTA	TCTG	TCTG	TCTG	TCTG	TCTA	TCTA	TCTA	TCCA	TCTA	TCTA	TCTA
Alelo 14	TCTA	TCTG	TCTG	TCTG	TCTA									
Alelo 14	TCTA	TCTG	TCTG	TCTG	TCTG	TCTA								

Figura 6 - Sequência de nucleótidos de três alelos detetados no locus vWA. A classificação dos três alelos de igual comprimento corresponde ao mesmo alelo, o 14, mas a determinação da sua sequência permite fazer a sua distinção. Adaptado de Hadrill et al. (2021).

3.2.6. MPS

As tecnologias de MPS, também conhecidas como tecnologias de sequenciamento de próxima geração (*Next Generation Sequencing* - NGS), têm sido amplamente adotadas no campo forense nos últimos anos. Essas tecnologias revolucionaram o sequenciamento de DNA, permitindo a geração rápida e eficiente de milhões de leituras de sequenciamento numa única execução^{2; 41; 42; 43; 44}. O âmbito do MPS é vasto e, além de realizar a pesquisa de marcadores forenses “clássicos” de DNA (STRs controladas pelo banco de dados de DNA e da região de DNA mitocondrial), apresenta potencial para outros marcadores de DNA menos explorados na área criminal, por exemplo, novos STRs, polimorfismos nucleares de nucleotídeo único (*Single-Nucleotide Polymorphisms* - SNPs), marcadores de inserção/deleção e toda a sequência de DNA mitocondrial do genoma^{43; 45; 46; 47; 48}.

A plataforma MPS possui múltiplas vantagens, tais como incorporar num único fluxo de trabalho a análise simultânea de centenas ou milhares de diferentes marcadores de DNA, a detecção e confirmação da variação da sequência de nucleótidos nos marcadores predefinidos, incluindo as variantes nas regiões de repetição de STR e nas sequências adjacentes^{2; 43; 49} e melhora os resultados de amostras de DNA de baixo nível e degradadas, afiliado a *amplicons* (secções de DNA ou ácido ribonucleico (RNA) resultantes da amplificação e/ou replicação) mais curtos em comparação com o STR normal^{50; 51}. Estes atributos aumentam o poder discriminatório e são particularmente relevantes nos ensaios de DNA condicionados por amostras forenses de difícil compreensão⁵².

Embora o MPS tenha permitido o sequenciamento de alto rendimento de todos os genomas de diversos organismos, a abordagem forense é, por vezes, mais específica incluindo

uma amplificação inicial por PCR de um conjunto de marcadores alvo, submetendo posteriormente os *amplicons* oriundos do PCR por MPS ^{2; 53}.

Díspar do CE tradicional, o MPS consegue, portanto, analisar simultaneamente um maior número de loci com maior diversidade de alelos STR e poder discriminatório e, também, usar *amplicons* mais curtos, convergindo numa análise mais eficaz das provas biológicas degradadas e/ou de baixa quantidade. Sendo assim, esta tecnologia proporciona a distinção de alelos que seriam, frequentemente, indistinguíveis utilizando CE, método atualmente mais utilizado num contexto forense, demonstrando que o MPS é mais vantajoso na interpretação de perfis mistos complexos ^{2; 43; 54; 55; 56; 57; 58}.

Por um lado, há vários obstáculos que interferem com a adoção geral do MPS em aplicações forenses. Estes desafios incluem: (1) o desempenho oscilante de certos marcadores para determinados loci, (2) a suscetibilidade a inibidores do PCR em comparação com os kits convencionais de tipagem STR, (3) o elevado custo da tecnologia, (4) processos e etapas complexas e demoradas envolvidas na Biblioteca de DNA e preparação de moldes de DNA, indispensáveis para que a automação de procedimentos STR-MPS seja de alto rendimento e reprodutibilidade, (5) tecnologia MPS que requer ferramentas bioinformáticas mais potentes para o alinhamento de milhões de sequências STR, bem como a disponibilidade de servidores de armazenamento de dados MPS com maior capacidade para o armazenamento de uma grande quantidade de arquivos de dados de sequência, (6) algumas limitações para obter resultados de sequenciamento reproduzíveis de certos STRs forenses devido a complexidades de alinhamentos de sequência STR ^{43; 59; 60; 61; 62}. Um desafio particular é o desenvolvimento de um sistema de nomenclatura padronizado que seja capaz de capturar a variação das sequências dos alelos STR gerados por MPS, mantendo a compatibilidade com os dados STR baseados em CE existentes nas bases de dados nacionais de DNA ^{61; 63; 64}.

Por outro lado, o banco de dados sobre a frequência dos alelos detetados através de MPS está a aumentar graças ao conjunto de publicações no mundo ^{55; 65; 66}. Paralelamente, os custos das MPS estão constantemente a diminuir e, com o desenvolvimento de ferramentas bioinformáticas capazes de processar grandes volumes de dados, a implementação de tecnologias MPS em fluxos de trabalho forenses está cada vez mais acessível ². Os sistemas STR-MPS comerciais correntes que examinam diferentes conjuntos de STRs autossómicos, Y-STRs e X-STRs e são confiáveis, reprodutíveis, sensíveis e abundantemente concordantes com o CE em inúmeros estudos de validação forense. Estes estudos confirmam a conformidade do MPS com as diretrizes forenses de validação de DNA ^{55; 62; 67; 68; 69}.

4. Novas Técnicas de Aplicação Forense

4.1. Proteômica Forense

O proteoma é descrito como o conjunto total de proteínas de um organismo ou tecido articuladas em condições fisiológicas ou ambientais específicas⁷⁰. As proteínas, tipicamente um elemento dominante nas provas de casos criminais, são a matriz de muitas biomoléculas forenses relevantes, em particular o DNA que é uma molécula modelo no estudo forense⁷¹. Portanto, a Proteômica é o estudo do proteoma e das suas alterações, e uma disciplina deveras capaz de gerar uma extensa capacidade de dados e de aprofundar conhecimentos sobre os processos biológicos⁷⁰, que quando direcionado às ciências forenses, se designa Proteômica Forense.

Outrora, as proteínas eram a principal fonte de dados para a identificação⁷¹ e, equiparável à sequenciação completa do genoma, a proteômica oferece uma elevada especificidade molecular para um largo espectro de alvos numa única medição⁷⁰. No entanto, as proteínas presentes nas amostras recolhidas para prova são altamente complexas, contendo quantidades significativas de informação, difíceis de extrapolar corretamente com a tecnologia disponível na época^{70: 71}. Além do mais, grande parte dos ensaios biológicos dependem do reconhecimento biomolecular, tal como anticorpos e sequências de oligonucleótidos complementares, para alcançar especificidade, sendo demoroso e dispendioso⁷⁰.

A partir da dissolução da matriz proteica e da sua extração é realizada a sua análise. Os produtos da extração são mais abundantes e mais estáveis que o DNA e associados a semelhanças no percurso do DNA e do desenvolvimento tecnológico, pode-se aferir a adaptabilidade da tecnologia proteômica aos desafios contestados na implementação bioforense^{70: 71}. Numa amostra, onde o DNA já não está acessível aos investigadores num estado ótimo, mas sim, razoavelmente degradado, a maior durabilidade proteica é favorável⁷¹.

Os proteomas contêm polimorfismos de aminoácidos que remetem ao código genético do contribuidor da amostra, e, também, têm informações sobre a fonte tecidual, pertinente para uma investigação criminal⁷¹. Os progressos tecnológicos, sobretudo a espectrometria de massa, ultrapassou muitas das barreiras iniciais e melhorou o fluxo de trabalho para análises de marcadores e de varrimento, e a quantidade de informação requerida contextual e de identificação⁷¹, exigida para fins forenses. Este rigor na área proteômica é mesmo necessário, pois uma cautela acrescida na taxa de erro é fundamental na admissibilidade em tribunal, de acordo com a decisão do Supremo Tribunal dos EUA em *Daubert vs. MerrellDow Pharmaceuticals*⁷⁰.

4.1.1. Espectrometria de Massa Proteômica

Sucintamente, há quatro grandes inovações técnicas que marcaram a proteômica: Cromatografia líquida de alta resolução (*High-Pressure Liquid Chromatography* - HPLC), Ionização *ElectroSpray* (*ElectroSpray Ionization* - ESI), Espectrometria de Massa (*Mass Spectrometry* - MS) com detetor otimizado e *Peptide Spectral Matching* (PSM).

4.1.1.1. HPLC

HPLC é um método que aumenta o poder discriminatório de fracionamento de proteínas e peptídeos, derivados de pressões mais consistentes e elevadas e fluxos baixos a uma velocidade constante. Acoplado ao HPLC temos colunas de capilaridade de nano fluxo com diâmetros internos de 75µm que aumentam a sensibilidade^{71;72}.

4.1.1.2. ESI

Após eluição na coluna cromatográfica, está inserido o ESI, onde os péptidos são atomizados num campo elétrico forte com gases neutros sobreaquecidos. De seguida, o solvente ácido sublima as gotículas com os peptídeos que confere uma carga dentro dessa mesma gotícula. Por fim, o ião de peptídeo passa para o estado gasoso, ideal na manipulação de campos elétricos ESI. Esta volatilização é, deste modo, obtida por meios quimicamente suaves e sem degradação do péptido. Um feito que outrora seria impossível^{71;72}.

4.1.1.3. MS com detetor otimizado

Os espectrómetros de massa manipulam os iões de péptidos e, por avanços de engenharia no detetor de massa, a exatidão, precisão, frequência e sensibilidade foram melhorados. O mecanismo de separação iónica tem vários modelos, nomeadamente o quadrupolo. Essencialmente, seleciona e dirige os péptidos em gamas de massa distintos. Essa massa é posteriormente medida por meio de um *orbitrap*, ou seja, uma câmara colisão iónica de fragmentação^{71;73}. O detetor, neste momento mais otimizado, transforma o sinal biológico massa/carga (m/z) num sinal eletrónico, mais precisamente, num espectro de fragmentação altamente específico e reproduzível que expressa a sequência de aminoácidos na amostra. Este espectro inclui dados de iões visíveis, o respetivo rácio de intensidade, tempos de retenção, massa do péptido e padrão que são interpretadas pelo perito^{71;72}.

4.1.1.4. PSM

A sequenciação do genoma humano impactou, não só a revolução do DNA, mas, também, delineou o proteoma humano. Efetivamente, o padrão de fragmentação do péptido é único para um péptido particular, contudo a aferição dessa correspondência espectral é sujeita a incertezas. A associação retratada é muito complexa e requer restringir o número de sequências peptídicas previsíveis numa amostra com o intuito de simplificar a interpretação e chegar a conclusões mais seguras, que a nível da proteómica e bio informação, reduz o limiar de pesquisa. A engenharia moderna descrita, PSM, avalia cada correspondência observada na espectrometria e atribui valores estatísticos entre a massa teórica da base de dados e a massa dos fragmentos proveniente do espectro da amostra. Da informação retirada, conclui-se o intervalo de incerteza. Em todo o caso, o rigor judicial pede uma certeza no método, sem margem para erros fora do intervalo, sendo indispensável a sua correta validação⁷¹.

4.1.1.5. Shotgun Proteómica

A combinação destes fatores acima mencionados denomina-se *Shotgun* Proteómica.

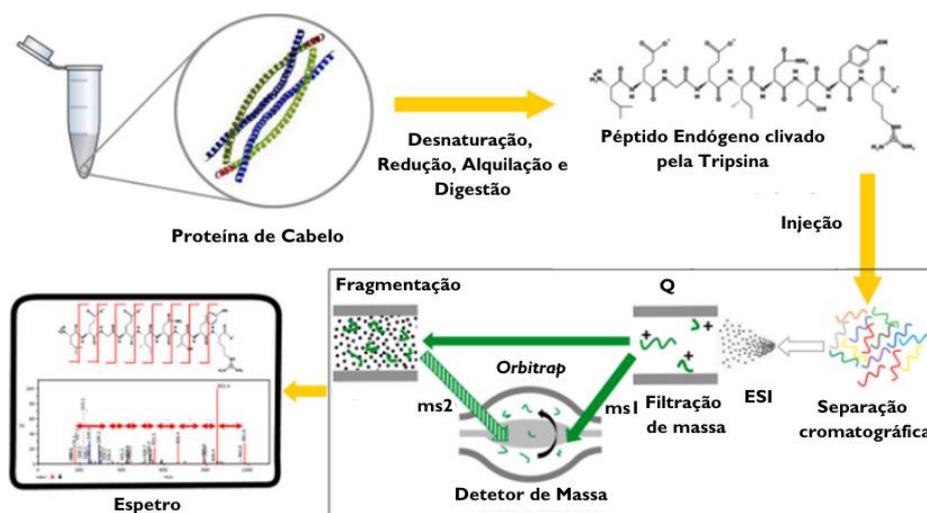


Figura 7 - Proteómica *Shotgun*. Na MS proteómica *shotgun*, as proteínas são digeridas com tripsina e tratadas quimicamente com redução e alquilação. A mistura complexa de péptidos obtida é separada por cromatografia. De seguida, são volatilizados por ESI e depois manipulados por MS para obter tanto a massa do péptido (MS1) como a massa dos fragmentos do péptido (MS2) por injeção no *orbitrap*. Os espectros dos fragmentos MS2 são depois comparados com os espectros da base de dados de proteínas do projeto do genoma humano. Adaptado de Parker et al. (2021).

Esta técnica é capaz de analisar proteoma com maior cobertura e capacidade de identificação, mas durante a digestão por tripsina, ocorrem milhões de variações de péptidos distintos, derivados de mais de 10.000 genes expressos em diversos tecidos. Esses péptidos apresentam abundâncias extremamente variadas, abrangendo mais de sete ordens de

grandeza, acabando por ser inevitável ocorrer variação associada a diferentes execuções. Na abordagem de proteómica *shotgun*, a seleção de péptidos para a fragmentação é altamente aleatória, o que significa que alguns deles podem não ser detetados em todas as sequências analisadas. Essa variabilidade pode levar a resultados inconsistentes na deteção de certos péptidos durante a análise^{71;74}.

A deteção de massa é um método dependente da concentração e como tal, limitada pela capacidade de aquisição do scanner que, em termos forenses, implica falta de provas por omissão. Uma estratégia eficiente para lidar com os efeitos estocásticos envolve utilizar a aquisição de dados focada para um conjunto conhecido de péptidos. A redução do espectro de análise, foca os recursos do instrumento convergindo numa maior sensibilidade de deteção, também conhecido por *Targeted Proteomics*^{71;72}.

A espectrometria de massa de triplo quadrupolo (QQQ) é a plataforma mais popular na emergência proteómica, amplamente utilizado em laboratórios de toxicologia clínica e forense. Nessa configuração, os péptidos são isolados com base nos valores *m/z* no quadrupolo 1 (Q1), posteriormente fragmentados no quadrupolo 2 (Q2) e, por fim, os iões de fragmentos específicos são selecionados para deteção no quadrupolo 3 (Q3)^{71;75}.

4.1.2. Principais Aplicações

4.1.2.1. Ossos

O osso é composto por uma estrutura reticulada de colagénio protetora da matriz óssea intrinsecamente ligada à estabilidade das proteínas de colagénio. A proteómica óssea do colagénio, já aplicada em contextos arqueológicos e paleontológicos, tem vantagens nas ciências forenses, em particular na determinação da espécie dos fragmentos ósseos encontrados num local do crime⁷⁰.

A nível do Intervalo *Post-Mortem* (IPM), estudos consideravelmente recentes apontam para capacidade de datar a idade biológica no momento da morte, através da medição da extensão de desaminação dos resíduos de asparagina, uma propriedade natural da sua fisiologia, comparando a abundância de marcadores proteicos previstos e os perfis gerais da proteómica⁷⁰. No caso de ossos humanos, *Single Amino Acid Polymorphisms* (SAAPs) de proteínas podem indicar o genótipo de um alelo SNP, bem como identificar a etnicidade de uma pessoa numa investigação criminal. Para além disso, também podem ser usadas na identificação de outras classes de amostras como, o cabelo^{70;76}.

4.1.2.2. Identificação proteica de fluido e tecido corporal

As entidades criminais procuram compreender a cena do crime, e saber explicar e identificar os vestígios, líquidos e outras provas encontradas é fulcral. A informação da natureza do fluido corporal é um objeto pertinente a ser investigado e a classificação dos fluidos corporais humanos recorrendo à proteómica permite menos testes para uma única amostra, requer menor quantidade de amostras e maior rendimento do procedimento laboratorial, ao contrário dos métodos químicos e bioquímicos convencionais⁷⁰.

O grande potencial da proteómica converge na sua habilidade de rastrear todos os tipos de fluidos corporais e detetar múltiplos marcadores proteicos simultaneamente. Através de *Untargeted Proteomics* recorrendo a grupos de marcadores para diversos fluidos biológicos é possível avaliar a presença ou ausência das proteínas, desde que seja enquadrado um algoritmo adequado à complexidade proteómica. Este método de trabalho já mostra sucesso para detetar biomarcadores de doenças humanas, sendo promissor para futuras execuções forenses. Porém, um importante desafio a considerar remete ao facto de que uma proteína abundantemente expressa num fluido e característica desse fluido, mesmo assim, pode estar presente noutro. Este problema reflete uma questão oportuna em tribunal. De modo a resolver esta questão, estudos relacionados com a abundância das proteínas por meio de algoritmos, mostra resultados promissores na previsão de vários tecidos e órgãos⁷⁰.

4.2. Comunidade Microbiana

O estudo do microbioma provocou grande impacto no contexto clínico de medicina personalizada de alta precisão, preventiva, diagnóstica e terapêutica, remetendo a vários estudos associando disbiose microbiana e o desenvolvimento patológico⁷⁷. O fundamento da ciência forense microbiana é descrito na caracterização dos microrganismos numa amostra, estabelecendo uma associação entre as comunidades bacterianas presentes e o local ou tecido corporal referente. A finalidade é correlacionar a amostra derivada do local do crime ou de uma vítima e um suspeito, com o propósito de identificá-lo⁷⁸. Porém, a ação prática deste princípio ainda não está bem sustentada no ramo da ciência forense.

A nível criminal, o Federal Bureau of Investigation (FBI) efetuou as primeiras investigações microbiológicas nos ataques biológicos com *Bacillus anthracis* por meio de envelopes. Os mesmos foram entregues a senadores americanos e a gabinetes de imprensa nos Estados Unidos. Infelizmente, as tecnologias não estavam adaptadas e havia dificuldade na

base de dados de estirpes de referência e na avaliação do valor das provas, acabando a investigação em 2011^{79; 80}.

O projeto Metagenomics of the Human Intestinal Tract relatou a presença de 3,3 milhões ($\times 10^6$) de genes não redundantes apenas no microbioma intestinal humano, um facto concordante com outros estudos sobre a grande diversidade do microbioma^{77; 81}. Aliás, a microbiota humana é constituída por 10-100 biliões ($\times 10^{12}$) de células microbianas simbióticas exclusivas de um hóspede humano^{81; 82; 83}, dispersas por várias comunidades bacterianas, distribuído por diferentes partes do corpo¹⁰. Exemplo disso, são a boca e o trato intestinal que possuem cerca de 200 e 400 espécies, respetivamente⁸³. Ademais, a singularidade deste ecossistema é aproximadamente 1,3 vezes superior ao número total de células humanas⁸⁴.

A microbiota humana é suscetível a uma panóplia de fatores, como idade, sexo, hábitos quotidianos, ocupação, localização geográfica e interações interpessoais, provando uma extensa diversificação capaz de distinguir países de origem, etnias e pessoas. De facto, a extensa série e a ubiquidade microbiana de cada indivíduo assinala uma característica notória para o fim criminal, agregado à sua competência de indicador geográfico, marcador temporal para determinação do IPM e conexão de animais, ambiente, pessoas e objetos ao suspeito. Para que tal método seja aplicado no contexto forense é importante desenvolver procedimentos operacionais harmonizados para a recolha, análise e interpretação de provas microbianas, bem como, criar uma base de dados robusta, de modo a auxiliar em processos criminais e esclarecer as causas de morte⁷⁷.

4.2.1. Aplicações

4.2.1.1. Identificação do Suspeito

Vários estudos apresentam resultados promissores sugerindo a identificação humana através de perfis microbianos autóctones, ou seja, indígena de um determinado ambiente. Apesar de os métodos ainda não terem a precisão e exatidão requeridos para tribunal, pesquisas no material genético microbiano, metagenoma, tem um impacto promissor nos casos de DNA humano insuficiente e de falta de pistas benéficas no decorrer da investigação, na qual a sua aplicabilidade é mais concordante com a realidade atual^{85; 86}.

4.2.1.2. Estudos do Projeto do Microbioma Humano

Cientistas da Universidade de Harvard realizaram uma pesquisa envolvendo 242 voluntários que participaram no Projeto do Microbioma Humano (*Human Microbiome Project*

- HMP). Nesse estudo, eles analisaram o microbioma presente na saliva, pele, fezes e outras partes do corpo desses indivíduos. O objetivo principal foi avaliar se o microbioma poderia ser uma ferramenta única e estável para identificar pessoas de forma distinta e efetivamente confirmaram características microbianas suficientes para identificar cada indivíduo de maneira singular. Além de que uma característica ao nível do gene é mais viável para identificação que um atributo remetente ao táxon, com poucas ocorrências de falsos positivos e, também, estabilidade superior de fezes microbianas (80% é identificável após um ano) comparativamente à pele e zonas vaginais, mais afetadas por interferentes. Contudo, superfícies corporais, tal como pele e cabelo, transmitem facilmente a sua microbiota a outros indivíduos ou à superfície de um objeto por contacto, uma qualidade desejável ao cenário criminal^{85; 86}.

4.2.1.3. Origem da Amostra

Numa investigação forense, a formulação hipotética dos eventos que sucedem num ato criminal é crucial. A habilidade de correlacionar uma amostra a uma parte específica do corpo e ao seu contribuidor pode ser o segredo para desvendar o crime. O microbioma atesta a essa particularidade e até à data há vários estudos, cujo foco são as diferentes partes do corpo (pele, manúbrio, superfície palmar da mão, planta do pé), que relacionam ao sujeito corretamente⁸⁵. Além disso, o crescente conhecimento da microbiota humana fortalece a correlação de uma determinada bactéria, ou série de bactérias ou outras naturezas de microrganismos, a um componente corporal (Tabela 1).

Tabela 1 - Possíveis Indicadores Corporais

Local	Comunidade Microbiana
Mãos (1)	<i>Micrococcus sp.</i> e <i>Staphylococcus sp.</i> / <i>Propionibacteria</i> (2) / <i>Firmicutes</i> (3)
Secreções vaginais	<i>Lactobacillus sp.</i>
Fezes	<i>Firmicutes</i> e <i>Bacteroidetes</i>
Pelo púbico feminino	<i>Lactobacillus sp.</i>
Genitais Masculinos	<i>Corynebacterium sp.</i>
Esperma (4)	<i>Lactobacillus sp.</i> e <i>Staphylococcus sp.</i>
Cavidade Oral	<i>Streptococcus salivarius</i>

(1) Microbiota das mãos é sujeita a alterações por isso menos confiável que uma impressão digital. (2) Comum em adultos. (3) Comum em crianças. (4) Parâmetro não influenciado pela qualidade do esperma¹⁰.

4.2.1.4. Microbioma Ambiental

Os micróbios são intervenientes naturais e comuns de todos os espaços que habitamos e nós contribuímos para esse ambiente através da nossa “nuvem microbiana” que se propaga por meio de partilha microbiana no ar, ou através da pele por contacto, entre outras. Esta característica microbiana de transferência afeta o espaço habitado pelo seu hospedeiro e coabitantes do mesmo local. A microbiota pode estender-se a superfícies quer por contacto quer por via aérea e entre os próprios objetos, explicando a convergência cutânea frequente no mesmo agregado familiar^{87;88}. A partir desta rede de partilha é possível comparar um perfil de uma casa, onde houve um assassinato, a um suspeito e se houver similaridades no microbioma cutâneo do mesmo, é inferida a sua presença no local do crime⁸⁶. A par disso, o uso de objetos pessoais e usuais como telemóveis, computadores e sapatos tem, particularmente interesse, devido à ligação direta a um indivíduo e o *habitat* microbiano do objeto que pode identificá-lo e até, especialmente no último exemplo, rastreá-lo^{89; 90}. Assim sendo, o microbioma ambiental, principalmente os objetos inanimados albergam analitos importantes de cariz judicial.

4.2.1.5. Abusos Sexuais

A flexibilidade dos microrganismos no âmbito criminal abrange diferentes propósitos, até de natureza sexual, mais concretamente quando os recursos de outro género de prova são limitados⁷⁷. Um estudo recente analisou o microbioma púbico de vítimas e constatou que 10% provinha do transgressor⁹¹. Mediante esta noção, a presença de microbioma púbico da vítima no agressor sexual e vice-versa é sugestivo de transferência por contacto direto que pode vir a ser usado como prova num processo do tribunal. A aplicabilidade da microbiota genital na resolução de casos de abusos sexuais já emergiu no contexto policial. Efetivamente, alguns casos criminais já praticaram esta ideologia através de populações microbianas fecais e vaginais em situações de penetração anal, vaginal e digital que implicam culpabilidade no ato, permitindo a condenação pelo tribunal¹⁰.

4.2.1.6. Métodos de Análise do Metagenoma

4.2.1.6.1. Análise de fusão de alta resolução (HRM)

A HRM é uma técnica poderosa para detetar distinções na sequência genética e estados de metilação⁹². A tecnologia HRM é apropriada a amostras de esfregaços orais utilizando o gene 16S RNA ribossómico (RNAr). Desta forma demonstra o seu potencial na distinção entre indivíduos, porém, num tamanho amostral reduzido (n=5)⁸⁵.

4.2.1.6.2. *Shotgun* acoplado a hidSkinPlex®

Um novo método foi concebido para identificar indivíduos aproveitando o metagenoma. A abordagem inclui a sequenciação metagenômica *shotgun* que é utilizado para reconstruir genomas de organismos separadamente e gerar fragmentos aleatórios dos genomas do sistema microbiano ambiental, tudo de forma minuciosa, caracterizando uma comunidade⁹³. Pelo recurso a esta tecnologia *Shotgun*, foi estudada a variabilidade nucleotídica dos microbiomas cutâneos como meio de identificação e introduzindo o hidSkinPlex®, um painel *multiplex* de sequenciação que utiliza marcadores específicos de clados do microbioma da pele para identificar um perfil específico^{86; 94}. O recurso a clados específicos permite a identificação mais segura de um grupo taxonômico biológico relacionado a um ancestral comum⁹⁵. O resultado da atribuição do hospedeiro aos respectivos perfis gerados obteve uma exatidão de 92% a 100%. Numa outra técnica foi instituído o hidSkinPlex+® que contém 365 polimorfismos de nucleotídeo único ou SNPs, alcançando um conjunto de marcadores aprimorado, nomeadamente, mais pequeno e mais robusto, e com exatidão de 95%^{86; 96}.

4.2.1.6.3. Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR)

A técnica CRISPR associado à endonuclease 9 (Cas9) representa uma abordagem inovadora e foi adaptada a partir do sistema imunológico natural das bactérias, usando a sua função fisiológica de proteção de procariontes de elementos genéticos móveis, nomeadamente vírus. A CRISPR-Cas9 utiliza uma única sequência de RNA guia (RNAg) e Cas9. A RNAg é uma combinação de RNA-CRISPR (crRNA), que é complementar à sequência de DNA alvo, e o crRNA de ativação em trans (tracrRNA). Este sistema trabalha em harmonia com o fim de completar o processo de edição genética, no qual o tracrRNA identifica as proteínas Cas9 e liga-se a elas e, posteriormente, o RNAg dirige todo o complexo para o local alvo, onde é identificado e ligado o complexo ribonucleoproteína RNAg/Cas9 à sequência pretendida de DNA alvo. Por fim, a Cas9 permite quebras de cadeia dupla e, mais tarde, a reparação do DNA, através de sequências de DNA personalizadas ou pelo mecanismo natural do hospedeiro, finaliza o processo de manipulação genética. O método CRISPR-Cas9 é notável pela sua rentabilidade e capacidade de produção em grande escala, o que a torna útil numa ampla variedade de aplicações^{97; 98}.

A relevância destes marcadores é o do rastreamento da história de infeções bacterianas, chegando a conclusões sobre a sua filogenética eficazmente. Uma possível metodologia consiste na extrapolação de dados da análise de metagenômica *shotgun* da pele

humana de matrizes CRISPR com o propósito de definir a singularidade. A tipagem CRISPR atingiu uma exatidão de 95,2%, demonstrando um elevado polimorfismo⁸⁶.

4.2.1.7. IPM

Numa visão forense, os micro-organismos apresentam um papel imprescindível na decomposição de restos mortais⁷⁷. As alterações das comunidades microbianas podem ser analisadas para estimar o IPM. De facto, verifica-se que as comunidades microbianas mudam consoante a decomposição do cadáver, definindo um "relógio microbiano". Como já foi discutido, os seres humanos carregam uma extensa comunidade microbiana dentro e fora do seu corpo, que interage constantemente com o meio envolvente e o alteram^{77:99}. Sucintamente, há duas formas de decomposição microbiana: Tanatomiobioma, que é o estudo dos microorganismos encontrados nos órgãos internos e nas cavidades após a morte e comunidades epinecroticas, que comportam a pesquisa de procariotas, fungos, protistas e eucariotas localizados na superfície humana. A degradação da matéria orgânica, incluindo a decomposição de cadáveres, é influenciada por fatores biológicos, tais como enzimas celulares, bactérias, fungos, protozoários, insetos e predadores, bem como por fatores não biológicos relacionados ao ambiente, como a humidade e as condições climáticas¹⁰.

A identificação das comunidades microbianas pode ser efetuada através de marcadores, como por exemplo moléculas do RNAr 16S. No decorrer de um estudo sobre a variação de padrões na comunidade bacteriana do intestino após a morte humana, foi utilizado a sequenciação do gene 16S RNAr. Os resultados observados permitiram concluir o decréscimo da população da ordem *Bacteroidales* ao longo do tempo, em contraste de um acréscimo da população da classe *Clostridiales* e *Gammaproteobacteria* associado às moscas. A utilização deste método em investigações forenses é limitada principalmente devido à ausência de um modelo preditivo com base num conjunto suficiente de amostras de cadáveres humanos⁸⁶.

Nas primeiras 48 horas, o "relógio" microbiano é mais fidedigno em circunstâncias que o cadáver está fresco e não contaminado por microrganismos do solo. Ultrapassando esta faixa, a taxa de erro aumenta ao longo do tempo e conforme a evolução do estado do cadáver para uma fase de decomposição avançada, a incerteza do método muda para 5 a 7 dias. Nas ocasiões na qual só resta o esqueleto, os micróbios vinculados aos ossos podem ajudar a aferir o IPM¹⁰⁰.

4.2.1.8. Localização Geográfica

O microbioma ambiental institui um forte recurso forense, proveniente do aumento de amostragem em diferentes escalas e orientações espaciais. O perfil microbiano tem reportado diferenças consideráveis entre residências, escritórios, cidades e países. Congruentemente, presumindo informação suficiente, algoritmos estatísticos apropriados e métodos mais rigorosos, o microbioma proporciona a previsão de localização espacial e temporal de uma amostra e rastrear a “pegada” biológica de um suspeito até às suas raízes, provando ser uma ferramenta cada vez mais concebível. Nessa mesma linha de pensamento são até verificados marcadores de altitude (*Arthrobacter sp.*, *Paenibacillus sp.* e *Carnobacterium sp.*) de acordo com um estudo feito no Tibete⁸⁵. Decerto, um auspicioso “Global Positioning System (GPS)” orgânico forense.

4.2.2. DNA VS Microbioma

A análise do DNA, um dos procedimentos jurídicos predileto, destaca-se, muitas vezes unilateralmente, de muitas outras abordagens analíticas forenses. Não obstante, o DNA humano é mais afetado à degradação que o DNA bacteriano resultante da forma circular e membrana bacteriana. Paralelamente, o microbioma humano contém mais de um milhão de genes, que ronda um valor 500 vezes superior ao número de genes no genoma humano⁸⁶. Além de uma resistência e especificidade superior, o microbioma apresenta uma distribuição pelas diferentes partes do corpo única e estável por um tempo considerável. Incoerente com os progressos no DNA, ainda existem muitos casos criminais não resolvidos até à data. A necessidade de aprimorar os elementos de prova é crucial para conectar o autor do crime ao local onde ocorreu o delito e as tecnologias NGS podem auxiliar o estudo do microbioma humano em diferentes órgãos, como uma alternativa promissora aos métodos forenses atuais, dado que as bactérias estão presentes de forma ubíqua em todas as partes do corpo, e cada indivíduo possui seu próprio microbioma exclusivo¹⁰.

5. Conclusão e Considerações Finais

Em toda a história das ciências forenses, o momento mais impactante foi sem dúvida, a técnica de impressão digital do DNA. Aliado às inúmeras evidências científicas, o DNA revolucionou o sistema criminal moldando a realidade da justiça e as investigações criminais. Além do seu perfil único para identificação, nenhuma tecnologia na época era capaz de se comparar à sua relevância na ciência forense. O mesmo se verifica na atualidade, um verdadeiro GS.

Contudo, o seu percurso não foi ideal. Situações onde são utilizados vestígios, requerem um pensamento crítico cauteloso. Vários casos de injustiças associados ao abuso de programas estatísticos não validados e irrealistas, como o CPI, para amostras de difícil interpretação com múltiplos contribuidores, quantidades reduzidas e contaminações, puseram em causa a confiança no perito forense. Apesar das novas tecnologias, como TrueAllele[®], utilizarem enquadramentos estatísticos apropriados, a segurança nas conclusões tiradas de amostras vestigiais com baixa qualidade de DNA deve ser auxiliada de inovações na bioestatística e de métodos mais eficazes para a obtenção de leituras mais esclarecedoras do perfil de DNA, como os NGS, na qual um dos líderes tecnológicos é o MPS.

Outra barreira, é a interpretação de provas pelas entidades da justiça. O quotidiano científico presente é muito mais complicado que o representado na televisão, bem como, causalidade e efeito não são obrigatoriamente correlações diretas. Facilmente o DNA pode depositar-se no local do crime a um instante diferente do previsto, bem como, pode “viajar” por transferência, acabando por ser incógnita a sua origem. Consequentemente, a habilidade, outrora difícil, de recolher e analisar amostras vestigiais, levantou estas novas preocupações. Numa perspetiva internacional, o conhecimento sobre as capacidades, limitações e implicações de provas periciais, especialmente de DNA, das entidades da justiça, devem ser corretamente estimadas, de modo a não serem iludidos por frases e discursos sobre dados estatísticos e científicos com conotações falaciosas.

Para confrontar todos estes desafios, o ideal seria ter alternativas para auxiliar a investigação policial, perante amostras de DNA de qualidade reduzida ou quantidade nula. De facto, duas disciplinas se destacam: A Proteómica e o Microbioma.

A abordagem da Proteómica já possui fundamentos nas ciências forenses, mas ainda exige um crescimento tecnológico alargado, especialmente na reprodutibilidade para ser instituído. Esta revolução iniciou-se maioritariamente por via do desenvolvimento do método *Shotgun* Proteómica, aprimorando a análise proteica. Os atributos desejáveis desta vertente e motivos para a sua importância, caracterizam-se pela abundância na matriz das amostras e estabilidade superior ao DNA, conjugado com as suas aplicações na datação e identificação de um indivíduo associado ao colagénio ósseo e identificação de fluidos e tecidos corporais.

A nível do Microbioma, a sua emergência nas ciências forenses ainda é ténue. Contudo, o seu potencial como prova de distinção de indivíduos, surge da sua variabilidade e resistência superior ao DNA, e a sua utilização já foi constatada em investigações criminais, tais como abusos sexuais. A ubiquidade microbiana, acrescida da sua versatilidade para localização

geográfica, origem ambiental e corporal da amostra, identificação e IPM, ilustra a sua importância nas ciências forenses. Contudo, os métodos utilizados para a metagenómica precisam de um maior espectro amostral de estudos e de resultados mais precisos e exatos.

Ambas as vertentes inovadoras apresentadas revelam ser promissoras e até num futuro mais próximo serem ferramentas mais relevantes no panorama forense para auxílio da investigação criminal. A possibilidade de aplicação real na metodologia forense provém dos novos meios de sequenciação, tal como o MPS, que acarreta ferramentas bioinformáticas mais sofisticadas capazes de processar grandes volumes de dados. No entanto, limitações bioinformáticas no alinhamento de múltiplas sequências e a dificuldade dos servidores de armazenamento de dados em processar níveis elevadíssimos de informação são problemas que as tecnologias MPS, DNA, microbioma e proteómica precisam de enfrentar.

Na visão das ciências forenses, a gestão de qualidade de processos e procedimentos forenses devem ser corretamente validados e direcionados para investigação criminal, de modo a alcançar alta precisão e exatidão. Para chegar a esses critérios as semelhanças, conhecimentos e técnicas retiradas de uma disciplina são transponíveis para outras. A partir do aumento dos estudos, otimizações em bioinformática, sequenciamento e eficácia dos métodos desenhados para as ciências forenses, a possibilidade de ter grandes bases de dados, organizar sequencias complexas, ter um GPS biológico mundial e analisar amostras de difícil interpretação com múltiplas variáveis, aproxima-se cada vez mais da realidade.

Por último, o foco do DNA para procedimentos forenses no sistema judicial e na investigação policial, “cega” a busca pela verdade, pois, a análise do DNA é um método, não é detetive, é apenas uma “peça do puzzle”. Inclusivamente, *softwares* estatísticos não incluem fatores desconhecidos como falsificações de provas. A todo um fundamento pericial deve ser aliado uma boa investigação criminal. Por conseguinte, o facto do DNA ser o GS atual e futuro, não invalida a procura de outros meios para identificação de indivíduos, especialmente nas situações em que o DNA se encontra limitado.

Bibliografia

1. YourGenome - **What is a DNA fingerprint?**. [Acedido a 14 de julho 2023]. Disponível na Internet: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-a-dna-fingerprint/>.
2. HADDRILL, Penelope R. - Developments in forensic DNA analysis. **Emerging Topics in Life Sciences**. ISSN 2397-8554. 5:3 (2021) 381–393. doi: 10.1042/ETLS20200304.
3. ROEWER, Lutz - DNA fingerprinting in forensics: Past, present, future. **Investigative Genetics**. ISSN 20412223. 4:1 (2013) 1–10. doi: 10.1186/2041-2223-4-22/FIGURES/6.
4. BUTLER, John M. - The future of forensic DNA analysis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. ISSN 14712970. 370:1674 (2015). doi: 10.1098/RSTB.2014.0252.
5. MCCORD, Bruce R. *et al.* - Forensic DNA Analysis. **Analytical chemistry**. ISSN 1520-6882. 91:1 (2019) 673–688. doi: 10.1021/ACS.ANALCHEM.8B05318.
6. STIFFELMAN, Bess - No Longer the Gold Standard: Probabilistic Genotyping is Changing the Nature of DNA Evidence in Criminal Trials. 2019). doi: 10.15779/Z384Q7QQ6X.
7. SCHWEITZER, N. J.; SAKS, Michael J. - The CSI Effect: Popular Fiction About Forensic Science Affects the Public's Expectations About Real Forensic Science. **Jurimetrics**. 47:3 (2007) 357–364.
8. PERLIN MARK - When DNA Is Not a Gold Standard Failing to Interpret Mixture Evidence. **The Champion**. 42:4 (2018) 50–56.
9. SUSAN M. BALLOU; MARGARET C. KLINE; MARK D. STOLOROW - **The Biological Evidence Preservation Handbook: Best Practices for Evidence Handlers**. 2013. [Acedido a 25 de julho 2023]. Disponível na Internet: <https://doi.org/10.6028/NIST.IR.7928>.
10. GOUELLO, Audrey *et al.* - Analysis of Microbial Communities: An Emerging Tool in Forensic Sciences. **Diagnostics**. ISSN 20754418. 12:1 (2022). doi: 10.3390/DIAGNOSTICS12010001.
11. ROUX, Claude *et al.* - The end of the (forensic science) world as we know it? The example of trace evidence. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**. ISSN 1471-2970. 370:1674 (2015). doi: 10.1098/RSTB.2014.0260.

12. PORTIN, Petter - The birth and development of the DNA theory of inheritance: sixty years since the discovery of the structure of DNA. **Journal of genetics**. ISSN 0973-7731. 93:1 (2014) 293–302. doi: 10.1007/S12041-014-0337-4.
13. WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. - Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. **Nature**. ISSN 1476-4687. 171:4361 (1953) 964–967. doi: 10.1038/171964b0.
14. VARSHA - DNA Fingerprinting in the Criminal Justice System: An Overview. **DNA and Cell Biology**. 25:3 (2006) 181–188. doi: 10.1089/dna.2006.25.181.
15. WEIR, Bruce S. - THE RARITY OF DNA PROFILES. **The annals of applied statistics**. 1:2 (2007) 358. doi: 10.1214/07-AOAS128.
16. LETTS, Brandon - Mitochondrial DNA and its use in the forensic analysis of skeletal material. **Forensic Genetic Approaches for Identification of Human Skeletal Remains**. 2023) 213–230. doi: 10.1016/B978-0-12-815766-4.00010-8.
17. JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. - Individual-specific «fingerprints» of human DNA. **Nature**. ISSN 0028-0836. 316:6023 (1985) 76–79. doi: 10.1038/316076A0.
18. EDWARDS, A. *et al.* - DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Human Genetics**. ISSN 00029297. 49:4 (1991) 746.
19. OLDONI, Fabio; PODINI, Daniele - Forensic molecular biomarkers for mixture analysis. **Forensic Science International: Genetics**. ISSN 1872-4973. 41:2019) 107–119. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2019.04.003.
20. ALONSO, A. *et al.* - Amplified fragment length polymorphism analysis of the VNTR locus DIS80 in central Spain. **International Journal of Legal Medicine**. ISSN 09379827. 105:6 (1993) 311–314. doi: 10.1007/BF01222113.
21. BROWN, Tracey *et al.* - **Making Sense of Forensic Genetics**. [Acedido a 20 de julho 2023]. Disponível na Internet: <https://senseaboutscience.org/wpcontent/uploads/2017/01/making-sense-of-forensic-genetics.pdf>.
22. KEERTI, Akshunna; NINAVE, Sudhir - DNA Fingerprinting: Use of Autosomal Short Tandem Repeats in Forensic DNA Typing. **Cureus**. 14:10 (2022). doi: 10.7759/CU REUS.30210.

23. GOOR, Robert M. *et al.* - A Mathematical Approach to the Analysis of Multiplex DNA Profiles. **Bulletin of mathematical biology**. ISSN 00928240. 73:8 (2011) 1909. doi: 10.1007/S11538-010-9598-0.
24. APOSTOLOV, Aleksandar - Differentiation of mixed biological traces in sexual assaults using DNA fragment analysis. **Biotechnology, Biotechnological Equipment**. ISSN 13102818. 28:2 (2014) 301. doi: 10.1080/13102818.2014.909171.
25. PANNEERCHELVAM, S.; NORAZMI, M. Nor - Forensic DNA Profiling and Database. **The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS**. ISSN 1394195X. 10:2 (2003) 20.
26. THOMPSON, William C.; SCHUMANN, Edward L. - Interpretation of statistical evidence in criminal trials - The Prosecutor's Fallacy and the Defense Attorney's Fallacy. **Law and Human Behavior**. ISSN 01477307. 11:3 (1987) 167–187. doi: 10.1007/BF01044641.
27. GARRETT, Brandon L. *et al.* - INVALID FORENSIC SCIENCE TESTIMONY AND WRONGFUL CONVICTIONS. **VIRGINIA LAW REVIEW**. 95:1 (2009).
28. HAMPIKIAN, Greg - Correcting forensic DNA errors. **Forensic Science International: Genetics**. ISSN 18780326. 41:2019) 32–33. doi: 10.1016/j.fsigen.2019.03.005.
29. KELLY, Hannah *et al.* - The interpretation of low level DNA mixtures. **Forensic science international. Genetics**. ISSN 1878-0326. 6:2 (2012) 191–197. doi: 10.1016/J.FSI GEN.2011.04.013.
30. GILL, P. *et al.* - Interpreting simple STR mixtures using allele peak areas. **Forensic Science International**. ISSN 03790738. 91:1 (1998) 41–53. doi: 10.1016/S0379-0738(97)00174-6.
31. NIZAMI, Syed B. *et al.* - Omics Approaches in Forensic Biotechnology: Looking for Ancestry to Offence. **Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life**. 1:2018) 111–129. doi: 10.1016/B978-0-12-804659-3.00006-3.
32. United Nations - **Global Issues: Population**. [Acedido a 26 de julho 2023]. Disponível na Internet: www.un.org/en/global-issues/population.
33. WANG, Tsewei - Commentary on Perlin MW, Szabady B. Linear mixture analysis: a mathematical approach to resolving mixed DNA samples. *J Forensic Sci* 2001;46(6):1372-78. **Journal of forensic sciences**. ISSN 0022-1198. 47:5 (2002) 1176; author reply 1177. doi: 10.1520/jfs15488j.

34. KELLY, Hannah *et al.* - A comparison of statistical models for the analysis of complex forensic DNA profiles. **Science & Justice**. ISSN 1355-0306. 54:1 (2014) 66–70. doi: 10.1016/J.SCIJUS.2013.07.003.
35. BIEBER, Frederick R. *et al.* - Evaluation of forensic DNA mixture evidence: protocol for evaluation, interpretation, and statistical calculations using the combined probability of inclusion. **BMC genetics**. ISSN 1471-2156. 17:1 (2016). doi: 10.1186/S12863-016-0429-7.
36. BILLE, Todd; BRIGHT, Jo Anne; BUCKLETON, John - Application of random match probability calculations to mixed STR profiles. **Journal of forensic sciences**. ISSN 1556-4029. 58:2 (2013) 474–485. doi: 10.1111/1556-4029.12067.
37. PERLIN, Mark W.; SINELNIKOV, Alexander - An Information Gap in DNA Evidence Interpretation. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 4:12 (2009) 8327. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0008327.
38. PERLIN, Mark William - Inclusion probability for DNA mixtures is a subjective one-sided match statistic unrelated to identification information. **Journal of Pathology Informatics**. ISSN 21533539. 6:1 (2015) 59. doi: 10.4103/2153-3539.168525.
39. Executive Office of the President President’s Council of Advisors on Science and Technology - **Forensic Science in Criminal Courts: Ensuring Scientific Validity of Feature-Comparison Methods**. 2016. [Acedido a 17 de julho 2023]. Disponível na Internet: https://obamawhitehouse.archives.gov/sites/default/files/microsites/ostp/PCAST/pcast_forensic_science_report_final.pdf
40. CURRAN, James M.; BUCKLETON, John - Inclusion probabilities and dropout. **Journal of forensic sciences**. ISSN 1556-4029. 55:5 (2010) 1171–1173. doi: 10.1111/J.1556-4029.2010.01446.X.
41. MCCORD, Bruce; LEE, Steven B. - Novel Applications of Massively Parallel Sequencing (MPS) in Forensic Analysis. **ELECTROPHORESIS**. ISSN 1522-2683. 39:21 (2018) 2639–2641. doi: 10.1002/ELPS.201870175.
42. KAYSER, Manfred; PARSON, Walther - Transitioning from Forensic Genetics to Forensic Genomics. **Genes 2018, Vol. 9, Page 3**. ISSN 2073-4425. 9:1 (2017) 3. doi: 10.3390/GENES9010003.
43. ALONSO, Antonio *et al.* - Current state-of-art of STR sequencing in forensic genetics. **Electrophoresis**. ISSN 15222683. 39:21 (2018) 2655–2668. doi: 10.1002/ELPS.201800030.

44. AALBERS, Sanne E.; WEIR, Bruce S. - Analyzing population structure for forensic STR markers in next generation sequencing data. **Forensic Science International: Genetics**. ISSN 1872-4973. 49:2020) 102364. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2020.102364.
45. CHO, Sohee *et al.* - Kinship Testing Based on SNPs Using Microarray System. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**. ISSN 16603818. 43:6 (2016) 429. doi: 10.1159/000446322.
46. PHILLIPS, C. *et al.* - Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. **Forensic science international. Genetics**. ISSN 1878-0326. 1:3–4 (2007) 273–280. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2007.06.008.
47. KAYSER, Manfred - Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. **Forensic science international. Genetics**. ISSN 1878-0326. 18:2015) 33–48. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2015.02.003.
48. PARSON, Walther *et al.* - Evaluation of next generation mtGenome sequencing using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM). **Forensic Science International. Genetics**. ISSN 18724973. 7:5 (2013) 543. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2013.06.003.
49. BORSUK, Lisa A. *et al.* - Sequence-based US population data for the SE33 locus. **Electrophoresis**. ISSN 1522-2683. 39:21 (2018) 2694–2701. doi: 10.1002/ELPS.201800091.
50. ZHANG, Qingzhen *et al.* - Evaluation of the performance of Illumina's ForenSeq™ system on serially degraded samples. **Electrophoresis**. ISSN 1522-2683. 39:21 (2018) 2674–2684. doi: 10.1002/ELPS.201800101.
51. SHIH, Shelly Y. *et al.* - Applications of Probe Capture Enrichment Next Generation Sequencing for Whole Mitochondrial Genome and 426 Nuclear SNPs for Forensically Challenging Samples. **Genes**. ISSN 2073-4425. 9:1 (2018). doi: 10.3390/GENES9010049.
52. JÄGER, Anne C. *et al.* - Developmental validation of the MiSeq FGx Forensic Genomics System for Targeted Next Generation Sequencing in Forensic DNA Casework and Database Laboratories. **Forensic Science International: Genetics**. 28:2017) 52–70. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.01.011.
53. KNIJFF, Peter DE - From next generation sequencing to now generation sequencing in forensics. **Forensic Science International: Genetics**. ISSN 18780326. 38:2019) 175–180. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.10.017.

54. NOVROSKI, Nicole M. M. *et al.* - Expanding beyond the current core STR loci: An exploration of 73 STR markers with increased diversity for enhanced DNA mixture deconvolution. **Forensic science international. Genetics**. ISSN 1878-0326. 38:2019) 121–129. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2018.10.013.
55. GAAG, Kristiaan J. VAN DER *et al.* - Massively parallel sequencing of short tandem repeats-Population data and mixture analysis results for the PowerSeq™ system. **Forensic science international. Genetics**. ISSN 1878-0326. 24:2016) 86–96. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2016.05.016.
56. BALLARD, David; WINKLER-GALICKI, Jakub; WESOŁY, Joanna - Massive parallel sequencing in forensics: advantages, issues, technicalities, and prospects. **International Journal of Legal Medicine**. ISSN 14371596. 134:4 (2020) 1291. doi: 10.1007/S00414-020-02294-0.
57. GETTINGS, Katherine Butler *et al.* - Sequence-based U.S. population data for 27 autosomal STR loci. **Forensic science international. Genetics**. ISSN 18780326. 37:2018) 106. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2018.07.013.
58. DAVENPORT, Lucinda *et al.* - Forensic identity SNPs: Characterisation of flanking region variation using massively parallel sequencing. **Forensic Science International: Genetics**. ISSN 1872-4973. 64:2023) 102847. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2023.102847.
59. SIDSTEDT, Maja *et al.* - The impact of common PCR inhibitors on forensic MPS analysis. **Forensic Science International: Genetics**. ISSN 1872-4973. 40:2019) 182–191. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2019.03.001.
60. ELWICK, Kyleen *et al.* - Comparative tolerance of two massively parallel sequencing systems to common PCR inhibitors. **International journal of legal medicine**. ISSN 1437-1596. 132:4 (2018) 983–995. doi: 10.1007/S00414-017-1693-4.
61. GETTINGS, Katherine Butler *et al.* - STRSeq: A catalog of sequence diversity at human identification Short Tandem Repeat loci. **Forensic science international. Genetics**. ISSN 1878-0326. 31:2017) 111–117. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2017.08.017.
62. BALLARD, David; WINKLER-GALICKI, Jakub; WESOŁY, Joanna - Massive parallel sequencing in forensics: advantages, issues, technicalities, and prospects. **International journal of legal medicine**. ISSN 1437-1596. 134:4 (2020) 1291–1303. doi: 10.1007/S00414-020-02294-0.

63. BUTLER, John M. - Recent advances in forensic biology and forensic DNA typing: INTERPOL review 2019–2022. **Forensic Science International: Synergy**. ISSN 2589-871X. 6:2023) 100311. doi: 10.1016/J.FSISYN.2022.100311.
64. PARSON, Walther *et al.* - Massively parallel sequencing of forensic STRs: Considerations of the DNA commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG) on minimal nomenclature requirements. **Forensic science international. Genetics**. ISSN 1878-0326. 22:2016) 54–63. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2016.01.009.
65. NOVROSKI, Nicole M. M. *et al.* - Characterization of genetic sequence variation of 58 STR loci in four major population groups. **Forensic science international. Genetics**. ISSN 1878-0326. 25:2016) 214–226. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2016.09.007.
66. KIM, Se Yong *et al.* - Massive parallel sequencing of short tandem repeats in the Korean population. **Electrophoresis**. ISSN 1522-2683. 39:21 (2018) 2702–2707. doi: 10.1002/ELPS.201800090.
67. GETTINGS, Katherine Butler *et al.* - STRSeq: A catalog of sequence diversity at human identification Short Tandem Repeat loci. **Forensic Science International: Genetics**. ISSN 18780326. 31:2017) 111–117. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.08.017.
68. BRUIJNS, Brigitte; TIGGELAAR, Roald; GARDENIERS, Han - Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review. **Electrophoresis**. ISSN 15222683. 39:21 (2018) 2642–2654. doi: 10.1002/ELPS.201800082.
69. YOUNG, Brian *et al.* - A technique for setting analytical thresholds in massively parallel sequencing-based forensic DNA analysis. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 12:5 (2017). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0178005.
70. MERKLEY, Eric D. *et al.* - Applications and challenges of forensic proteomics. **Forensic science international**. ISSN 1872-6283. 297:2019) 350–363. doi: 10.1016/J.FORSCIINT.2019.01.022.
71. PARKER, Glendon J. *et al.* - Forensic proteomics. **Forensic science international. Genetics**. ISSN 1878-0326. 54:2021). doi: 10.1016/J.FSIGEN.2021.102529.
72. ROZANOVA, Svitlana *et al.* - Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. ISSN 1940-6029. 2228:2021) 85–116. doi: 10.1007/978-1-0716-1024-4_8.

73. KYLE, P. B. - Toxicology: GCMS. **Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory**. 2017) 131–163. doi: 10.1016/B978-0-12-800871-3.00007-9.
74. MICHALSKI, Annette; COX, Juergen; MANN, Matthias - More than 100,000 detectable peptide species elute in single shotgun proteomics runs but the majority is inaccessible to data-dependent LC-MS/MS. **Journal of proteome research**. ISSN 1535-3907. 10:4 (2011) 1785–1793. doi: 10.1021/PR101060V.
75. VIDOVA, Veronika; SPACIL, Zdenek - A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. **Analytica chimica acta**. ISSN 1873-4324. 964:2017) 7–23. doi: 10.1016/J.ACA.2017.01.059.
76. MASON, Katelyn Elizabeth *et al.* - Protein-based forensic identification using genetically variant peptides in human bone. **Forensic science international**. ISSN 1872-6283. 288:2018) 89–96. doi: 10.1016/J.FORSCIINT.2018.04.016.
77. GARCÍA, Manuel G. *et al.* - Impact of the Human Microbiome in Forensic Sciences: a Systematic Review. **Applied and environmental microbiology**. ISSN 1098-5336. 86:22 (2020) 1–20. doi: 10.1128/AEM.01451-20.
78. CLARKE, Thomas H. *et al.* - Integrating the microbiome as a resource in the forensics toolkit. **Forensic science international. Genetics**. ISSN 1878-0326. 30:2017) 141–147. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2017.06.008.
79. KUIPER, Irene - Microbial forensics: next-generation sequencing as catalyst: The use of new sequencing technologies to analyze whole microbial communities could become a powerful tool for forensic and criminal investigations. **EMBO reports**. ISSN 1469-3178. 17:8 (2016) 1085–1087. doi: 10.15252/EMBR.201642794.
80. BUDOWLE, Bruce *et al.* - Validation of high throughput sequencing and microbial forensics applications. **Investigative genetics**. ISSN 2041-2223. 5:1 (2014). doi: 10.1186/2041-2223-5-9.
81. URSELL, Luke K. *et al.* - Defining the Human Microbiome. **Nutrition reviews**. ISSN 00296643. 70:Suppl 1 (2012) S38. doi: 10.1111/J.1753-4887.2012.00493.X.
82. TURNBAUGH, Peter J. *et al.* - The human microbiome project. **Nature**. ISSN 1476-4687. 449:7164 (2007) 804–810. doi: 10.1038/NATURE06244.

83. DEMBINSKI, Gina M.; PICARD, Christine J. - Effects of microbial DNA on human DNA profiles generated using the PowerPlex® 16 HS system. **Journal of Forensic and Legal Medicine**. ISSN 1752-928X. 52:2017) 208–214. doi: 10.1016/J.JFLM.2017.09.010.
84. SENDER, Ron; FUCHS, Shai; MILO, Ron - Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLoS biology**. ISSN 1545-7885. 14:8 (2016). doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.1002533.
85. ROBINSON, Jake M. *et al.* - Forensic Applications of Microbiomics: A Review. **Frontiers in microbiology**. ISSN 1664-302X. 11:2021). doi: 10.3389/FMICB.2020.608101.
86. ZHANG, Jun *et al.* - Application of Microbiome in Forensics. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**. ISSN 22103244. 21:1 (2023) 97. doi: 10.1016/J.GPB.2022.07.007.
87. MEADOW, James F. *et al.* - Humans differ in their personal microbial cloud. **PeerJ**. ISSN 2167-8359. 3:9 (2015). doi: 10.7717/PEERJ.1258.
88. NECKOVIC, Ana *et al.* - Investigation of direct and indirect transfer of microbiomes between individuals. **Forensic science international. Genetics**. ISSN 1878-0326. 45:2020). doi: 10.1016/J.FSIGEN.2019.102212.
89. LAX, Simon *et al.* - Forensic analysis of the microbiome of phones and shoes. **Microbiome**. ISSN 2049-2618. 3:1 (2015). doi: 10.1186/S40168-015-0082-9.
90. FIERER, Noah *et al.* - Forensic identification using skin bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 1091-6490. 107:14 (2010) 6477–6481. doi: 10.1073/PNAS.1000162107.
91. WILLIAMS, Diana W.; GIBSON, Greg - Classification of individuals and the potential to detect sexual contact using the microbiome of the pubic region. **Forensic science international. Genetics**. ISSN 1878-0326. 41:2019) 177–187. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2019.05.004.
92. VASEF, Mohammad *et al.* - DNA High-Resolution Melting Curve Analysis. **Diagnostic Pathology: Molecular Oncology**. 2016) 2–14. doi: 10.1016/B978-0-323-37678-5.50014-1.
93. JOSEPH, Tyler A.; PE'ER, Itsik - An Introduction to Whole-Metagenome Shotgun Sequencing Studies. **Methods in Molecular Biology**. ISSN 19406029. 2243:2021) 107–122. doi: 10.1007/978-1-0716-1103-6_6/COVER.
94. SHERIER, Allison J.; WOERNER, August E.; BUDOWLE, Bruce - Population Informative Markers Selected Using Wright's Fixation Index and Machine Learning Improves Human

Identification Using the Skin Microbiome. **Applied and Environmental Microbiology**. ISSN 10985336. 87:20 (2021) 1–14. doi: 10.1128/AEM.01208-21.

95. WU, Longjun; LAMBERT, J. David - Clade-specific genes and the evolutionary origin of novelty; new tools in the toolkit. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. ISSN 1084-9521. 145:2023) 52–59. doi: 10.1016/J.SEMCDB.2022.05.025.

96. SHERIER, Allison J.; WOERNER, August E.; BUDOWLE, Bruce - Determining Informative Microbial Single Nucleotide Polymorphisms for Human Identification. **Applied and environmental microbiology**. ISSN 1098-5336. 88:7 (2022). doi: 10.1128/AEM.00052-

97. SHARMA, Garima *et al.* - CRISPR-Cas9: A Preclinical and Clinical Perspective for the Treatment of Human Diseases. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**. ISSN 1525-0024. 29:2 (2021) 571–586. doi: 10.1016/J.MTHE.2020.09.028.

98. GOSTIMSKAYA, Irina - CRISPR–Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. **Biochemistry. Biokhimiia**. ISSN 16083040. 87:8 (2022) 777. doi: 10.1134/S0006297922080090.

99. GAUTAM, Khushboo; RAWAL, Rakesh - Microbial Clock: A review on forensic microbiology for crime scene investigations. **International Journal of Forensic Research**. ISSN 2767-2972. 2022). doi: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.35849.52325>.

100. METCALF, Jessica L. - Estimating the postmortem interval using microbes: Knowledge gaps and a path to technology adoption. **Forensic science international. Genetics**. ISSN 1878-0326. 38:2019) 211–218. doi: 10.1016/J.FSIGEN.2018.11.004.