

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Nádia Solange Canário Lopes Gaspar

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE AMINAS
PUTREFATIVAS NA ANÁLISE DE ANFETAMINAS POR
MÉTODOS IMUNOENZIMÁTICOS, EM AMOSTRAS DE
SANGUE *POST MORTEM***

VOLUME 1

Dissertação no âmbito do Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses,
orientado pelo Professor Doutor Francisco Manuel Andrade Corte Real Gonçalves e
pela Dra. Paula Cristina Nunes Leitão Valente Venâncio Monsanto apresentado à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Setembro de 2022

FACULDADE DE MEDICINA

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE AMINAS PUTREFATIVAS NA ANÁLISE DE ANFETAMINAS POR MÉTODOS IMUNOENZIMÁTICOS, EM AMOSTRAS DE SANGUE *POST* *MORTEM*

Ficha técnica

Tipo de trabalho	Dissertação
Título	Estudo das interferências na análise de anfetaminas por métodos imunoenzimáticos, em sangue <i>post mortem</i>
Autora	Nádia Solange Canário Lopes Gaspar
Orientadores	Professor Doutor Francisco Manuel Andrade Corte Real Gonçalves Dra. Paula Cristina Nunes Leitão Valente Venâncio Monsanto
Identificação do curso	2º Ciclo em Medicina Legal e Ciências Forenses
Área científica	Química e Toxicologia Forenses
Ano	2022



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

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

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, que, mesmo em momentos difíceis, não mediram esforços na realização dos meus sonhos.

Agradecimentos

Este trabalho marca o final do meu mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses. É preciso ter noção que o sucesso não advém apenas de um esforço individual e, para chegar ao final desta etapa muitos foram responsáveis pelo meu sucesso, por esta razão chegar a esta fase não seria possível sem o apoio de algumas pessoas, e por esse motivo gostaria de lhes deixar o devido agradecimento.

Ao Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF, I.P.), na pessoa do Presidente Professor Francisco Corte Real Gonçalves, por consentir a realização da minha tese no INMLCF na Delegação Centro e por toda a disponibilidade demonstrada para a realização do mesmo.

Ao meu orientador, Professor Doutor Francisco Corte Real Gonçalves, que tão gentilmente se disponibilizou a orientar a minha tese.

À minha orientadora do INMLCF, a Dra. Paula Monsanto, o meu sincero obrigada, pela disponibilidade, rigor e apoio. Pelas críticas e conhecimento transmitido que ajudaram a tornar mais completa a informação do trabalho e ainda pela paciência, dedicação e prontidão demonstrada no esclarecimento de dúvidas, tornando possível a elaboração e conclusão deste trabalho, apesar das obrigações profissionais a que estava sujeita.

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

A todos os profissionais do Serviço de Química e Toxicologia Forenses do INMLCF, I.P., pela acolhedora recepção e disponibilidade demonstrada ao longo deste percurso e todos os conselhos e incentivos, em especial à Professora Doutora Helena Teixeira, à Mestre Carla Mostra, à Dra. Eugénia Frias, pelo seu profissionalismo, espírito de equipa e entejuda e por todos os conhecimentos transmitidos e apoio prestado.

Agradeço ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, especialmente as professoras Doutoradas Maria Ermelinda Eusébio e Maria Miguéns Pereira, pela colaboração e disponibilização de alguns padrões de substâncias ensaiadas.

A todos os professores com quem me cruzei neste percurso e que muito me ensinaram.

À FMUC pela formação académica, não só a nível profissional, mas também a nível pessoal ao longo destes 2 anos de estudo.

Agradeço aos meus pais, Fernanda Maria Canário Lopes Gaspar e Ramiro da Silva Gaspar, que sempre me apoiaram e acreditaram nas minhas capacidades mesmo em momentos que as dificuldades pareciam não ter fim, não tenho palavras para agradecer a confiança e apoio depositado em mim ao longo deste percurso académico e ainda por todo o esforço, investimento e oportunidade para que conseguisse um curso superior, sem eles nada disto poderia ser possível de realizar, por isso deixo um especial agradecimento a ti pai, por toda a preocupação, pela paciência, por me compreenderes e por estares sempre presente, e a ti mãe não tenho como te agradecer pelas palavras de incentivo e de força quando mais precisei e por seres a pessoa que és. Vocês são o principal contributo que fazem de mim a pessoa que sou hoje, sem vocês, jamais chegaria onde cheguei.

À minha irmã Diana Gaspar um especial agradecimento pela ajuda e espírito crítico na execução e tradução da minha dissertação, por todas as palavras de apoio e carinho, pelo encorajamento, a amizade e a inesgotável paciência demonstradas nos momentos mais atribulados deste trabalho e da minha vida.

Ao meu noivo João Duarte, pelo permanente apoio nos momentos mais difíceis, pela paciência na colaboração na execução desta tese, especialmente por apresentar sempre um sorriso, quando sacrificava os dias, as noites, os fins-de-semana e os feriados em prol da realização deste trabalho, ajuda sem a qual esta tese nunca teria sido concluída.

A todos os meus verdadeiros amigos que ganhei ao longo destes 2 anos de mestrado, pela ajuda e constante presença nos bons e nos maus momentos.

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

A todos o meu sincero e profundo **Muito Obrigado!**

Epígrafe

“Todas as substâncias são venenos, não existe nada que não seja veneno.
Somente a dose correta diferencia o veneno do remédio” Aureolus Philippus Theophrastus
Bombastus Von Hohenheim- que viveu entre 1493 e 1541- século XVI

Índice

1.	Introdução.....	1
2.	Objetivos.....	3
3.	Metodologias	3
4.	Toxicologia.....	4
4.1	Toxicologia Forense.....	4
4.1.1	Investigação toxicológica	5
4.1.1.1	Achados autópticos	5
4.1.1.2	Aspetos pré-analíticos na análise toxicológica <i>post mortem</i>	5
4.1.2	Colheita, envio, receção, registo e conservação de amostras	6
4.1.3	Redistribuição <i>post mortem</i>	6
4.1.4	Matrizes biológicas	7
4.1.4.1	Sangue.....	8
4.1.4.2	Urina	9
4.1.4.3	Humor vítreo	10
4.1.4.4	Conteúdo gástrico.....	10
4.1.4.3	Bílis	11
4.1.4.5	Fígado	11
4.1.4.7	Líquido cefalorraquidiano	11
4.1.4.8	Tecidos queratinizados	11
4.1.4.9	Mecónio	12
4.1.5	Análise toxicológica.....	12
4.1.6.1	Técnicas de triagem/rastreio	13
4.1.6	Análise de resultados.....	14
4.1.7	Interferências analíticas.....	14
5	Capítulo das anfetaminas	21
5.1	Enquadramento histórico.....	21
5.3	Epidemiologia	22
5.4	Prevalência	23
5.5	Características das anfetaminas.....	24
5.5.1	Mecanismo de ação	25
5.5.2	Toxicocinética	26
5.5.3	Toxicodinâmica	27
5.5.4	Efeitos tóxicos	27
5.5.5	Efeitos do consumo de anfetaminas	29
5.5.5.1	Efeitos Agudos.....	29
5.5.5.2	Efeitos crónicos.....	29
5.5.6	Fatores condicionantes	30

5.5.7 Interações	30
5.5.7.1 Contaminantes das formulações anfetamínica.....	30
6 Decomposição cadavérica.....	31
7 Aminas biogénicas: Origem e classificação	33
7.2.1 Cadaverina	37
7.2.2 Putrescina.....	37
8 Procedimento experimental.....	38
9 Resultados	42
10 Discussão	45
11 Conclusão.....	47
12 Perspetivas futuras	48
13 Referências Bibliográficas	49

Índice de figuras

Figura 1 – Esquema representativo das diversas catinonas sintéticas e a sua estrutura básica. Fonte (76)	24
Figura 2 – Comparação entre a estrutura química da adrenalina e da feniletilamina. Fonte: (68)	25
Figura 3 – Principais vias de biotransformação das anfetaminas. Fonte (22).....	27
Figura 4 – Reação geral de descarboxilação dos aminoácidos livres (84).....	33
Figura 5 – Placas de poliestireno para ensaio ELISA	38
Figura 6 – Demonstração do método de ELISA por competição	38
Figura 7 – Compostos detetados nos casos falso positivos na análise de anfetaminas por imunoensaios enzimáticos no SQTF-DC entre 2018 e 2020	41

Índice de Tabelas

Tabela 1 Reações Cruzadas perante imunoenaios para deteção de anfetaminas.....	15
Tabela 2 Aminoácidos precursores e respetiva amina correspondente após descarboxilação (85).....	34
Tabela 3- Principais parâmetros analíticos da análise instrumental (EVOLIS).....	39
Tabela 4- Lista de calibradores e controlos de qualidade usados em (PE-SQTF-C-104_Rev02	39
Tabela 5 Resultados obtidos através dos Evolis MT Twins Plus para deteção de anfetaminas	42
Tabela 6 Resultados obtidos por EIA no sistema Evolis ^{MT} Twin Plus para deteção de anfetaminas em amostras de soro fortificadas	43
Tabela 7 Resultados obtidos por EIA no sistema Evolis TM Twin Plus para deteção de anfetaminas nas amostras brancas	44

Abreviaturas

Ac- Anticorpo

ACTH- Hormona Adrenocorticotrópica

Ag- Antígeno

AMPH- Anfetaminas

ATP- Adenosina trifosfato

AVC- Acidente Vascular Cerebral

DA- Dopamina

2,3- PPG – 2,3 difosfoglicerato

EAA- Espectrofotometria de absorção atómica

EAM (UV/VIS) – Espectrofotometria de absorção molecular

EIA- Imunoensaios enzimáticos

BZD- Benzodiazepinas

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

FMUC- Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

5-HT – Serotina

GC-FID – Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama

GC-MS – Cromatografia gasosa com detetor de espectrometria de massa

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

IPAC – Instituto Português de Acreditação, IP

LC-MS - Cromatografia líquida com detetor de espectrometria de massa

MAO- Monoamino Oxidase

NA- Noradrenalina

pH- Potencial Hidrogeniónico

PHDA- Perturbação de Hiperatividade e Défice de Atenção

pKa- Logaritmo negativo da constante de dissociação ácida

PMI- Intervalo *Post Mortem*

RNA- Ácido Ribonucleico

RNS- Espécies Reativas de Nitrogénio

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

SAGM - Solução salina, adenina, glicose e manitol

SNC- Sistema Nervoso Central

SQTF – Serviço de Química e Toxicologia Forenses

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

RPM- redistribuição *post mortem*

VMAT- Transportador de monoamina vesicular

Resumo

Em laboratórios de toxicologia, com um elevado número de pedidos de pesquisa de drogas de abuso, o recurso a métodos de rastreio imunoenzimáticos é essencial para permitir a obtenção de resultados de forma rápida e com uma sensibilidade adequada. Esta metodologia é utilizada no SQTF-DC do INMLCF, I.P. desde 2003 e tem sido continuamente melhorada com o objetivo de adequá-la a diversos tipos de amostras com interesse toxicológico, incluindo o sangue *post mortem*.

A obtenção de resultados positivos com recurso a métodos de triagem imunoenzimáticos, obriga à sua posterior confirmação através de métodos capazes de fornecer informação estrutural sobre os analitos de interesse como, os sistemas de cromatografia gasosa ou líquida acoplados a detetores de espectrometria de massa, motivo pelo qual as ocorrências de resultados falso positivos nos ensaios de triagem traduzem um consumo desnecessário de recursos materiais e humanos.

O objetivo deste trabalho consistiu na realização de uma revisão bibliográfica da literatura existente relacionada com a seleção das principais amostras biológicas utilizadas em Toxicologia Forense, em particular o sangue, matriz que foi a utilizada neste estudo, e em como a sua putrefação pode conduzir à libertação de compostos que induzem a produção de falsos positivos quando se utilizam testes de rastreio imunoenzimáticos. Pretendia-se deste modo identificar os compostos potencialmente geradoras desses resultados e, eventualmente promover o ajuste dos valores de concentração *cut off* atualmente utilizados pelo SQTF, a fim de reduzir ou eliminar a ocorrência de resultados falso positivos nas amostras de sangue *post mortem*.

Neste sentido, o trabalho inclui uma parte teórica de revisão bibliográfica da literatura e de uma avaliação dos compostos detetados no SQTF-DC entre 2018-2020 associados aos casos de falsos positivos no método imunoenzimático para a triagem de anfetaminas.

Incluiu também a parte prática propriamente dita onde se fortificaram diversas amostras de sangue em concentrações conhecidas de amins putrefativas e de fármacos e analisaram-se segundo os procedimentos em vigor no SQTF-DC do INMLCF, usando um autoanalisador Evolis Twin Plus, para triagem de anfetaminas, com um kit da *OraSure Technologies, Inc.*, específico para a análise de anfetaminas.

Foi ainda testado o efeito do conservante/ anticoagulante presente na amostra de sangue usada como amostra branco e foi feito um ensaio *in vitro* com uma amostra *post mortem* para verificar o efeito de degradação da amostra (com e sem conservante) nos resultados obtidos neste procedimento.

Para o estudo da interferência da matriz foram também realizados ensaios em amostras de soro fortificadas com os analitos selecionados, em especial com a cadaverina e a putrescina. Os resultados obtidos permitem concluir que a tiramina dá origem a um resultado falso positivo quando em concentrações acima de 10 µg/mL e que o indol e o fenol originam também resultados falsos positivos para concentrações acima de 125 µg/mL.

A cadaverina e a putrescina, até uma concentração de 200 µg/mL, não apresentaram qualquer tipo de interferência nestes ensaios, mesmo quando analisadas em conjunto.

Os fármacos testados também não apresentaram qualquer interferência, mesmo sendo analisados em concentrações com elevada toxicidade.

Relativamente aos estudos de estabilidade da amostra, após quase 6 meses, a amostra de sangue *post mortem* deixada à temperatura ambiente, não produziu interferência na triagem de anfetaminas (com e sem fluoreto de sódio). Os restantes ensaios, em sangue com SAGM como conservante e em soro, também não originaram interferências.

Podemos concluir que o método utilizado é bastante eficaz na triagem de anfetaminas e que muito provavelmente resultados falsos positivos ocorrerão pelas características do sangue durante o processo de putrefação do cadáver e não após a colheita. Tendo também demonstrado ter elevados níveis de especificidade, os resultados obtidos levam a não sugerir efetuar a alteração da concentração *cut off* para a análise de anfetaminas em sangue *post mortem* pelo método imunoenzimático efetuado de acordo com o procedimento de ensaio PE-STF-C-104_rev02.

Palavras chaves: Testes imunoenzimáticos (ELISA), anfetaminas, sangue *post mortem*, amins putrefativas

Abstrat

In toxicology laboratories, with a high number of requests for research on drugs of abuse, the use of immunoenzymatic screening methods is essential to allow obtaining results quickly and with adequate sensitivity. This methodology is used in the SQTF-DC of the INMLCF, I.P. since 2003 and has been continuously improved in order to adapt it to different types of samples with toxicological interest, including *post mortem* blood.

Obtaining positive results using immunoenzymatic screening methods requires their subsequent confirmation through methods capable of providing structural information on the substances of interest, such as gas or liquid chromatography systems coupled to mass spectrometry detectors, which is why the occurrences of false positive results in the screening tests translate into an unnecessary consumption of material and human resources.

The objective of this work was to carry out a bibliographic review of the existing literature related to the selection of the main biological samples used in Forensic Toxicology, in particular blood, the matrix that was used in this study, and how its putrefaction can lead to the release of compounds that induce the production of false positives when using enzyme-linked immunosorbent screening tests. In this way, it was intended to identify the substances potentially generating these results and, eventually, promote the adjustment of the cut off concentration values currently used by the SQTF, in order to reduce or eliminate the occurrence of false positive results in *post mortem* blood samples.

In this sense, the work includes a theoretical part of a literature review and an evaluation of the drugs detected in the SQTF-DC between 2018-2020 associated with cases of false positives in the enzyme-linked immunosorbent method for amphetamine screening.

It also includes the practical part itself, where several blood samples were fortified with known concentrations of putrefactive amines and drugs and analyzed according to the procedures in force in the SQTF-DC of the INMLCF, using an Evolis Twin Plus autoanalyser, to screen for amphetamines, with a kit from OraSure Technologies, Inc., specifically for the analysis of amphetamines.

The effect of the preservative/anticoagulant present in the blood sample used as a blank sample was also tested and an *in vitro* assay was performed with a *post mortem* sample to verify the effect of sample degradation (with and without preservative) on the results obtained in this procedure.

For the study of matrix interference, tests were also carried out on serum samples fortified with the selected substances, especially with cadaverine and putrescine.

The results obtained allow us to conclude that tyramine gives rise to a false positive result when at concentrations above 10 µg/mL and that indole and phenol also give rise to false positive results at concentrations above 125 µg/mL.

Cadaverine and putrescine, up to a concentration of 200 µg/mL, did not present any type of interference in these assays, even when analyzed together.

The tested drugs also did not show any interference, even being analyzed at concentrations with high toxicity.

Regarding the sample stability studies, after almost 6 months, the *post mortem* blood sample left at room temperature did not interfere with amphetamine screening (with and without sodium fluoride). The remaining assays, in blood with SAGM as a preservative and in serum, also did not cause interference.

We can conclude that the method used is quite effective in the screening of amphetamines and that false positive results will most likely occur due to the characteristics of the blood during the process of putrefaction of the corpse and not after collection. Having also demonstrated high levels of specificity, the results obtained lead us not to suggest changing the cut off concentration for the analysis of amphetamines in *post mortem* blood by the enzyme immunoassay performed according to the PE-STF-C-104_rev02 test procedure.

Keywords: Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), amphetamines, *post mortem* blood, putrefactive amines

I. Introdução

O Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF, I.P.) é a instituição nacional de referência na área científica da medicina legal e de outras ciências forenses, à qual cabe a prestação de um conjunto de serviços especializados de apoio técnico pericial e laboratorial e a cooperação com os Tribunais, com o Ministério Público e com órgãos de polícia criminal e demais serviços e entidades que intervêm no sistema de administração da justiça, através da realização de exames e perícias médico-legais e forenses que lhe são solicitados nos termos da lei (1–3).

Esta instituição realiza uma série de exames e perícias em indivíduos vivos e em cadáveres, nomeadamente exames e perícias laboratoriais químicas e toxicológicas, para determinar inúmeros compostos em amostras biológicas e não biológicas no Serviço de Química e Toxicologia Forenses do INMLCF (2).

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

As referidas perícias e exames laboratoriais são realizados no âmbito da atividade das delegações e dos gabinetes médico-legais e forenses, assim como, quando solicitados pelas autoridades e entidades para o efeito competentes ou pelo presidente do conselho diretivo do INMLCF. Para além das referidas competências, também compete ao SQTF emitir pareceres e prestar auxílio técnico-científico no domínio das suas competências (4,5).

O SQTF é um serviço acreditado pelo Instituto Português de Acreditação, I.P. (IPAC), de acordo com os requisitos da norma internacional NP EP ISO/IEC 17025:2018, nomeadamente para os procedimentos de ensaio do álcool, drogas de abuso e benzodiazepinas (4). É também um serviço certificado pela norma NP EN 9001:2015, pelo que garante a qualidade dos seus resultados, uma vez que todas as atividades realizadas no mesmo decorrem de acordo com a legislação e as boas práticas laboratoriais.

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

técnica analítica de espectrofotometria de absorção molecular (EAM-UV/VIS) e a confirmação e quantificação de metais ou metaloides, em especial o arsénio por espectrofotometria de absorção atômica (EAA).

Toda a atividade pericial da responsabilidade do INMLCF é realizada com autonomia técnica e científica e imparcialidade, sob as normas legais processuais aplicáveis e as decisões das autoridades judiciárias competentes. Quanto ao rigor e à qualidade, o INMLCF encontra-se permanentemente em atualização relativamente à evolução das metodologias técnico-científicas de âmbito pericial, desenvolvendo regularmente trabalhos científicos relevantes, o que promove a investigação e o desenvolvimento quer da medicina legal quer de outras ciências forenses (6).

O trabalho aqui apresentado, além de me permitir conhecer e estudar a realidade da toxicologia forense e um aprofundar os temas associados às anfetaminas e às aminas biogénicas, insere-se na necessidade do SQTf/INMLCF em atualizar e melhorar continuamente os métodos analíticos usados, podendo constituir uma mais-valia com impacto no rastreio de anfetaminas em sangue efetuado por imunoenaios enzimáticos (EIA) com um equipamento *Evolis Twin Plus* associado a kits de anfetaminas da marca *OraSure Technologies, inc.*

Esta metodologia é utilizada no SQTf da delegação do Centro do INMLCF desde 2003 e é essencial para permitir a obtenção de resultados de forma rápida e com uma sensibilidade adequada. Tem sido continuamente melhorada com o objetivo de adequá-la a diversos tipos de amostras com interesse toxicológico em especial para análise direta de sangue total colhido em vivo (em casos associados por exemplo à área de Clínica Forense ou no âmbito do código da estrada) e de sangue *post mortem*. É um ensaio acreditado pela norma NP EP ISSO/ IEC 17025:2018 e executado segundo o mesmo procedimento e protocolo instrumental nas três Delegações do INMLCF, pelo que o resultado deste trabalho terá impacto em todo o SQTf.

O resultado negativo nos testes imunoenzimáticos são uma forte indicação de que os xenobióticos que se pretendem detetar não se encontram presentes na amostra em estudo, ou estão numa concentração inferior ao *cut off*. Por outro lado, os resultados positivos obrigam à confirmação por métodos mais específicos com os quais se obtenha informação estrutural das substâncias de interesse, como o são os sistemas de cromatografia gasosa ou líquida com detetores de espectrometria de massa. Estas técnicas são mais dispendiosas e demoradas quer na preparação de amostras quer na análise e no tratamento de resultados pelo que a ocorrência de resultados falsos positivos traduz um consumo adicional de recursos materiais e humanos, além de um aumento do tempo de resposta na realização das análises toxicológicas.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho consistiu na realização de uma revisão bibliográfica da literatura existente relacionada com a seleção das principais amostras biológicas utilizadas em Toxicologia Forense, em particular o sangue, matriz que foi a utilizada neste estudo, e em como a sua putrefação pode conduzir à libertação de compostos que induzem a produção de falsos positivos quando se utilizam testes de rastreio imunoenzimáticos. Pretendia-se deste modo identificar os compostos potencialmente geradores desses resultados e, eventualmente promover o ajuste dos valores de concentração *cut off* atualmente utilizados pelo SQTF, a fim de reduzir ou eliminar a ocorrência de resultados falso positivos.

3. Metodologias

Este trabalho teve duas componentes interligadas: uma que incluiu a revisão bibliográfica e avaliação dos resultados toxicológicos obtidos em casos com falsos positivos nos ensaios de rastreio por EIA (em amostras de sangue *post mortem*) e uma componente prática no laboratório.

Foi efetuada uma revisão bibliográfica entre 22 de setembro de 2021 e 24 de agosto de 2022 nas bases de dados PubMed, B-on, Google Académicos, RCAAP (Repositórios Científicos de Acesso Aberto de Portugal) e SciELO. As palavras-chaves utilizadas na pesquisa foram: toxicologia forense, anfetaminas, amins putrefativas, cadaverina, putrescina, imunoensaios, resultados falsos positivos, reatividade cruzada, sangue *post mortem*. Toda a pesquisa foi realizada em português, inglês e espanhol.

Selecionaram-se 215 artigos, dos quais foram usados 98, por serem mais recentes e por incidirem em assuntos relevantes para este trabalho. Esta revisão biográfica visou aprofundar o conhecimento nos temas indicados e descritos neste trabalho e identificar possíveis interferentes na análise de anfetaminas que pudessem ser testados em análise por EIA como eventuais responsáveis pelos resultados falsos positivos nas amostras de sangue *post mortem*.

Foram avaliados os resultados obtidos nos casos analisados no Serviço de Química e Toxicologia Forenses da delegação do Centro do INMLCF, I.P entre 2018 e 2020 cuja análise de rastreio por EIA em sangue *post mortem* tinha sido considerada como falso positiva. Da lista de compostos confirmados nesses casos foram selecionadas as mais prevalentes para também serem testados em análise por EIA como eventuais responsáveis pelos resultados falsos positivos nestas amostras.

Na componente prática deste projeto foram seguidos os procedimentos e protocolos usados no SQTF para a análise de rastreio de anfetaminas em amostras de sangue. Atualmente o SQTF realiza estas análises pela técnica de ELISA (Imunoensaios enzimáticos) usando um equipamento *Evolis Twin Plus* associado a kits de anfetaminas da marca *OraSure Technologies, inc.*

Para este estudo foram usados dois tipos de amostras de sangue: sangue cedido ao INMLCF pelo Instituto Português do Sangue e da Transplantação (para efeitos de estudo e por não poder ser usado para fins terapêuticos) e sangue *post mortem* resultante de colheitas em âmbito de autópsias. Estas amostras foram inicialmente fortificadas com amins putrefativas, em especial com cadaverina e putrescina e posteriormente com as substâncias medicamentosas selecionadas (pela pesquisa bibliográfica e as detetadas nos casos falsos positivos no SQTF-DC, descrito acima) individualmente ou agrupadas. Foi testado o efeito do conservante/ anticoagulante presente na amostra de sangue e feito um ensaio *in vitro* em amostra *post mortem* com vista a apurar o efeito de degradação da mesma nos resultados obtidos por EIA.

Para o estudo da interferência da matriz foram também realizados ensaios em amostras de soro fortificadas com as substâncias selecionadas.

4. Toxicologia

A toxicologia é uma ciência multidisciplinar que estuda as substâncias tóxicas e as alterações que estas produzem no organismo, por outras palavras, é o estudo da interação entre as substâncias tóxicas e os sistemas biológicos a fim de determinar qualitativa e quantitativamente o potencial tóxico destas substâncias.

A toxicologia pretende avaliar os efeitos das substâncias tóxicas nos seres vivos de forma a prevenir intoxicações e os seus efeitos adversos, porém, uma vez ocorrida a intoxicação, a toxicologia tem como objetivo identificar, diagnosticar, tratar ou atenuar os efeitos nocivos e estabelecer o prognóstico. A toxicologia compreende também o estudo do próprio agente tóxico, desde a origem, mecanismo de ação, propriedades, consequências dos seus efeitos lesivos, métodos qualitativos e quantitativos, meios de contrariar os desequilíbrios dinâmicos que provocam, valorização do grau de toxicidade dos agentes tóxicos, medidas profiláticas da intoxicação e tratamento geral. Dentro dos fatores que influenciam a toxicidade de uma substância podem ser destacados os seguintes: dose, concentração, composição, via de administração, excreção, estado de saúde, idade, sexo, variabilidade genética, fatores ambientais e interações medicamentosas (7–9).

4.1 Toxicologia Forense

A toxicologia forense é uma área da toxicologia que aplica os princípios da toxicologia fundamental e os princípios da química analítica instrumental no esclarecimento de questões judiciais e judiciais. Estas questões estão relacionadas com situações de intoxicação e seus potenciais efeitos adversos, fatais ou não, no âmbito dos diversos domínios do direito, nomeadamente o direito penal, civil e do trabalho.

A aplicação da toxicologia forense associada ao direito tem como intuito cooperar na investigação toxicológica em causas civis, criminais e sociais, de forma a evitar possíveis injustiças a qualquer membro da sociedade. Deste modo, a toxicologia forense estuda e aplica a toxicologia aos objetivos da lei. No âmbito das suas competências, são realizadas perícias e exames laboratoriais, químicos e toxicológicos com vista à análise qualitativa e quantitativa de substâncias nas matrizes biológicas e não biológicas recolhidas ao indivíduo vivo ou *post mortem*.

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

A primeira etapa, a deteção da(s) substância(s), é a etapa mais difícil, dado que a natureza da mesma pode não ser conhecida. Os testes de triagem para possíveis medicamentos, drogas ou outros devem ser utilizados quando não existem informações sobre a possível identidade, estando disponíveis alguns tipos de imunoensaios para o rastreio/triagem de uma ampla gama de compostos presentes em amostras biológicas como o sangue, a urina e o humor vítreo.

Os métodos de triagem são mais flexíveis que os métodos analíticos específicos e, como tal, podem ser aplicados a diversos analitos, sendo estes, portanto, essenciais para a investigação de intoxicações com substâncias desconhecidas ou até mesmo quando o agente tóxico é conhecido ou suspeito. Após ser verificada a presença de um agente tóxico, devem ser usados procedimentos analíticos específicos para o identificar (caso o método de rastreio não tenha essa possibilidade) e para confirmar a sua presença conclusivamente (7,9–11).

Em muitas situações é ainda importante efetuar a quantificação da(s) substância(s) detetadas com vista a uma avaliação do grau de influência ou para o esclarecimento de uma eventual causa de morte.

4.1.1 Investigação toxicológica

As perícias médico-legais e forenses, nomeadamente os exames e perícias no âmbito da toxicologia forense, são regidos pela lei n.º 45/2004, de 19 de agosto, que estabelece o regime jurídico das perícias médico-legais e forenses. Os exames toxicológicos são realizados no SQTF do INMLCF, I.P., para a determinação, confirmação e quantificação de compostos químicos tóxicos com interesse forense em amostras biológicas e não biológicas, nomeadamente de drogas de abuso, medicamentos, pesticidas, substâncias voláteis e de outras substâncias e grupos (9,11).

Os exames toxicológicos são solicitados ao SQTF da delegação do Instituto da área territorial do tribunal ou da autoridade policial que os requer, pelo que as perícias toxicológicas podem ser solicitadas pelos tribunais e demais serviços e entidades que intervêm no sistema de administração da justiça (como a autoridade judiciária e judicial e órgãos de polícia criminal), por entidades públicas e privadas (como os hospitais), por particulares, pelo Serviço de Patologia Forense das Delegações e Gabinetes Médico-legais e Forenses do INMLCF, I.P., no âmbito das suas atividades, e pelo presidente do conselho diretivo (1,12,13).

As perícias toxicológicas *ante mortem* mais solicitadas atualmente aos Serviços de Química e Toxicologia Forenses do INMLCF, I.P. incluem a determinação e quantificação de álcool e substâncias psicotrópicas e estupefacientes, nomeadamente cocaína e metabolitos, anfetaminas e derivados, canabinóides e opiáceos (8,9).

4.1.1.1 Achados autópticos

Os achados autópticos são evidências encontradas quer no indivíduo, quer no exame ao local, que permitem efetuar uma avaliação do caso mesmo antes da obtenção dos resultados dos exames complementares. Algumas evidências sugerem o envolvimento de determinados compostos específicos (por exemplo, colheres, seringas, embalagem de medicamentos prescritos vazios, entre outros, podem ser indicativos de overdose). Estes achados devem ser sempre confirmados com a análise toxicológica (10).

4.1.1.2 Aspetos pré-analíticos na análise toxicológica *post mortem*

Os aspetos pré-analíticos apresentam um papel importante na qualidade e na fiabilidade dos resultados analíticos obtidos, uma vez que dependem do tipo e da qualidade da amostra recolhida. A fase pré-analítica abrange etapas como o pedido, a colheita, o armazenamento, o transporte e a preparação de amostras biológicas.

A variação pré-analítica ocorre devido a interferências *in vivo* e *in vitro* existindo diversos fatores que podem provocar alterações na concentração dos xenobióticos entre o momento da morte e a subsequente autópsia, designadas de alterações autolíticas (destruição espontânea) e processos de putrefação (decomposição), que por sua vez, podem limitar a utilidade das amostras.

A escolha da matriz depende de fatores que se relacionam com a natureza, a integridade da matriz, tipo de investigação (*ante mortem* ou *post mortem*) e considerações analíticas. Perante casos de suspeita de intoxicação e sempre que possível, é importante conhecer qual foi a via de administração da possível substância, se esta é de uso recente ou de longo prazo, estimativa do intervalo de tempo entre a administração e a morte, eventual caracterização dos seus metabolitos, assim como a distribuição de ambos pelos vários tecidos e fluidos biológicos. O conhecimento dos mecanismos de degradação das drogas permite que a Toxicologia Forense conheça bem a substância alvo, particularmente das drogas mais lábeis e voláteis, de forma a enquadrar melhor os métodos de conservação e estabilidade da substância em questão. Este conhecimento além de importante para a obtenção e avaliação dos resultados pode inclusivamente ser um fator de segurança para os profissionais envolvidos no decorrer da autópsia/ colheita de amostras.

4.1.2 Colheita, envio, receção, registo e conservação de amostras

A colheita e o armazenamento das amostras biológicas são das etapas mais importantes na análise toxicológica para garantir a fiabilidade dos resultados e subsequente interpretação. Por esse motivo a colheita das amostras biológicas deve obedecer a um conjunto de procedimentos standardizados e documentados. A escolha da amostra (*post mortem*) por parte do perito deve ser orientada pelo histórico do caso, pela disponibilidade e quantidade da(s) amostra(s), pela estabilidade do analito, pelos parâmetros toxicocinéticos, pelo tempo de detecção, pela presença de interferências e pelo estado de putrefação do cadáver. As amostras disponíveis podem ser inúmeras e com qualidade e quantidade variáveis. As principais são: sangue periférico (da veia femoral ou jugular), urina, conteúdo gástrico, cabelo, unhas e tecidos (especialmente o fígado). A natureza de uma substância eventualmente suspeita em situações de intoxicação ou o estado geral do cadáver poderá exigir a escolha de outro tipo de amostras como o humor vítreo, a bÍlis, o líquido cefalorraquidiano, o pulmão ou o músculo, entre outras (10,14).

Após colhidas e acondicionadas as amostras biológicas, estas devem ser transportadas o mais rapidamente possível até ao SQTf em condições de temperatura apropriadas. Na receção, as amostras biológicas devem ser sempre acompanhadas das respetivas requisições das análises solicitadas ao SQTf, bem como da ficha de garantia da cadeia de custódia (9).

A receção das amostras e das respetivas requisições consiste na primeira etapa da cadeia de custódia intralaboratorial. É realizada a verificação das amostras recebidas com as informações descritas na requisição. Posteriormente as amostras são rotuladas, registadas e armazenadas em câmaras frigoríficas (9).

A estabilidade dos analitos a analisar é um parâmetro que pode ser influenciado por inúmeros fatores como as propriedades físico-químicas, características da amostra recolhida, procedimento de colheita, seleção do recipiente (nomeadamente do tamanho), recurso a conservantes, entre outros. A rápida degradação de certos analitos pode ser explicada pela instabilidade química, transformação metabólica ou combinação de ambos os mecanismos. Em casos *post mortem*, a degradação dos analitos encontra-se acelerada devido à putrefação do cadáver, invasão e proliferação microbiana (11).

Os mecanismos de degradação durante o armazenamento são semelhantes aos processos de autólise e putrefação. Dentre os processos mais comuns, destacam-se a hidrólise, a oxidação e a redução, que normalmente são mais lentas quando as temperaturas de armazenamento são baixas. Os processos ocorrem devido à presença de enzimas endógenas como esterases, glucuronidas ou invasão bacteriana, ocorrendo durante o intervalo *post mortem*. As propriedades físico-químicas dos analitos, as características da amostra recolhida, o procedimento de recolha, a seleção do recipiente e a forma de armazenamento são os principais aspetos que vão determinar a estabilidade dos analitos (10,14).

4.1.3 Redistribuição *post mortem*

A redistribuição *post mortem* (RPM) baseia-se na transferência de substâncias após a morte a favor do gradiente de concentração, resultando em variações da concentração do tóxico, dificultando significativamente a interpretação dos resultados analíticos, uma vez que pode não ser a exata em relação à altura da morte. Para uma correta interpretação dos resultados, é necessário ter em consideração que as células iniciam o processo de morte celular e subsequentemente, a perda da integridade. Devido ao estado de hipoxia, inicia-se o metabolismo anaeróbio, aumentando assim as concentrações de ácido láctico e fosfatos inorgânicos, resultando, na redução do pH intracelular. A bomba sódio-potássio deixa de exercer a sua função aumentando o sódio intracelular seguindo de edema e uma cascata de acontecimentos que provocam danos na membrana celular, levando à difusão passiva dos xenobióticos. Este fenómeno engloba a difusão a partir de órgãos reconhecidos como reservatório (pulmão, coração, fígado), a difusão das

substâncias dos órgãos para o sangue, a difusão passiva do conteúdo existente no estômago para os órgãos adjacentes, bem como a atividade metabólica residual. A RPM também é influenciada pelo estado de putrefação, pelas propriedades dos analitos, posição e movimento do corpo após a morte, visto que, o próprio fluxo sanguíneo influencia a redistribuição em vários locais do organismo.

As características físico-químicas dos xenobióticos podem afetar a concentração no momento da morte, destacando-se o volume de distribuição, a ligação a proteínas plasmáticas, a lipofilicidade e o potencial hidrogeniônico (pKa). As drogas básicas e lipofílicas apresentam elevada capacidade de serem retidos pelos tecidos e, por isso, apresentam alta probabilidade de sofrer redistribuição *post mortem*.

A redistribuição a nível pulmonar afeta a cavidade cardíaca, o que poderá explicar a elevada concentração de xenobióticos na amostra de sangue proveniente da cavidade esquerda do coração. No fígado, a redistribuição ocorre através das veias hepáticas dirigindo-se para a veia cava inferior e posteriormente para a cavidade cardíaca direita, bem como por difusão direta para órgãos vizinhos, nomeadamente estômago, duodeno e vesícula biliar. Ocorre também a difusão passiva do conteúdo estomacal para o lobo esquerdo do fígado, lobo esquerdo do pulmão e ventrículo esquerdo. A razão entre a concentração do tóxico no sangue cardíaco e no sangue periférico auxilia na avaliação da redistribuição *post mortem* e, em geral, as substâncias que apresentam esta razão superior a um, apresentam maior probabilidade de sofrer redistribuição *post mortem* (10,11,15).

4.1.4 Matrizes biológicas

A Toxicologia Forense pode separar-se em duas áreas distintas de acordo com o tipo de análises solicitadas: *ante e post mortem*. Consequentemente, a variedade de matrizes biológicas passíveis de serem usadas na análise toxicológica varia em função da área de atuação. As matrizes preferenciais para colheita *in vivo* são o sangue, a urina, o cabelo, unhas e o conteúdo gástrico (lavado gástrico e vômito), enquanto *post mortem* são o sangue (periférico e cardíaco), a urina, o humor vítreo, o conteúdo gástrico, a bÍlis e órgãos (principalmente o fígado e rim). Em casos particulares podem ainda ser colhidas no decorrer da autópsia outras matrizes alternativas e adicionais como o líquido cefalorraquidiano, o líquido pericárdico, o cérebro, o baço, o músculo esquelético, pele, unhas, de forma a permitir e/ou complementar a investigação toxicológica (9).

A seleção e a recolha do material biológico para a realização de análises toxicológicas são um dos passos mais importantes na interpretação dos resultados. A escolha deve ter em conta todas as características da substância a pesquisar, todas as modificações possíveis do analito devido a alterações metabólicas e, principalmente, a toxicocinética, a estabilidade na matriz, bem como, a disponibilidade da amostra no cadáver. A ocorrência de fenómenos de redistribuição *post mortem* deve ser tida em consideração aquando da seleção das matrizes de forma a garantir a confiabilidade e fidedignidade nos resultados obtidos para posterior interpretação. A escolha da matriz depende quase sempre do estudo a realizar, sendo que na análise de drogas de abuso o sangue e a urina são as matrizes biológicas mais comumente analisadas no SQTf-DC (9).

De seguida serão abordadas as principais características, assim como as vantagens e as desvantagens das diferentes matrizes biológicas utilizadas em Toxicologia Forense.

4.1.4.1 Sangue

O sangue é a matriz biológica de eleição nas análises toxicológicas para a deteção, quantificação e interpretação das concentrações dos compostos, uma vez que permite efetuar a correlação entre a quantidade e os efeitos do tóxico no organismo, através de uma comparação a partir de uma extensa base de dados. Esta matriz permite detetar inúmeras substâncias, nomeadamente álcool (na colheita de sangue periférico *ante mortem* deve-se ter em atenção ao tipo de antisséptico utilizando, pois não deve ser usado antissépticas contendo álcoois ou iodo para desinfetar a pele antes da punção venosa, visto que estas podem provocar a sua contaminação, bem como não deve ser utilizado sistema de vácuo na flebotomia, uma vez que se trata de um produto volátil), drogas de abuso, medicamentos, pesticidas e metais, tanto *in vivo* como *post mortem* (9,14,16).

Quando o resultado analítico é positivo, indica o uso ou exposição recente ao analito, uma vez que, as substâncias desaparecem da circulação sanguínea de forma bastante rápida. Para além das referidas vantagens, o sangue pode ser colhido de diferentes locais anatómicos. A deteção de substâncias tóxicas e seus metabolitos no sangue pode permitir a determinação do consumo crónico ou agudo, da via de administração e/ou da ocorrência ou não de redistribuição *post mortem* através da comparação das análises entre o sangue periférico e o sangue cardíaco. Apesar das inúmeras vantagens do sangue, esta matriz também apresenta desvantagens, nomeadamente o facto das concentrações de substâncias serem sujeitas a alterações *post mortem*, o local de colheita poder influenciar as concentrações das substâncias tóxicas, a existência de uma grande variação na correlação interpessoal das concentrações de substâncias com os efeitos, as amostras *post mortem* estarem frequentemente coaguladas ou hemolisadas e a possível distribuição desigual das substâncias entre o plasma e o sangue total (10,17).

Apesar desta matriz biológica necessitar de alguma preparação da amostra e apresentar uma janela de deteção temporal relativamente baixa quando comparada com outras amostras, como a urina e o cabelo, ou seja, algumas substâncias são detetáveis por períodos de tempo relativamente curtos no sangue, quando comparados com outras matrizes, mesmo assim é a escolha mais adequada para fins de triagem. Na análise *post mortem* é recomendada a colheita de sangue cardíaco (colhido preferencialmente da cavidade direita) e periférico para efetuar a avaliação da suscetibilidade de redistribuição *post mortem*. Apesar do sangue cardíaco ser mais abundante e de fácil colheita, é afetado pela redistribuição *post mortem* por se localizar numa região central e próximo de órgãos com capacidade de acumular elevadas quantidades de compostos. O sangue periférico é colhido através da veia femoral ou subclávia, sendo menos suscetível a fenómenos de redistribuição, por se encontrar afastado da região central e devido à presença de válvulas que impedem o movimento do sangue de outros locais (10).

A interpretação dos resultados é extremamente complexa nos casos em que as substâncias presentes nas amostras de sangue cardíaco sofrem RPM e, se encontram presentes em concentrações que variam entre o limite máximo terapêutico e o limite mínimo tóxico, para o qual foram reportados casos de intoxicação ou morte. Nestes casos, a análise de uma amostra de sangue periférico pode ser decisiva, para avaliar o papel que o analito teve na vítima pelo que, sempre que possível, devem ser colhidas durante a autópsia amostras de sangue *post mortem*, provenientes de dois locais distintos, do coração (sangue cardíaco) e dos vasos periféricos (sangue periférico) (9,18).

4.1.4.2 Urina

A urina é o principal líquido de excreção do organismo e, consiste numa das matrizes biológicas mais utilizadas em toxicologia forense na detecção de drogas de abuso, quer em casos *ante mortem*, quer em casos *post mortem* (quando esta esteja disponível).

Esta matriz permite a análise qualitativa tanto das substâncias tóxicas como também dos seus metabolitos, através de testes imunoenzimáticos, tornando-se deste modo uma ferramenta muito importante na triagem alguns grupos de substâncias com interesse médico-legal. Muitos dos testes de rastreio comercializados são apenas destinados a amostras de urina.

A urina é uma amostra biológica significativamente menos complexa que o sangue, uma vez que contém uma pequena quantidade de macromoléculas, devido ao processo de filtração renal, o que simplifica a preparação da amostra para análise. A urina é composta essencialmente por água (95-98%), ureia, ácido úrico, creatinina e iões, nomeadamente sódio, potássio, cloro e magnésio (9,18). Apresenta diversas vantagens, nomeadamente pelo facto de estar prontamente disponível, a sua colheita é não invasiva, tem habitualmente um grande volume disponível e elevadas concentrações de substâncias tóxicas e/ou dos seus metabolitos. Esta matriz permite a determinação de concentrações detetáveis das substâncias tóxicas, mesmo quando estas são administradas em doses terapêuticas e, em alguns casos, permite determinar concentrações de substâncias tóxicas cem vezes superiores às determinadas no sangue. Para além das vantagens referidas, a urina também permite detetar a presença de diversas substâncias e seus metabolitos excretadas poucas horas após o seu consumo e, podem continuar a ser detetáveis durante vários dias ou semanas após o último consumo, sendo as concentrações de drogas e dos seus metabolitos geralmente maiores que no sangue. É importante referenciar que a via de administração influencia na quantidade da substância que é absorvida e o metabolismo influencia no tipo e na quantidade de metabolitos que se formam, o que provoca o aumento ou a diminuição da janela de detecção. A janela de detecção de drogas de abuso na urina pode variar de 24 horas a um mês, dependendo maioritariamente da substância.

Apesar das vantagens da urina como matriz biológica, esta também apresenta algumas desvantagens. Na colheita em vivo surge a necessidade de supervisão, dado o elevado risco de adulteração da amostra. Há também ausência de uma correlação com o estado de influência da pessoa e o facto de raramente ser possível uma análise quantitativa e quando possível, a interpretação dos resultados exige atenção redobrada.

Nos casos de colheita de urina *post mortem*, existem três desvantagens: a possibilidade de inexistência de urina, uma vez que é comum que a bexiga se esvazie durante o processo de morte, a possibilidade de não se detetar a droga original, (isto pode ocorrer em casos de morte repentinas, em que o tempo de sobrevivência é inferior a uma hora, as drogas não são excretadas e, como tal, a urina não constitui uma matriz ideal para a detecção da substância administrada, ou seja, os resultados podem ser negativos se a morte ocorrer perto no momento da ingestão, não permitindo correlacionar a concentração da droga na urina e os efeitos farmacológicos e tóxicos devido à taxa de excreção dos tóxicos e ao volume de urina, uma vez que muitas drogas são rapidamente metabolizadas, ou estão presentes em concentrações relativamente baixas; e a dificuldade de interpretar as concentrações da maioria das drogas presentes na urina, uma vez que não existe uma correlação direta entre a concentração da droga na urina e no sangue.

O facto de não existir uma correlação com os níveis sanguíneos está associada ao facto de a urina não ser um fluido circulante, mas sim um resíduo colhido na bexiga. As concentrações das drogas e seus metabolitos na urina dependem do tempo de formação da urina em relação à colheita e ingestão das drogas. A urina também não apresenta uma correlação com efeitos tóxicos no momento da colheita, sendo a bexiga um reservatório e, ao contrário do sangue, não está em equilíbrio com os tecidos.

A identificação positiva de substâncias tóxicas na urina confirma o consumo dessas, pois estavam presentes no organismo algum tempo antes da morte, porém não indica a quantidade ingerida e/ou a data de ingestão, e, no caso concreto das drogas de abuso, nada prevê quanto ao estado da pessoa, pelo que para interpretar o contexto de consumo, o sangue deve ser analisado para os analitos encontrados na urina. Nos casos em que existe a suspeita de que a morte terá

ocorrido logo após o consumo da substância (presença de um recipiente suspeito ou de uma agulha com seringa no braço do cadáver), os achados negativos da substância na urina podem ser consistentes caso as concentrações sanguíneas dessa substância sejam elevadas (9,10,17,19).

4.1.4.3 Humor vítreo

O humor vítreo é um líquido gelatinoso e viscoso, localizado no interior do globo ocular, num ambiente isolado e protegido. É constituído essencialmente por água (98-99%) e quantidades vestigiais de ácido hialurónico, glicose, iões, catiões, aniões e colagénio, esta matriz apresenta uma baixa atividade enzimática (ausência de esterasas responsáveis pela rápida hidrólise de determinadas substâncias e metabolitos) e é menos propensa à decomposição bacteriana, o que justifica a sua maior resistência aos fenómenos de putrefação e redistribuição *post mortem*. É uma matriz biológica de colheita acessível e que permanece estéril até três dias ou mais após a morte, pelo que apresenta maior estabilidade quando comparado com outras matrizes. Trata-se ainda de uma matriz com facilidade de análise não tendo praticamente nenhuma preparação da amostra. Porém apresenta um volume disponível limitado, motivo pelo qual é aconselhado que a amostra colhida de cada olho seja combinada num único recipiente, devidamente identificado. O humor vítreo apresenta também dificuldade de interpretação dos resultados para grande parte das drogas, uma vez que existe pouca informação literária sobre as concentrações de substâncias nesta matriz. Devido à sua natureza aquosa, os xenobióticos com alta afinidade de ligação às proteínas e com carácter lipofílico, a serem detetadas, encontram-se em concentrações inferiores quando comparadas com as sanguíneas (9,11).

4.1.4.4 Conteúdo gástrico

A recolha do conteúdo gástrico é um procedimento realizado no momento da autópsia, onde se retira uma alíquota (cerca de 30 mL). Esta matriz é particularmente útil em casos de intoxicação por via oral, visto ser uma das principais vias de administração de muitos medicamentos e substâncias tóxicas, em casos de sobredosagem pode ser facilmente detetada mesmo pela simples observação macroscópica e organoléptica desta matriz fornecendo orientações do tipo de tóxico envolvido, o que ajudam no processo analítico, como os cheiros (por exemplo o aroma a fruta pode indicar presença de etanol, o odor a xilol sugere a presença de inseticidas organofosforados e o cheiro a amêndoa amarga pode indicar intoxicação por cianetos) e colorações que podem estar associados a determinados compostos, bem como a presença de comprimidos e cápsulas não dissolvidos (11,20).

Caso haja suspeita de intoxicação por metais pesados, como o arsénio, chumbo ou mercúrio deve ser colhido o conteúdo gástrico e adicionalmente conteúdo intestinal para serem sujeitos a análises toxicológicas (20).

A quantidade total de xenobióticos remanescentes no conteúdo gástrico é muito importante, pois permite concluir se o resultado é consistente com a hipótese de *overdose* ou dose terapêutica. A deteção de grandes concentrações xenobióticos no conteúdo estomacal apenas é indicativo de *overdose* quando suportado por dados obtidos no sangue e/ou em tecidos. Contudo, a deteção de baixas concentrações no estômago pode representar a difusão passiva, dos iões contidos no sangue que retornam ao estômago através do suco gástrico, o que acontece principalmente com xenobióticos de carácter básico que têm tendência a ficar retidos no compartimento gástrico devido ao baixo pH ou resultar de administração intranasal (11,20).

4.1.4.3 BÍLIS

A bÍlis é um líquido complexo e variável, recolhida através da vesícula biliar por aspiração com seringa ou por incisão. Funciona como reservatório de xenobióticos sujeitos a excreção biliar e a circulação entero-hepática, sendo importante na excreção de algumas drogas e metabolitos, que são posteriormente eliminados através das fezes. Em Toxicologia Forense, é uma alternativa excelente quando a droga não é detetável no sangue e, alguns métodos analíticos foram adaptados e/ou validados especificamente para permitir a quantificação de algumas drogas e seus metabolitos nesta matriz, reduzindo a interferência da matriz (elevada concentração de ácidos biliares e outras substâncias endógenas).

Vários estudos demonstraram que algumas drogas, como a morfina, estão presentes em concentrações superiores na bÍlis quando comparadas às sanguíneas, o que se torna particularmente relevante especialmente na análise de drogas com tempo de semivida curto (10).

4.1.4.5 FÍGADO

O fÍgado é um tecido sólido colhido em casos *post mortem* para completar os dados toxicológicos obtidos no sangue ou na impossibilidade de colheita deste. É o principal órgão responsável pela metabolização de fármacos e drogas, o que explica as elevadas concentrações observadas neste órgão, permitindo que os tóxicos sejam facilmente detetados mesmo quando presentes em baixas concentrações no sangue, contudo, atendendo à complexidade enquanto matriz, a exigência de purificação de estratos a analisar em sistemas cromatográficos, pode levar a uma diminuição de sensibilidade dos métodos de análise.

Na interpretação dos resultados é necessário ter em conta o fenómeno de redistribuição *post mortem*. A amostra deste tecido quando colhida no lado direito terá estado menos sujeita a este fenómeno (10).

4.1.4.7 Líquido cefalorraquidiano

O líquido cefalorraquidiano apresenta uma aparência transparente e está localizado num ambiente protegido, estando menos sujeito a contaminação bacteriana. O uso desta amostra é limitado uma vez que existem poucos dados na literatura acerca dos valores de referência, dificultando a interpretação dos resultados analíticos. É recolhido através da punção suboccipital ou pode ser aspirado através dos ventrículos depois do crânio ter sido removido. Atualmente esta matriz é mais utilizada na deteção de opióides, devido à proximidade do local de ação destes compostos, ou então para deteção de 6-acetilmorfina para determinação de exposição recente a heroína (10).

4.1.4.8 Tecidos queratinizados

De entre as amostras de tecidos queratinizados o cabelo é cada vez mais utilizado no setor de toxicologia forense, para controlo do consumo de drogas, e as unhas são também excelentes amostras, uma vez que retêm as drogas durante um longo período de tempo, fornecendo assim informações que excedem a obtida a partir de matrizes convencionais como o sangue e a urina, definindo um histórico do uso ou mudança de hábitos em relação às drogas.

O cabelo é considerado um órgão excretor secundário e como tal apresenta diversas vantagens como a indicação da exposição repetida ou crónica, a monitorização clínica e a facilidade na colheita. O cabelo apresenta uma janela de deteção, que dependendo a substância pesquisada, pode ir de 5 dias a meses. A baixa atividade metabólica do eixo do cabelo e a proteção exercida pelos componentes da matriz contribuem para a estabilidade dos componentes

incorporados. Contudo também existem algumas limitações que podem impedir a pesquisa de um determinado analito, como a pigmentação, os fatores individuais, ambientais e metodológicos (como os procedimentos pré-analíticos e a colheita da amostra) (21).

No cabelo é normalmente acumulada a droga original (sem sofrer metabolização), sendo esta uma vantagem para a detecção de drogas que são rapidamente metabolizadas como é o caso da heroína (10,17).

As unhas são compostas por queratina que absorve as drogas durante o crescimento. Isto dá origem a que nesta amostra a janela de detecção seja maior (10,22).

4.1.4.9 Mecónio

O mecónio tem sido utilizado como matriz biológica alternativa para verificar a exposição uterina às drogas de abuso e outras substâncias.

O mecónio consiste na primeira excreção do recém-nascido, a sua formação inicia-se a partir do segundo trimestre de gestação (por volta da 12^a semana) e acumula-se no intestino do feto até o momento do parto, podendo ser excretado em até cinco dias após o nascimento.

É uma matriz extremamente complexa, apresenta uma consistência pegajosa, com coloração verde-escura a negra e não possui o odor característico, geralmente presente nas fezes. É composto por água, células epiteliais descamadas do trato gastrointestinal e da pele, ácido e sais biliares, entre outros.

As drogas utilizadas pela mãe durante a gestação são incorporadas no mecónio por dois mecanismos distintos: a difusão passiva através dos vasos sanguíneos da placenta para o feto e da incorporação das substâncias por deglutição do líquido amniótico. A incorporação e o acúmulo de substâncias nessa matriz são resultantes do consumo, metabolismo e eliminação materna, transferência placentária e metabolismo fetal, fatores estes que tornam o mecónio uma ótima matriz para verificar exposição fetal com ampla janela de detecção gestacional.

As vantagens do uso do mecónio são a disponibilidade da amostra, sendo uma colheita fácil e não invasiva, e a capacidade de fornecer informações preservadas sobre a exposição fetal a substâncias a partir do primeiro trimestre de gravidez.

As desvantagens dessa matriz são a complexidade e heterogeneidade da amostra, o que exige etapas adicionais de preparação, purificação e concentração dos analitos, aumentando o tempo e o custo das análises (23).

4.1.5 Análise toxicológica

A seleção do método analítico deve ser feita perante as alternativas disponíveis, tendo sempre em conta a sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão dos métodos. Inicialmente a autoridade judicial emite uma requisição para que sejam recolhidas amostras que, dependendo da situação, poderão ser recolhidas durante a autópsia ou quando os indivíduos estão no hospital. Após a colheita segue-se a preparação da amostra onde é efetuada a análise qualitativa através de métodos de rastreio. Se o resultado da triagem for positivo, a amostra segue para confirmação e quantificação por um método distinto. Este método de confirmação e quantificação deve ser preciso e exato de modo a evitar os interferentes do método de rastreio. Por fim, o resultado é interpretado face às variáveis envolvidas e o relatório é enviado às autoridades judiciais.

O relatório final da análise deve ser explícito quanto ao método utilizado, quanto à sensibilidade da técnica, incerteza do resultado, valores de *cut off*, principais limitações e quanto ao cumprimento da cadeia de custódia (10).

4.1.6.1 Técnicas de triagem/rastreio

Na toxicologia forense, na maioria das vezes não é possível obter informação clínica (sintomas), como na toxicologia clínica, desta forma torna-se necessário iniciar a pesquisa dos analitos solicitados através de etapas de triagem (24).

As técnicas de rastreio consistem num procedimento qualitativo de um determinado grupo de compostos realizado numa amostra biológica com finalidade de identificar a presença ou não de uma determinada substância, para isso recorre-se muitas vezes aos imunoensaios.

Os imunoensaios são técnicas de rastreio muito utilizadas nos laboratórios de Toxicologia Forense devido à sua simplicidade e rapidez no resultado, necessitam de uma pequena quantidade de amostra e detetam concentrações na ordem dos pg-mg e são métodos padronizados e validados pelo fabricante, pois os seus valores analíticos de *cut off* podem variar entre os fabricantes e entre as diferentes técnicas. Como o próprio nome indica baseia-se em técnicas imunológicas, reações que ocorrem entre antigénio (Ag) e anticorpo (Ac). Normalmente os testes comerciais baseiam-se na utilização de Ac com afinidade estrutural para o composto ou grupo de compostos a detetar (exemplo: anfetaminas) e uma forma marcada do Ag a pesquisar que compete na reação com o analito presente na amostra e permitirá detetar a formação do complexo analito-Ac. Um dos inconvenientes destes ensaios é o facto de este não detetar especificamente uma substância, ou seja, o Ac produzido para o Ag (exemplo anfetaminas) apresenta reatividade cruzada com outros compostos com estruturas químicas semelhantes, ou ainda analitos que sejam imunologicamente reativos facto particularmente relevante em amostras *post mortem* (25–27).

Podem ser utilizados diversos métodos de deteção como é o caso da Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays (ELISA), Enzyme Multiplied Immuno Technique (EMIT), as imunocromatografias (IC), os radioimunoensaios (RIA) e a imunofluorescência (IF) (10,11,17,25,28).

A triagem de drogas de abuso e de benzodiazepinas, no SQTFC do INMLCF, I.P. é realizada num analisador automático (*Sistema EvolisTM Twin Plus System -Stratec Biomedical Systems AG*), cujo funcionamento tem por base reações imunoenzimáticas de fase sólida (ELISA) (9).

A técnica de ELISA consiste num imunoensaio enzimático, do tipo heterogéneo, permite uma etapa de lavagem após a adição dos reagentes, para separar o conjugado que se ligou ao Ac dos conjugados que ficaram livres. Na deteção de substâncias, têm-se um Ac sintético imobilizado na fase sólida (placa poliestireno), específico para o Ag de interesse presente na amostra. A enzima reage com o substrato adicionado ao sistema, gerando um produto de reação colorido, monitorado visualmente ou por espectrofotómetro. A relação entre a intensidade de coloração e a quantidade de Ag é inversamente proporcional. Na técnica de ELISA, as enzimas mais utilizadas são a peroxidase, a fosfatase alcalina e a beta-galactosidase. Existem diversas variantes da técnica de ELISA, como o ELISA indireto, o ELISA sanduíche e o ELISA competitivo, sendo os dois últimos os mais aplicados para deteção de Ag na amostra (29).

Esta técnica permite a automatização, uma resposta qualitativa rápida, com boa sensibilidade e especificidade e a capacidade de analisar um só metabolito ou vários metabolitos em simultâneo. Os resultados são apenas presuntivos, uma vez que não distinguem as substâncias dentro de cada grupo de substâncias analisadas (10,17,24,26,27,30).

4.1.6 Análise de resultados

A análise dos resultados do procedimento de triagem tem por base a comparação das absorvâncias obtidas para as amostras com as absorvâncias de amostras brancas fortificadas com os analitos de interesse e de acordo com o valor de cut-off definido.

O resultado do procedimento de triagem é expresso como positivo quando a absorvância obtida para a amostra é inferior à média das absorvâncias obtidas para o calibrador de concentração *cut off* (por ser analisado em duplicado). Também são considerados positivos os resultados cujo valor da absorvância fica compreendido entre o valor de *Acut off* e [*Acut off* + (*Acut off* × 0.15)], isto é, com valores de absorvância superiores ao valor da amostra *cut off* em 15%.

O resultado é expresso como negativo, quando a absorvância obtida para a amostra é superior à média das absorvâncias obtidas para o referido calibrador, com exceção dos resultados cujos valores de absorvância são superiores ao valor da amostra *cut off* em 15%.

4.1.7 Interferências analíticas

Nos processos de determinações laboratoriais as interferências analíticas mais frequentes são as que decorrem da própria constituição das matrizes selecionada, das interferências entre analitos e as associadas ao estado de conservação das amostras.

A conservação de amostras podem sofrer influência perante a forma de armazenamento e período decorrido entre a colheita e a análise laboratorial. Estes fatores e em especial as flutuações de temperatura resultantes do transporte poderão constituir um erro grave pré-analítico, distanciando o que é a realidade no momento da colheita e os resultados obtidos. Esta situação está relacionada com a estabilidade das moléculas e com o desenvolvimento bacteriano e degradação da matriz.

Relativamente as soluções conservantes adicionadas ao sangue, estas podem induzir algumas alterações nas análises de deteção de anfetaminas por métodos imunoenzimáticos pelo que nas amostras *post mortem* nos tubos destinados ao acondicionamento de sangue (e de outras amostras) é adicionado fluoreto de sódio, na concentração aproximada de 1-2% (p/v).

Quanto às outras interferências nos ensaios imunoenzimáticos, além da reatividade cruzada e que se espera existir para as substâncias do mesmo grupo, há também que considerar aquelas que são devidos às reações cruzadas de possíveis substâncias endógenas ou de substâncias que tenham sido absorvidas pela pessoa em vida (18,20).

Na Tabela 1, está apresentado um levantamento bibliográfico das principais interferências nos testes de triagem para deteção de anfetaminas.

Tabela 1 Reações Cruzadas perante imunoenaios para detecção de anfetaminas

Autores	Substância		Amostra	Técnica	Referências
Alec Saitman et al.	Bupropiona	<ul style="list-style-type: none"> • Concluíram que a trazodona tem de ser > 200µg/mL para produzir um resultado falso-positivo 	Urina	SYVA EMIT II Plus	(31)
	Clorpromazina			SYVA EMIT- MAM®	
	Demetilamilamina (DMAA)			kits Roche KIMS ® e SYVA EMIT II ®	
	Labetalol			Não mencionado	
	Metformina			Bioite Triagem	
	Ofloxacina			AM/MA II ®	
	Prometazina			SYVA EMIT- MAM	
	Trazodona (<i>m</i> -CPP)			SYVA Ecstasy EMITII ®	
Loreto Quesada et al.	Fenofibrato	<ul style="list-style-type: none"> • Concluíram que, em urina enriquecida, ~225 µg/mL de ácido fenofibrico e 150 µg/mL de fenofibrato seriam suficientes para resultar em um resultado positivo no DRI ® Ecstasy Assay usando um ponto de corte de 500 ng/mL. A reatividade cruzada resultante é de 0,2% para ácido fenofibrico e 0,3% para fenofibrato. 	Urina	DRI(®)	(32)
Barry K Logan et al.	Trazodona, metaclorofenilpiperazina (mCPP), trifluorometilfenilpiperazina (TFMPP)	<ul style="list-style-type: none"> • Os pacientes que tomam trazodona podem obter resultados falso-positivos no teste EMIT de urina para MDMA. • Resultados positivos para AMPH na presença de trazodona na triagem de drogas usando anticorpos policlonais com o EMIT I 	Urina	EMIT II	(33,34)
Jennifer M. Colby et al.	Fluoroquinolonas		Urina	Abbott TdxFlx	(35)
Isabel Gomila et al.	Cloroquina	<ul style="list-style-type: none"> • A cloroquina pode causar resultados falso-positivos no Ensaio de Anfetaminas DRI quando está presente em altas concentrações. A hidroxicloroquina não produziu resultados falso-positivos nos imunoenaios avaliados. 	Urina	Anfetaminas DRI	(36)
Sarah Bugier et al.	Fenofibrato		Urina	DRI Ecstasy Assay	(37)
Marion Leclercq et al.	Metoprolol	<ul style="list-style-type: none"> • Os metabolitos do metoprolol reagiram de forma cruzada apenas com o imunoensaio das anfetaminas, mas em concentrações mais altas (ou seja, 2.000 µg/mL para α-hidroximetoprolol e 750 µg/mL para O-demetilmetoprolol). • Outras substâncias que apresentaram reações cruzadas com as AMPH foram a pseuoefedrina, fenilefrina, bupropiona, clorpromazina, trazodona, ranitidina. 	Urina	MULTIGENT® anfetamina	(38)

Robin Wijngaard et al.	Tetracaína	<ul style="list-style-type: none"> • A tetracaína é um anestésico local utilizado na prática clínica como pomada durante o cateterismo urinário. Verificaram que a tetracaína era responsável por cerca de 80% dos casos falso-positivos de anfetaminas nas amostras de urina 	Urina	Imunoensaio CEDIA Anfetamina/ecstasy	(39)
Jacob J Hugheye Jennifer M Colby	A-metildopamina (um metabolito da metildopa), ceftarolina fosamil e procainamida, ácido esmolol, esmolol, N-acetil-3-hidroxiprocainamida	<ul style="list-style-type: none"> • Uma associação forte significa que a probabilidade de uma triagem de falso-positivo é aumentada pela exposição anterior a uma substância, mas não significa necessariamente que a triagem de falso-positivo seja causada pela própria substância. Uma possibilidade alternativa é que a associação se deva a um metabolito, como ocorre nas anfetaminas com metildopa. Uma segunda possibilidade é que a associação seja espúria e causada por coexposições com outras substâncias de reação cruzada, como é o caso da buprenorfina com citarabina. • A metildopa e, 3-o-metildopa, não originaram interferência 	Urina	Imunoensaios (não específica)	(40)
Li Liu et al.	Ranitidina,	<ul style="list-style-type: none"> • Ao contrário do ensaio EMIT II Plus, o ensaio AMPH tem atividade cruzada com a ranitidina, que é independente da proporção amostra/reagente. • Demonstrou falsos positivos no equipamento da Beckman Coulter AMPH e não no Siemens EMIT II Plus 	Urina	Imunoensaio Beckman Coulter AMPH e Siemens EMIT II Plus	(41)
Stephanie J. Marin et al.	Fentermina, Tranilcipromina, Propranolol, MDA, MDEA , MDMA, Eritro-dihidro bupropiona, (±)- Hidroxibupropiona	<ul style="list-style-type: none"> • O estudo de reatividade cruzada de EIA indicou que uma combinação de compostos, incluindo metabolitos, é provavelmente responsável pelos resultados falso-positivos de EIA observados em laboratório, em vez de um único composto, pois foi observada baixa reatividade cruzada para compostos individuais quando analisados pelos ensaios EMIT II. 	Urina	Imunoensaio AMPH	(42)
Christine LH Snozek et al.	Mexiletina	<ul style="list-style-type: none"> • A urina livre de drogas enriquecida com mexiletina causou resultados positivos em todos os ensaios, embora os ensaios EMIT II Plus e KIMS tenham reagido de forma cruzada em concentrações mais baixas de mexiletina 	Urina	os imunoensaios automatizados Syva EMIT II Plus e Roche KIMS	(43)
Justin Kaplan et al.	Aripiprazol	<ul style="list-style-type: none"> • Potenciais reações cruzadas em crianças: fluvoxamina, buspirona, aripiprazol • Não está provado que possa provocar FP em adultos 	Urina	Não identificado	(44)
Navin Dadlani , Anna Farrar , Graham Jones	Fenofibrato	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilidade de resultados falso-positivos de anfetaminas devido à provável reatividade cruzada do fenofibrato com os reagentes do teste. 	Urina	Imunoensaios	(45)
Loreto Quesada et al.	Ácido fenoffbrico		Urina	DRI(®) Ecstasy,	(46)

Olof Beck et al.		<ul style="list-style-type: none"> • O teste CEDIA Amphetamine/Ecstasy e EMIT dau Amphetamine Class mostraram a maior reatividade em relação às novas drogas, o que era esperado, já que muitas têm estrutura e atividade semelhantes às das anfetaminas. 	Urina	CEDIA, EMIT e KIMS	(47)
Nancy C Brahm et al.	Bronfeniramina, bupropiona, clorpromazina, clomipramina, dextrometorfano, difenidramina, doxilamina, ibuprofeno, naproxeno, prometazina, quetiapina, quinolonas (ofloxacina e gatifloxacina), ranitidina, sertralina, tioridazina, trazodona, venlafaxina, verapamil, fenilpropanolamina		Urina	Imunoensaios	(48)
Guido Pelletti et al.		<ul style="list-style-type: none"> • Este método de triagem não é recomendado para compostos anfetamínicos, devido ao alto número de falsos positivos. 	Sangue total <i>post mortem</i>	Imunoensaios (CEDIA)	(49)
Hallvard Gjerde et al		<ul style="list-style-type: none"> • A presente modificação do método EMIT dau parece ser um bom método para triagem de drogas em amostras de sangue forense, exceto para anfetaminas em amostras de necropsia. • Também foi relatado anteriormente que amostras de sangue <i>post mortem</i> podem dar origem a anfetamina EMIT falso-positiva resultados, e foi sugerido que isso era devido a putrefactantes. 	Sangue <i>post mortem</i> (sangue total hemolisado)	EMIT dau	(50)
Yukiko Hino et al		<ul style="list-style-type: none"> • A rejeição da amostra ocorreu em alguns casos com os ensaios de anfetaminas EMIT. O sistema de imunoensaio EMIT modificado aqui apresentado parece ser útil para triagem de drogas de abuso em amostras de sangue <i>post mortem</i>, especialmente quando a urina não está disponível. 	Sangue <i>post mortem</i>	EMIT II Plus e EMIT dau	(51)
Simon Elliott , Vitória Burgess	Mebeverina	<ul style="list-style-type: none"> • Mebeverina é altamente instável em fluido biológico contendo esterase (em particular sangue e plasma), mas é bastante estável em soluções aquosas e urina. • O fluoreto de sódio não pareceu reduzir a degradação da mebeverina, mas sim a fisostigmina (inibidor da esterase, reduz a hidrólise da mebeverina). 	Sangue <i>post mortem</i>	Imunoensaios (CEDIA)	(52)

		<ul style="list-style-type: none"> • A falta de reatividade cruzada com os ác. Verátrico e vanílico sugere que a imunoligação ocorre na porção metoxibenzeno da molécula de mebeverina, que possui maior semelhança estrutural com as AMPH • A cadeia lateral de hidroxibutílica intacta de mebeverina e MB-OH evitou a reatividade cruzada com o imunoensaio, e que os resultados positivos para as AMPH poderiam ser devido a metabolitos N- desidroxibutilados de mebeverina como o PMEA e o PMA. • Num caso de intoxicação por mebeverina, foi analisado 1,2 mg/L, de <i>sangue post mortem</i> com as concentrações de de MB-OH e ácido verátrico de 74 e 127 mg/L, respectivamente pelo que testou positivo no IA de anfetaminas 			
F Musshoff , T Kraemer	Famprofazona (ingrediente dos comprimidos Gewodin)	<ul style="list-style-type: none"> • Famprofazona, sofre conversão metabólica em anfetamina e metanfetamina. Usando GC/MS, a ingestão de famprofazona foi verificada pela identificação do composto original inalterado na amostra de urina. 	Urina e sangue	triagem imunoquímica	(53)
Magdalena Łukasik-Glebocka et al	Suplemento dietético (Thermal Pro)	<ul style="list-style-type: none"> • De entre todos os componentes do suplemento o que poderá ter reagido no imunoensaio deverá ter sido o dimetilamiloamina (DMAA, geranamina) ou componente amargo da laranja. 	Urina	Imunoensaio (FPIA; Axsym, Abbott)	(54)
F Moriya , Y Hashimoto	Fenetilamina	<ul style="list-style-type: none"> • A fenetilamina, uma amina putrefativa, deu resultados positivos para AMP em concentrações acima de 5.000 ng/mL. • As amostras falso-positivas para AMP continham fenetilamina em concentrações relativamente altas devido à putrefação moderada a pesada. 	Sangue <i>post mortem</i>	Imunoensaio não especificado	(55)
Lars Kroener , Frank Musshoff , Burkhard Madea		<ul style="list-style-type: none"> • Os imunoensaios de microplaca revelaram sensibilidades mais altas e provaram ter vantagem na detecção das concentrações mais baixas de drogas. No entanto, especialmente para aplicações clínicas em casos de emergência com intoxicações agudas, quando os resultados de triagem são urgentemente necessários, ensaios homogêneos como ADx ou Cedia fornecem alternativas preferíveis com manuseio mais rápido e fácil. 	Sangue total	ADx e CEDIA DAU comparados com MTP e Pyxis 24	(56)
KA Moore et al			Sangue <i>post mortem</i>	ELISA	(57)
RA Klinger , LM Blum , F Rieders	N,N-dimetilformamida (DMF)		Soro, plasma e sangue <i>post mortem</i>	EMIT	(58)
Colisão IB et al.			Sangue <i>post mortem</i>	RIA	(59)
Um Paulo , Um poços , A Dasgupta	Quinidina (é um isômero óptico da quinidina)	<ul style="list-style-type: none"> • Os autores concluem que, embora o anticorpo usado no ensaio de quinidina seja estereoespecífico, o anticorpo usado no ensaio de anfetaminas pelo mesmo fabricante não é estereoespecífico 	Soro	Imunoensaios (Abbott)	(60)

		<ul style="list-style-type: none"> Os autores observaram reatividade cruzada significativa da L-anfetamina com o imunoensaio de anfetamina também comercializado pela Abbott Laboratories e executado no analisador AxSYM 		Laboratories, Abbott Park, IL).	
Luigino G Apolônio et al		<ul style="list-style-type: none"> Este kit é improvável serem suscetíveis a FP devido à putrefação de aminas O uso de PBS para eliminar as contribuições da matriz ao avaliara a reatividade cruzada das aminas que ocorrem naturalmente no processo biológico <i>post mortem</i> Outro fator a ser considerado é que o sangue não diluído pode resultar numa resposta mais forte porque a hemoglobina pode não ligar-se especificamente e reagir 3.3'; 5,5'-tetrametilbenzidina para causar um aumento na cor de fundo. 	Sangue, urina e saliva	ELISA direto Bio-Quant	(61)
Omar Felipe Dueñas Garcia	labetalol		Urina	Não especifica qual o imunoensaio	(62)
Joshua L. Fenderson et al.	Atomoxetina	<ul style="list-style-type: none"> Diazepam, hidromorfona ou zafirlucaste não foram relatados para provocar um falso-positivo para anfetaminas no imunoensaio CEDIA. Atomoxetina ou seus metabolitos sejam a causa do resultado do teste falso-positivo 	Urina	Imunoensaio CEIA.	(63)
Stacy EF Melanson et al	Clorpromazina ou bupropiona	<ul style="list-style-type: none"> É importante ressaltar que o(s) metabolito(s) da clorpromazina, e não o fármaco original, mostraram causar a interferência 	Urina	Imunoensaio de anfetamina/metanfetamina monoclonal EMIT II Plus	(64)
Jason M Barão et al.	Meta-clorofenilpiperazina (m-CPP)		Urina	Imunoensaio Anfetaminas II (Roche Diagnostics)	(65)
Erica R Casey et al.	Bupropiona		Urina	Imunoensaio Syva EMIT II	(66)
Isabel Gomila et al.	Benzofuranos (5-(2-Metilaminopropil) Benzofurano (5-MAPB), 5-(2-metilaminopropil)-2,3-di-hidrobenzofurano (5-MAPDB), 5-(2-Aminopropil)-Benzofurano (5-APB), 5-(2-Aminopropil)-2,3-di-hidrobenzofurano (5-APDB), 5-(2-	<ul style="list-style-type: none"> Foram feitos para inibir os transportadores de dopamina, noradrenalina e serotonina Mostraram afinidade para 5-HT2B/2C e adrenorecetores $\alpha 1$ /retores 2C Demostraram reatividade cruzada para 5-MAPB, 5-MAPDB, 5-APB e não mostraram reatividade para o EIA de AMPH o 5- AEDB 	Urina	Usando 8 metodos diferentes de imunoensaios para detecção de anfetaminas	(67)

	Etilaminopropil) Benzofurano (5-EAPB) e 5-(2-Aminoetil)-2,3 - di-hidrobenzofurano (5-AEDB)				
Kent R. Olson et al.	Efedrina, fenfluramina, isometepteno, MDA, MDMA, fentermina, fenmetrazina, fenilpropanolamina, pseudoefedrina, bupropiona, clorpromazina, labetalol, ranitidina, sertralina, trazodona, trimetobenzamida	<ul style="list-style-type: none"> • Todos os ensaios são reativos a metanfetamina e anfetamina, bem como a fármacos que são metabolizados gerando anfetaminas (benzfetamina, clobenzorex, famprofazona, femproporex, selegilina). O ensaio policlonal é sensível a amins simpatomiméticas de reação cruzada (efedrina, fenfluramina, isometepteno, MDA, MDMA, fentermina, fenmetrazina, fenilpropanolamina, pseudoefedrina e outros análogos da anfetamina); fármacos não estimulantes de reação cruzada (bupropiona, clorpromazina, labetalol, ranitidina, sertralina, trazodona, trimetobenzamida). O ensaio monoclonal é reativo a d-anfetamina e d-metanfetamina; além disso, muitos têm alguma reatividade para MDA e MDMA. 	Sangue e urina	Imunoensaios	(34)

5 Capítulo das anfetaminas

5.1 Enquadramento histórico

Desde os tempos mais remotos, que a natureza humana é caracterizada pela procura insaciável de prazer e de bem-estar, sendo que, perante dificuldades na obtenção desses objetivos tem recorrido à criação e/ou utilização de substâncias químicas das mais variadas origens (68).

As anfetaminas (AMPH) foram sintetizadas pela primeira vez em 1887, num laboratório em Berlim, pelo químico Lazar Edeleanu. Apesar desta descoberta ter sido feita no século XIX, este medicamento só foi testado em animais 40 anos depois (1927), data em que o químico G.A. Alles, juntamente com outros investigadores, voltaram a sintetizar a α -metilfenetilamina racémica, mais comumente conhecida na atualidade por anfetamina, ficando também reconhecidos pela identificação dos efeitos estimulantes desta substância. A sua síntese ocorreu no seguimento de uma tentativa de sintetizar um composto que se demonstrasse mais económico e simples de sintetizar para substituir a efedrina, medicamento este que atua como agonista beta adrenérgico (19,68,69).

Em 1910 foi introduzido pela primeira vez o conceito de aminas simpaticomiméticas, por Barger e Dale, o que mais tarde contribuiu para que investigadores, baseados nestes avanços, descobrissem derivados das catecolaminas, estando assim, um passo mais perto de sintetizar a anfetamina.

Em 1932, surgiu com o nome comercial de Benzedrina, registado pela empresa farmacêutica Smith Kline & French, em França. Embora a substância ativa da Benzedrina seja a anfetamina, só passados alguns anos é que surgiu com essa designação, razão pela qual nas primeiras publicações surge apenas o nome comercial.

A farmacêutica Smith Kline & French até forneceu amostras gratuitas do sulfato de Benzedrina a médicos interessados em prescrever a substância e, para estudos que pretendessem explorar lucrativamente os efeitos da anfetamina, por exemplo na função cerebral e respiratória.

Quando se teve a perceção que as anfetaminas atuavam como estimulantes do sistema nervoso central, começaram a ser utilizadas para diferentes finalidades, tais como o alívio da fadiga e o aumento do estado de alerta, e como broncodilatadores em casos de quadros clínicos de asma (68).

Porém só em 1935 é que foram colocadas no mercado, como tratamento para narcolepsia (para a qual ainda é usada hoje), depressão leve, parkinsonismo pós-encefálico e uma série de outros distúrbios (70).

Primeiramente foi produzida sob a forma farmacêutica de pó, com a função de atuar como descongestionante nasal, e apenas uns anos mais tarde, surgiu sob a forma de comprimidos. Com o aparecimento destes últimos e, como não era necessária prescrição médica para adquirir este medicamento, rapidamente se tornou bastante requisitado pela população, uma vez que venderam cerca de 50 milhões de unidades nos primeiros 3 anos em que esteve disponível no mercado (68).

Mas a empresa farmacêutica Smith Kline & French continuou a investir nesta substância e, em 1937 lançou no mercado o isómero mais potente dos 2 isómeros da anfetamina, a d-anfetamina, com o nome comercial de "Dexedrine". Foi também neste ano que, pela primeira vez se descobriram os efeitos benéficos da Benzedrina no tratamento de crianças, que na altura eram descritas com um comportamento problemático, mas que agora se entende se tratar de uma síndrome, o transtorno de défice de atenção/hiperatividade.

Apesar deste sucesso, rapidamente se percebeu que seria imperativo que a anfetamina apenas se pudesse obter com uma prescrição médica, lei que surgiu em 1939, sendo que estas prescrições começaram por estar associadas a estudantes e profissionais médicos, e mais tarde, também a artistas, militares e condutores de camiões (68) devido a estes medicamentos atuarem na redução do stresse e na melhoria da concentração e do desempenho intelectual (70).

Nesta altura Bett comentou sobre o uso generalizado de 'pílulas de energia' pelas forças aliadas na Segunda Guerra Mundial, estimando que 150 milhões de comprimidos de benzedrina foram fornecidos ao pessoal de serviço britânico e americano durante o curso do conflito global,

de forma a aumentar o estado de alerta e a agressividade, mas também para combater a fadiga dos soldados, devido aos seus efeitos estimulantes. Um dos principais efeitos deste tipo de consumo é de provocar insónias, o que se demonstrou particularmente útil para os vários militares das tropas, especialmente para as forças aéreas que tinham de completar voos de longa duração.

Apesar da utilização em larga escala na II Guerra Mundial, apenas no período da Guerra da Coreia é que foi oficialmente autorizado o uso das anfetaminas pelos militares, nos Estados Unidos.

Durante este período e durante o pós-guerra foi amplamente consumido por parte da população do Japão, o que levou a uma pandemia de consumo de forma a aumentar a capacidade de trabalho (existem registos que os operários das fábricas de munições, situadas no Japão, beneficiavam dos efeitos da anfetamina, utilizando-a para combater a sonolência o que levou a que a OMS adotasse medidas para o seu controlo (68).

Em 1946 a indústria farmacêutica desenvolveu uma lista com 39 usos clínicos desta substância. Destes podemos destacar o tratamento da esquizofrenia, de dependência de opiáceos, paralisia cerebral infantil, náuseas, soluços persistentes e doença por radiação. Hoje em dia, este medicamento é maioritariamente prescrito para o tratamento de obesidade, narcolepsia e síndrome do défice de atenção e hiperatividade.

A produção de anfetaminas continuou a aumentar exponencialmente na indústria farmacêutica, e em 1970 conseguiu atingir uma quantidade anual de 10 biliões de comprimidos, sendo que destes 50 a 90% acabavam por chegar ao mercado negro. Este valor alertou o Departamento de Justiça dos Estados Unidos, que um ano mais tarde viu-se obrigado a impor quotas legais na produção deste medicamento (68).

Por volta de 1985, o uso ilegal de *ecstasy* alcançou proporções tão grandes nos EUA que ele foi declarado ilegal. No Reino Unido, desde 1977, todas as substâncias derivadas da anfetamina (incluindo a MDMA) já eram consideradas ilegais sendo incorporada à Lista I do Convénio de Substâncias Psicotrópicas e classificadas como droga de abuso.

O Convénio de Substâncias Psicotrópicas realizado inicialmente em 1961, em Nova York, de abrangência internacional, foi retificado junto ao Secretário-Geral da Organização das Nações Unidas (18/06/1964) (22).

Apesar de, aparentemente, ser um medicamento bastante versátil, podendo ser utilizado para o tratamento de diferentes indicações, rapidamente se começou a reportar um abuso desta substância, devido ao facto do seu forte potencial de causar dependência (68).

5.3 Epidemiologia

Relativamente às anfetaminas naturais, várias estão presentes na planta *Catha edulis*, que cresce livremente a altas altitudes no Este de África e na Península Arábica, sendo um hábito generalizado de consumo das populações locais.

Quanto às anfetaminas sintéticas, o seu consumo dá-se sobretudo nas classes populacionais mais jovens, afeta preferencialmente os adolescentes, adultos jovens, ou homens homossexuais ou bissexuais. A mais popular anfetamina tipo “designer drug” é a MDMA, muito comum nos dias de hoje em festas (71).

O uso indevido dos estimulantes tipo anfetaminas prescritos medicamente, também são comuns. No entanto, apenas alguns países reportam qualquer prevalência desta situação, principalmente os da América do Norte e do Sul, não se podendo, no entanto, negligenciar este acontecimento noutros países. Segundo dados dos *Centers for Disease Control and Prevention*, nos EUA, o consumo de fármacos sujeitos a receita médica aumentou, sem prescrição para os mesmos, como aconteceu, por exemplo, com o Adderall (anfetamina e dextroanfetamina).

O consumo de múltiplas substâncias, ou policonsumo, continua a representar uma grande preocupação, tanto numa perspectiva de saúde pública como de controlo de drogas (72,73).

Na Europa, o consumo de estimulantes do tipo anfetaminas (excluindo *ecstasy*) encontra-se pouco abaixo da média global, estando a anfetamina mais disponível do que a metanfetamina,

enquanto que o consumo de *ecstasy* é superior. Na Europa central e oeste, a anfetamina e o “*ecstasy*” continuam a ser os estimulantes sintéticos mais consumidos. Durante os últimos anos assistiu-se a uma mudança no conteúdo dos comprimidos de *ecstasy*: a MDMA e homólogos deixaram de ser as únicas substâncias psicoativas e o conteúdo dos comprimidos ficou cada vez mais diversificado, com menor presença destas substâncias. Enquanto o uso da anfetamina tem estabilizado em algumas regiões, existem preocupações que esta esteja a ser substituída pela metanfetamina, devido à crescente disponibilidade da mesma em alguns mercados. Em algumas regiões mais afetadas pela crise financeira, verificou-se uma descida na demanda de heroína e cocaína, pois, os consumidores destas, alteraram para drogas mais baratas, como por exemplo, a metanfetamina e canabinóides (72–74).

No que diz respeito à nossa realidade nacional, dados de 2011 revelam que, relativamente ao consumo ao longo da vida, a maior prevalência é a de canabinóides, para todas as idades, seguida pela cocaína, para idades inferiores a 16 anos, e pelas anfetaminas, para idades superiores aos 16 anos. No Alentejo, a substância mais prevalente, depois dos canabinóides, são as anfetaminas, registando-se aqui o valor mais elevado do país. A prevalência do consumo é, globalmente, superior no sexo masculino. Na população escolar portuguesa, o consumo de drogas, que tinha vindo a aumentar desde os anos 90, diminuiu, pela primeira vez, em 2006/2007, subindo novamente até 2010/2011, sendo os canabinóides a droga largamente preferencial, seguida da cocaína, *ecstasy*, outras anfetaminas e dietilamida do ácido lisérgico (LSD). O *ecstasy* apresenta uma média de idade de iniciação de 17 anos e as restantes anfetaminas, de 18 anos. Estes foram considerados pela população escolar, como menos acessíveis do que os canabinóides. No entanto, tem-se verificado, ao longo dos anos, um aumento na perceção da facilidade na obtenção de anfetaminas (75).

5.4 Prevalência

Durante o recente período de pandemia Sars-Cov2, que atravessámos, a economia da vida noturna da Europa foi perturbada o que parece ter conduzido a uma redução da procura de estimulantes durante 2020, sendo provavelmente um fenómeno de curta duração, uma vez que a disponibilidade e o consumo de drogas mantêm-se em níveis elevados em toda a União Europeia, ainda que existam diferenças consideráveis entre os países.

Segundo o Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência no Relatório Europeu sobre Drogas tendências e evoluções de 2022, estima-se que aproximadamente 83.4 milhões, ou seja, 29% dos adultos (15-64 anos) na União Europeia, tenham alguma vez consumido uma droga ilícita, sendo que o consumo foi comunicado por mais homens (50.5 milhões) do que mulheres (33 milhões).

De entre as drogas consideradas ilícitas a canábis continua a ser a substância mais consumida (22.2 milhões), os estimulantes são a segunda categoria indicada com mais frequência. Os dados do Relatório Europeu sobre Drogas de 2022, é baseado nos dados estatísticos recolhidos em 2020, onde se estima que, 3.5 milhões de adultos tenham consumido cocaína, 2.6 milhões MDMA e 2 milhões de anfetaminas, cerca de 1 milhão de europeus consumiram heroína ou outro opiáceo ilícito (74).

5.5 Características das anfetaminas

Como se sabe as anfetaminas representam uma classe de substâncias psicoativas, cuja estrutura é semelhante aos neurotransmissores monoamínicos (nomeadamente à adrenalina/epinefrina). As AMPH derivam da estrutura das feniletilaminas, as quais são, primariamente, estimulantes do sistema nervoso central (SNC). Existe uma grande variedade de anfetaminas, tendo em conta que a sua estrutura permite substituições em variados locais da sua constituição, nomeadamente a nível do anel aromático, o que se traduzirá, também, em variações nos seus efeitos. Podem, assim, ser divididas em dois grandes grupos, as naturais como a catinona (presente na planta *Catha edulis*), a efedrina (um alcaloide encontrado nas plantas *Ephedra sp*), e a mescalina (presente em várias espécies de cactos), e as sintéticas, dentro desta classe podem ser ainda subdividida em anfetaminas clássicas como a anfetamina (*speed*), metanfetamina (*ice*, *crystal meth*) e 3,4- metilendioxi metanfetamina (MDMA) e pelos novos derivados das anfetaminas (*legal highs*) maioritariamente os derivados da catinona, as chamadas catinonas sintéticas, estas catinonas sintéticas têm a mesma estrutura como base consistindo esta num anel benzeno e uma cadeia lateral aminoalquilo. Atualmente são conhecidos cerca de 30 derivados da catinona, como a mefedrona, metilona, metilendioxi pirovalerona (MDPV), metedrona ou butilona (76).

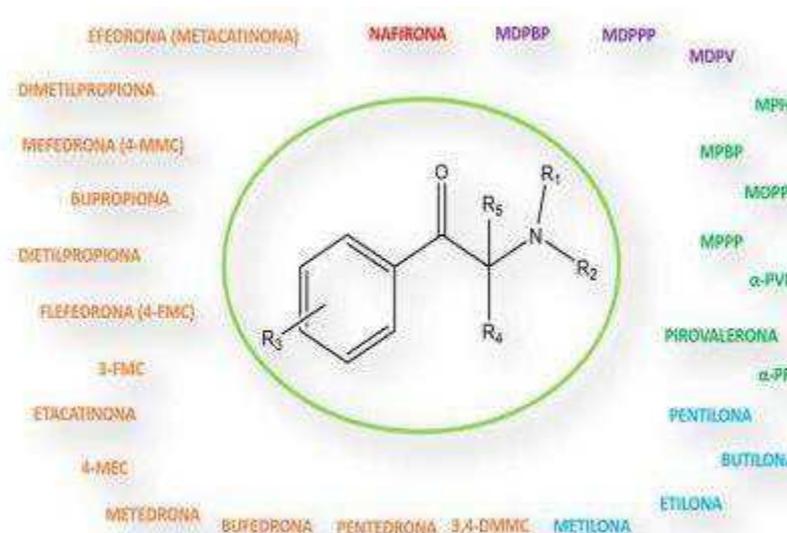


Figura 1 – Esquema representativo das diversas catinonas sintéticas e a sua estrutura básica. Fonte (76).

As catinonas sintéticas derivam das fenilalquilaminas e estão diretamente relacionadas com as anfetaminas, devido a apresentarem uma estrutura química muito semelhante como se pode ver na fig 1. A diferença entre elas reside no grupo cetona introduzido na posição β da cadeia aminoalquílica ligada ao anel fenilo. Devido a este facto, estas novas drogas são designadas por β -anfetamina, sendo análogos da catinona natural e, sintetizados pela adição de vários substituintes. O grupo β -ceto vai aumentar a sua polaridade e como consequência estes compostos tendem a ser mais hidrofílicos, o que diminui a capacidade para atravessar a barreira hematoencefálica fazendo com que sejam menos potentes do que as anfetaminas.

Como consequência são necessárias doses mais elevadas de catinonas sintéticas para alcançar os mesmos efeitos causados pelas anfetaminas (76,77).

As anfetaminas apresentam-se como um óleo incolor volátil e insolúvel em água, o sal mais comum é o sulfato, um pó branco solúvel em água, sendo que a maioria das formulações ilícitas existem nesta forma, podendo também existir sob a forma de comprimidos (9,73).

É, normalmente, consumida sob a forma de d-anfetamina ou mistura racêmica¹. As principais vias de administração são a oral, nasal ou, menos frequentemente, intravenosa (IV), sublingual ou rectal. Não é, habitualmente, fumada pelo facto do sal sulfato ser insuficientemente volátil.

O padrão de abuso das anfetaminas é o consumo tipo “binge”, que consiste num período de frequente administração da droga, seguido de um período de abstinência, com sucessivas repetições deste ciclo (7,73).

As anfetaminas são fortes estimulantes do SNC e do sistema simpático, porém também apresentam efeitos nos sistemas cardiovascular, pulmonar, gastrointestinal, metabólico e muscular (7).

5.5.1 Mecanismo de ação

As anfetaminas, uma vez que derivam da família das feniletilaminas, atuam como estimulantes do sistema nervoso central e têm fortes semelhanças com a adrenalina, como mostra na Figura 2. No entanto o seu mecanismo de ação é bastante complexo, pois conseguem interagir com diferentes alvos (68).

Devido ao facto de serem estruturalmente similares aos neurotransmissores monoamínicos:

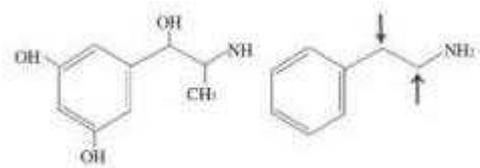


Figura 2 – Comparação entre a estrutura química da adrenalina e da feniletilamina. Fonte: (68).

noradrenalina (NA), dopamina (DA) e serotonina (5-HT) são consideradas substratos exógenos competitivos dos transportadores de monoaminas presentes na membrana plasmática de neurónios monoaminérgicos, local principal onde atuam (68,73).

Assim que as anfetaminas entram no citoplasma da célula, depois de se ligarem aos transportadores de monoaminas, estimulam a libertação de neurotransmissores. Este processo pode acontecer por via de dois mecanismos distintos, que são eles o gradiente de concentração, através da reversão da função normal da serotonina, ou pelo aumento da concentração citoplasmática de neurotransmissores, pois deixa de haver armazenamento nas vesículas, devido à ação das anfetaminas (68).

Estas são reconhecidas pelos transportadores membranares destes neurotransmissores existentes no neurónio monoaminérgico, combinam-se com eles, e são incorporadas para o interior do citoplasma, através da normal recaptação destes neurotransmissores. Aqui, irão encontrar-se, preferencialmente, na sua forma protonada, uma vez que o pH intracelular é inferior ao extracelular. As anfetaminas na sua forma desprotonada podem difundir-se, de volta, para a fenda sináptica, estando disponíveis para um novo ciclo de captação mediada pelos transportadores monoamínicos (68,73).

Através deste mecanismo, é reduzida a recaptação de neurotransmissores endógenos e, por outro lado, induzido o transporte reverso desses mesmos neurotransmissores (68).

O resultado final e a amplificação da ação dos neurotransmissores monoamínicos a nível dos terminais nervosos, também denominado de ação simpaticomimética.

De uma forma resumida, sabe-se que as anfetaminas atuam, principalmente sobre a NA e DA. A NA, atua principalmente no bloqueio da sua recaptação, que predomina em baixas doses e, no aumento da sua libertação, que predomina em altas doses. A d-anfetamina é um potente inibidor da recaptação de NA, o que pode ser a base da sua maior potência em relação à l-anfetamina. Já a DA provoca inibição da sua recaptação e aumenta a sua libertação via transporte reverso. A nível periférico, a libertação de NA é superior à de DA. O que faz com que haja um aumento da atividade da tirosina hidroxilase, que por sua vez conduz a uma maior libertação de catecolaminas (73).

¹ Uma mistura racémica é definida como uma mistura de dois enantiómeros, com quantidades iguais, sendo um dextrógiro (d⁺) e o outro levógiro (l⁻). Sendo assim, um feixe de luz que incide sobre essa mistura não é desviado para a direita e nem para a esquerda, seguindo paralelo ao eixo das abcissas.

5.5.2 Toxicocinética

No que diz respeito à toxicocinética, as anfetaminas podem ser administradas por diversas vias, como por exemplo, oral, nasal, retal ou vaginal, inalada e intravenosa (73). A forma mais comum é a via oral, onde a anfetamina é rapidamente absorvida pela mucosa bucal e trato gastrointestinal. Os níveis plasmáticos atingem a concentração máxima entre 1 a 3 horas, dependendo de fatores como a atividade física, a quantidade de alimento presente no estômago e o pH da urina. A absorção completa dá-se de 4 a 6 horas após a exposição (78).

Como se sabe as anfetaminas são um grupo relativamente homogêneo, nas quais apresentam ligação às proteínas plasmáticas em quantidades muito variadas (menos de 20%) e, como tal, elevada biodisponibilidade oral e elevado volume de distribuição (4L/Kg), por se difundirem facilmente para o compartimento extravascular. Esta difusão ocorre, também, por serem bases fracas (pKa 9,9), pelo seu peso molecular ser relativamente baixo e por serem substâncias anfipáticas, conseguindo atravessar facilmente membranas e atingindo concentrações elevadas em tecidos/fluidos com pH inferior ao do sangue, tal como a saliva no suor e no leite (73). Assim sendo, no processo de distribuição a anfetamina é concentrada nos rins, nos pulmões, no líquido cefalorraquidiano e no cérebro e, devido às suas características lipofílicas conseguem também atravessar a barreira hematocefálica e placentária, resistindo à degradação pela monoamino oxidase (MAO), devido à presença do grupo α -metil na sua estrutura molecular, o qual aumenta ainda mais a sua solubilidade através de membranas (73,78).

A concentração máxima plasmática (C_{max}) é atingida entre 1,5-3h após a administração. A C_{max} aumenta de forma dose-dependente, não existindo diferenças significativas entre os seus dois enantiómeros (68). É metabolizada, principalmente, por dois mecanismos diferentes. O primeiro é a N-desaminação e oxidação em derivados de ácido benzóico, como a 1-fenil-2-propanona (o seu principal metabolito), sendo a reação catalisada pelas isoenzimas do complexo CYP450, e o segundo a hidroxilação em 4-hidroxianfetamina, com intervenção do CYP2D6. Existe ainda uma via minor de metabolização, que compreende a oxidação do β -carbono na cadeia lateral, com formação de norefedrina, o seu metabolito ativo.

Apesar desta substância ser metabolizada no fígado, existe ainda uma percentagem de 3 a 55,5% que é excretada inalterada, acabando por ser excretada também por via hepática, mas principalmente por via renal (68,73). Assim, as semi-vidas plasmáticas estão, em grande extensão, dependentes do pH urinário, por serem bases fracas, a sua excreção renal aumenta com a acidificação da urina e diminui com a sua alcalinização, razão pela qual os indivíduos abusadores destas substâncias consomem bicarbonato, na tentativa de prolongar os seus efeitos. De um modo prático quando se administra 5 mg de D-L-anfetamina em homens adultos saudáveis observa-se eliminação por via urinária no intervalo de 3 a 4 dias. A alcalinização da urina prejudica a eliminação dos derivados anfetamínicos (22).

As semividas de eliminação de ambos os isómeros podem variar, por exemplo o enantiómero positivo, por ter um metabolismo mais rápido, tem uma semi-vida de eliminação mais curta que o negativo, estas variações são de 6 a 12h podendo chegar a 34 horas e não parecem ser afetadas pela via de administração, mas sim como referi anteriormente pelo pH urinário.

Os indivíduos dependentes de anfetaminas apresentam normalmente maior volume de distribuição (6L/Kg) e maior semi-vida de eliminação, pela acumulação nos tecidos e pela tolerância farmacocinética que desenvolvem, uma vez que semi-vidas longas podem levar a acumulação, após repetidas administrações.

As anfetaminas são biotransformadas noutros compostos ativos da classe, durante o processo de biotransformação (fig.3). O conhecimento da toxicocinética é essencial para o sucesso na interpretação de resultados em análises toxicológicas, influenciando diretamente na avaliação final e emissão de laudos analíticos (22), uma vez que a análise da anfetamina na urina pode ser confundida, devido a ser também um metabolito da metanfetamina e de vários compostos medicinais (73,78).

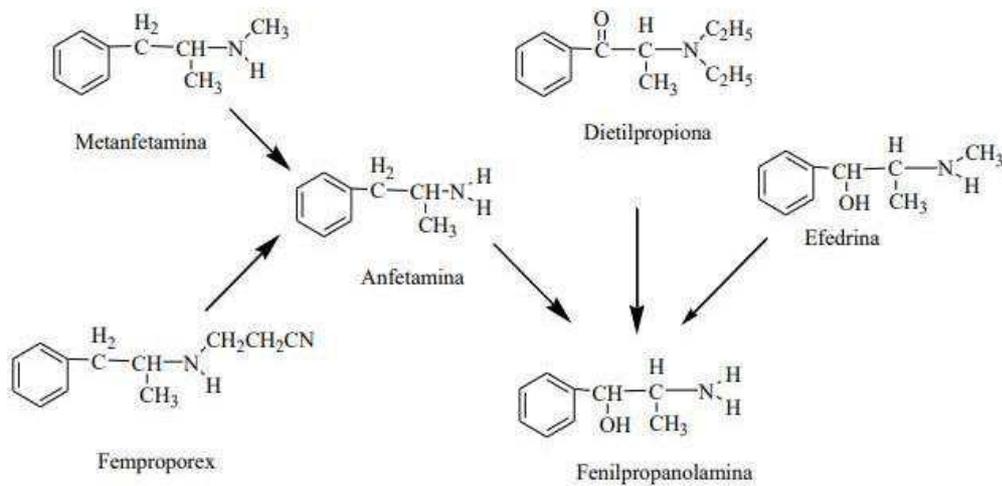


Figura 3 – Principais vias de biotransformação das anfetaminas. Fonte (22).

5.5.3 Toxicodinâmica

Os efeitos clínicos das anfetaminas são uma consequência da estimulação adrenérgica periférica e central, através da regulação da ação dos neurotransmissores catecolamínicos, nomeadamente a noradrenalina e a dopamina. Assim, dá origem à sua manifestação clínica mais evidente: a síndrome simpaticomimética (mediada pelos recetores alfas e beta-adrenérgicos), caracterizada por taquicardia, taquipneia, hiperidrose com movimento coreoestático, diaforese, hipertensão, hipertermia, midríase, hiperreflexia, tremores e um espectro de manifestações no Sistema Nervoso Central, como agitação, irritabilidade, paranoia, alucinações, desinibição, hiperexcitação, convulsões e coma. Estes efeitos podem ser condicionados por diversos fatores que convergem num determinado indivíduo num determinado momento (68,73,79).

As anfetaminas são muito utilizadas pelo seu efeito estimulante, eufórico, anorexigénio, alucinogénio e empatogénico ou entactogénico (estes dois últimos principalmente usados para descrever os efeitos da MDMA na socialização). Os consumidores da planta *Catha Eludis* afirmavam, já, um aumento da energia, estado de alerta, autoestima, imaginação, da capacidade de associar ideias e uma sensação de prazer (73).

5.5.4 Efeitos tóxicos

Pelo facto das variadas ações farmacológicas das anfetaminas se traduzirem, não só, em eficácia terapêutica, mas também, em efeitos adversos e risco de abuso para fins recreativos, o balanço do benefício/risco é o desafio chave no seu potencial uso clínico (73).

Os efeitos toxicológicos dos derivados anfetamínicos são complexos, mas basicamente os análogos anfetamínicos são conhecidos por aumentar a concentração de aminas biogénicas, incluindo a dopamina e norepinefrina, no SNC. Este é o mecanismo de ação aceite para indução de desordens de movimento (hiperestimulação) bem como para a psicose anfetamínica associados ao abuso dessa substância. As anfetaminas possuem capacidades de aumentar as concentrações sinápticas destes neurotransmissores por diferentes mecanismos, que incluem aumento da libertação de dopamina na fenda sináptica devido à alteração de pH das vesículas que armazenam a dopamina permitindo a sua libertação. Outro mecanismo aceite é a inibição da recaptação dessas

substâncias via transporte ativo ou por atividade do transportador de dopamina dependente de canal.

Os efeitos mais comuns sobre o SNC consistem em inquietação, tontura, tremor, reflexos hiperativos, loquacidade, tensão, irritabilidade, insónias, febre e, algumas vezes, euforia. Pode ocorrer confusão, agressividade, alterações da libido, ansiedade, delírio, alucinações paranoides, estados de pânico e tendências suicidas ou homicidas, sobretudo em pacientes com transtornos mentais. Todavia, esses efeitos psicóticos podem ser produzidos em qualquer indivíduo, se forem ingeridas quantidades suficientes da substância por períodos prolongados. Em geral, a estimulação central é seguida de fadiga e depressão. Os efeitos cardiovasculares são comuns e incluem cefaleias, calafrios, palidez, ou rubor, palpitação, arritmias cardíacas, dor anginosa, hipertensão ou hipotensão e colapso circulatório. Pode ocorrer sudorese excessiva. Os sintomas gastrointestinais incluem boca seca, gosto metálico, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia e cólicas abdominais. Em geral, a intoxicação fatal termina em convulsões e, os principais achados patológicos consistem em hemorragias cerebrais. Os mecanismos moleculares clássicos pelos quais estes eventos se desencadeiam incluem stress oxidativo, excitotoxicidade e disfunção mitocondrial (22,80).

Embora altas doses de anfetaminas possam provocar liberação de serotonina, os efeitos nos recetores serotoninérgicos (5HT e 5HT2) são muito mais significativos para as anfetaminas alucinógenas (ex: *ectasy*). A concentração de MDMA requerida para estimular a liberação de serotonina é dez vezes menor que a requerida para a liberação de dopamina ou norepinefrina (22,79).

Como consequência da liberação de catecolaminas, há poderosas ações estimulantes tanto no SNC quanto nos recetores periféricos alfa e beta adrenérgicos, resultando em estado de alerta aumentado, aumento das pressões sistólica e diastólica, aumento da atividade locomotora, estimulação do centro respiratório bulbar e na redução da sensação de fadiga e aumento do efeito anorexigénio.

O mecanismo de dependência a essas substâncias parece estar relacionado especificamente à ação da dopamina e das ações desta amina sobre estruturas da via mesolímbica (*nucleus accumbens*, córtex frontal...). Os efeitos da serotonina e da dopamina no sistema mesolímbico são responsáveis pela alteração de percepção e pelo comportamento psicótico, paranoia e agressividade verificados na intoxicação.

As anfetaminas apresentam um fenómeno chamado taquifilaxia (tolerância aguda), que consiste na obtenção de respostas menores a substâncias depois de repetidas administrações. A explicação para este fenómeno encontra-se no seu próprio mecanismo de ação. Se as administrações são contínuas e próximas umas das outras ocorrerá um esvaziamento progressivo dos neurotransmissores adrenérgicos e dopaminérgicos que podem chegar ao esvaziamento completo. Existem evidências de que a toxicidade induzida pelas anfetaminas vai além do dano envolvido com recetores neuronais dopaminérgicos e serotoninérgicos, atingindo até mesmo células endoteliais. Os mecanismos exatos e os danos associados ainda necessitam de elucidação. Entretanto, os danos se estendem a processos excitotóxicos, proteolíticos, inflamatórios e biogénicos que contribuem com o processo de stress oxidativo.

Os efeitos tóxicos agudos das anfetaminas é resultado de uma excessiva concentração extracelular de NA, DA e 5-HT, consequência do seu mecanismo de ação farmacológicas e, em geral, resultam da superdosagem.

A interrupção do uso crónico das substâncias desse grupo pode acarretar um efeito rebote semelhante ao observado em consumidores de cocaína e ocorre em, aproximadamente, 90% dos consumidores. É caracterizado por depressão, “fissura” pela substância, ansiedade, insónias, cansaço físico, paranoia e irritabilidade. Os sintomas são mais intensos nas primeiras semanas de abstinência e podem persistir por meses (22).

5.5.5 Efeitos do consumo de anfetaminas

5.5.5.1 Efeitos Agudos

Os efeitos agudos causados pelo consumo de anfetaminas surgem, principalmente, devido à produção excessiva de noradrenalina, dopamina e serotonina, que se acumulam no espaço extracelular, devido ao seu mecanismo de ação. Uma vez que a anfetamina atua como um estimulante do SNC, o quadro clínico mais comum de ocorrer está relacionado com sintomas do sistema adrenérgico, tais como hipertensão, tremor, taquicardia, taquipneia, diaforese, midríase, juntamente com sentimentos de aumento de confiança, sociabilidade, euforia e energia. Quando os efeitos do MDMA começam a diminuir os sintomas adquiridos têm tendência a ser o oposto, como relaxamento do corpo.

Outros sintomas possíveis de observar pertencem ao foro neurológico, como por exemplo alucinações, paranoia, convulsões, e em casos mais extremos, pode conduzir a coma. Tem também, a particularidade de conseguir suprimir o apetite e a fadiga, podendo mesmo levar a quadros de insónia (68).

Os três principais mecanismos de toxicidade das anfetaminas são a hiponatrémia, a hipertermia e o stress oxidativo.

5.5.5.2 Efeitos crónicos

Os efeitos que aparecem a longo prazo da utilização de anfetaminas têm sido largamente estudados com o intuito de mais facilmente responsabilizar os seus utilizadores das consequências nefastas que podem surgir (68).

A intoxicação crónica por anfetaminas é caracterizada por sintomas semelhantes aos da superdosagem aguda. Porém, as condições mentais anormais são mais comuns, levando ao surgimento de psicose anfetamínica, caracterizada por alucinações tácteis e ilusões paranoides, confusão, delírio e pânico, podendo atuar como fator precipitante de esquizofrenia incipiente.

O abuso crónico das anfetaminas é caracterizado por fases de autoadministração de doses repetidas durante horas ou dias seguidos por períodos de sono profundo e prolongado depois do qual, o individuo apresenta-se hiperfágico, disfórico e com grande sensação de cansaço físico. A tolerância aos efeitos simpaticomiméticos (taquicardia, hipertermia, hipertensão) é menor do que as que induzem efeitos psicoestimulantes, sendo o uso repetido um fator de risco para outras complicações orgânicas, além do mais, é muito frequente que os consumidores habituais de anfetaminas utilizem sedativos para reduzir a sensação de disforia induzida pelo uso prolongado da substância gerando um risco de adição ou potenciação dos efeitos tóxicos caso não se alcance o seu efeito. Casos de vasculites necrosantes também está associada ao abuso crónico destas substâncias além de problemas em válvulas cardíacas e hipertensão pulmonar primária (22).

Esses efeitos, tais como neurotoxicidade e lesão cerebral, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade e hepatotoxicidade e rabdomiólise são as principais consequências provocadas pelo consumo prolongado das anfetaminas.

5.5.6 Fatores condicionantes

O tipo e severidade dos efeitos das anfetaminas, tanto os desejados como os tóxicos, são bastante imprevisíveis, uma vez que são condicionados por uma grande variedade de fatores, como a dose, a via de administração, as características do consumidor, os estados fisiológicos e fisiopatológicos, as condições ambientais e co-exposição com outras substâncias.

A dose pode variar de acordo com a fórmula da substância e, é o que vai determinar a intensidade e duração dos efeitos, bem como o potencial aditivo. Com a tolerância, são necessárias doses cada vez maiores para atingir os mesmos efeitos, potenciando também a toxicidade.

A via de administração pode condicionar os efeitos adversos das anfetaminas, independentemente de outros fatores. A prevalência de sintomas psicológicos, como depressão, ansiedade, paranoia, alucinações ou violência, está associada principalmente à via intravenosa. A via nasal apresenta elevado potencial de abuso, por ser muito mais aditiva do que a via oral, e tem, igualmente, maior probabilidade de complicações, quando comparada com esta.

Por outro lado, têm de se ter em conta as características do consumidor, como o sexo, a idade, a etnia, a orientação sexual ou toxicogenética, que de certa forma condicionam a capacidade metabólica do indivíduo, a sua suscetibilidade aos efeitos e a aquisição dos padrões de consumo.

A co-exposição com outras substâncias pode ocorrer, não só por uma exposição inadvertida por contaminantes contidos nas formulações anfetamínica, mas também pelo policonsumo simultâneo de outras substâncias: lícitas, ilícitas, fármacos ou componentes presentes na alimentação (73).

5.5.7 Interações

As interações com as anfetaminas podem ocorrer a nível farmacocinético e/ou farmacodinâmico. Relativamente às interações farmacocinéticas, uma vez que as anfetaminas são sobretudo metabolizadas pelo complexo enzimático CYP450, os seus efeitos podem ser influenciados por outras substâncias que partilhem ou afetem a mesma via metabólica. Por exemplo, inibidores do CYP2D6 reduzem o metabolismo hepático das anfetaminas, podendo prolongar a sua toxicidade. Por outro lado, as anfetaminas podem potenciar os efeitos deletérios de substâncias ou de fármacos com reduzida janela terapêutica que são substratos do CYP450, como antidepressivos tricíclicos, antipsicóticos, antiarrítmicos, β -bloqueantes ou tramadol.

A nível das interações farmacodinâmicas, por serem simpaticomiméticas, podem também interagir com substâncias que partilhem do mesmo mecanismo de ação ou que sejam suas antagonistas (73).

5.5.7.1 Contaminantes das formulações anfetamínica

Pelo facto das anfetaminas ilícitas serem produzidas em laboratórios clandestinos, o seu conteúdo e pureza dependem muito da fonte, pelo que os restantes compostos que fazem parte da sua composição podem originar efeitos farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos inesperados. Muitas das vezes são adicionadas substâncias, só para aumentar o volume das amostras e assim aumentar o lucro, que apesar de serem consideradas como inertes podem ter influência nos efeitos da droga, como, por exemplo, o bicarbonato de sódio, que é adicionado com intenção de alcalinizar os fluidos de excreção, retardando assim a eliminação das anfetaminas.

Esta diminuição no grau de pureza, pelos contaminantes, faz com que os consumidores tenham de aumentar as quantidades administradas para obterem os efeitos desejados, aumentando também assim o risco de efeitos tóxicos, tanto pela anfetamina como pelos seus contaminantes,

podendo levar a casos de overdose se as substâncias tomadas de seguida possuírem maior grau de pureza.

De entre os contaminantes mais comuns das anfetaminas destacam-se os produtos derivados da síntese química, as misturas com outras anfetaminas, o bicarbonato de sódio, o talco, os açúcares, a quetamina, a efedrina, a cafeína, o LSD, o dextrometorfano e outros excipientes inertes.

Os produtos resultantes da síntese química, como a MDA, tetraidrofurano ou metanol, podem interagir com a MDMA ou possuir efeitos tóxicos intrínsecos.

Normalmente existe sempre misturas de anfetaminas, por exemplo, a associação de MDMA com MDA, MDEA, metanfetamina ou outras. Uma vez que estas partilham semelhantes vias metabólicas e mecanismos de ação, o potencial de interação é elevado. Os níveis plasmáticos aumentam, potenciando-se a ação tóxica de cada uma destas substâncias e potenciando a adição, principalmente na associação de anfetaminas pró-dopaminérgicas. Por exemplo, a associação de MDMA com metanfetamina, provoca efeitos sinérgicos na euforia e desinibição social, e efeitos tóxicos mais intensos do que cada uma destas substâncias separadamente.

O dextrometorfano é uma substância muito presente nestas formulações, pois é capaz de potenciar os efeitos pro-serotoninérgicos, além de, competir pelas mesmas vias metabólicas (CYP450), aumentando a incidência e severidade dos efeitos adversos de ambas as substâncias.

A Cafeína muitas vezes está presente por duas razões, ou contaminação da formulação ou por consumo concomitante de café, chá, refrigerantes ou bebidas energéticas. Esta tem a capacidade não só de aumentar a absorção intestinal, mas também provocar a morte quando coadministrada de forma gauda com anfetamina, MDMA ou MDA. Das interações com a MDMA fazem parte o aumento da libertação de DA, a potenciação da neurotoxicidade serotoninérgica, o aumento da intensidade e duração da resposta hipertérmica, a taquicardia profunda e persistente (não observada se ambas consumidas separadamente) e o aumento da perda ponderal. Com a MDA, observa-se indução de estados convulsivos, aumento da intensidade e duração da resposta hipertérmica e diminuição dos níveis cerebrais de 5-HT e seus metabolitos (73).

6 Decomposição cadavérica

O início do processo de decomposição cadavérica deve-se à interrupção do bombeamento de sangue e da respiração, parando assim o transporte de oxigénio pelo corpo. Esta decomposição dos corpos é um processo natural que ocorre nos organismos logo após a morte.

No princípio, a degradação pode não ser perceptível a olho nu dado que os eventos relacionados a este processo têm início a nível celular. As modificações no cadáver progredirão vagarosamente durante cada estágio da decomposição, caracterizando as diferentes alterações *post mortem*.

A ausência de oxigénio nas células impossibilita a fosforilação oxidativa de nutrientes para a produção de trifosfato de adenosina (ATP), utilizada na produção de energia metabólica. Além disso, com a interrupção da corrente sanguínea, os sistemas de tamponamento presentes no sangue tornam-se ineficazes ocasionando a acidificação do plasma intracelular.

Neste ambiente anaeróbico e ácido, a fosforilação oxidativa é completamente interrompida e inicia-se a fermentação anaeróbia do ácido pirúvico a ácido láctico e a oxidação das cadeias de ácidos gordos, que constituem as membranas celulares, causando assim a morte celular e a ativação de enzimas responsáveis pela degradação de fosfolípidios, carboidratos, proteínas e lípidos. É iniciada a autólise celular. Todos esses processos que iniciam a autólise celular são característicos da primeira fase de decomposição cadavérica, conhecida como **fase fresca**.

Durante esta fase, o estabelecimento de um ambiente anaeróbico no organismo causa a proliferação de microrganismos anaeróbicos presentes no sistema digestivo e respiratório, os

quais irão utilizar como substrato, para seus processos metabólicos, os produtos gerados durante a autólise celular e as demais proteínas, carboidratos e lípidos presentes no organismo.

O metabolismo destes microrganismos causa uma intensa formação de gases (metano, hidrogênio e sulfeto de hidrogênio) e de ácido láctico, acético, acetoacético e propanóico. Dentre estes produtos, a formação do sulfeto de hidrogênio a partir da descarboxilação de aminoácidos sulfurados (como a cisteína) destaca-se por conferir ao cadáver uma coloração verde-escura, na região da fossa ilíaca direita (devido a precipitação do sulfeto de hidrogênio com os átomos de ferro presentes na hemoglobina). A formação do sulfeto de ferro (II) ocasiona uma mudança de coloração no cadáver nas regiões onde o sangue está concentrado, sendo uma das características da segunda fase de decomposição conhecida como **cromática**.

Na terceira fase de decomposição conhecida como **enfisematosa**, a principal característica é o inchaço do cadáver devido ao acúmulo dos gases produzidos pelo metabolismo dos microrganismos, por isso, esta fase irá durar apenas enquanto a pele não romper com o aumento da pressão interna, o que pode durar até 48 horas.

Após a **fase enfisematosa**, inicia-se a **fase coliquativa** que é caracterizada pelo extravasamento dos fluidos constituídos pelos compostos orgânicos gerados pelos microrganismos e pela autólise celular. Este fluido, denominado necrochorume, é o principal meio pelo qual um cadáver em decomposição se torna capaz de alterar a química do ambiente que o rodeia.

Durante a fase coliquativa ocorre uma intensa colonização do cadáver por insetos necrófagos, que são atraídos para este pelos odores cadavéricos oriundos principalmente da presença dos compostos orgânicos cadaverina (1,5-pentanodiamina) e putrescina (1,4-butanodiamina) no necrochorume, os quais são produzidos pela descarboxilação da lisina e da ornitina.

Apesar da presença dos insetos necrófagos ser mais evidente na fase coliquativa, é importante ressaltar que estes podem ser encontrados no cadáver a partir de 30 segundos após o óbito, atraídos por outros compostos voláteis como o ácido sulfídrico.

Após a perda de 70 % da massa do cadáver considera-se o fim da fase coliquativa e o início do estágio de **esqueletização**, sendo esta a última fase de decomposição cadavérica.

De uma forma geral, todos os mamíferos decompõem-se através destas 5 fases de decomposição, mas a duração entre elas e as transformações durante o processo de decomposição dos corpos humanos, pode sofrer interferências por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos.

Os fatores intrínsecos afetam as mudanças *post mortem*, e incluem a idade, o conteúdo gástrico, o estado nutricional antes da morte (massa corpórea e as dimensões corporais), bem como a causa da morte.

Já os fatores extrínsecos incluem as vestimentas, o isolamento do cadáver, a atividade da fauna e flora e o ambiente (clima, temperatura, humidade). Estes fatores variam geograficamente e localmente. Em circunstâncias específicas, por exemplo, em ambientes quentes e secos, pode ocorrer mumificação dos tecidos, enquanto que a formação de adipocera pode acontecer quando o cadáver se encontra num meio alcalino e anaeróbico (exemplo ambientes aquáticos) (81,82).

Diversos fatores podem influenciar o tipo e quantidade de aminas biogénicas encontradas num cadáver, desde sua composição química, flora microbiana presente e a temperatura a que esteve sujeito.

A matéria-prima de origem animal é uma fonte natural de substrato a partir do qual as aminas biogénicas são formadas e é também o maior componente da matriz em que as reações de descarboxilação ocorrem. Como o perfil de aminas biogénicas é afetado pelas enzimas descarboxilases, pelos aminoácidos disponíveis e pelo ambiente onde esses componentes se encontram, qualquer alteração num desses fatores vai provocar variações nas quantidades e tipos de aminas biogénicas que se formam (83).

Com isto podemos inferir que uma temperatura ótima para o crescimento microbiano favorecerá o metabolismo e a proliferação celular, levando ao aumento da atividade de enzimas proteolíticas em estripes microbianas, tornando os aminoácidos livres mais disponíveis e suscetíveis à formação de aminas biogénicas (84).

O pH é um fator importante que influencia a atividade das enzimas aminoácido descarboxilases. A sua diminuição resulta num aumento da atividade da descarboxilase das bactérias e, nessa condição, as bactérias produzem mais descarboxilases como parte do seu mecanismo de proteção. Por outro lado, pH altos favorecem o crescimento de microrganismos, aumentando os aminoácidos livres, mas limitam a atividade da descarboxilase. Condições que resultam num baixo potencial de oxidação-redução e estimulam a produção de histamina, pois a histidina descarboxilase parece ser inativada ou destruída na presença de oxigénio. A formação de aminas por bactérias é também influenciada pela temperatura, que entre 20°C e 37°C é ótima para o crescimento da maioria das bactérias que produzem descarboxilases (83).

7 Aminas biogénicas: Origem e classificação

As aminas biogénicas são metabolitos nitrogenados, de baixo peso molecular, que podem ser produzidos através da descarboxilação de aminoácidos livres, ou através da transaminação de aldeídos e cetonas, devido à ação do metabolismo microbiano (Tabela 2).

A reação de descarboxilação envolve a remoção enzimática do grupo α -carboxilo, com libertação de dióxido de carbono e sequente formação da amina biogénica (Fig.4).

A ocorrência deste fenómeno pode ser mediada através de duas vias biossintéticas, a via endógena, quando se trata de enzimas endógenas presentes naturalmente nos alimentos, e a via exógena, quando se trata de enzimas descarboxilases exógenas produzidas pela flora microbiana (84).

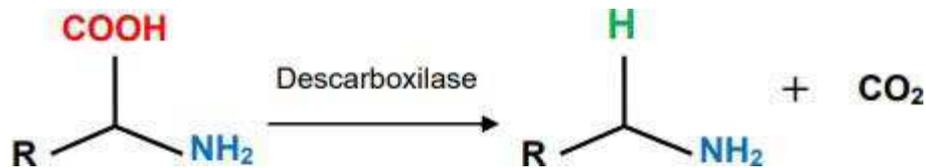
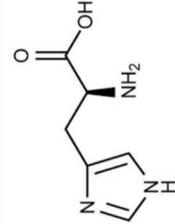
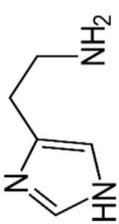
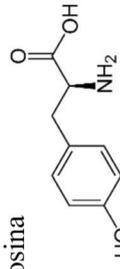
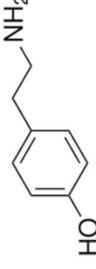
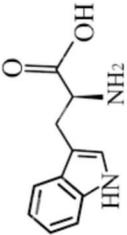
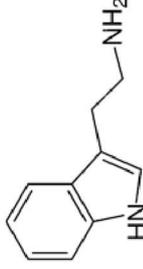
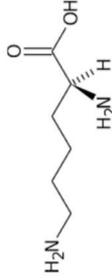
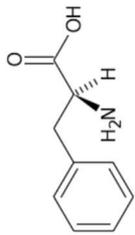
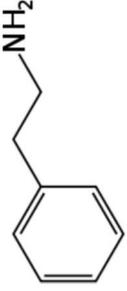
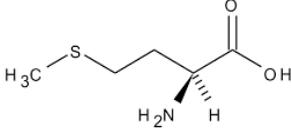
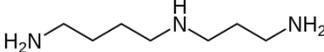
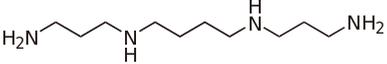
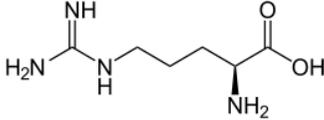
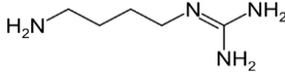
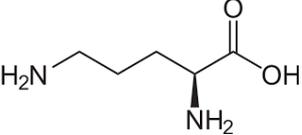
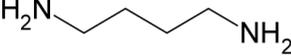
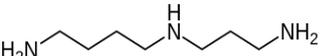


Figura 4 – Reação geral de descarboxilação dos aminoácidos livres (84)

Tabela 2 Aminoácidos precursores e respetiva amina correspondente após descarboxilação (85).

Aminoácidos Precursores	Aminas Biogénicas	Função	Efeitos
<p>Histidina</p> 	<p>Histamina</p> 	<p>Estimulação dos neurónios sensoriais e motores. Liberação de adrenalina e noradrenalina.</p>	<p>Vasodilatação, liberação de adrenalina e noradrenalina, excitação da musculatura lisa do útero, intestino e do trato respiratório, estimulação dos neurónios sensoriais e motores, controle da secreção ácida gástrica, mediação primária da resposta alérgica imediata.</p>
<p>Tirosina</p> 	<p>Tiramina</p> 	<p>Aumenta a pressão sanguínea. Vasocostritor.</p>	<p>Vasocostrição, aumento do pulso cardíaco, da pressão sanguínea, da taxa respiratória e do nível de glicose no sangue, liberação da noradrenalina no sistema nervoso simpático, lacrimação, salivação excessiva e derrames</p>
<p>Triptofano</p> 	<p>Triptamina</p> 	<p>Aumenta a pressão sanguínea. Vasocostritor.</p>	<p>Aumento da pressão arterial e vasoconstrição</p>
<p>Lisina</p> 	<p>Cadaverina</p> 	<p>Deterioração de aminoácidos.</p>	<p>Diminuição da pressão arterial e da frequência cardíaca, tetania, paralisia nas extremidades, potencialização da toxidez das outras aminas</p>
<p>Fenilalanina</p> 	<p>Feniletilamina</p> 	<p>Aumenta a pressão sanguínea. Vasocostritor.</p>	<p>Liberação da noradrenalina no sistema nervoso simpático, aumento da pressão arterial, vasoconstrição e derrames</p>

<p>Metionina</p> 	<p>Espermidina</p>  <p>Espermina</p> 	<p>Metabolismo, crescimento e diferenciação celular.</p> <p>Regulação e estimulação da síntese de DNA, RNA e proteínas.</p> <p>Manutenção da alta atividade metabólica para um funcionamento saudável do intestino.</p>	
<p>Arginina</p> 	<p>Agmatina</p>  <p>Putrescina</p> 		
<p>Ornitina</p> 	<p>Putrescina</p>  <p>Espermindina</p> 	<p>Protetor celular contra o estresse oxidativo. Recicladores de radicais livres.</p>	<p>Diminuição da pressão arterial e da frequência cardíaca, tetania, paralisia nas extremidades,</p> <p>Potencialização da toxicidade das outras aminas</p>

Nas células eucariotas, a síntese destes compostos aminados é essencial, uma vez que atuam como precursores da biogénese de hormonas, alcaloides, ácidos nucleicos e proteínas. A produção endógena de amins como a epinefrina, dopamina e serotonina, resulta de situações relacionadas com stress, cansaço, nervosismo e ainda hipoglicémia e jejum prolongado. Em paralelo, as amins biogénicas, como a putrescina e a espermina, são críticas na modulação do ácido desoxirribonucleico (DNA), do ácido ribonucleico (RNA) e na síntese proteica, enquanto as amins como a histamina são indispensáveis para o correto funcionamento dos neurotransmissores. Contudo, nas células procarióticas, pensa-se que as amins sejam formadas em resposta à acidificação do meio, funcionando como mecanismo de defesa às condições adversas do pH. A descarboxilação aumenta a vitalidade das células bacterianas através do consumo de protões e da excreção simultânea de amins e dióxido de carbono, verificando-se o restabelecimento do pH do ambiente envolvente.

Segundo Molenaar et al., 1993, a produção de amins biogénicas é também uma forma de obtenção de energia, podendo revelar-se necessária a microrganismos, como as bactérias ácido lácticas, que não possuem cadeia respiratória para gerar quantidades elevadas de adenosina trifosfato (ATP). Deste modo, através do antiporte energético aminoácido/amina, pode ser gerada uma força motriz de protões que liberta energia passível de ser utilizada pela célula, quer no transporte de nutrientes, quer na produção de ATP por meio da ATPase.

Ainda assim, a produção de amins biogénicas pode também mediar processos fisiológicos nas bactérias como a resposta ao stress osmótico e ao stress oxidativo.

As amins biogénicas como a histamina, cadaverina, putrescina, tiramina, triptamina, espermina e espermidina estão frequentemente presentes em produtos fermentados, como o queijo, o vinho e a cerveja e, alimentos como peixe, carne, lacticínios e vegetais também apresentam uma probabilidade elevada de conter amins biogénicas.

Apesar de desempenharem funções vitais nos seres vivos, estes compostos podem também desencadear efeitos tóxicos, sendo estes evidenciados apenas quando a concentração é muito elevada (ingestão de alimento com concentração elevada destes metabolitos) ou quando os mecanismos naturais de degradação das amins são inibidos ou geneticamente deficientes, como ocorre nos casos de morte. Consoante o seu modo de atuação nos sistemas vivos, as amins podem ser designadas de psicoativas ou vasoativas.

As amins classificadas de psicoativas (histamina, a putrescina e a cadaverina) atuam nos transmissores nervosos do sistema nervoso central, já as amins vasoativas (tiramina e a triptamina), atuam direta ou indiretamente sobre o sistema vascular.

Todavia, a quantidade e o tipo de amins formadas são influenciadas essencialmente pelas condições ambientais e proporção da população microbiana com atividade descarboxilase.

As amins bioativas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina na molécula, da estrutura química, da via biossintética e da função que exercem.

Podendo assim serem classificados de diferentes formas, atendendo à sua estrutura química, podendo ser designados de alifáticos (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e agmatina), aromáticos (tiramina e feniletilamina) ou heterocíclicos (histamina e triptamina), contudo, considerando o número de grupos amina, também podem ser classificados de monoamina (histamina, tiramina, feniletilamina e triptamina), diaminas (putrescina e cadaverina), ou poliaminas (espermina e espermidina). Ainda, em relação à estrutura química, podem ser classificadas em catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas (serotonina) e em imidazolaminas (histamina) (83,86–92).

Quanto à via biossintética, as amins são classificadas em naturais, que são formadas durante a biossíntese “in situ”, ou seja, a partir de uma molécula mais simples, à medida que são requeridas (espermina e espermidina), ou podem estar armazenadas nos mastócitos e basófilos (histamina). Por outro lado, as amins biogénicas são formadas por reações de descarboxilação conduzidas por descarboxilases bacterianas, sendo esta a principal via de formação de amins (histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina).

Com relação à função que exercem, as amins biogénicas podem ser classificadas em moduladoras e promotoras do crescimento (espermidina e espermina), por atuarem no crescimento e manutenção do metabolismo celular e em vasoativas e psicoativas (tiramina, histamina e serotonina) devido ao seu efeito nos sistemas vascular e neural (87–92).

A cadaverina e a putrescina são consideradas aminas putrefativas, porque a produção dessas diaminas voláteis é aumentada após a morte como resultado da decomposição dos tecidos, produzindo um cheiro muito característico (93).

7.2.1 Cadaverina

Entre as aminas biogênicas derivadas da decomposição de tecidos biológicos, encontra-se a diamina alifática cadaverina (1,5, diaminopentano), que é produzida por meio da descarboxilação do aminoácido lisina intracelular, pela enzima lisina descarboxilase, por ação de várias espécies de *Enterobacteriaceae*, durante a putrefação de tecidos orgânicos de corpos em decomposição. A cadaverina é um dos principais elementos responsáveis pelo odor nauseabundo dos cadáveres, estando presente no necrochorume. Em concentrações fisiológicas, a cadaverina participa de diversos processos celulares como crescimento e divisão celular, transcrição, tradução e processos de morte celular. Os sítios nucleofílicos dessa amina permitem uma interação com os ácidos nucleicos, os lipídios e as proteínas, afetando a estabilidade dessas moléculas (84,94).

7.2.2 Putrescina

Dentre as substâncias produzidas pela decomposição cadavérica, a putrescina cujo nome segundo a IUPAC é 1,4 diaminobutano, tendo como fórmula molecular $C_4H_{12}N_2$. Trata-se de um líquido oleoso incolor, com um odor forte pungente, similar ao odor da piperidina e a peixe-podre, é encontrada em grandes quantidades nos corpos em decomposição. Tem massa molar de 88,15 g mol⁻¹, densidade de 0,877, ponto de fusão de 25-28 °C e um ponto de ebulição de 158-160 °C. É inflamável e incompatível com ácidos, cloretos de ácidos, anidridos ácidos e agentes oxidantes fortes. É miscível em água, formando soluções alcalinas fortes – valor de pKa de 10,8 (a 20 °C) (90,95).

Esta amina putrefativa é produzida principalmente por contaminação com várias estirpes de *Enterobacteriaceae*, sendo também produzida por algumas espécies de *Lactobacillus* e *Enterococcus faecalis* (84).

A putrescina é uma poliamina muito importante nos processos fisiológicos, por se tratar de uma molécula precursora para outras duas poliaminas, a espermidina e a espermina, ambas importantíssimas no processo de proliferação celular.

A Putrescina é uma poliamina formada a partir do aminoácido ornitina, por meio de uma reação catalisada pela enzima ornitina descarboxilase. A ornitina, por sua vez, é originada da clivagem do aminoácido arginina, por uma reação catalisada pela arginase (90,95).

8 Procedimento experimental

Neste trabalho foram seguidos os procedimentos e protocolos usados no SQTf para análise de triagem de anfetaminas em amostras de sangue pela técnica ELISA, nomeadamente o Procedimento de ensaio em vigor (PE-SQTf-C-104_Rev02) e usado um equipamento *Evolis Twin Plus* associado a kits de anfetaminas da marca *OraSure Technologies, inc.* Foram também cumpridos os procedimentos em vigor no SQTf no cumprimento da norma NP EP ISSO/IEC 17025:2018 e das boas práticas laboratoriais.

O método imunoenzimático usado emprega anticorpos imobilizados numa placa de poliestireno com número variável de poços em ensaio, possibilitando a realização do ensaio com a uniformidade de todas as etapas tanto para as amostras como para as referências (calibradores e controlos).

As placas usadas neste procedimento laboratorial têm 96 poços e estão ilustradas na imagem abaixo (Figura 5).

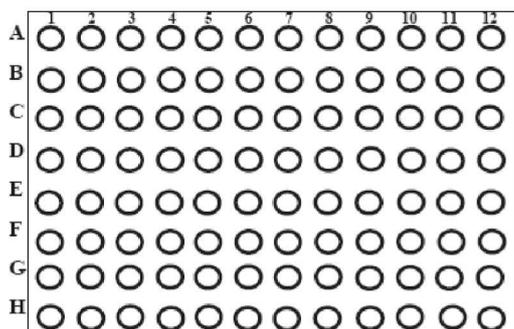


Figura 5 – Placas de poliestireno para ensaio ELISA

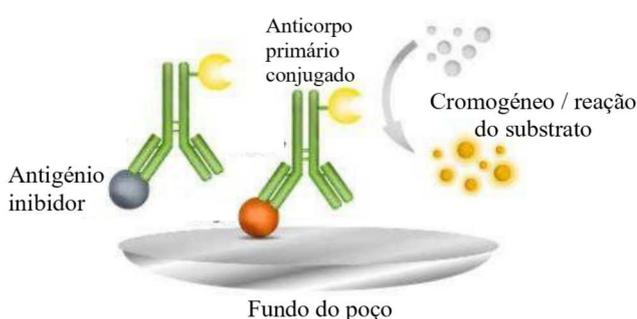


Figura 6 – Demonstração do método de ELISA por competição

Na Figura 6 está demonstrado esquematicamente o método de Elisa competitivo, metodologia essa utilizada neste ensaio, como o nome indica este opera de forma competitiva na qual os antígenos marcados com enzimas competem com antígenos livres (analito) por um número limitado de anticorpos imobilizados, desta forma quanto maior a concentração de antígeno da amostra, mais fraco será o sinal eventual.

Este ensaio é realizado em 8 etapas:

- 1- Adição da amostra sobre um suporte sólido (microplaca) onde estão imobilizados anticorpos específicos para a anfetamina.
- 2- Adição de um segundo antígeno que compete com as anfetaminas presentes na amostra pela ligação ao anticorpo. Este antígeno está conjugado com uma enzima, a peroxidase (Conjugado);
- 3- Incubação;
- 4- Lavagem, destinada a separar os imunocomplexos formados dos reagentes não ligados;
- 5- Adição de excesso de substrato cromogénico (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) que reage com a peroxidase para formar um produto corado (Substrato);
- 6- Incubação;
- 7- Adição da solução de paragem ou solução STOP;
- 8- Leitura ótica dos poços.

A alteração de cor é medida a um comprimento de onda de 450 nm (referência a 620 nm), sendo a intensidade da coloração inversamente proporcional à concentração de anfetaminas no sangue. Os anticorpos utilizados pelo método são específicos da anfetamina, apresentando, contudo, reatividade cruzada com compostos estruturalmente semelhantes.

Todos os testes efetuados foram realizados de acordo com o Procedimento de ensaio PE-SQTf-C-104_Rev02_Triagem de anfetaminas no sangue por ELISA, em vigor no SQTf-DC, de acordo com o protocolo instrumental em vigor (Tabela 3) num sistema *Evolis™ Twin Plus*

(Stratec Biomedical Systems AG) e usando o kit Amphetamine-Specific intercept® Micro_Plate EIA da OraSure Technologies, Inc. (USA).

Tabela 3- Principais parâmetros analíticos da análise instrumental (EVOLIS)

Parâmetro	Descrição	Observações
Volume de amostra dispensado	25 µL	
Volume reagente 1 dispensado	100 µL	Reagente conjugado
Temperatura e tempo de incubação 1	T. ambiente, 30 min	
Volume reagente 2 dispensado	100 µL	Reagente substrato
Temperatura e tempo de incubação 2	T. ambiente, 30 min	
Volume reagente 3 dispensado	100 µL	Reagente stop

Os calibradores e controlos usados neste procedimento de ensaio são preparados fortificando uma amostra de sangue branco com diferentes concentrações da substância de referência: D-anfetamina (PE-SQTF-C-104_Rev02), como descrito na Tabela 4.

Tabela 4- Lista de calibradores e controlos de qualidade usados em (PE-SQTF-C-104_Rev02)

Calibrador/Controlo	Concentração de D-Anfetamina em sangue
Calibrador <i>cut off</i>	100 ng/mL
Calibrador negativo	0 ng/mL
Nível baixo	200 ng/mL
Nível alto	1000 ng/mL
Amostra branca	0 ng/mL
Branco de reagentes	0 ng/mL (amostra de diluente forense)

O Procedimento de ensaio PE-SQTF-C-104_Rev02_Triagem de anfetaminas no sangue por ELISA é um ensaio acreditado de acordo com a Norma NP EP ISO/IEC 17025:2018. Por este motivo e também para uma gestão adequada dos kits usados*² (a maioria dos ensaios realizados neste trabalho foram integrados em séries de trabalho de rotina laboratorial nos quais foram usados os calibradores e controlos preparados pelos colaboradores do SQTF-DC.

As amostras foram preparadas fortificando amostras de sangue branco (*post mortem* e sangue cedido ao INMLCF pelo Instituto Português do Sangue e da Transplantação) previamente testadas para a deteção de anfetaminas pelo PE-SQTF-C-104_Rev02 com resultados negativos.

Para a análise no equipamento todas as amostras, calibradores e controlos (exceto branco de reagentes), depois de homogeneizadas e estarem à temperatura ambiente, são diluídas para tubos de poliestireno onde se junta 800 µL de diluente +200 µL de amostra, posteriormente são

*² Durante a recente pandemia SARS-CoV-2, a empresa produtora esteve encerrada por ter os trabalhadores infetados, tendo por isso havido alguns condicionantes no gasto de testes, tendo-se decidido efetuar os testes não de forma separada, mas integradas em séries de trabalho de rotina.

homogeneizadas através de agitação em vórtex (cerca de 10-20 segundos) e colocadas no suporte do equipamento.

Com base na revisão bibliográfica efetuada e expressa na Tabela 1 e na análise dos resultados obtidos nos casos analisados no Serviço de Química e Toxicologia Forenses da delegação do Centro do INMLCF, I.P entre 2018 e 2020 cuja análise de rastreio por EIA em sangue *post mortem* tinha sido considerada como falso positiva (Figura 5) foram testadas as seguintes aminas putrefativas: cadaverina, putrescina e tiramina, alguns dos seus metabolitos e compostos de degradação bacteriana: piperidina, indol, fenol e etanol e as seguintes substâncias medicamentosas: paracetamol, trazodona (e o seu metabolito m-CPP), sertralina, furosemida, hidroclorotiazida, bisoprolol, tramadol, quetiapina, varfarina, diazepam, oxazepam, citalopram, difenidramina, dimenidrinato, fenobarbital, feniramina e o padrão da gama alta de medicamentos (os medicamentos que compõe este padrão são o ácido valpróico, atropina, carbazepina, cloroquina, diclofenac, difenidramona, estricnina, flecaínida, flebamato, fenitoína, fenobarbital, furosemida, gabapentina, ketamina, ketoprofeno, lacosamida, lamotrigina, levetiracetam, lidocaína, nimesulida, oxcarbazepina, paracetamol, pentobarbital, perampanel, perindopril, piracetam, pregabalina, primidona, promazina, propofol, tiaprida, ticlopidina, tiopental, topiramato, trazodona, varfarina, zonisamida, diluídos em metanol).

Estes fármacos foram analisados individualmente e alguns em conjunto de forma a tentar perceber se poderia ocorrer alguma potencialização da interferência com a combinação de compostos e ser essa combinação a responsável pelos resultados falso positivos.

Quando avaliadas em conjunto, no caso de se obterem resultados positivos, seguir-se-ia a análise com os compostos individualizados.

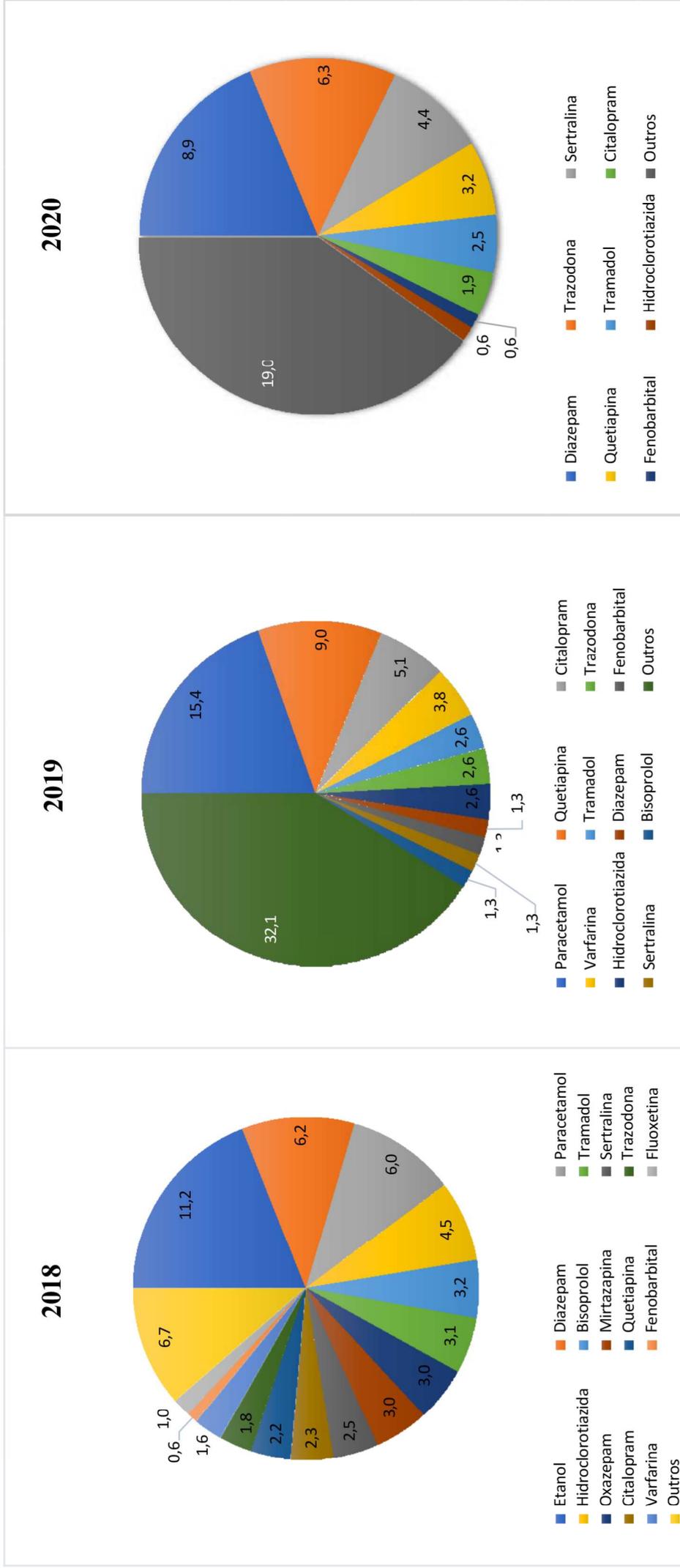


Figura 5 – Compostos detetados nos casos falso positivos na análise de anfetaminas por imunoenaiosais enzimáticos no SQTf-DC entre 2018 e 2020

9 Resultados

Na Tabela 5 são apresentados os resultados dos ensaios realizados em amostras fortificadas com os diferentes analitos e as correspondentes concentrações, analisadas de acordo com o procedimento de ensaio em vigor no SQTF-DC: PE-SQTF-C-104_Rev02_Triagem de anfetaminas no sangue por ELISA.

Tabela 5 Resultados obtidos através dos Evolis MT Twins Plus para detecção de anfetaminas

Categoria	Substância	Concentração Final ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância do Calibrador negativo	Absorvância do Calibrador Cut off	Absorvância da amostra	Resultado
Aminas Putrefativas	Cadaverina	9,90	0.7170	0.2895	0.6770	Negativo
		19,61	0.7170	0.2895	0.7200	Negativo
		90,64	0.6650	0.2560	0.6000	Negativo
		165,73	0.6650	0.2560	0.6620	Negativo
	Putrescina	9,9	0.7170	0.2895	0.780	Negativo
		19,61	0.7170	0.2895	0.8190	Negativo
		90,64	0.6650	0.2560	0.7350	Negativo
		165,73	0.6650	0.2560	0.7690	Negativo
Antipirético	Paracetamol	24,39	0.7170	0.2895	0.8260	Negativo
		46,90	0.6650	0.2560	0.7220	Negativo
Antidepressivo	Trazodona	1,96	0.7170	0.2895	0.7990	Negativo
		2,57	0.6650	0.2560	0.7170	Negativo
		16,78	0.6335	0.2140	0.6360	Negativo
Antidepressivo	Sertralina	1,92	0.6650	0.2560	0.6700	Negativo
Diurético/ Hipertensivo	Furosemida	9,90	0.7170	0.2895	0.7260	Negativo
		21,88	0.6650	0.2560	0.5860	Negativo
Diurético / Hipertensivo	Hidroclorotiazida	1,96	0.7170	0.2895	0.6470	Negativo
		2,57	0.6650	0.2560	0.5920	Negativo
Hipertensivo	Bisoprolol	0,50	0.7170	0.2895	0.6630	Negativo
		0,63	0.6650	0.2560	0.6530	Negativo
Opioide sintético (analgésico)	Tramadol	1,92	0.6650	0.2560	0.7030	Negativo
Antipsicótico	Quetiapina	1,92	0.6650	0.2560	0.7360	Negativo
Anticoagulante	Varfarina	24,39	0.7170	0.2895	0.7250	Negativo
		46,90	0.6650	0.2560	0.7410	Negativo
Ansiolítico	Diazepam	9,90	0.7170	0.2895	0.6880	Negativo
		21,88	0.6650	0.2560	0.7250	Negativo
Ansiolítico	Oxazepam	9,90	0.7170	0.2895	0.6650	Negativo
		21,88	0.6650	0.2560	0.6590	Negativo
Antidepressivo	Citalopram	0,98	0.7170	0.2895	0.6330	Negativo
		1,24	0.6650	0.2560	0.6160	Negativo
Mistura padrão de medicamentos	Gama alta	2	0.6650	0.2560	0.6190	Negativo
Anti-histamínico	Difenidramina	200	0.6335	0.2140	0.7460	Negativo
Anti-emético e anti-vertiginoso	Dimenidrinato	200	0.6335	0.2140	0.7460	Negativo
Barbitúrico (anticonvulsivantes)	Fenobarbital	200	0.6335	0.2140	0.7620	Negativo
Monoamina	Tiramina	40	0.6825	0.2560	0.0920	Positivo
		20	0.6890	0.2745	0.1590	Positivo
		10	0.6890	0.2745	0.2360	Zona de incerteza
Anti-histamínico	Feniramina	40	0.6825	0.2560	0.9580	Negativo
Metabolito da trazodona	m-CPP	20	0.6825	0.2560	0.6320	Negativo

Metabolito da cadaverina	Piperidina	90,91	0.6520	0.2205	1.7170	Negativo
Substâncias putrefativas (formados a partir da degradação bacteriana de aminoácidos aromáticos, como a tirosina e o triptofano)	Indol	166,67	0.6520	0.2205	0.1640	Positivo
		83,33	0.6485	0.2465	0.3540	Negativo
		125	0,7170	0.2430	0.2420	Zona de incerteza
	Fenol	166,67	0.6520	0.2205	0.1780	Positivo
		83,33	0.6485	0.2465	0.2840	Negativo
		125	0,7170	0.2430	0.2710	Zona de incerteza
	Etanol	54.09	0,7170	0.2430	0.6550	Negativo

Além da interferência dos analitos em amostras de sangue, pareceu importante avaliar a resposta aos testes usando uma matriz mais simples, em especial para a putrescina e para a cadaverina, de modo que a matriz não fosse um fator limitante.

Analysaram-se por isso amostras de soro fortificado. Os compostos usados, concentrações e resultados estão expressos na Tabela 6.

A amostra de soro usada foi o “calibrador negativo” dos próprios kits de anfetaminas. por estar facilmente disponível e por ser já seguro que não apresentariam reatividade cruzada os ensaios.

Tabela 6 Resultados obtidos por EIA no sistema Evolis^{MT} Twin Plus para detecção de anfetaminas em amostras de soro fortificadas

Matriz	Substância	Concentração Final (µg/mL)	Absorvância do Calibrador negativo	Absorvância do Calibrador Cut off	Absorvância da amostra	Resultado
Soro	Putrescina + cadaverina	200 de cada (t0)	0.6335	0.2140	0.9390	Negativo
Soro	Putrescina+ cadaverina + Paracetamol	200 de cada amina + 11,10 paracetamol	0.6335	0.2140	0.7720	Negativo
Soro	Putrescina + Cadaverina + Tramadol	200 de cada amina + 100 tramadol	0.6335	0.2140	0.8960	Negativo

Perante os resultados negativos obtidos nas amostras fortificadas, em especial com a putrescina e a cadaverina, pretendeu ainda avaliar se a reatividade cruzada apresentada nos resultados falsos positivos poderia advir do efeito de degradação da própria amostra de sangue, na presença destes compostos. Para isso, a amostra fortificada com estes dois compostos a uma concentração de 200µg/mL foi, depois de analisada (t0), deixada no laboratório à temperatura ambiente (que variou entre os 20 e 25°C) e reanalisada após 23 dias (t1), 13 dias (t2) após o t1 e 21 dias (t3) após o t2, do momento t0 ao t3 decorreram 57 dias (aproximadamente 2 meses), estes dados podem ser consultados na Tabela 7.

Pretendeu ainda avaliar o efeito de degradação da própria amostra de sangue após a colheita e qual o efeito do conservante usado nas colheitas em âmbito de autópsia pelo INMLCF, o fluoreto de sódio.

Assim, com a colaboração do Serviço de Clínica e Patologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF, obteve-se uma amostra de sangue *post mortem* em tubos com e sem conservante, com a mesma origem. Cerca de 2 mL de cada uma destas amostras e de uma amostra de sangue branco proveniente do Instituto Português do Sangue e da Transplantação (com SAGM como conservante), inicialmente analisadas (t0) de acordo com o PE-SQTF-C-104 foram deixadas à temperatura ambiente (a uma temperatura variou entre os 20 e 25°C).

A amostra de sangue branco foi novamente analisada após 13 dias (t1a) e 21 dias (t2a), perfazendo um total de 35 dias desde o t0 até ao t2a.

As amostras de sangue *post mortem* sem conservante e com o conservante fluoreto de sódio (1% m/v) foram testadas após 19 dias (t1b) do t0 e 172 dias (t2b) após t1b, do momento inicial ao final decorreram 191 dias (aproximadamente 6 meses), estes dados podem ser consultados na Tabela 7.

Tabela 7 Resultados obtidos por EIA no sistema Evolis™ Twin Plus para deteção de anfetaminas nas amostras brancas

Categoria	Conservante/ Substância	Tempos*	Absorvância do Calibrador negativo	Absorvância do Calibrador Cut off	Absorvância da amostra	Resultado
Sangue branco	Contem SAGM (cloreto de sódio, adenina, guanosina monohidratada e manitol)	t(0)	0.7245	0.2710	0.6990	Negativo
		t(1a)	0.7285	0.2015	0.6720	Negativo
		t(2a)	0.6790	0.2370	0.6590	Negativo
Sangue <i>post mortem</i>	Com fluoreto de sódio	t(0)	0.6890	0.2745	0.6440	Negativo
		t(1b)	0.7170	0.2430	0.5890	Negativo
		t(2b)	0.6290	0.2665	0.5070	Negativo
	Sem fluoreto de sódio	t(0)	0.6890	0.2745	0.6390	Negativo
		t(1b)	0.7170	0.2430	0.5480	Negativo
		t(2b)	0.6290	0.2665	0.5450	Negativo
Sangue branco	Putrescina (200µg/mL) + cadaverina(200µg/mL)	t(0)	0.6335	0.2140	0.9390	Negativo
		t(1c)	0.7245	0.2710	0.8130	Negativo
		t(2c)	0.7285	0.2015	0.8290	Negativo
		t(3c)	0.6790	0.2370	0.7620	Negativo

Legenda: *Tempo decorrido entre a primeira análise t0 e as restantes

t(1a) - 13 dias; t(2a) - 21 dias

t(1b) - 19 dias; t(2b) - 172 dias

t(1c) - 23 dias; t(2c) - 13 dias; t(3c) - 21 dias

10 Discussão

Em situações de morte, com todas as variáveis associadas, as amostras *post mortem* de caso para caso são muito heterogêneas e só é possível ao INMLCF fazer conservação do cadáver após a sua chegada às instalações onde é realizada a autópsia.

Após a colheita de amostras no âmbito das autópsias médico-legais estas são acondicionadas nas Unidades de Patologia para posterior entrega no SQTf.

Como podemos constatar os testes imunoenzimáticos são muito utilizados na área forense devido a apresentarem uma elevada capacidade de detetar uma ampla gama de classes de drogas em pouca quantidade de amostra, com uma menor manipulação e preparação das amostras, envolvendo poucos reagentes e com um tratamento de resultados rápido, tornando-se por isso um método mais fácil, rápido e de menores custos.

Hallvard Gjerde et al. perante os resultados falsos positivos obtidos na deteção de anfetaminas em amostras de sangue *post mortem*, sugerem que possa ocorrer devido a substâncias putrefativas presentes na amostra. Estas conclusões também já foram tiradas por outros autores (50).

Apesar da presença de aminas biogénicas em cadáveres ser um parâmetro que pode variar devido a diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos, na bibliografia pesquisada não foram localizados estudos com a quantificação das aminas putrefativas encontradas em cada fase da decomposição.

A decomposição cadavérica, como referido anteriormente, depende de vários fatores, principalmente da temperatura e, em menor grau, da humidade, mas não só: é também o resultado de uma complexa variedade de processos que vão desde a digestão enzimática e a ação bacteriana.

Entre os marcadores bioquímicos propostos nas últimas décadas, o papel potencial das aminas putrefativas putrescina e cadaverina tem sido indicado por alguns autores para a estimativa do PMI, referindo que as suas concentrações devem aumentar ao longo PMI. Gonzalez-Riano et al. descreveu um aumento pronunciado de putrescina e de cadaverina no córtex cerebral de camundongos algumas horas após a morte, com uma alta percentagem de mudança (130% e 105%, respetivamente) ao longo do tempo, revelando serem padrões úteis para estimativa de PMI (49).

Alguns estudos realizados em animais mortos, concluem que a formação de aminas biogénicas apresenta um crescimento linear, principalmente a cadaverina e a tiramina (96).

Contudo, existem alguns estudos, como o realizado por Pelletti G et al., que consideram que as concentrações de aminas putrefativas são estáveis até 24 horas após a morte, mas que estas aumentam com o tempo quase até 120 horas após a morte. Nesse estudo, conseguiram diferenciar entre um PMI inferior a 24 horas: a putrescina e a cadaverina tinham concentrações inferiores a 0,01 mg/g (limite inferior de quantificação); e um PMI superior a 72 horas: a putrescina e a cadaverina tinham concentrações superiores a 0,1 mg/g (97).

Tendo em conta os resultados obtidos durante a execução desta prática laboratorial e apresentados na Tabela 5, é possível constatar que a cadaverina e a putrescina, até uma concentração de 200 µg/mL, não apresentaram qualquer tipo de interferência, mesmo quando analisadas em conjunto.

Os medicamentos testados, todos em concentrações consideradas tóxicas e muito acima das concentrações determinadas no SQTf em casos reais, (alguns envolvendo suspeitas de intoxicação fatal) não causaram qualquer tipo de interferência no ensaio.

Também não se verificou efeito “de potencialização” ao serem analisadas em conjunto nem com a adição de cadaverina e de putrescina, pois em todas as amostras analisadas se obteve um resultado negativo no imunoensaio para deteção de anfetaminas.

Perante a não obtenção de resultados positivos nas aminas putrefativas inicialmente estudadas (cadaverina e putrescina), foram testadas outras aminas, como a tiramina. No caso da tiramina, num primeiro teste com a concentração de 40 µg/mL, o resultado deu logo positivo, assim, posteriormente foi testado em concentrações mais baixas, a 20 µg/mL e a 10 µg/mL, tendo a de 20 µg/mL dado positiva, já a de 10 µg/mL encontrava-se dentro da zona cinzenta (zona de

incerteza + 15%), pelo qual foi considerado o valor como estando no limite para originar um resultado positivo.

Com o indol e com o fenol obtiveram-se resultados positivos para uma concentração de 166,67 µg/mL. Quando se analisou com metade desta concentração (83,33 µg/mL) o resultado foi negativo. Testou-se novamente com uma concentração maior (125 µg/mL) e obteve-se uma absorvância na zona cinzenta. (zona de incerteza + 15%), considerado positivo.

O etanol pode estar presente numa amostra por dois motivos, primeiro por consumo de alguma bebida alcoólica, ou devido a atividade bacteriana durante o processo de decomposição. Neste estudo foi testado o etanol numa concentração de 54 µg/mL e o resultado foi negativo, concluindo-se que esta substância não demonstrou reatividade cruzada com o ensaio das anfetaminas. Esta situação era naturalmente a esperada já que a realidade das análises no SQTf não dá essa indicação e muitíssimas são positivas para esta substância.

Das aminas estudadas (cadaverina, putrescina e tiramina), só a tiramina é que interferiu com o imunoensaio das anfetaminas traduzindo-se num resultado falso positivo.

Um estudo realizado por F Moriya e Y Hashimoto mostram resultados falsos positivos para anfetaminas em sangue *post mortem* na presença de fenetilamina em concentrações acima dos 5000 ng/mL (55). Autores como Simon Elliott, Stacy EF Melanson e Kent R. Olson nos seus estudos realizados concluem que por vezes o que interfere com os imunoensaios de anfetaminas não é o fármaco original, mas sim um ou mais dos seus metabolitos, podendo haver alguma reação de sinergia entre eles (34,52,64).

Olof Beck et al. mostraram maior reatividade em relação a algumas novas drogas, o que era esperado, já que muitas tem estruturas e atividade semelhante às das anfetaminas (47). O mesmo foi demonstrado em diversos estudos, a partir da observação da biotransformação de alguns fármacos depararam-se que estes podem converter-se em estruturas muito semelhantes às anfetaminas, podendo dar origem a reações cruzadas com os EIA de anfetaminas (98).

Com base nestes resultados, podemos ainda observar que a tiramina dá origem a resultado falso positivo quando em concentrações acima de 10 µg/mL e o indol e o fenol em concentrações acima de 125 µg/mL e que a cadaverina e a putrescina, até uma concentração de 200 µg/mL, não apresentaram qualquer tipo de interferência, mesmo quando analisadas em conjunto.

Os medicamentos testados, todos em concentrações consideradas tóxicas e muito acima das concentrações determinadas no SQTf em casos reais, também não apresentaram interferência na análise de anfetaminas por EIA.

A bibliografia refere que a formação de aminas por bactérias é também influenciada pela temperatura, esta deve-se encontrar entre os 20°C e os 37°C, temperaturas estas ótimas para o crescimento da maioria das bactérias que produzem descarboxilases (83). No estudo realizado não obtivemos nenhuma interferência no resultado do imunoensaio quando as amostras permaneceram à temperatura ambiente durante 191 dias.

II Conclusão

Num período marcado pela pandemia SARS-CoV-2, a realização de projetos e, como foi o caso, a execução das análises de rotina laboratorial sofreu as limitações que todos conhecemos. Neste caso em particular, sentiu-se o efeito da falta de entrega do material necessário à realização dos EIA, dificuldades nos tempos de entrega deste e de outro material, dificuldades na aquisição de padrões de referência e nalguns casos na manutenção de equipamentos, aos quais se associaram os riscos inerentes do manuseamento de amostras potencialmente contaminadas com SARS-CoV-2. Ainda assim as ferramentas atualmente ao dispor (internet) possibilitaram a concretização de um dos objetivos: a revisão bibliográfica da literatura que me permitiu um melhor conhecimento das matérias abordadas. Foi o caso do estudo das anfetaminas, das aminas biogénicas e mais dentro da realidade do INMLCF o estudo da putrefação de cadáveres e o conhecimento mais aprofundado da realidade do Serviço de Química e Toxicologia Forenses este aliado ao reconhecimento direto no Serviço.

A avaliação dos casos com resultados falso positivos nos imunoenaios enzimáticos para determinação de anfetaminas, permitiu não só selecionar as substâncias alvo deste estudo prático, mas também e ainda que numa abordagem muito restrita, verificar com casos reais o que é o consumo de medicamentos na nossa população.

Relativamente à componente laboratorial, os resultados obtidos esclarecem quanto à interferência de aminas putrefativas e de um conjunto de substâncias medicamentosas presentes nas amostras falso positivas ocorridas em análises imunoenzimáticas realizadas no SQTf-DC.

A grande heterogeneidade das amostras de sangue *post mortem* recebidas no SQTf, associadas a diferentes estados de conservação/putrefação dos cadáveres, influenciados pelos fatores descritos, e o facto de não se saber quais são as aminas putrefativas presentes num cadáver e os seus níveis e ainda por não estarem disponíveis valores de concentração de aminas putrefativas que pudessem ser usadas como referência neste trabalho, foram usadas quantidades em que houvesse homogeneização da amostra, atendendo a que a quantidade de sangue usada em cada ensaio EIA é de 200µL.

Além da cadaverina e da putrescina, testaram-se outras aminas, das quais a tiramina (e alguns dos seus metabolitos, como o indol e o fenol) apresentaram um resultado positivo em concentrações muito mais baixas que a cadaverina e a putrescina.

Neste estudo, todas as substâncias medicamentosas (selecionadas com base na literatura e na avaliação dos casos falsos positivos no ensaio EIA para anfetaminas) foram testadas acima da concentração da janela terapêutica, muitas delas em níveis com elevada toxicidade. Nenhum fármaco testou positivo nestas concentrações.

Relativamente ao estudo da cadaverina e da putrescina na matriz soro, em ensaios realizados nas mesmas condições aos das amostras de sangue, os resultados foram concordantes para as duas amostras (sangue e soro), com as mesmas fortificações, pelo que se conclui que a matriz sangue não é por si só fator limitante nestas fortificações.

Nos ensaios *in vitro*, concluímos que a degradação da amostra após a colheita (e até 191 dias – quase 6 meses) não originou resultados falso positivos com e sem conservante (fluoreto de sódio). Nos testes realizados também não se verificaram interferências nas amostras de sangue cedido pelo IPST.

Posto isto, os resultados obtidos não nos permitem sugerir efetuar a alteração da concentração *cut off* para a análise de anfetaminas em sangue *post mortem* pelo método imunoenzimático efetuado de acordo com o procedimento de ensaio PE-STF-C-104_rev02, uma vez que, esta se demonstrou ter elevados níveis de especificidade.

Podemos concluir que o método utilizado é bastante eficaz na triagem de anfetaminas e que muito provavelmente resultados falsos positivos ocorrerão pelas características do sangue logo no momento da colheita no cadáver, não sendo essa situação de possível controlo.

I2 Perspetivas futuras

Qualquer investigação, ao responder a determinadas questões, permite o delinear de novos projetos de pesquisa. Os resultados obtidos no decurso deste trabalho têm implicações na prática laboratorial na área de toxicologia, onde veio comprovar que a metodologia utilizada é eficaz e pouco sujeita a interferências, conferindo deste modo maior confiança aos peritos de toxicologia nos resultados obtidos.

Além dos compostos analisados, e caso seja possível obter mais padrões, sugere-se a testagem das restantes aminas biogénicas e de novas drogas pois muitas têm estruturas semelhantes às anfetaminas.

Atendendo às circunstâncias das mortes, outro mecanismo que poderia ser mais estudado é a endocrinologia no momento da morte, se existe alguma produção de algum metabolito, hormona ou alguma neurotoxina endógena que em casos de mortes violentas seja produzido em excesso e seja a razão dos resultados falsos positivos nestes testes.

Os estudos *in vitro* sugeriram que a degradação da amostra quando mantida à temperatura ambiente não origina um resultado falso positivo na análise de anfetaminas por EIA. Contudo sabemos que caso pretendêssemos analisar as próprias anfetaminas, os resultados não corresponderiam aos obtidos no momento da colheita. Sendo este um dado importante poderia sugerir-se a comparação de amostras de casos semelhantes, eventualmente associando-as ao intervalo *post mortem*.

13 Referências Bibliográficas

1. Decreto-Lei n.o 166/2012, de 31 de julho. Diário da República, 1.a série - N.o 147 p. 3951–7 [Internet]. 2012 [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/wdinmlWebsite/Data/file/OrganizacaoMedicoLegal/Organiza%C3%A7aoFuncionamentoINML/LeisOrganicas/DL166_2012-LeiOrganicalNMLCF.pdf
2. inmlcf - Missão [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=122%20&catid=29&Itemid=288
3. inmlcf - Visão [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=121%20&Itemid=287
4. inmlcf - Serviço de Química e Toxicologia Forenses [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=129%20:servico-de-quimica-e-toxicologia-forenses&catid=37&Itemid=292
5. Portaria n.º 19/2013 | DRE [Internet]. [cited 2021 Oct 16]. Available from: <https://dre.pt/dre/detalhe/portaria/19-2013-257062>
6. inmlcf - Valores [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=123%20&Itemid=289
7. Dinis-Oliveira RJ, Magalhães T, Carvalho FD. Introdução à Toxicologia Forense. Pactor. Dinis-Oliveira RJ CFBM, editor. Lisboa; 2015. 1–7 p.
8. Dinis-Oliveira RJ, Magalhães T, Carvalho F. A Perícia em Toxicologia Forense: Da Suspeita à Interpretação dos Resultados. Pactor. Pinheiro MF, editor. 2013. 159–87 p.
9. Silva ECT. As drogas de abuso em contexto forense [Internet]. [Coimbra]: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2020 [cited 2021 Nov 24]. Available from: <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/94258/1/Relat%c3%b3rio%20de%20Est%c3%a1gio%20-%20Eva%20Silva%202020.pdf>
10. Neves JR dos S. Análise toxicológica de opióides em contexto forense [Internet]. [Porto]: Faculdade Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa; 2016 [cited 2022 Jan 24]. Available from: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5811/1/PPG_25546.pdf
11. Quental ARDPS. Análise toxicológica da cocaína e dos seus metabolitos em contexto forense [Internet]. [Porto]: Universidade Fernando Pessoa; 2015 [cited 2022 Jan 24]. Available from: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5170/1/PPG_23796.pdf?fbclid=IwAR0sq9aXHTOv7VHO2ByNlIXtx_1MvcikxFs3PMEZMebxgVYRiMnBc6d8kPM
12. inmlcf - Vítimas de Crimes [Internet]. [cited 2021 Oct 13]. Available from: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=115&Itemid=283
13. Lei n.o 45/2004, de 19 de Agosto. Diário da República - I série-A, No 195 p. 5362– 8.
14. Dinis-Oliveira R. J., Magalhães T., Carvalho F. D. Recomendações gerais para colheita de amostras biológicas. 1ª ed. Lidel. Dinis- Oliveira R. J., Carvalho F, Bastos ML, editors. Lisboa; 2015. 103–107 p.
15. Carvalho VM. Redistribuição da cocaína e sua influência na neuroquímica post mortem [Internet]. [São Paulo]: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2011 [cited 2022 Jan 26]. Available from:

- https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/tde-15072011-120720/publico/tese_virginia.pdf
16. Bulcão R, Cristina Garcia S, Pereira Limberger Marília Baierle R, Dutra Arbo M, Aparecida da Matta Chasin A, Valladão Thiesen F, et al. Designer drugs: aspectos analíticos e biológicos. *Quim Nova*. 2012;35(1):149–58.
 17. Boehl PO. A utilização de imunoenaios na detecção de substâncias psicoativas [Internet]. [Porto Alegre]: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011 [cited 2022 Aug 26]. Available from: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/70119/000821947.pdf?sequence=1>
 18. Franco JM. Recomendações para colheita e acondicionamento de amostras em Toxicologia Forense [Internet]. [cited 2022 Jan 24]. Available from: <https://www.inmlcf.mj.pt/wdinmlWebsite/Data/file/OutrasInformacoes/PareceresOrientacoesServico/Normas/NP-INMLCF-009-Rev01.pdf>
 19. Takitane J. Verificação do uso de anfetaminas (“rebite”) por motoristas profissionais através da análise toxicológica em urina [Internet]. [São Paulo]: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014 [cited 2022 Jan 26]. Available from: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-24102014-121944/publico/JulianaTakitane.pdf>
 20. Lisboa MP. Matrizes Biológicas de Interesse Forense [Internet]. [Coimbra]: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; 2016 [cited 2022 Feb 17]. Available from: https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/48554/1/M_Marcia%20Lisboa.pdf
 21. Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, Duarte JA. Collection of Biological Samples in Forensic Toxicology, Toxicology Mechanisms and Methods. 2010. 363–414 p.
 22. Pantaleão L do N. Análises Toxicológicas de anfetaminas e benzodiazepínicos em amostras de cabelo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa [Internet]. [São Paulo]: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2012 [cited 2022 Feb 17]. Available from: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/tde-02042014-104017/publico/Lorena_do_Nascimento_Pantaleao_ME_original.pdf?fbclid=IwAR0TgUoNSczmXFyZlr1Z2AyGJXAd3jebliD8SdpSxCwA9u7t0MI7zJI9BtU
 23. Bordin DCM. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense [Internet]. São Paulo; 2015 [cited 2022 Feb 16]. Available from: https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v7n2a04.pdf?fbclid=IwAR1mJzEkZHHbLldm5chDPa_suXpJE3L75NWcQjSEdJNDzilU_r a1iduKOEc
 24. Cruz ACH da. Quantificação de cocaína e seu produto de biotransformação, benzoilecgonina, em amostras de cabelo: desenvolvimento, validação e aplicação de método. [Internet]. [Florianópolis]: Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina; 2018 [cited 2022 Feb 16]. Available from: https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/189745/PFMC-P0017-D.pdf?sequence=-1&isAllowed=y&fbclid=IwAR3ISSf5uokn3knJcnDkOF1ctA_OMpO0Q0LW H9qdqRLRCubOZa07MZug0_M

25. Escada MSC de S e. Método de análise de piperazinas em fluidos biológicos [Internet]. [Aveiro]: Universidade de Aveiro; 2007 [cited 2022 Feb 16]. Available from: <https://ria.ua.pt/bitstream/10773/2994/1/2008001185.pdf>
26. Moreira IM. Análise de Benzodiazepinas em Toxicologia Forense [Internet]. [Coimbra]: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; 2018 [cited 2022 Apr 3]. Available from: <https://eg.uc.pt/bitstream/10316/84429/1/DOCUMENTO%20UNICO%20I NES%20MOREIRA.pdf?fbclid=IwAR0wtaB8wbgx1E7rmtiuNHQAF-tapvQETGL-oUw0wbOq7WiGDjR5JHqaxw>
27. Gomes MS. Contributo da Química Forense na Detecção de Drogas de Abuso [Internet]. [Lisboa]: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2013 [cited 2022 Apr 13]. Available from: https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/10074/1/ulfc105875_tm_Miriam_Gomes.pdf
28. Rinaldi André, André Rinaldi Fukushima, Rosa Erica, Marcos Leilo Barreto. Aplicação de imunoensaios para análise de fármacos e drogas de abuso em sangue total, com finalidade forense [Internet]. 2009 [cited 2022 May 1]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/260310417_APLICACAO_DE_I MUNOENSAIOS_PARA_ANALISE_DE_FARMACOS_E_DROGAS_DE_ABUSO_EM_SANGUE_TOTAL_COM_FINALIDADE_FORENSE
29. Sebben VC. Análise de efedrinas e anfetaminas em urina empregando SPE e SPME po CG/EM/EM [Internet]. [Porto Alegre]: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007 [cited 2022 May 1]. Available from: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/12004/000617215.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
30. Silva MAA. Análise toxicológica por técnicas de triagem aplicada em amostras biológicas post-mortem de casos suspeitos de intoxicação provenientes de Instituto de Criminalística [Internet]. [Goiânia]: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás; 2014 [cited 2022 May 1]. Available from: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/4449/5/Disserta%20c3%a7% c3%a3o%20-%20Maria%20Augusta%20Alves%20Silva%20-%202014.pdf?fbclid=IwAR3a7YLOsWS61PS-5NhuGr6gbAkJCY7rzvktb1xRI6n8L4UwgvV1gv3XgSI>
31. Saitman A, Park HD, Fitzgerald RL. False-Positive Interferences of Common Urine Drug Screen Immunoassays: A Review. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2022 May 1];38(7):387–96. Available from: <https://academic.oup.com/jat/article/38/7/387/2798054>
32. Quesada L, Gomila I, Fe A, Servera MA, Yates C, Morell-Garcia D, et al. Fenofibric Acid Can Cause False-Positive Urine Methylenedioxymethamphetamine Immunoassay Results. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2022 May 1];39(9):734–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26203185/>
33. Logan BK, Costantino AG, Rieders EF, Sanders D. Trazodone, meta-chlorophenylpiperazine (an hallucinogenic drug and trazodone metabolite), and the hallucinogen trifluoromethylphenylpiperazine cross-react with the EMIT®II ecstasy immunoassay in urine. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2010 [cited 2022 May 1];34(9):587–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21073812/>
34. Kent R. Olson. Manual de Toxicologia Clínica [Internet]. AMGH Editora Ltda. 2014 [cited 2022 May 1]. Available from:

- http://www.saude.ufpr.br/portal/medtrab/wp-content/uploads/sites/25/2016/08/Manual-de-Toxicologia-CI%C3%ADnica_pdf.pdf
35. Colby JM, Patel PC, Fu DY, Rutherford NJ. Commonly used fluoroquinolones cross-react with urine drug screens for opiates, buprenorphine, and amphetamines. *Clin Biochem*. 2019 Jun 1;68:50–4.
 36. Gomila I, Quesada L, López-Corominas V, Fernández J, Servera MA, Sahuquillo L, et al. Cross-Reactivity of Chloroquine and Hydroxychloroquine With DRI Amphetamine Immunoassay. *Ther Drug Monit* [Internet]. 2017 [cited 2022 May 28];39(2):192–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28207572/>
 37. Bugier LS, Garcia-Hejl LCC, Vest CP, Plantamura CJ, Chianea CD, Renard CC. A Cross-Reactivity of Fenofibric Acid With MDMA DRI Assay. *Mil Med* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 May 28];181(9):1013–5. Available from: <https://academic.oup.com/milmed/article/181/9/1013/4159839>
 38. Leclercq M, Soichot M, Delhotal-Landes B, Bourgogne E, Goullain H, Mégarbane B, et al. False positive amphetamines and 3,4-methylenedioxymethamphetamine immunoassays in the presence of metoprolol-two cases reported in clinical toxicology. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2020 Aug 2 [cited 2022 May 28];44(2):200–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31384953/>
 39. Wijngaard R, Parra-Robert M, Marés L, Escalante A, Salgado E, González-de-la-Presa B, et al. Tetracaine from urethral ointment causes false positive amphetamine results by immunoassay. *Clin Toxicol (Phila)* [Internet]. 2021 [cited 2022 May 28];59(6):500–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33112680/>
 40. Hughey JJ, Colby JM. Discovering Cross-Reactivity in Urine Drug Screening Immunoassays through Large-Scale Analysis of Electronic Health Records. *Clin Chem* [Internet]. 2019 [cited 2022 May 28];65(12):1522. Available from: [/pmc/articles/PMC7055671/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31384953/)
 41. Liu L, Wheeler SE, Rymer JA, Lower D, Zona J, Peck Palmer OM, et al. Ranitidine interference with standard amphetamine immunoassay. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 May 28];438:307–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25242739/>
 42. Marin SJ, Doyle K, Chang A, Concheiro-Guisan M, Huestis MA, Johnson-Davis KL. One Hundred False-Positive Amphetamine Specimens Characterized by Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 May 28];40(1):37. Available from: [/pmc/articles/PMC4731401/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26527556/)
 43. Snozek CLH, Kaleta EJ, Jannetto PJ, Linkenmeyer JJ, Harnish TL, Stephen J, et al. False-positive amphetamine results on several drug screening platforms due to mexiletine. *Clin Biochem* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2022 Jun 5];58:125–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29802836/>
 44. Kaplan J, Shah P, Faley B, Siegel ME. Case Reports of Aripiprazole Causing False-Positive Urine Amphetamine Drug Screens in Children. *Pediatrics* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2022 Jun 8];136(6):e1625–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26527556/>
 45. Dadlani N, Farrar A, Jones G. Variability amongst urine toxicology amphetamine readings with concurrent administration of fenofibrate. *Australas Psychiatry* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2022 Jun 8];26(1):24–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28699773/>
 46. Quesada L, Gomila I, Fe A, Servera MA, Yates C, Morell-Garcia D, et al. Fenofibric Acid Can Cause False-Positive Urine

- Methylenedioxymethamphetamine Immunoassay Results. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2022 Jun 5];39(9):734–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26203185/>
47. Beck O, Rausberg L, Al-Saffar Y, Villen T, Karlsson L, Hansson T, et al. Detectability of new psychoactive substances, “legal highs”, in CEDIA, EMIT, and KIMS immunochemical screening assays for drugs of abuse. *Drug Test Anal* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jun 24];6(5):492–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24665024/>
 48. Brahm NC, Yeager LL, Fox MD, Farmer KC, Palmer TA. Commonly prescribed medications and potential false-positive urine drug screens. *Am J Health Syst Pharm* [Internet]. 2010 Aug 15 [cited 2022 Jun 28];67(16):1344–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20689123/>
 49. Pelletti G, Rossi F, Garagnani M, Barone R, Roffi R, Fais P, et al. Optimization of cloned enzyme donor immunoassay cut-offs for drugs of abuse in post-mortem whole blood. *Forensic Sci Int*. 2020 Jul 1;312:110291.
 50. Gjerde H, Christophersen AS, Skuterud B, Klemetsen K, Mørland J. Screening for drugs in forensic blood samples using EMIT® urine assays. *Forensic Sci Int*. 1990 Feb 1;44(2–3):179–85.
 51. Hino Y, Ojanperä I, Rasanen I, Vuori E. Performance of immunoassays in screening for opiates, cannabinoids and amphetamines in post-mortem blood. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2003 Jan 28 [cited 2022 Aug 28];131(2–3):148–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12590054/>
 52. Elliott S, Burgess V. Investigative implications of the instability and metabolism of mebeverine. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2006 [cited 2022 Jan 24];30(2):91–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16620538/>
 53. Musshoff F, Kraemer T. Identification of famprofazone ingestion. *Int J Legal Med* [Internet]. 1998 Oct [cited 2022 Jul 7];111(6):305–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9826089/>
 54. Łukasik-Głębocka M, Sommerfeld K, Tezyk A, Zielińska-Psujka B. [Intoxicação aguda com suplemento dietético para perda de peso sugerindo falsamente o uso de anfetaminas] - PubMed. 2013 [cited 2022 Jul 7]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24501816/>
 55. Moriya F, Hashimoto Y. Application of the Triage panel for drugs of abuse to forensic blood samples - PubMed. 1996 [cited 2022 Jul 19]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8691649/>
 56. Kroener L, Musshoff F, Madea B. Evaluation of immunochemical drug screenings of whole blood samples. A retrospective optimization of cutoff levels after confirmation-analysis on GC-MS and HPLC-DAD. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2003 [cited 2022 Jul 19];27(4):205–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12820742/>
 57. Moore KA, Werner C, Zannelli RM, Levine B, Smith ML. Screening blood and tissues for nine cases of drugs of abuse using automated microplate immunoassay. *Forensic Sci Int* [Internet]. 1999 Dec 6 [cited 2022 Jul 19];106(2):93–102. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10664895/>
 58. Klingler RA, Blum LM, Rieders F. Direct automated EMIT d.a.u. analysis of N,N-dimethylformamide-modified serum, plasma, and postmortem blood for amphetamines, barbiturates, methadone, methaqualone, phencyclidine, and propoxyphene. *J Anal Toxicol* [Internet]. 1990 [cited 2022 Jul 23];14(5):288–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2263063/>

59. Colisão I, Spiehler V, Guluzian S, Sedgwick P. Definir concentrações de corte para triagem de imunoensaio de sangue post mortem - PubMed. *J Ciência Forense* 1998 mar;43(2):390-4 [Internet]. 1998 [cited 2022 Jul 23]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9544549/>
60. Paul A, Wells A, Dasgupta A. Stereospecificity of antibody: quinine, the optical isomer of quinidine and anti-malarial drug chloroquine do not cross-react with quinidine immunoassays. *Ther Drug Monit* [Internet]. 2000 Apr [cited 2022 Jul 29];22(2):174–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10774629/>
61. Apollonio LG, Whittall IR, Pianca DJ, Kyd JM, Maher WA. Matrix effect and cross-reactivity of select amphetamine-type substances, designer analogues, and putrefactive amines using the Bio-Quant direct ELISA presumptive assays for amphetamine and methamphetamine. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2007 [cited 2022 Jul 28];31(4):208–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17555644/>
62. Dueñas-García OF. False-positive amphetamine toxicology screen results in three pregnant women using labetalol. *Obstetrics and gynecology* [Internet]. 2011 [cited 2022 Jul 28];118(2 Pt 1):360–1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21775860/>
63. Fenderson JL, Stratton AN, Domingo JS, Matthews GO, Tan CD. Amphetamine Positive Urine Toxicology Screen Secondary to Atomoxetine. *Case Rep Psychiatry* [Internet]. 2013 [cited 2022 Jul 28]; 2013:1–3. Available from: [/pmc/articles/PMC3570929/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2413570929/)
64. Melanson SEF, Lee-Lewandrowski E, Griggs DA, Long WH, Flood JC. Reduced Interference by Phenothiazines in Amphetamine Drug of Abuse Immunoassays. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2006 Dec 1 [cited 2022 Jul 28];130(12):1834–8. Available from: [https://meridian.allenpress.com/aplm/article/130/12/1834/459751/Reduce](https://meridian.allenpress.com/aplm/article/130/12/1834/459751/Reduce-d-Interference-by-Phenothiazines-in)
65. Baron JM, Griggs DA, Nixon AL, Long WH, Flood JG. The trazodone metabolite meta-chlorophenylpiperazine can cause false-positive urine amphetamine immunoassay results. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2011 [cited 2022 Jul 28];35(6):364–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21740694/>
66. Casey ER, Scott MG, Tang S, Mullins ME. Frequency of false positive amphetamine screens due to bupropion using the Syva EMIT II immunoassay. *J Med Toxicol* [Internet]. 2011 Jun [cited 2022 Aug 3];7(2):105–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21191682/>
67. Gomila I, Moranta C, Quesada L, Pastor Y, Dastis M, Torrents A, et al. Cross-reactivity of selected benzofurans with commercial amphetamine and ecstasy immunoassays in urine. *Bioanalysis* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Aug 3];9(22):1771–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28975809/>
68. Galamba MAF. Uso terapêutico e recreacional de anfetaminas e derivados-riscos e benefícios [Internet]. [Lisboa]: Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz; 2017 [cited 2022 Aug 3]. Available from: https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/20183/1/Galamba_Maria_Am%C3%A9lia_Fialho.pdf
69. Hermes RF. Identificação de perfil de drogas de abuso em leite materno de puerpéras em um hospital no vale do rio pardo [Internet]. [Santa Cruz do Sul]: Universidade de Santa Cruz do Sul –; 2015 [cited 2022 Aug 7]. Available from: <https://repositorio.unisc.br/jspui/bitstream/11624/1014/1/Rafaele%20Francine%20Hermes.pdf>

70. Heal DJ, Smith SL, Gosden J, Nutt DJ. Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective. *J Psychopharmacol* [Internet]. 2013 Jun [cited 2022 Aug 7];27(6):479. Available from: [/pmc/articles/PMC3666194/](#)
71. Carvalho M, Carmo H, Costa VM, Capela JP, Pontes H, Remião F, et al. Toxicity of amphetamines: an update. *Archives of Toxicology* 2012 86:8 [Internet]. 2012 Mar 6 [cited 2022 Aug 5];86(8):1167–231. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-012-0815-5>
72. Estimulantes de tipo anfetamínicos [Internet]. 2001 [cited 2022 Aug 27]. Available from: https://www.unodc.org/documents/archive/report_2001-06-26_1_es/cons_ats.pdf
73. Belo MMT. Anfetaminas: da saúde à ilicitude [Internet]. [Coimbra]: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2015 [cited 2022 Aug 13]. Available from: <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/31415/1/TESE%20-%20Mariana%20Belo.pdf>
74. Emcdda. Relatório Europeu sobre Drogas. Tendências e evoluções [Internet]. 2022 [cited 2022 Aug 13]. Available from: https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/14644/2022.2419_PT_03_wm.pdf
75. 2013 national report (2012) TO THE EMCDDA by the Reitox National Focal Point “PORTUGAL” New Developments, Trends and in-depth information on selected issues REITOX. [cited 2022 Aug 13]; Available from: www.idt.pt
76. Henriques CMC. Drogas sintéticas e seus precursores: revisão sistemática de canabinóides sintéticos, catinonas sintéticas, efedrina e dimetilamina. Experiência profissionalizante na vertente de Farmácia Comunitária e Investigação [Internet]. [Covilhã]: Universidade da Beira Interior; 2018 [cited 2022 Aug 17]. Available from: https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/8273/1/6137_12952.pdf
77. Carvalho TRS. Avaliação in vitro da nefrotoxicidade de catinonas sintéticas [Internet]. [Porto]: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa; 2017 [cited 2022 Aug 17]. Available from: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/6576/1/PPG_27514.pdf
78. Sanchez C. Avaliação da presença de anfetaminas, cocaína e tetraidrocanabinol em amostras de sangue *post mortem* e de indivíduos vivos, utilizando a técnica de microextração em fase líquida com uso de fibra oca de polipropileno (HF-LPME) [Internet]. [São Paulo]: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2017 [cited 2022 Aug 21]. Available from: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/tde-24052018-145142/publico/Cloviss_Sanchez_DO_Corrigida.pdf
79. Barata mário GBS. Prevalência do consumo de drogas ilícitas nas Forças Armadas: estudo epidemiológico num dos ramos [Internet]. [Lisboa]: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa; 2008 [cited 2022 Aug 26]. Available from: <https://run.unl.pt/bitstream/10362/4880/3/Barata%20M%C3%A1rio%20T M%202008.PDF?fbclid=IwAR3MNUvgFbmdo6b6mo9ougiPOpjOkZLmpZn3yGzvjlCtSBIYsfliQ-By7eo>
80. Zeferino MT. Acidentes de trânsito e os estimulantes do tipo anfetaminas- estudo de caso junto às empresas de transporte rodoviário de cargas no estado de santa catarina [Internet]. [Florianópolis]: Universidade Federal de Santa Catarina; 2004 [cited 2022 Aug 27]. Available from: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/87295/206188.pdf?>

- sequence=1&isAllowed=y&fbclid=IwAR0DjFuQnRiHLId6xSzHZE-GYbao9hg57XAjFO36RzW1ldZ6OKFTu_OI2PE
81. Souza LR. Citogenotoxicidade de solo contaminado por necrochromo e toxicidade de aminas biogénicas derivadas de processos putrefativos [Internet]. [Rio Claro/ São Paulo]: universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2021 [cited 2022 Aug 24]. Available from: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/215398/souza_lr_me_rcla.pdf?sequence=3&isAllowed=y
 82. Antonio A da S. Avaliação das características físico-químicas de ilhas de decomposição cadavérica no desenvolvimento de modelos de previsão do intervalo pós-morte em área de mata tropical [Internet]. [Manaus]: Universidade Federal do Amazonas; 2016 [cited 2022 Aug 20]. Available from: <https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/5045/2/Disserta%c3%a7%c3%a3o%20-%20Ananda%20da%20Silva%20Antonio.pdf>
 83. Alves MRC. VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM MORTADELA UTILIZANDO UPLC-MS/MS CAMPINAS 2017 [Internet]. [Campinas]: Instituto de Tecnologia de Alimentos; 2017 [cited 2022 Aug 28]. Available from: <https://ital.agricultura.sp.gov.br/arquivos/pos/dissertacoes/2018/Dissertacao%20Marcia%20Regina%20Cucatti%20Alves.pdf>
 84. Dias RM. DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS Implementação de uma metodologia em produtos cárneos [Internet]. [Viana do Castelo]: Instituto Politécnico de Viana do Castelo; 2019 [cited 2022 Aug 24]. Available from: http://repositorio.ipvc.pt/bitstream/20.500.11960/2469/1/Rafaela_Dias.pdf
 85. Cardozo M, LKSC, FTCC, LALS. Aminas Biogénicas: Um Problema de Saúde Pública. Rev Virtual Quim, 2013, 5 (2), 149-168 Data de publicação na Web: 6 de março de 2013.
 86. Pereira IS. Implementação do método analítico para determinação de aminas biogénicas em amostras de pescado e produtos de pesca. Avaliação de processos para a sua formação [Internet]. [Lisboa]: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; 2018 [cited 2022 Aug 24]. Available from: https://run.unl.pt/bitstream/10362/54860/1/Pereira_2018.pdf
 87. Rigueira JCS. Influência da contagem de células somáticas no perfil e teores de aminas bioativas e na qualidade de leite cru e de queijo mussarela [Internet]. [Belo Horizonte]: Faculdade de Farmácia da UFMG Belo Horizonte; 2010 [cited 2022 Aug 24]. Available from: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/MBSA-8FMNEN/1/tese_juliana_doutorado.pdf#page=34
 88. Diniz Fabiana Barbosa. Elaboração de tabela de aminas bioativas em alimentos e estimativa da ingestão no Brasil [Internet]. [Belo Horizonte]: Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte; 2015 [cited 2022 Aug 28]. Available from: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUBD-A5GLJS/1/disserta_o_fabiana_b_diniz.pdf
 89. Biosfera E, Científico Conhecer-Goiânia C. Aminas biogénicas como indicadores de qualidade de salames e produtos cárneos fermentados. (9):2013.
 90. Pereira FDC. Estudo dos efeitos biológicos da poliamina putrescina em diferentes organismos-teste [Internet]. [Rio Claro]: Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista; 2017 [cited 2022 Aug 29]. Available from:

- https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/151130/pereira_fdc_dr_rcla_int.pdf?sequence=4&isAllowed=y
91. Bandeira CM. Fontes de espermina e atividade antioxidante in vivo [Internet]. [Belo Horizonte]: Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte; 2011 [cited 2022 Aug 24]. Available from: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/MAFB-8S5NBS/1/tese_cec_lia.pdf
 92. de Araújo DHP. Universidade Federal do Pará Instituto de Tecnologia programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos [Internet]. [Belém]: Instituto de Tecnologia da Universidade Federal do Pará; 2013 [cited 2022 Aug 24]. Available from: <https://ppgcta.propesp.ufpa.br/ARQUIVOS/dissertacoes/2013/Deborah%20Araujo.pdf>
 93. Madboly AG, Asmaa;, Hussein YA, Metwally ES. Cadaverine and putrescine levels in human brain tissue for postmortem interval estimation. 115 Egypt J Forensic Sci Appl Toxicol. 2021;21(1).
 94. Hara RV. Avaliação dos efeitos citogenotóxicos da diamina cadaverina, presente no necrochorume, por meio de ensaios com sistemas testes in vitro e in vivo [Internet]. [Rio Claro]: Instituto de Biociência da Universidade Estadual Paulista; 2016 [cited 2022 Aug 24]. Available from: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/144608/hara_rv_dr_rcla_int.pdf?sequence=5&isAllowed=y
 95. Putrescina | Molécula da Semana - FCIências [Internet]. [cited 2022 Aug 24]. Available from: <https://www.fciencias.com/2017/01/12/putrescina-molecula-da-semana/>
 96. Aline Alves D, Luis Krabbe E, Lange Contreira C, Cristina Bedendo G, Noé da Fonseca F, Gonçalves Xavier E, et al. Dinâmica da formação de aminas biogênicas em carcaças de aves mortas, armazenadas em temperatura ambiente.
 97. Ferreira MTS. Para lá da morte: estudo tafonômico de decomposição cadavérica e da degradação óssea e implicações na estimativa do intervalo pós-morte [Internet]. [Coimbra]: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra; 2013 [cited 2022 Aug 29]. Available from: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/21839>
 98. Silva CML da. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de anfetamina, metanfetamina e famprofasona em sangue e fígado após administração controlada de famprofasona em suínos. [Niterói]: Universidade Federal Fluminense; 2018.