

Mariana Mateus

Análise exploratória das potencialidades forenses do cabelo, com aplicação de técnicas de GC-MS.

Dissertação apresentada para prova de Mestrado em Química Forense

Professora Doutora Elvira Gaspar
Professora Doutora Dina Murtinho

Setembro de 2014

Universidade de Coimbra

"Success is the sum of small efforts, repeated day in and day out."

– Robert Collier

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, com a maior gratidão, à Professora Elvira Gaspar. Por tudo o que fez por mim, enquanto aluna e enquanto pessoa. Mais que uma Orientadora, uma Professora, uma “Mãe Científica”.

Ao Professor Higuinaldo Neves por me ajudar nas dúvidas, problemas e soluções, um obrigada de coração.

Quero ainda expressar a minha gratidão aos meus colegas de laboratório. Ao José Santana que, com a sua paciência, conhecimento e amizade, contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho. À Inês Nunes que, com o seu companheirismo e amizade me auxiliou quando precisei. E ao Renato, por me fazer sorrir no momento certo.

À minha família. À minha Mãe, Luisa Ayala Monteiro, ao meu Pai, Manuel Mateus, e aos meus avós, Maria Luísa e José António, por lutarem comigo e me segredarem a palavra essencial, em todo o meu percurso académico.

Às palavras muitas vezes não ditas, da Filipa, da Betty e da Ema. Pelo respeito, amizade e constante força. Sem vocês a dificuldade triplicava.

À João e ao Pedro pela palavra ideal, no momento preciso.

Às minhas “meninas da Costa” e aos meus “Amadoras”, por me ouvirem, acreditarem em mim e me apoiarem.

RESUMO

A presente dissertação envolveu o estudo e avaliação do cabelo como amostra forense, por se tratar de uma amostra não-invasiva, estável, embora não-convencional. O objectivo foi desenvolver e avaliar uma metodologia analítica de alta resolução para a determinação da composição química de amostras de cabelo, bem como a presença de compostos com potencial relevância forense, em situações não dirigidas e aquando do desconhecimento de características individuais.

O estudo envolveu 42 voluntários com idades compreendidas entre os 14 e os 24 anos. Foram testadas as metodologias analíticas já descritas na literatura. No respeitante à preparação de amostra no presente trabalho procedeu-se à optimização do procedimento de lavagem da matriz e estudou-se o melhor solvente, temperatura e tempo de extracção. Relativamente ao método cromatográfico utilizado, cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS), foram estabelecidos os melhores parâmetros analíticos para a determinação da composição química do cabelo.

Para descortinar os resultados obtidos utilizaram-se técnicas de análise estatística de multivariável: Análise de Componente Principal (PCA), Análise Discriminante Linear (LDA) e Análise de Clusters. O estudo mostrou que é possível, através da determinação dos compostos relevantes, reconhecer para cada amostra, o género e o grupo etário. No entanto, não foi possível a determinação de hábitos de consumo associados ao estilo de vida, como o consumo de tabaco e/ou de bebidas alcólicas.

O composto *4-hidroxi-2-pentanona*, aparenta ser um marcador biológico do cabelo para o grupo dos adolescentes. Já os ácidos hexanóico e heptanóico são potenciais biomarcadores da faixa etária dos adultos. Para a condição de género, os ácidos heptanóico, tridecanóico, *cis-9-hexadecenóico* e um ácido insaturado do ácido octadecanóico sobressaem para o grupo masculino, enquanto o ácido hexanóico de destaca para o feminino.

Trata-se de um trabalho inovador, o qual mostrou que o método tem potencial para ser utilizado para fins classificativos, na identificação de desconhecidos, em função do género e da idade. Os resultados, sendo exploratórios, requerem agora a validação com recurso a um universo mais amplo de sujeitos.

Palavras-chave: Cabelo, jovens, grupo etário, género, toxicologia forense.

ABSTRACT

This work involved the study and evaluation of human hair as a forensic non-invasive and stable sample, although non-conventional. The goal was to develop a high resolution analytical methodology to determine the composition of hair samples and the presence of compounds with potential forensic relevance in situations not addressed and when individual characteristics are unknown.

The study involved 42 volunteers aged between 14 and 24 years. Analytical methodologies already described in the literature were tested. Respecting sample preparation, in this work the washing procedure was optimized, and the best solvent, temperature and extraction time were also studied. For the chromatographic methodology, the best analytical parameters for gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) were established, to determine the chemical composition of the hair.

To unfold the results, multivariate statistical analysis were used: Principal Component Analysis (PCA), Linear Discriminant Analysis (LDA) and cluster analysis. The study showed that it is possible, through the use of target compounds, to recognize gender and age groups. However, due to the small universe of samples and their characteristics, it was not possible to determine consumption habits linked to lifestyle, such as tobacco and/or alcoholic beverages.

The compound *4-hydroxy-2-pentanone*, seems to be the biological markers for the group of teenagers. The hexanoic and heptanoic acids appear to be biomarkers of adults. For the condition of gender, the acids such as heptanoic, tridecanoic, *cis*-9-hexadecenoic and one undetermined octadecenoic acid stand for the male group, while hexanoic acid highlights for females.

This is an innovative work, having the method potential to be used for classification purposes in the identification of unknown samples, based on gender and age. A larger universe of subjects must be used in order to validate the results.

Keywords: Hair, young people, age group, gender, forensic toxicology.

ÍNDICE

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Índice	xi
Índice de figuras	xv
Índice de tabelas	xix
Abreviaturas.....	xxi
CAPÍTULO 1 – Introdução	1
CAPÍTULO 2 – Revisão de Literatura	3
Parte I – Os Jovens e os seus Hábitos.....	3
1. Juventude.....	3
2. Determinantes Sociais de Saúde e Bem-Estar dos Jovens	4
3. Comportamentos de Risco/Hábitos de Consumo	5
Parte II – Substâncias em Amostras Biológicas	7
1. Introdução.....	7
2. O Cabelo como Matriz Biológica.....	7
2.1. História da Análise	7
2.2. Anatomia do Cabelo	10
2.3. Incorporação de drogas.....	12
2.4. Interesse Forense	13
2.4.1. Consumo de Substâncias Lícitas	16
Álcool	16
Nicotina	18
CAPÍTULO 3 – Procedimento Experimental.....	21
1. Introdução.....	21
2. Recolha e preparação da amostra	21
2.1. Cabelo.....	21

2.2. Recolha e armazenamento da amostra.....	23
2.3. Lavagem da amostra.....	23
2.4. Extracção dos compostos	23
2.5. Derivatização do extracto	24
2.6. Instrumentação e condições cromatográficas.....	24
2.6.1. Análise por GC-MS.....	24
3. Reagentes.....	24
3.1. Solventes e Padrões utilizados.....	24
3.2. Preparação das soluções padrão	25
3.2.1. Síntese dos ésteres metílicos	25
3.2.2. Síntese dos ésteres etílicos.....	26
3.2.3. Síntese dos ésteres isopropílicos	26
3.2.4. Síntese da 4-hidroxi-2-pentanona.....	27
4. Desenvolvimento de método	28
4.1. Lavagem	29
4.2. Extracção	29
4.2.1. Hidrólises Alcalina e Ácida.....	29
4.2.2. Extracção por solvente	30
CAPÍTULO 4 – Resultados e discussão.....	35
1. Resultados.....	35
2. Desconvolução de dados	41
2.1. Métodos	41
2.2. Metodologia.....	41
2.2.1. Técnicas	42
2.2.2. Redução de variáveis	45
2.2.3. Adaptação da matriz de dados	49
2.2.4. Análise exploratória da matriz da Tabela 7.....	50

2.3. Visão Global	55
2.3.1. Análise de aglomerados (Cluster analysis).....	56
2.3.2. Análise discriminante Linear (LDA).....	57
2.3.3. Desagregação da estrutura de dados	59
2.3.4. Simplificação da Matriz	63
2.4. Conclusão	66
CAPÍTULO 5 – Conclusões	69
Referências Bibliográficas.....	71
Anexos.....	I

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama da estrutura do cabelo - <i>adaptado de Boumba, Ziavrou, & Vougiouklakis, 2006</i>	10
Figura 2 - Molécula do Etanol (Rodrigues, 2012).....	16
Figura 3 - Estrutura química da Nicotina	19
Figura 4 - Estrutura química da Cotinina	19
Figura 5 - Esquema reaccional da metilação do ácido capróico utilizando diazometano.	25
Figura 6 - Esquema reaccional da etilação do ácido palmítico utilizando etanol.....	26
Figura 7 - Esquema reaccional da síntese do ácido mirístico a miristato de isopropilo. 27	
Figura 8 – Esquema reaccional da síntese de 4-hidroxi-2-pentanona	28
Figura 9 - Cromatograma (TIC) obtido na análise (GC-MS) da fracção etérea (em natureza).	31
Figura 10 - Cromatograma (TIC) obtido na análise (GC-MS) da fracção etérea derivatizada por metilação.....	31
Figura 11 - Variabilidade explicada por análise de componente principal (PCA) da matriz constante da Tabela 4. Azul- Calibração; Vermelho – Validação	46
Figura 12 - Projecção bidimensional dos valores “Scores” relativos aos dois primeiros componentes principais (PC-1 e PC-2) contendo 52 % de variância acumulada. Elevada dispersão das amostras individuais (casos) com ausência de estrutura.	46
Figura 13 - Pesos de correlação (“Loadings”) das variáveis da Tabela 4 ao longo PC-1 e PC-2. Circulo exterior- 100% de variabilidade explicada. Circulo interior – 50% de variabilidade explicada.	48
Figura 14 - Projecção bidimensional dos valores “Scores” relativos aos dois primeiros componentes principais (PC-1 e PC-2) após redução de variáveis, contendo 68 % de variância acumulada. Existem amostras que constituem casos individuais peculiares, responsáveis.....	49
Figura 15 - Análise de componentes principais dos dados da Tabela 7 (11 variáveis). A- Distribuição dos casos em projecção bidimensional ao longo de PC-1 e PC-2. Os dois componentes explicam 74 % da variância (D). B- Pesos de correlação das variáveis ao longo de PC-1 e PC2.Todas as variáveis se encontram agora acima dos 50% de variância explicada. C- Gráfico de influência a 100% de variância explicada (PC-7). Alguns casos têm demasiada influência no modelo. D- Variância explicada. Os dois	

primeiros componentes são agora responsáveis por 74% da variância de calibração (curva azul). A variância de validação ainda se afasta (61%).	51
Figura 16 - Análise de componentes principais (Tabela 7). Distribuição dos casos em função da idade. Área vermelha= Adultos; Área verde= Adolescentes.....	53
Figura 17 - Análise de componentes principais. Distribuição tridimensional de casos ao longo de PC-1, PC-2 e PC-3 (81% de variância explicada). Área vermelha= Adolescentes; Área Verde= Adultos.	54
Figura 18 - Análise de componentes principais (Tabela 7). Distribuição dos casos em função do género. Área vermelha= Masculino; Área Verde= Feminino.	54
Figura 19 - Análise de componentes principais (Tabela 7). Distribuição tridimensional dos casos em função do género, ao longo dos PC-1, PC-2 e PC-3 .Área vermelha= masculino; Área verde= Feminino. A interpenetração deve-se à maior dispersão dos casos do género feminino.	55
Figura 20 - Distribuição dos casos em função de género e grupo etário. À esquerda: Projecção bidimensional (PC-1 – PC2) com os quatro quadrantes definidos – A- Adultos masculinos; B - Adolescentes masculinos; C- Adultos femininos; D – Adolescentes femininos. À direita Projecção tridimensional (PC-1 – PC-2 – PC3). Vermelho – casos masculinos; verde – casos femininos.....	56
Figura 21 - Dendograma de análise de aglomerado segundo o método de Ward usando distancias euclidianas.	57
Figura 22 - Análise discriminante linear (LDA) para classificação por escala etária .- Adolescentes (vermelho) vs. Adultos (azul).....	58
Figura 23 - Análise discriminante linear (LDA) para classificação em função da condição de género .- Feminino (azul) vs. Masculino (vermelho). Quatro casos femininos e um masculino são classificados erroneamente.	59
Figura 24 - Condição de género entre a população adulta.	60
Figura 25 - Condição de género entre a população adolescente.....	60
Figura 26 - Distribuição dos sujeitos por condição de género e condição etária utilizando como valores das variáveis apenas a condição de presente (1) ou ausente (2). TM- Adolescentes masculinos. TF- adolescentes femininos. AM- adultos masculinos. AF- Adultos Femininos.	61
Figura 27 - Separação de género em função da idade ilustrada pelas correspondentes linhas de tendência. Vermelho – Feminino (F); Azul – Masculino (M).	62

Figura 28 - Distribuição etária por condição de género (método da semelhança máxima), explicitando a posição dos centroides para cada grupo. TM- Adolescentes masculinos. TF- adolescentes femininos. AM- adultos masculinos. AF- Adultos femininos.....	63
Figura 29 - Análise PCA (77% de variância) após remoção das variáveis 2, 6, 7, 10 e 12. Não existe alteração do modelo.....	64
Figura 30 - Análise discriminante em função do grupo etário após eliminação das variáveis 2, 6, 7, 10, e 12. Vermelho=Adolescentes. Azul= Adultos.....	65
Figura 31 - Análise discriminante em função da condição de género após eliminação das variáveis 2, 6, 7, 10 e 12. Não existe alteração do modelo.....	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação das amostras analisadas (sexo, idade e quantidade de amostra)	22
Tabela 2 – Tempos de retenção (RT) dos compostos detectados na síntese de 4-hidroxi-2-pentanona, e respectivos iões relevantes no seu espectro de massa, obtido por GC-MS.	28
Tabela 3 – Compostos identificados no extracto etéreo (em natureza) e na fracção etérea derivatizada por metilação.....	32
Tabela 4 - Compostos identificados nas amostras analisadas (1=Presente. 2=Ausente). As amostras estão distribuídas de acordo com a idade dos indivíduos.	35
Tabela 5 - Matriz de amostragem (A divisão entre adultos e adolescentes foi arbitrariamente estabelecida a partir do 19 anos)	41
Tabela 6 - Matriz de composição reduzida empiricamente às variáveis mais significativas.....	43
Tabela 7 - Matriz de dados reduzida em função dos resultados de PCA preliminares. A variável 14 foi substituída pela 22 após condução de análises subsequentes e consideração de valores discrepantes ("outliers"). Os valores em falta foram substituídos por -999 (Saar-Tsechansky, et al., 2007).....	49

ABREVIATURAS

- amu – Unidade de massa atómica (*Atomic mass unit*)
- CDT – Transferina deficiente em hidratos de carbono
- EtG – Etil glucuronide
- FAEE – Ésteres etílicos de ácidos gordos
- GC – Cromatografia Gasosa
- GC-MS – Cromatografia Gasosa associada a Espectrometria de Massa
- GC-MS/MS – Cromatografia Gasosa associada a Espectrometria de Massa em tandem
- GC-MS/NCI – Cromatografia Gasosa associada a Espectrometria de Massa com Ionização Química Negativa
- GGT – GAMA-glutamyl-transpeptidase
- HCL – Ácido clorídrico
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- HPLC/APCI-MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Ionização Química à Pressão Atmosférica associada a Espectrometria de Massa
- HPLC/ESI-MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de ionização por electrospray associada a Espectrometria de Massa
- HPLC-ECD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção electroquímica
- HPLC-FL – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Fluorescência
- HPLC-MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associada a Espectrometria de Massa
- HS-SPME – Microextração em fase sólida por *headspace*
- LC – Cromatografia Líquida
- LC/ESI-MS/MS – Cromatografia Líquida de ionização por electrospray associada a Espectrometria de Massa em tandem
- LC-MS – Cromatografia Líquida associada a Espectrometria de Massa

- LC-MS/MS – Cromatografia Líquida associada a Espectrometria de Massa em tandem
- LDA – Análise Discriminante Linear (*Linear Discriminant Analysis*)
- MS – Espectrometria de Massa
- NaOH – Hidróxido de sódio
- ONU – Organização das Nações Unidas
- PCA – Análise de Componente Principal (*Principal Component Analysis*)
- RIA – Radioimunoensaios
- RT – Tempo de retenção (*Retention time*)
- SIM – Monitorização de ião selectivo (*Selective ion monitoring*)
- SNC – Sistema Nervoso Central
- UNESCO – Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
- VCM – Volume corpuscular médio das hemácias
- WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o cabelo tem-se demonstrado uma matriz biológica muito útil na realização de análises toxicológicas forenses. Pode potencialmente fornecer o historial dos compostos consumidos por determinado sujeito, num período de meses a anos, possibilitando uma janela de detecção superior ao sangue e à urina, em analogia com outros tipos de pêlo e unhas. A possibilidade de realização de testes, recorrendo ao cabelo como matriz alternativa ou complementar, permitirá ampliar o leque de investigações toxicológicas e forenses, envolvendo mortes relacionadas com o consumo de drogas, crimes facilitados devido ao consumo de drogas, controlo de doping, determinação da exposição a xebobióticos durante o período de gestação e ainda no controlo de protecção de crianças, no controlo do abuso de drogas em programas de desintoxicação e no local de trabalho e ainda, na toxicologia *post-mortem*, mesmo em cadáveres que se encontrem em avançado estado de decomposição.

Nos dias de hoje podemos afirmar que esta matriz, depois da urina e do sangue, já é uma amostra importante, no respeitante ao seu uso para detecção de consumo de drogas. É uma matriz não-invasiva, de fácil recolha, não sendo de fácil adulteração, e podendo ser armazenada e transportada à temperatura ambiente, devido à sua estabilidade. A principal vantagem da utilização do cabelo recai na possibilidade de traçar um perfil cronológico de consumo, dependendo da dimensão da amostra no respeitante ao comprimento do cabelo do indivíduo.

Na presente introdução é feita uma pequena revisão histórica da análise do cabelo, bem como da sua anatomia e incorporação de drogas e do interesse forense na utilização desta matriz. São ainda referidas metodologias analíticas, desde que o cabelo é recolhido até à análise dos resultados.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA

Parte I – Os Jovens e os seus Hábitos

1. Juventude

Existe uma grande controvérsia no respeitante à definição de “juventude”. A UNESCO define a “juventude” como esta sendo o período de transição entre a dependência infantil e a independência da vida adulta. Ou seja, é uma definição difícil de caracterizar pois cada jovem apresenta um momento diferente, de consciência, para a ingressão na vida adulta. É uma fase caracterizada pelos esforços realizados no alcance de desenvolvimentos físicos, mentais, emocionais e sociais. Contudo, a idade é o único factor não-subjectivo no respeitante ao período compreendido entre a escolaridade obrigatória e a altura da obteção do primeiro emprego. Devido ao elevado nível de desemprego este é um factor difícil de determinar, o mesmo acontece com o período de dependência devido, também, ao aumento do custo de vida (UNESCO).

As Nações Unidas, definem a juventude como sendo a idade compreendida entre os 15 e os 24 anos (UNESCO), baseando as suas estatísticas neste intervalo etário bem como nos dados demográficos, educação, emprego e saúde, facultados pelas Nações Unidas, (WHO, 1986).

Os jovens que apresentam idades compreendidas entre os 11 e os 15 anos encaram muitas tensões e desafios, no âmbito escolar, social e familiar. Estes parâmetros, quando associados às mudanças físicas e emocionais referentes ao amadurecimento, marcam o período de maior influência dos hábitos de consumo, os quais se podem complicar. Isto é, os comportamentos adoptados nesta faixa etária podem continuar até à idade adulta e podem vir a afectar questões como a saúde mental, o desenvolvimento de problemas a nível da saúde, como o uso de tabaco e álcool, alterações na alimentação e a nível da actividade física (WHO, 2012).

A adolescência é o período de tempo associado ao início da puberdade e ao aparecimento de características sexuais secundárias, estando o seu fim menos clarificado, uma vez que pode variar de cultura para cultura e, de indivíduo para indivíduo (WHO, 1986).

2. Determinantes Sociais de Saúde e Bem-Estar dos Jovens

A análise das determinantes sociais de saúde e bem-estar nos jovens é de elevada importância. Consiste na análise de um leque de factores externos como a saúde, a educação, a inserção social, a descoberta, ocupação e realização, determinantes que se irão reflectir na vida adulta.

A World Health Organization (WHO) publicou um relatório, em 2012, onde são nomeadas as determinantes sociais responsáveis por afectar a saúde e o bem-estar, nos jovens. Este relatório defende que existem mecanismos de protecção e de risco, que são oferecidos no contexto social onde os jovens se inserem. Estes mecanismos, que muitas vezes se demonstram desiguais, vão-se reflectir a nível da saúde, incluído a pobreza e a privação (WHO, 2012).

A família é o primeiro factor social nomeado por esta organização, como sendo um mecanismo de protecção. Esta defende que é fundamental que haja uma boa relação/comunicação entre os pais e o filho. O apoio familiar prepara os jovens na resposta a situações inesperadas, prevenindo-os para determinadas influências e/ou consequências negativas, levando-os a uma maior satisfação para com a vida e a um menor número de queixas físicas e psicológicas, comparativamente com os jovens onde o seio familiar não é o melhor. O apoio vindo dos pais, irmãos e colegas provoca, nos jovens, uma “saúde mais positiva”. Assim, sugere-se que os auxiliares de saúde analisem não só os problemas de saúde, mas também, a influência familiar no apoio e desenvolvimento de comportamentos impulsionadores da saúde.

O segundo factor social nomeado pela WHO foram as relações pessoais. É essencial que um jovem desenvolva relacionamentos, tanto a nível amoroso como de amizade, para que possa definir uma identidade, fortalecer habilidades sociais e a auto-estima e tornar-se autónomo. Os jovens que participam nas redes sociais aparentam um melhor estado de saúde e sensação de bem-estar apesar de, a estas, também se agregarem comportamentos de risco, como é o caso do consumo do álcool e do tabaco.

O ambiente escolar também pode ser um factor determinante no desenvolvimento da auto-estima, auto percepção, saúde e comportamento de um jovem. Os jovens que vêm a escola como sendo um apoio ao desenvolvimento intelectual, demonstram-se mais saudáveis, apresentam poucos problemas de saúde, mostram-se mais satisfeitos com a vida e, não se integram tão facilmente no grupo dos fumadores.

As escolas apresentam um papel muito importante, relativamente ao apoio e bem-estar, nos jovens, e nas suas reacções perante situações desafiantes.

A última determinante social de saúde e bem-estar nos jovens, anunciada pela WHO consiste na vizinhança e no meio em que se inserem. Os bairros que lidam com níveis de capital superior tendem a proporcionar melhores condições relativamente à saúde e bem-estar mental, existe uma maior promoção da saúde, em si, uma maior probabilidade da prática de desporto e uma incidência inferior nos comportamentos de risco. Estes dados podem indicar que existe uma proporcionalidade directa entre o capital social e o estado de saúde dos indivíduos (WHO, 2012).

A análise das determinantes sociais de saúde e de bem-estar nos jovens ajuda na compreensão e na percepção da importância do bom desenvolvimento do jovem, um tema muito debatido nos dias de hoje. Em resposta a muitos conflitos mentais, vêm associados comportamentos de risco, que se poderão manter até à idade adulta.

3. Comportamentos de Risco/Hábitos de Consumo

A expressão “comportamento de risco” pode definir a participação, do adolescente, em actividades que possam vir a comprometer a sua saúde, tanto a nível físico como mental. Muitas das experiências derivam da curiosidade do jovem ou do meio em que se encontram (grupo de amigos e família). Quanto mais tarde forem detectadas estas condutas, mais consolidadas serão e, conseqüentemente, mais afectados podem vir a ser os jovens, a nível individual, familiar e social (Feijó, et al., 2001).

Os riscos são vistos como acontecimentos ou condições que amplificam a tendência à adopção de comportamentos menos certos, num determinado grupo de pessoas (Linley, et al., 2004). Contudo, não é fácil a interligação entre os factores de risco e a saúde pois, cada caso é um caso, e os indivíduos reagem de maneira diferente perante cada situação e meio em que se inserem (Ribeiro, 2007).

O tabagismo, o consumo de álcool e de substâncias ilícitas, a utilização de métodos de emagrecimento perigosos, o início precoce da actividade sexual e a recorrência à agressão física são alguns dos comportamentos que podem pôr em risco a saúde individual dos jovens ou até levar à morte (Ribeiro, 2007), a curto e a longo prazo, pelo que têm vindo a ser objecto de estudo de alguns investigadores (Carter, et al., 2007).

Parte II – Substâncias em Amostras Biológicas

1. Introdução

As matrizes biológicas de eleição para a detecção de substâncias têm sido o sangue e a urina. Contudo, ambas têm limitações pelo que, matrizes menos convencionais, tais como o cabelo, pêlo e unhas, têm vindo a ser adoptados.

2. O Cabelo como Matriz Biológica

2.1. História da Análise

Foi em 1979 que a análise a cabelo se mostrou interessante para os investigadores, depois de Baumgartner ter conseguido extrair opiáceos, de humanos e de ratos, utilizando metanol e aquecimento da amostra (Baumgartner, et al., 1979). Contudo, já em 1858 tinha sido publicado, por Hoppe, o primeiro caso de utilização de cabelo humano, para determinação de arsénio pertencente a um corpo exumado há 11 anos, no “*Guia Prático de Medicina Legal*” (Casper, 1858). Os metais pesados foram dos primeiros compostos a serem detectados em cabelo, recorrendo-se à espectroscopia de absorção atómica (Balíková, 2005). Em 1954, Goldblum conseguiu determinar anfetaminas no cabelo pertencente a uma cobaia (Sachs, 1997).

Estudos realizados em poetas do século XIX e múmias sul-americanas evidenciaram a estabilidade de drogas a longo prazo, em cabelo, sugerindo a possibilidade e utilidade de armazenamento das amostras, preservação e transporte das mesmas (Marsh, et al., 1995).

Em 1980, foi publicado um artigo por Klug, “*Zur Morphinbestimmung in Kopfhaaren*”, onde foram descritas as condições utilizadas na análise de cabelo, para a detecção de morfina e codeína. Este autor optou por um tratamento diferente da amostra, tendo desintegrado completamente o cabelo com hidróxido de sódio; ou seja, o cabelo foi transferido para uma solução líquida e o extracto analisado como se fosse uma amostra de urina, recorrendo-se à cromatografia em camada fina usando um detector de fluorescência (Klug, 1980). Nesse mesmo ano, Valente interessou-se, também, pela detecção de morfina e de cocaína. Efectuou a comparação de métodos de extracção e fez diferentes tentativas de optimização do método, com o intuito de diminuir os limites de detecção, tendo comparado a utilização de meios aquosos

alcalinos e ácidos com metanol e solução tampão, resultados publicados em “*Hair as the sample in assessing morphine and cocaine addiction*” (Valente, et al., 1981).

Ainda em 1980, Wolfgang Arnold falou na detecção de morfina no cabelo, recorrendo a kits de RIA (radioimunoensaio), numa conferência em Heidelberg, onde apresentou casos fatais de consumidores de heroína e resultados de exames direccionados para os diferentes hábitos de consumo. Ao fim de vários testes a cabelos e de prestadas várias provas em tribunal, ainda que muito desacreditadas, comparações realizadas recorrendo-se a GC-MS (Cromatografia Gasosa associada a Espectrometria de Massa) vieram comprovar que, de facto, o investigador, era dotado de razão. Em 1985, na reunião anual de Hamburgo, foram apresentados os resultados da análise de cabelo de pacientes com consumo abusivo de codeína. Os resultados apresentaram concentrações elevadas de morfina, os quais o autor (Arnold) atribuiu, erroneamente, ao consumo abusivo de heroína. No entanto, as declarações de Arnold foram muito uteis para o desfecho de um inquérito policial. Este autor foi considerado um dos grandes responsáveis pela aceitação da análise à matriz em estudo, por parte da polícia. Este morreu a 1994, com 75 anos de idade, e diz-se que nos últimos 14 anos de vida lutou pela reputação da análise do cabelo, por parte dos peritos forenses (Sachs, 1997).

Em 1981, após uma extracção com uma solução de dodecilsulfato de sódio, foi detectado fenobarbital recorrendo a RIA e, em 1983, foram detectados barbitúricos e metaqualona (Sachs, 1997).

Foi em 1983, nos Estados Unidos da América, que um grupo de investigadores detectou, pela primeira vez, nicotina no cabelo de seres humanos (Ishiyama, et al., 1983). Este estudo tem-se propagado noutros países, ao longo do tempo. A quantidade de cigarros fumados tem vindo a ser comparada aos níveis de nicotina encontrados. Vários autores vêm afirmando que o eixo do cabelo pode ser visto como um “gravador”, podendo correlacionar o consumo individual de tabaco com os níveis de nicotina encontrados no cabelo (Mizuno, et al., 1993). Em 1985, foi descrita a utilização de acetona e banho de ultrassons para a detecção e quantificação de nicotina e cotinina através de RIA (Haley, et al., 1985). Em 1994, um estudo com vista à detecção de nicotina, ao longo de um ano, num grupo de 20 indivíduos (13 fumadores e 7 não-fumadores) recorrendo a GC-MS, evidenciou que poderia existir reprodutibilidade na análise e que seria possível a distinção entre fumador passivo e fumador activo (Zahlsen, et al., 1994). GC-MS, RIA e HPLC-ECD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Electroquímica) são exemplos de técnicas cujos resultados

foram o espelho das informações facultadas pelos indivíduos em estudo (Al-Delaimy, 2002).

Em 1989 adoptaram-se procedimentos baseados em princípios enzimáticos, a pH alcalino, prevenindo, assim a destruição de substâncias como opiáceos e benzoilecognina (Sachs, 1997).

No início da década de 90, Nakahara começou a extrair fármacos recorrendo a uma solução de metanol com ácido clorídrico, em banho de ultrassons, durante uma hora. Esta fracção foi analisada, por GC-MS, e foram detectadas metanfetaminas. Há ainda menção à utilização de um tampão na extracção com β -glucuronidase. Esta referência é importante de ser citada, uma vez que foi a grande impulsionadora de procedimentos de rastreio utilizados até ao presente. A extracção líquido-líquido, após hidrólise com ácido clorídrico, introduzida por Kintz, e a extracção de fármacos com metanol em que o extracto é analisado após derivatização, proposta por Kauert, são dois métodos que foram também estudados (Sachs, 1997).

Em 1992 realizaram-se alguns estudos usando fluidos supercríticos, dióxido de carbono e acetato de etilo e metanol como modificadores, na extracção de opiáceos, do cabelo (Sachs, 1997).

Em 1993 foi sugerido que o EtG (etilglucuronido) fosse utilizado como um marcador em cabelo, do consumo abusivo de álcool (Kijewski, 1997). Contudo, só por volta de 2003 e com a utilização de técnicas como GC-MS (Jurado, et al., 2004), LC/ESI-MS/MS (Cromatografia Líquida de ionização por electrospray associada a Espectrometria de Massa em tandem), GC-MS/NCI (Cromatografia Gasosa associada a Espectrometria de Massa com Ionização Química Negativa), LC-MS/MS (Cromatografia Líquida associada a Espectrometria de Massa em tandem) (Yegles, et al., 2004) e, mais recentemente por GC-MS/MS (Cromatografia Gasosa associada a Espectrometria de Massa) (Agius, et al., 2010), começaram a surgir mais estudos realizados a este potencial marcador para o consumo abusivo de álcool. Já em 2001, foi proposto por vários autores, que alguns ésteres etilílicos de ácidos gordos fossem utilizados como marcadores do consumo abusivo de álcool. Para tal, foram utilizadas amostras de cabelo de pessoas alcoólicas em tratamento de desintoxicação, de cadáveres cuja morte foi atribuída ao consumo abusivo de álcool, de consumidores assíduos e de abstémios de álcool. As amostras sofreram uma lavagem com n-heptano, inseridas em frascos com uma mistura de n-heptano e dimetilsulfóxido, evaporadas, extraídas por

HS-SPME (Microextração em fase sólida por *headspace*) e analisadas por GC-MS (Pragst, et al., 2001).

A partir de 1993 começaram a surgir publicações que debatiam os mecanismos de contaminação das amostras; procedimentos de lavagem, bem como o crescimento do cabelo e modo de incorporação das drogas na matriz foram igualmente questionadas (Sachs, 1997). Destes trabalhos concluiu-se que parte das drogas pode ser eliminada devido ao tratamento diário do cabelo e que o cabelo que se encontra muito contaminado não se consegue descontaminar. O mecanismo de incorporação das substâncias na matriz cabelo não está ainda completamente.

2.2. Anatomia do Cabelo

O cabelo, apesar da sua aparência uniforme é, na realidade, uma matriz muito complexa e, ainda pouco conhecida. Sabe-se que não é uma fibra homogénea, mas sim um conjunto de células queratinizadas e é constituído por dois domínios, o externo e o interno. O domínio externo é constituído pelas hastes capilares, que são estruturas cilíndricas constituídas por células bastante compactadas, que nascem a partir do domínio interno, que é constituído pelos folículos localizados a 3-5 mm abaixo da superfície da pele (Pragst, et al.,

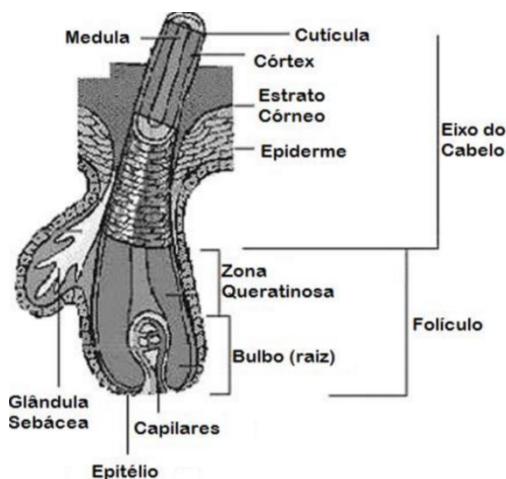


Figura 1 - Diagrama da estrutura do cabelo - adaptado de Boumba, Ziavrou, & Vougiouklakis, 2006

2006). Os folículos são pequenos órgãos com o formato de um saco, agregados ao epitélio da epiderme que estão associados com as glândulas sebáceas (Boumba, et al., 2006). Este é circundado por um sistema capilar rico, responsável por fornecer o material metabólico necessário para o bom crescimento do cabelo (Pragst, et al., 2006).

Cada fio de cabelo é composto por três camadas distintas, como ilustrado na Figura 1: cutícula externa, córtex central e medula interna (Pragst, et al., 2006). A cutícula é o estrato exterior e tem como principal função a protecção das fibras interiores de factores externos como a luz, calor, produtos químicos e acção mecânica (Boumba, et al., 2006) é, ainda, responsável pelo brilho (Pragst, et al., 2006). O córtex, por sua vez, é responsável pela elasticidade do fio de cabelo e pela sua coloração

(Pragst, et al., 2006). Esta segunda camada é constituída por células corticais, as queratinas e grânulos de pigmentos, ricos em melanina. As queratinas formam fibras longas que se ligam entre si através de ligações dissulfureto (-S-S-) e ligações cruzadas com proteínas. A melanina, por sua vez, é sintetizada em células especializadas, os melanócitos, que se localizam no bulbo. A cor adquirida pelo cabelo depende da quantidade, densidade e tipo de melanina produzida pelos melanócitos. Na camada central da haste do cabelo encontramos a medula. O tamanho desta camada varia consoante o diâmetro da fibra capilar de cada indivíduo. A haste do cabelo humano varia de 15-120 µm de diâmetro, dependendo do tipo e região do corpo em que o folículo está inserido (Boumba, et al., 2006).

O ciclo de crescimento do fio de cabelo é dos mais rápidos do ser humano (Pragst, et al., 2006). Este cresce acompanhado por um processo denominado queratinização. Os seus padrões de crescimento (padrão, cor, textura e diâmetro) são previsíveis, de acordo com as diferentes áreas do corpo que, por sua vez, dependem do sexo, da idade e da raça do indivíduo (Nakahara, 1999).

Ocorrem três fases no ciclo de crescimento do cabelo: anagénica, catagénica e telogénica.

Na fase anagénica ocorre um longo período de crescimento capilar (2-6 anos), no qual as células do bulbo sofrem múltiplas divisões. O fio de cabelo é formado à medida que estas células se multiplicam, diferenciam (em células da medula, córtex ou cutícula) e sofrem queratinização. É nesta fase que através da corrente sanguínea ocorre o transporte de nutrientes e, possivelmente, outras substâncias exteriores ao organismo, como vestígios de metais e medicamentos, entre outros. Estes componentes são incorporados no eixo do cabelo e, com o seu crescimento, são arrastados (Boumba, et al., 2006).

De seguida, o folículo piloso entra numa curta fase de transição – fase catagénica (2-3 semanas), onde a divisão celular e a queratinização são interrompidas (Boumba, et al., 2006).

Por fim, o folículo piloso entra num período de repouso – fase telogénica (10 semanas) – onde o eixo capilar cessa o crescimento por completo e a raiz liberta o folículo, facilitando a sua queda. Após este período, forma-se um novo fio nesse folículo. Estima-se que, num adulto, 80-90% dos fios de cabelo se encontrem na fase anagénica, 2% na fase catagénica e 10-18% na fase telogénica (Boumba, et al., 2006).

O cabelo cresce mais rápido do que os pêlos púbicos ou que as axilas (aproximadamente 0,3 mm por dia) que, por sua vez, crescem mais rápido que os pêlos da barba (aproximadamente 0,27 mm por dia). No entanto, todo o seu crescimento depende do tamanho com que o fio se encontra. Quando maior o cabelo, maior a sua fase de crescimento (Boumba, et al., 2006). Em média, a taxa de crescimento do folículo piloso, num homem, é de 0,44 mm por dia, enquanto, para uma mulher, é de 0,45 mm, contudo, a localização anatômica, raça, sexo e idade podem ser factores limitantes (Nakahara, 1999).

O cabelo humano é constituído por proteínas, água e lípidos, sendo as proteínas maioritárias, queratina principalmente, compostas por aminoácidos como a glicina, treonina, lisina e cisteína e por ácidos aspártico e glutâmico. Os lípidos originários das glândulas sebáceas são constituídos por ácidos gordos livres, mono-, di- e triglicéridos, ésteres de ácidos gordos, hidrocarbonetos e álcoois (Boumba, et al., 2006).

São já várias as substâncias químicas, entre elas cocaína (Toledo, et al., 2003) e canabinóides (Musshoff, et al., 2003) que foram detectadas em cabelo humano, resultado do consumo individual e conseqüente incorporação no eixo do cabelo e seu crescimento.

2.3. Incorporação de drogas

A exposição humana aos fármacos pode ocorrer das mais variadas formas, desde a auto-administração, inalação passiva ou através da exposição *in útero*.

A quantificação da distribuição fisiológica das drogas, no organismo humano, depende das matrizes analisadas. Isto é, após entrar no sistema circulatório através de absorção ou administração intravenosa, o fármaco dispõe-se à distribuição por todos os órgãos e tecidos e esta distribuição é mediada pelo fluxo sanguíneo. Cada substância apresenta propriedades biológicas, químicas e físicas específicas, tais como a volatilidade, lipofilicidade, pKa, extensão da ligação a proteínas plasmáticas, tamanho e estrutura molecular. Estas propriedades associadas a outros factores, como a via de administração das substâncias, seus processos metabólicos e frequência e duração da exposição, vão, certamente, influenciar os teores da droga no organismo (Oliveira, et al., 2007).

Durante a fase de distribuição, a droga atinge várias matrizes corporais, tais como a saliva, urina, suor, pele, unhas e cabelos. A permanência dos fármacos no

cabelo e nas unhas tem-se demonstrado irreversível, permanecendo nestas matrizes de forma definitiva. A sua eliminação, dá-se apenas devido ao crescimento contínuo destas estruturas (Oliveira, et al., 2007).

Pensa-se que estas substâncias se agregam ao cabelo a partir do plasma sanguíneo e/ou do suor ou, exogenamente, através do contacto com fumo ou póis/poeiras presentes no meio ambiente (Nakahara, 1999). Isto é, exintindo alguma droga ou seus metabolitos no plasma sanguíneo, estes irão ser incorporados na estrutura do cabelo na fase anagénica, durante o período de queratinização, onde permanecem até à queda do cabelo (Marsh, et al., 1995). Estas substâncias também são incorporadas no interior do cabelo por difusão do suor ou do sebo. As glândulas sudoríparas contactam a haste da matriz podendo contribuir para a incorporação de drogas hidrofílicas (Pragst, et al., 2006). Existem, ainda, outros factores capazes de controlar a quantidade de droga que se liga à proteína do cabelo como a afinidade à melanina, a lipofilicidade, hidrofobicidade e basicidade da droga (Srogi, 2006).

Quando se pretende utilizar o cabelo como matriz de análise deve ponderar-se a possibilidade de contaminação da amostra a partir da atmosfera, poeira, sujidade e ainda preparações cosméticas e/ou farmacêuticas. Deve ainda ter-se em conta que a concentração dos compostos depende da localização geográfica do cabelo, raça, sexo, idade e alimentação do indivíduo (Srogi, 2006).

2.4. Interesse Forense

Durante a última década, o interesse pelo estudo das matrizes biológicas aumentou consideravelmente no que diz respeito à detecção de drogas de abuso (Oliveira, et al., 2007).

Actualmente, o cabelo é reconhecido como a terceira amostra de eleição, relativamente à detecção da droga, metabolito activo, seguindo-se a urina e o sangue. Esta matriz biológica apresenta vantagens sobre as outras: é uma matriz não-invasiva, de fácil recolha, não é de fácil adulteração e pode ser armazenada e transportada à temperatura ambiente, devido à sua estabilidade. A principal vantagem da prática de análises recorrendo-se ao cabelo recai no intervalo de detecção das drogas. O cabelo permite traçar um perfil de consumo cronológico, dependendo do comprimento do cabelo e do seu tempo de vida no indivíduo (Cooper, et al., 2012). Esta comparação pode variar entre semanas e meses quando, em contrapartida, as análises à urina apenas

detectam o consumo de substâncias até três dias, no máximo. Ou seja, através do cabelo é possível detectar se o indivíduo é um consumidor crónico, enquanto na urina não é possível determinar nem o consumo crónico nem a exposição única (Oliveira, et al., 2007).

A possibilidade da realização de testes recorrendo ao cabelo, como uma matriz alternativa ou complementar, permitiu ampliar o leque de investigações toxicológicas e, conseqüentemente, a recolha desta amostra durante as investigações forenses, como é o caso das mortes relacionadas com o consumo de drogas e crimes facilitados devido ao consumo de drogas e também, na protecção de crianças, no controlo do abuso de drogas em programas de desintoxicação e, no local de trabalho, (Cooper, et al., 2012) no controlo de doping, toxicologia *post-mortem* e determinação da exposição a xenobióticos durante a gestação (Gordo, 2013).

Nas mortes relacionadas com o consumo de drogas, a análise às substâncias existentes no sangue *post-mortem* fornece, apenas, informações quanto ao consumo de drogas no momento anterior à morte do indivíduo. Por sua vez, a análise ao cabelo, fornece informação relativa ao antecedente histórico, uso de drogas nos meses anteriores ao óbito, o que permite estabelecer o papel das substâncias na morte do sujeito. Caso se detecte abstinência, nas semanas ou meses anteriores ao óbito, prova-se que a morte derivou da intolerância aos fármacos ingeridos. Também se podem recolher e analisar apenas as raízes do cabelo. Estas fornecem informações importantes no respeitante a intoxicações agudas, sendo amostras cruciais nos casos de decomposição avançada (Cooper, et al., 2012).

No caso dos crimes facilitados devido ao consumo de drogas, como violações e roubos, as substâncias mais detectadas são medicamentos, os quais podem provocar sedação e amnésia anterógrada (dificuldades em lembrar os eventos ocorridos durante o efeito das drogas, mas não do passado em geral), como é o exemplo das benzodiazepinas, hipnóticos, neurolépticos e anti-histamínicos (Wells, 2001). As vítimas que são submetidas a actos não-voluntários poderão não denunciar o crime mesmo havendo passado muitos dias, comprometendo assim os resultados das análises ao sangue e à urina. O cabelo pode mostrar-se útil na detecção e identificação da(s) droga(s), mesmo que meses depois. No entanto, esta detecção ainda se demonstra um desafio para os investigadores, devido às quantidades existentes nas matrizes biológicas. São necessárias técnicas sensíveis para a análise e detecção de baixos níveis de fármacos (Cooper, et al., 2012).

A análise da matriz cabelo pode ser também útil em casos de protecção de crianças e/ou disputa pela custódia pelos filhos. Os resultados analíticos podem indicar a exposição a drogas de abuso, medicamentos ou álcool pelas mães, por exemplo, durante a gravidez. As substâncias ingeridas pelas mães são, também, transferidas para o leite materno, expondo as crianças no período de amamentação. Quando as crianças começam a gatinhar e a andar, caso as superfícies estejam contaminadas, os fármacos poderão ser transferidos através das mãos, as quais são facilmente levadas à boca. Uma outra potencial fonte de transmissão de substâncias é a atmosfera poluída devida ao fumo de algum familiar próximo (Cooper, et al., 2012).

A Society of Hair Testing publicou algumas recomendações no que diz respeito à análise de cabelo em investigações forenses. Estas incluem o registo e procedimentos de amostragem, descontaminação, digestão e extracção dos compostos do cabelo, e a detecção e análise recorrendo à espectrometria de massa (Cooper, et al., 2012).

A colheita da amostra deve ser realizada por uma autoridade responsável, sendo que os princípios éticos e legais não podem ser desrespeitados (Balíková, 2005). No processo de recolha do cabelo, deve ter-se em conta a localização anatómica, havendo vários autores que defendem que os cabelos devem ser recolhidos a partir do vértice posterior do couro cabeludo, zona onde o crescimento dos fios é mais uniforme (Nakahara, 1999). Deve recolher-se a matriz a uma distância uniforme do couro cabeludo e esta deve ser suficiente para o número de ensaios que se pretende realizar, devendo as amostras ser identificadas correctamente, evitando-se a contaminação. Normalmente utilizam-se entre 10-100 mg de cabelo, por análise (Oliveira, et al., 2007). Durante a recolha da matriz deve ter-se em atenção a orientação do cabelo, nomeadamente a extremidade da raiz deve ser distinguida da ponta. Deve, ainda, registar-se o peso da amostra, o seu comprimento, cor, eventual tratamento químico ao qual foi submetido e localização anatómica da recolha (Balíková, 2005). Todo o procedimento de amostragem deve ser bem organizado e documentado, desde a colheita até à interpretação de resultados, garantindo, assim, a cadeia de custódia da prova.

A análise a drogas de abuso recorrendo ao cabelo tem vindo a ser usada por laboratórios de toxicologia forense. Até à data, foram reportadas várias drogas ilícitas, fármacos e metabolitos do consumo de álcool (Pragst, et al., 2006).

Aquando da impossibilidade de recolha de cabelo da cabeça é possível a recolha de outros tipos de cabelo, como pêlos púbicos, pêlos do braço ou axilas.

2.4.1. Consumo de Substâncias Lícitas

As substâncias lícitas são substâncias cuja produção e consumo são permitidos por lei, ou seja, não constam em Decreto-Lei.

O álcool, o tabaco e o café são exemplos de substâncias lícitas que, no dia-a-dia, são consumidas por um elevado número de indivíduos e, com grande incidência, pelos jovens. Contudo, o seu consumo excessivo poderá resultar em problemas que têm vindo a alertar a sociedade.

O consumo de café não será abordado nesta dissertação.

O regime jurídico aplicado ao tráfico e consumo de substâncias psicotrópicas e estupefacientes (substâncias ilícitas) encontra-se aprovado no Decreto-Lei nº 15/93, de 22 de Janeiro, parte integrante do Código Penal Português.

Álcool

Quando nos referimos ao “Álcool” referimo-nos ao consumo de bebidas contendo etanol (álcool etílico). Consumido por um elevado número de pessoas, na maioria dos países.

O Etanol tem a fórmula química $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, demonstrando possuir dois átomos de carbono, seis átomos de hidrogénio e um de oxigénio, como representado na Figura 2. É uma molécula pequena, sendo uma substância hidrossolúvel, a qual é absorvida rapidamente no trato gastrointestinal (Katzung, 2007). Apresenta-se como uma substância líquida, incolor, produzida a partir da fermentação de hidratos de carbono, como os açúcares encontrados em bagas e uvas, e o amido, ou sinteticamente, a partir de processos industriais (Myers, et al., 2011). É uma substância bastante comum, principalmente no mundo dos jovens, e a sua ingestão deriva de hábitos de consumo dos adultos ou de comportamentos sociais, funcionando como intensificador de relações (WHO, 2012).

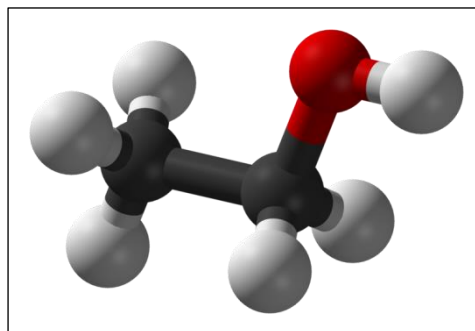


Figura 2 - Molécula do Etanol (Rodrigues, 2012)

Esta droga actua como um desinibidor de certos comportamentos e emoções e como depressor de muitas funções do Sistema Nervoso Central (SNC), como é o caso das capacidades motoras, raciocínio, julgamento, percepção e memória. É um composto irritante e tóxico para os tecidos e órgãos do corpo, incluindo o esófago, estômago, fígado e pâncreas. Quando consumido em elevadas doses pode deprimir as funções vitais do corpo, como a respiração, podendo levar à morte (Myers, et al., 2011).

O Etanol é das drogas de abuso mais consumidas nos dias de hoje devido ao seu consumo ser legal. A sua ingestão é um dos principais comportamentos de risco e está envolvido em inúmeros problemas de saúde, incluindo o desenvolvimento cerebral durante a infância (WHO, 2012).

Devido ao consumo abusivo de bebidas alcoólicas, a nível mundial, vários cientistas têm vindo a focalizar os seus estudos neste produto, tentando encontrar potenciais marcadores do consumo. A maior parte destes estudos foca-se em matrizes como o sangue e a urina, no entanto, já existem alguns estudos realizados no cabelo.

Para a detecção de consumo crónico de álcool têm sido estabelecidas algumas técnicas de baixo custo, como a análise do volume corpuscular médio das hemácias (VCM), a determinação da glicoproteína GAMA-glutamyl-transpeptidase (GGT) e da transferrina deficiente em hidratos de carbono (CDT) (Pragst, et al., 2006).

Alguns autores defendem que, apesar do etanol ser uma substância volátil, é de possível detecção, no cabelo. E afirmam, ainda, ser possível a diferenciação de consumidores crónicos dos pontuais (Pragst, et al., 2006).

Recentemente um grupo de investigadores definiu o etilglucuronido e alguns ésteres etílicos de ácidos gordos como sendo biomarcadores específicos do consumo de etanol (Wada, et al., 2010).

O etilglucuronido (EtG) é um composto não volátil, solúvel em água (Jurado, et al., 2004), e um metabolito formado na fase II do etanol, no fígado, principalmente (Pragst, et al., 2006), apesar de poder ser detectado em vários tecidos e fluidos corporais por um longo período de tempo após a eliminação completa do álcool, do organismo (Alt, et al., 2000). Foi detectado pela primeira vez por Sachs (Jurado, et al., 2004), em 1993 e, um ano mais tarde por Aderjan *et al.* (Aderjan, et al., 1994) e Skopp *et al.* (Skopp, et al., 2000). Foi, ainda, detectado em amostras recolhidas *post-mortem*, de cabelos de alcoólicos (Alt, et al., 2000). Uma percentagem de 0,02 a 0,06% do álcool ingerido é eliminado sob a forma de EtG (Pragst, et al., 2006).

Os ésteres etílicos de ácidos gordos (FAEE) formam-se na presença de etanol, a partir de ácidos gordos livres, triglicéridos, lipoproteínas ou fosfolípidos. Isto é, são metabolitos secundários da presença de etanol. Estes compostos são formados por acção de enzimas específicas e não específicas, presentes no fígado, pâncreas, coração, tecido adiposo, cérebro e nos leucócitos. Até à data, mais de 20 FAEEs, saturados e insaturados, lineares e ramificados, foram identificados na matriz cabelo (Pragst, 2007). Contudo, os compostos escolhidos como marcadores de consumo de álcool são apenas o miristato (E14), o palmitato (E16), o oleato (E18:1) e o estearato de etilo (E18). A soma da concentração destes quatro ésteres tem sido utilizada para quantificação no cabelo e na superfície da pele (Oliveira, et al., 2007). Alguns autores efectuaram a detecção de FAEEs, recorrendo à técnica analítica de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) combinada com GC-MS, usando como padrões internos os mesmos compostos deuterados (Pragst, et al., 2001).

Nicotina

O tabaco é a principal causa de morte evitável no mundo (WHO, 2012).

Normalmente o acto de começar a fumar estabelece-se durante a adolescência e, quando este se adquire na idade adulta, o primeiro cigarro foi fumado ainda na juventude. Após o início do consumo de tabaco, independentemente do número de cigarros ou da duração do consumo, é estabelecida uma ligação de dependência de nicotina e esta é mais rápida nos jovens do que nos adultos (WHO, 2012).

Apesar de já haverem estudos reveladores dos malefícios para a saúde do uso do tabaco, existem, ainda, muitos adolescentes que o continuam a consumir. Talvez por verem o acto de fumar como um comportamento adulto e quererem ser reconhecidos como tal. Muitos factores familiares, como o divórcio, a separação, conflitos no seio familiar e o tabagismo por parte dos pais, podem ser desencadeantes do uso do tabaco. Por sua vez, relações positivas com os pais podem prevenir o tabagismo na adolescência, contudo, as relações de amizade podem vir a incentivar este consumo (WHO, 2012).

Os efeitos negativos que o fumo do tabaco confere à saúde pública estão cada vez mais a ser explorados e documentados. Os compostos presentes no fumo do tabaco prejudicam tanto os fumadores passivos, como os activos (Chetiyankornkul, et al., 2004).

A nicotina é um composto orgânico, incolor e oleoso. É um alcalóide líquido à temperatura ambiente, e tem a fórmula química $C_{10}H_{14}N_2$, cuja estrutura podemos observar na Figura 3. É uma amina composta por dois anéis, uma piridina e uma pirrolidina. Quando exposto ao ar ou à luz adquire um tom acastanhado e o odor característico do tabaco (Yildiz, 2004). O composto encontra-se em mais de 60 espécies vegetais da família das Solanáceas (Gorrod, et al., 1999), principalmente na *Nicotiana tabacum* – cujas folhas têm utilidade no fabrico de cigarros e charutos (Oliveira, et al., 2011).

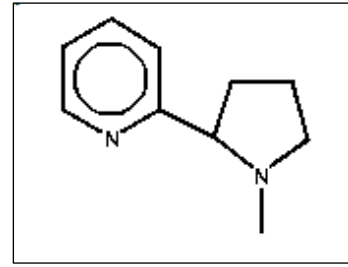


Figura 3 - Estrutura química da Nicotina

A nicotina e a cotinina (Figura 4), um metabolito derivado da C-oxidação da nicotina através da enzima citocromo P450 – cerca de 80% da nicotina ingerida é metabolizada em cotinina (Al-Delaimy, 2002) –, têm sido compostos bastante utilizados como biomarcadores, na determinação da ingestão e da exposição ao fumo do tabaco, durante um longo período de tempo (Pichini, et al., 1997). Já foram encontradas em amostras biológicas como é o caso da urina, sangue, saliva e cabelo. Na urina, a análise à cotinina tem-se demonstrado um marcador mais fiável que a nicotina, devido ao seu tempo de vida ser superior à nicotina – 2h (Chetiyanukornkul, et al., 2004).

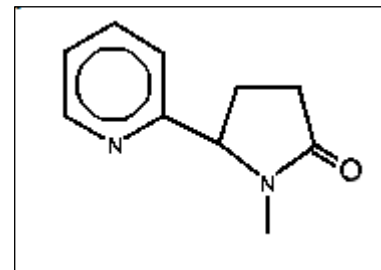


Figura 4 - Estrutura química da Cotinina

Os constituintes do fumo dos cigarros entram no organismo por inalação e são rapidamente absorvidos pela circulação sistémica. O facto de a nicotina ser um composto lipossolúvel confere-lhe um grande volume de distribuição no corpo (2-3L/kg) e a penetração nas membranas celulares (Al-Delaimy, 2002).

Existem autores que dizem que a cotinina pode ser detectada no cabelo, mas, no entanto, é detectada em menores concentrações, comparativamente com a nicotina, cerca de 10 vezes menos. Apesar das concentrações de cotinina no plasma serem superiores às de nicotina, no cabelo (Al-Delaimy, 2002). A determinação de biomarcadores biológicos para a inalação de cigarros, no cabelo, poderá vir a fornecer uma datação cronológica do consumo e exposição ao fumo do tabaco pois, cada centímetro representa, aproximadamente, um mês de exposição (Chetiyanukornkul, et

al., 2004). Além disso, as amostras de cabelo são largamente mais estáveis que qualquer outra amostra biológica, e podem ser facilmente recolhidas (Pichini, et al., 1997).

Até à data têm sido anunciadas várias técnicas de detecção de nicotina e cotinina em amostras de cabelo. A cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC-MS) ou de azoto e fósforo, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por luz ultravioleta (UV) ou electroquímicos, e os radioimunoensaios (RIA) são métodos que têm sido explorados na análise destes compostos. Os RIA têm-se demonstrado pouco específicos na análise de cotinina devido à interacção dos anticorpos anti-cotinina com outros metabolitos da nicotina. A MS é a técnica que apresenta maior precisão, de todas. É uma técnica relativamente rápida e permite a utilização de analitos deuterados como padrões internos (Chetiyankornkul, et al., 2004).

CAPÍTULO 3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1. Introdução

O principal objectivo desta dissertação de Mestrado consistiu na melhoria das metodologias analíticas usadas com a matriz cabelo, com vista à sua utilização como amostra forense para a detecção do consumo de drogas lícitas ou ilícitas. Para tal, foi necessário testar as metodologias analíticas já descritas na literatura, tendo-se optimizado o procedimento de lavagem da matriz, o (melhor) solvente, temperatura e tempo de extracção. Relativamente ao método cromatográfico, cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC-MS), foram estabelecidos os melhores parâmetros de análise.

Posteriormente, ficou evidente a necessidade de se estabelecer um perfil metabólico do cabelo, tendo em conta a idade e o género do indivíduo em estudo, o qual se mostrou fundamental para a determinação da presença de metabolitos (biológicos) indicadores de hábitos de consumo.

Todos os cabelos analisados foram recolhidos de indivíduos que se voluntariaram para a realização deste estudo. Porém, o comprimento total do cabelo e o comprimento da amostra cedida não foram tidos em conta, uma vez que o estudo não residia na determinação temporal do consumo das substâncias nem na quantidade ingerida.

2. Recolha e preparação da amostra

2.1. Cabelo

As amostras de cabelo foram cedidas por jovens com idades compreendidas entre os 14 e os 24 anos de idade. As dezasseis (16) amostras pertencentes a adolescentes entre os 14 e os 18 anos de idade, foram facultadas por um grupo de escuteiros da Amadora. O número total de sujeitos foi limitado pelas características inerentes à disponibilidade de voluntários, condicionadas ao universo de contacto directo.

A Tabela 1 referencia as características das amostras utilizadas no estudo.

Análise exploratória das potencialidades forenses do cabelo, com aplicação de técnicas de GC-MS.

Tabela 1 - Identificação das amostras analisadas (sexo, idade e quantidade de amostra). F – sexo feminino; M – sexo masculino.

Amostra	Sexo	Idade	Quantidade de amostra (mg)
1	F	14	20
2	F	14	13
3	F	15	19,9
4	M	15	20,5
5	M	15	17,7
6	F	15	16,2
7	F	15	19,9
8	M	15	20,8
9	F	16	20,7
10	M	16	20,3
11	F	16	20
12	M	17	20,5
13	F	17	20
14	M	17	20,3
15	M	17	20,3
16	F	18	20,6
17	F	19	19,8
18	F	19	20,4
19	F	20	7,5
20	M	20	12,2
21	M	20	9,4
22	M	20	20,1
23	M	20	20
24	F	21	21
25	F	21	18,7
26	M	21	20,9
27	F	21	20,6
28	F	21	21
29	F	22	20
30	F	22	20,1
31	M	22	20,1
32	M	22	17,9
33	F	22	17,2
34	F	23	20
35	F	23	20,1
36	F	23	19,9
37	F	23	20,2
38	M	24	20
39	F	24	11,1
40	F	24	8,8
41	F	24	4,8
42	F	24	6,6

2.2. Recolha e armazenamento da amostra

Como já foi mencionado, todas as amostras foram cedidas por jovens que se voluntariaram para a realização desta investigação.

Para a recolha dos cabelos, utilizou-se uma tesoura limpa e os cabelos foram armazenados em envelopes de papel até à sua análise.

O cabelo foi recolhido da parte posterior da cabeça. A parte posterior da cabeça é considerada a área que apresenta um padrão de crescimento mais uniforme (Al-Delaimy, 2002).

O comprimento total do cabelo dos indivíduos e o comprimento do cabelo utilizado como amostra não foram tidos em conta, uma vez que o objectivo deste estudo não foca a determinação específica.

2.3. Lavagem da amostra

O cabelo foi utilizado em secções entre 0,5 – 2 cm.

Após pesagem das amostras, estas foram submetidas a um processo de lavagem.

Utilizou-se uma solução de 5 mL de “extran” (Sodosil – Sigma), uma solução de lavagem alcalina, durante 5 minutos. Esta solução foi, então, retirada e completamente removida através da lavagem repetida com água destilada. De seguida utilizaram-se 5 mL de Hexano (durante 5 minutos).

O solvente foi removido e as amostras secas à temperatura ambiente.

2.4. Extracção dos compostos

Para a extracção dos compostos, adicionou-se 1mL de éter dietílico às amostras colocadas em vials de derivatização, os quais foram fechados com tampa de rosca e septo com película de PTFE (Politetrafluoretileno). Foi utilizado banho de ultra-sons, durante 1 hora.

2.5. Derivatização do extracto

Após a extracção, a fracção etérea foi transferida para um outro vial de derivatização. O solvente foi evaporado sob corrente de azoto e posteriormente adicionaram-se 500 μL de uma solução etérea de diazometano (CH_2N_2).

Após eliminação do excesso de diazometano (sob corrente de azoto), analisaram-se 0,02 μL de amostra.

2.6. Instrumentação e condições cromatográficas

2.6.1. Análise por GC-MS

As análises foram efectuadas por GC-MS (Agilent Technologies). Os compostos foram separados numa coluna SLB-5MS (60 mx 0,25 mmx 0,25 μm d_f) da Supelco. O gás de arraste foi o hélio, a fluxo constante de 1mL/min. A temperatura do injector foi mantida a 280°C. O programa de temperatura do forno iniciou a 35°C, permaneceu 5 minutos, tendo aumentado gradualmente a 4°C por minuto, até à temperatura final de 270°C.

Utilizou-se o modo de injeção splitless (2 minutos) com posterior abertura de válvula com razão de split de 1/20.

Usou-se o modo de impacto electrónico positivo de +350 V. A interface foi mantida a 280°C e a fonte iónica do espectrómetro de massa a 150 °C. O varrimento de massas usado foi de 40 a 460 amu (unidade de massa atómica). O modo de aquisição foi o *full scan*.

3. Reagentes

3.1. Solventes e Padrões utilizados

Os solventes e padrões utilizados foram obtidos através de diferentes entidades.

O éter dietílico e o etanol foram obtidos da Panreac, ambos com grau GC (99,5%). O hexano, o 2-propanol e o diclorometano foram obtidos da Sigma-Aldrich com graus de pureza diferentes – o hexano grau HPLC ($\geq 97,0\%$), o 2-propanol e o diclorometano grau GC (99,8% e $\geq 99,9\%$ de pureza, respectivamente). O metanol e o HCl são provenientes da Fluka, o metanol grau GC (99,8%) e o HCl $\geq 37,0\%$, “trace analysis”. Por sua vez, o NaOH grau PA ($\geq 98\%$) e foi obtido da Pronalab.

Os padrões cotinina, ácido tetradecanóico (ác. Mirístico; C₁₄) e ácido heptadecanóico (ác. Margárico; C₁₇) foram obtidos da Alfa Aesar. O padrão do ácido hexanóico (ác. Caproico; C₆) foi obtido da Fluka. Por sua vez, os ácidos undecanóico (ác. Undecílico; C₁₁), *cis*-9-hexadecenóico (ác. Palmitoleico; *cis*- Δ^9 -C₁₆), *cis,cis*-9,12-octadecadienóico (ác. Linoleico; *cis,cis*- Δ^9,Δ^{12} -C₁₈) e o *cis*-9-octadecenóico (ác. Oleico; *cis*- Δ^9 -C₁₈) da TCI. Enquanto os ácidos heptanóico (ác. Enântico; C₇), octanóico (ác. Caprílico; C₈), nonanóico (ác. Pelargónico; C₉), decanóico (ác. Cáprio; C₁₀), dodecanóico (ác. Láurico; C₁₂), tridecanóico (ác. tridecílico; C₁₃), pentadecanóico (ác. Pentadecílico; C₁₅), hexadecanóico (ác. Palmítico; C₁₆) e o octadecanóico (ác. Esteárico; C₁₈), a nicotina e o 2,4-pentanodiol foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Os padrões foram sujeitos às mesmas condições de análise das amostras.

3.2. Preparação das soluções padrão

Todas as soluções padrão foram preparadas em éter dietílico, metanol, etanol ou álcool isopropílico, na mesma concentração – 1 mg de padrão em 1 mL de solvente.

3.2.1. Síntese dos ésteres metílicos

Pesou-se 1 mg dos ácidos C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, *cis*- Δ^9 -C₁₆, C₁₆, C₁₇, *cis,cis*- Δ^9,Δ^{12} -C₁₈, *cis*- Δ^9 -C₁₈, e C₁₈ para vials de fundo cônico. Adicionou-se a cada vial uma solução etérea de diazometano (Furniss, et al., 1989). A solução de diazometano foi adicionada ao padrão até que a solução permanecesse com uma cor amarelada (característica da presença de diazometano). Posteriormente utilizou-se a corrente de azoto para evaporar o excesso de diazometano e simultaneamente concentrar a amostra. A Figura 5 ilustra o esquema reaccional da metilação do ácido capróico com diazometano, a metil-caproato.

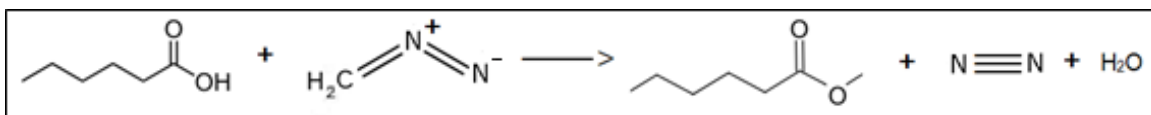


Figura 5 - Esquema reaccional da metilação do ácido capróico utilizando diazometano.

3.2.2. Síntese dos ésteres etílicos

Foi pesado 1 mg de cada ácido: C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, *cis*- Δ^9 -C₁₆, C₁₆, C₁₇, *cis,cis*- Δ^9,Δ^{12} -C₁₈, *cis*- Δ^9 -C₁₈, e C₁₈, e colocados em balões de fundo redondo, onde foi adicionado 1mL de etanol por cada mg de ácido, 1 gota de ácido sulfúrico e reguladores de ebulição. Os balões foram submetidos a aquecimento por refluxo durante 1,5h, procedendo-se à reacção de esterificação de Fisher. De seguida, as amostras foram transferidas para vials e foram extraídas 3 vezes com 1mL de éter dietílico. A fracção etérea foi, então, transferida para outro vial onde foi adicionado sulfato de sódio anidro. Após a eliminação da água, a amostra foi analisada por GC-MS. A Figura 6 ilustra o esquema reaccional da etilação do ácido palmítico a etil-palmitato.

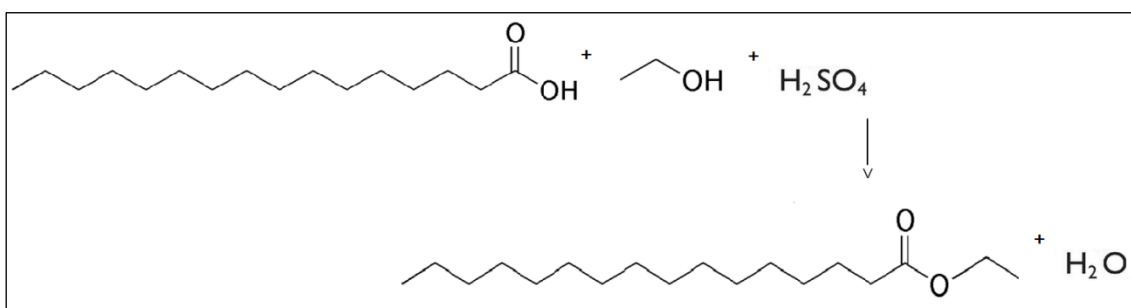


Figura 6 - Esquema reaccional da etilação do ácido palmítico utilizando etanol.

3.2.3. Síntese dos ésteres isopropílicos

Colocou-se aproximadamente 1 mg dos ácidos C₁₂, C₁₄ e C₁₆ em balões de fundo redondo e adicionou-se-lhes 1mL de álcool isopropílico e uma gota de ácido sulfúrico. Os balões foram submetidos a aquecimento por refluxo durante 1,5h, efectuando-se a reacção de esterificação de Fisher, à temperatura de ebulição do solvente. De seguida, as amostras foram transferidas para vials e extraídas 3 vezes com 1mL de éter dietílico. A fracção etérea foi, então, transferida para outros vials onde foi adicionado sulfato de sódio anidro. Após decantação da solução, a amostra foi analisada por GC-MS. A Figura 7 descreve o esquema reaccional da síntese do ácido mirístico a miristato de isopropilo, utilizando o isopropanol.

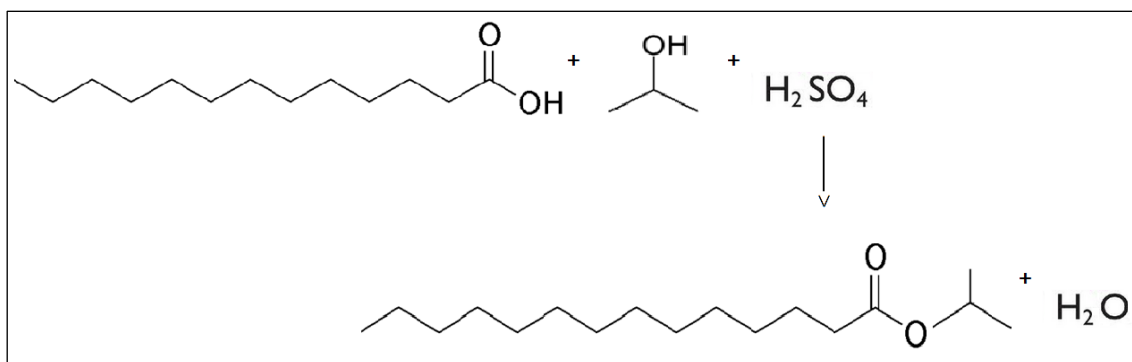


Figura 7 - Esquema reaccional da síntese do ácido mirístico a miristato de isopropilo.

3.2.4. Síntese da 4-hidroxi-2-pentanona

Num erlenmyer de 5mL adicionaram-se 0,204g de dicromato de potássio juntamente com 600 μ L de água. De seguida acrescentaram-se 200 μ L de ácido sulfúrico e mais 600 μ L de água e a solução foi colocada num banho de gelo.

Num vial diluíram-se 0,666g de 2,4-pentanodiol em 400 μ L de éter dietílico.

Juntaram-se as soluções e, durante 5 minutos, foram misturadas com o auxílio do vortéx.

À solução obtida acrescentaram-se 3mL de éter dietílico e 3mL de água.

Realizaram-se duas extracções com 1mL de éter dietílico e lavou-se a fracção etérea, duas vezes com 1mL de uma solução de 5% de bicarbonato de sódio. De seguida, usando um funil de Hirsh filtrou-se e concentrou-se a amostra recorrendo-se a corrente de azoto. A mistura final tem composição decorrente na Figura 8. Esta ilustra a síntese de 2,4-pentanodiol a 4-hidroxi-2-pentanona, recorrendo-se ao dicromato de potássio como agente oxidante. Cada um dos componentes foi identificado pelo seu espectro de massa e os correspondentes tempos de retenção (RT), consoante os parâmetros apresentados na Tabela 2, referências utilizadas na análise das amostras.

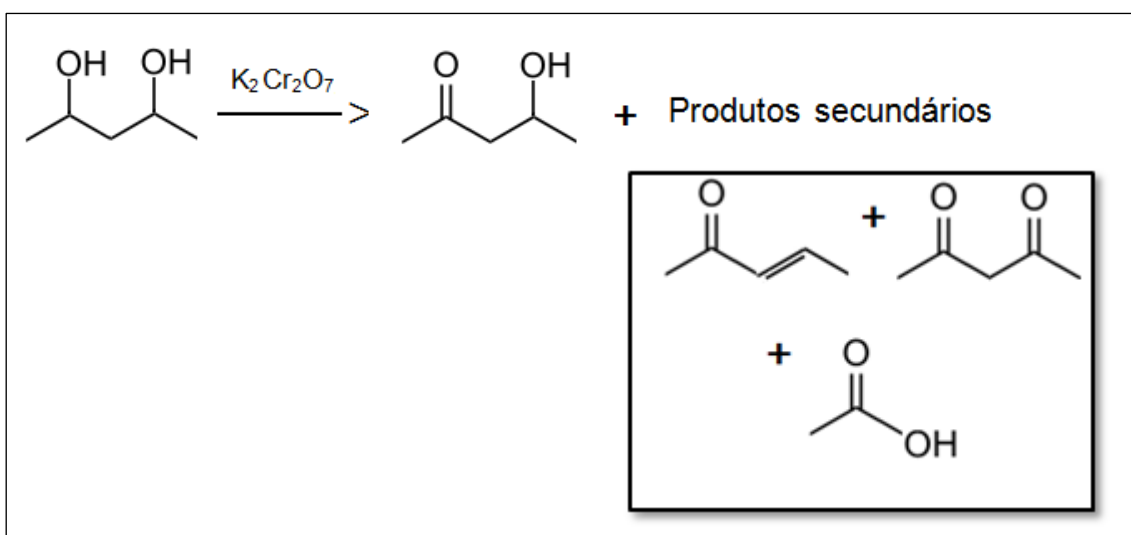


Figura 8 – Esquema reaccional da síntese de 4-hidroxi-2-pentanona

Tabela 2 – Tempos de retenção (RT) dos compostos detectados na mistura sintética da 4-hidroxi-2-pentanona, e iões dominantes no seu espectro de massa, obtido por GC-MS.

Composto	RT (minuto, segundo)	Iões (m/z)
Ácido acético	7'86"	<u>43</u> , M^+ - 60, 45
3-penten-2-ona	12'12"	<u>69</u> , M^+ - 84, 39, 41, 43
2,4-Pentanediona	13'93"	<u>43</u> , M^+ - 100, 85
4-hidroxi-2-pentanona	15'62"	<u>43</u> , M^+ - 102, 58, 69, 84

4. Desenvolvimento de método

O desenvolvimento de um método analítico implica experimentar diferentes procedimentos a fim de obter os melhores resultados no respeitante à reprodutibilidade e à técnica, fazendo uso do menor número de passos experimentais, os quais garantem a identificação e análise dos compostos alvo, ou seja, os compostos representativos.

Para tal utilizaram-se porções da mesma amostra, as quais foram inicialmente lavadas e posteriormente extraídas de diferentes modos.

4.1. Lavagem

A revisão da literatura mostrou que, de um modo geral, o procedimento de lavagem é composto por 3 passos. O procedimento de lavagem pode-se iniciar com solução de dodecil sulfato de sódio, seguido de água destilada e terminar com acetona (Pragst, et al., 2006); outros autores descreveram que o procedimento se pode iniciar com solução de Extran (Nakahara, 1995). No geral, todos mencionam um detergente para iniciar a descontaminação da amostra, seguido da passagem por água destilada e, por fim, um solvente orgânico.

Neste trabalho o procedimento de lavagem foi otimizado para: amostra (20 mg) colocada em contacto com 5 mL de Extran durante 5 min, seguido de passagem por água destilada (5 mL) e finalmente com 5 mL de hexano (no anexo 1. encontram-se os cromatogramas obtidos durante o procedimento de lavagem).

4.2. Extração

A extração de substâncias a partir do cabelo é um passo sensível. Os compostos alvo encontram-se infiltrados na estrutura do cabelo, ligados às proteínas, à melanina, e lípidos presentes no complexo da membrana celular (Pragst, 2004).

Apesar de estarem descritas várias metodologias de extração, não existe uma de eleição. Isto é, não existe um método de extração que possibilite a extração de todos os compostos existentes na matriz em estudo, o cabelo. Assim, é necessário ter em conta a estrutura química dos xenobióticos a analisar e conhecer a estabilidade do analito, nas diferentes soluções de extração (Pragst, et al., 2006).

A análise e identificação dos compostos determinantes, compostos alvo, é totalmente dependente das condições de extração (incluindo solvente, pH, temperatura e tempo). Por este motivo, foram testados diferentes procedimentos e comparados os resultados obtidos, ou seja, os compostos extraídos. Tendo em atenção que se trabalhou em micro-escala (trace analysis), foram sempre controlados os solventes utilizados, ou seja, efectuados “brancos” da composição química dos solventes.

4.2.1. Hidrólises Alcalina e Ácida

A hidrólise é uma reacção química que envolve a quebra de uma molécula por acção da molécula da água.

Quando se pretende extrair compostos que apresentam uma boa estabilidade em meio alcalino, recorre-se a soluções aquosas alcalinas. Pode-se recorrer a este método de extracção quando se pretende o isolamento dos compostos de interesse, através da desintegração da estrutura do cabelo (Pragst, et al., 2006).

A revisão de literatura mostrou que a morfina, anfetaminas, cananinóides e compostos com um grupo éster são compostos cuja extracção é favorecida pela hidrólise alcalina, com soluções aquosas de hidróxido de sódio (Boumba, et al., 2006). Contudo, as anfetaminas, opiáceos, metadona, a cocaína e os seus metabolitos também se demonstraram ser bem extraídos com soluções aquosas de ácido clorídrico, devido à protonação (Pragst, et al., 2006).

Efecturam-se hidrólises com soluções aquosas de ácido clorídrico (HCl) e de hidróxido de sódio (NaOH).

A 20 mg de cabelo, lavado, colocado num vial de fundo cónico adicionaram-se 1,5 mL das respectivas soluções aquosas.

As hidrólises foram efectuadas em duplicado, uma vez que se testaram dois solventes de polaridade diferente, hexano (C_6H_{14}) e diclorometano (CH_2Cl_2), para extracção dos compostos. Após a adição das soluções aquosas ao respectivo vial, estes foram levados ao ReactiTerm durante 15h, a uma temperatura de 80 °C. Posteriormente realizou-se a extracção com cada um dos solventes (C_6H_{14} e CH_2Cl_2) (3x1,5mL) e concentraram-se as amostras sob corrente de azoto. Estas foram analisadas em natureza e, também, pós derivatização por sililação, com o objectivo de se confirmar a funcionalidade dos compostos e a sua identificação. Analisaram-se todas as amostras por GC-MS (no anexo 2. encontram-se todos os cromatogramas obtidos nas hidrólises realizadas).

4.2.2. Extracção por solvente

No que concerne às técnicas de extracção de compostos de interesse do cabelo descritas na literatura, o metanol é o solvente mais empregue devido às suas características de solubilidade para com a maioria dos compostos até hoje estudados. Por ser um solvente polar, penetra na matriz do cabelo, dilata-a e provoca a libertação dos compostos, por difusão. Por ser um solvente orgânico tem a capacidade de solubilizar compostos neutros e de natureza lipofílica, presentes no interior do cabelo (Pragst, et al., 2006).

Assim, e com o intuito de testar solventes com diferentes polaridades, para a extracção de diferentes compostos, a extracção por solventes foi efectuada utilizando hexano, éter, metanol e diclorometano.

Inicialmente analisaram-se os três solventes.

Para as extracções com hexano, metanol e diclorometano, inseriram-se as 20 mg de cabelo num vial de fundo cónico de 1,5 mL com o respectivo solvente. Estes foram colocados no ReactiTerm durante 15h, a 80 °C, para que a extracção de compostos de interesse ocorresse. De seguida, retiraram-se os solventes para um novo vial, as amostras foram levadas à secura sob corrente de azoto. Foram então redissolvidas com cerca de 500 µL de solvente, analisadas em natureza, após metilação e após metilação/sililação. As amostras foram analisadas por GC-MS (no anexo 3, encontram-se todos os cromatogramas obtidos nas análises decorrentes das extracções por hexano, diclorometano e metanol).

Para a extracção com éter, o procedimento foi ligeiramente diferente. A 20 mg de cabelo (inseridos num vial de fundo cónico, após o procedimento de lavagem já descrito) foram adicionados 1,5 mL de éter. Este vial foi levado a um banho de ultrassons durante uma hora. Após extracção, o solvente foi transferido para um novo vial, sendo a amostra analisada em natureza e após metilação. Todos os passos foram controlados através da análise por GC-MS. Os cromatogramas obtidos da amostra utilizada para o estudo dos melhores métodos de extracção encontram-se representados na Figura 9 e na Figura 10.

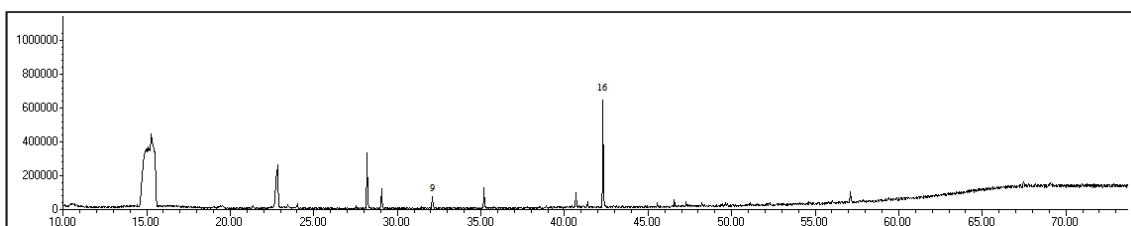


Figura 9 - Cromatograma (TIC) obtido na análise (GC-MS) da fracção etérea (em natureza).

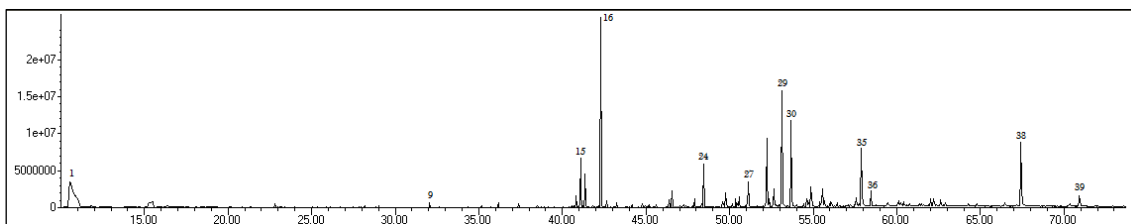


Figura 10 - Cromatograma (TIC) obtido na análise (GC-MS) da fracção etérea derivatizada por metilação.

Decorrente da extracção com éter, foi realizada uma tabela que inclui, detalhadamente, os compostos identificados e os respectivos tempos de retenção (Tabela 3).

Tabela 3 – Compostos identificados no extracto etéreo (em natureza) e na fracção etérea derivatizada por metilação (O composto nº 19 é um composto contaminante). RT – tempo de retenção em minutos; x – indicação da presença (qualitativa) do composto nas amostras analisadas.

Nº	RT	Composto	Em Natureza	Após metilação
1	10,55	Carbonato de etil metilo		X
2	14,06	Carbonato de dietilo		X
3	15,78	4-Hidroxi-2-pentanona		X
4	23,13	4-Metil-1,3-dioxolanlo -2-ona		X
5	25,34	Trimetil hidrazina		X
6	27,96	3-(1,1-dimetil etil)-2,5-Furandiona		X
7	28,19	Nonanal	X	X
8	28,84	Octanoato de metilo (C8 m)		X
9	32,09	Decanal	X	X
10	32,6	Nonanoato de metilo (C9 m)		X
11	36,16	Decanoato de metilo (C10 m)		X
12	38,5	6- <i>t</i> -butil-2,4-dimetilfenol		X
13	39,5	Undecanoato de metilo (C11 m)		X
14	40,02	2,5-Bis (1,1-dimetil propil)-2,5-ciclohexadiene-1,4-diona		X
15	41,08	2,6-Bis (1,1-dimetil etil)-2,5-ciclohexadiene-1,4-diona		X
16	42,27	Di- <i>terc</i> -butil metil fenol	X	X
17	42,64	Dodecanoato de metilo (C12 m)		X
18	44,16	Ramificado do C12 m		X
19	44,78	Dietilftalato		X
20	45,62	Tridecanoato de metilo (C13 m)		X
21	46,38	Benzofenona		X
22	46,56	Hediona		X
23	47,91	Insaturado do C14 m		X
24	48,44	Tetradecanoato de metilo (C14 m)		X
25	50,38	Ramificado do C14 m		X
26	51,07	Tetradecanoato de isopropilo		X
27	51,13	Pentadecanoato de metilo (C15 m)		X
28	52,37	Ramificado do C13 m		X
29	53,13	<i>Cis</i> -9-hexadecenoato de metilo (<i>cis</i> - Δ^9 -C16 m)		X
30	53,69	Hexadecanoato de metilo (C16 m)		X
31	54,44	Ramificado do C16 m		X
32	56,01	Hexadecanoato de isopropilo		X
33	56,11	Heptadecanoato de metilo (C17 m)		X
34	57,5	Ramificado do C18 m		X
35	57,87	<i>Cis</i> -9-octadecenoato de metilo (<i>cis</i> - Δ^9 -C18 m)		X
36	58,44	Octadecanoato de metilo(C18 m)		X
37	62,9	3-(4-Metoxifenil)-2-propenoato de 2-etilhexilo		X
38	67,42	1,2- Benzeno dicarboxilato de diisooctilo		X
39	70,92	2-Fenil-4-(2-hidroxi-2-metoxi-1-tioxoetil)-quinolina		X

A extracção com éter demonstrou ser efectiva para os compostos lipídicos e reprodutível. Sendo o procedimento mais simples, foi o seleccionado para este estudo e consequentemente o que foi utilizado com as “amostras-problema”, ou seja, as amostras reais. Os compostos obtidos nas amostras analisadas estão compilados na Tabela 4.

Análise exploratória das potencialidades forenses do cabelo, com aplicação de técnicas de GC-MS.

Ramificado do C12 m	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	1	2						
Ramificado do C12 m	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	1	2	1	2				
Dietilftalato	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2				
Tridecanoato de metilo (C13 m)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2				
Benzofenona	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1	1	2			
Hediona	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	2				
Ramificado do C13 m	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2			
α-Bisabolol	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2			
Insaturado do C14 m	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2				
Tetradecanoato de metilo (C14 m)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2			
Ácido tetradecanóico (C14)	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2			
Adipato de dibutilo	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
Ramificado do C12 m	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
Ramificado do C14 m	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2			
Ramificado do C14 m	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2			
Tetradecanoato de etilo (C14 e)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
Ramificado do C13 m	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
2-hidroxi- benzoato de 2- etilhexilo	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
Tetradecanoato de isopropilo	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Pentadecanoato de metilo (C15 m)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Ácido pentadecanóico (C15)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Ramificado do C13 m	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Ramificado de C15 m	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Ramificado de C15 m	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Dodecanoato de 3-metilbutilo	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
Ramificado do C13 m	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	2		

A Tabela 4 demonstra a presença de ésteres metílicos de ácidos gordos de cadeia normal nas amostras analisadas, bem como de ésteres metílicos ramificados e insaturados. No entanto, a presença de potenciais marcadores para o consumo de álcool, ésteres etílicos de ácidos gordos, entre os quais o miristato, o palmitato, o oleato e o estereato de etilo não foi detectada. A nicotina e cotinina, já descritos na literatura como compostos indicadores da ingestão de tabaco, também não foram detectadas. Tendo em consideração o intuito do presente trabalho, o de se estudar hábitos de consumo que os jovens adoptam nos dias de hoje, principalmente durante o período de vida de estudante do ensino superior, era suposto detectar-se a presença destes compostos, mas tal não aconteceu. Contudo, evidenciou-se a necessidade de outro estudo. Tornou-se visível a presença de compostos únicos nos indivíduos até aos 19 anos (primeiros indivíduos da Tabela 4) ou seja, na população mais nova, como é o caso da 4-hidroxi-2-pentanona, por exemplo. Assim, e com o intuito de se descortinar estes resultados, procedeu-se ao estudo de multivariável, não só para facilitar a leitura (química) da Tabela 4, mas também para estudar e entender as tendências dos compostos identificados.

2. Desconvolução de dados

2.1. Métodos

As amostras de cabelo obtidas a partir de doadores voluntários foram tratadas e analisadas conforme descrito na parte experimental.

O Universo de amostragem foi distribuído por 42 voluntários, de idades ente os 14 e os 24 anos, dos quais 18 adolescentes (idade inferior a 20 anos, 11 do sexo feminino e 7 do sexo masculino) e 24 adultos (idades iguais ou superiores a 20 anos, 16 do sexo feminino e 8 do sexo masculino) – Tabela 5.

Os compostos foram identificados por GC-MS, de acordo com a parte experimental, no total de 104 (Tabela 4).

Tabela 5 - Matriz de amostragem (A divisão entre adultos e adolescentes foi arbitrariamente estabelecida a partir dos 19 anos)

	Masculino (M)	Feminino (F)	Composto analisados
Adolescentes (T)	7	11	Total de 104 compostos conforme Tabela 4
Adultos (A)	8	16	

2.2. Metodologia

As análises estatísticas de multivariável foram realizadas com o programa The Unscramble® (CAMO Software AS, Oslo, Noruega), v.10.3, versão de avaliação. Análises complementares e visualizações gráficas foram obtidas com o programa imDEV amavelmente disponibilizado por Dmitry Grapov (Grapov, et al., 2012) e com Multibase 2013 ®, Numerical Dymamics, Hiroshima, Japão.

Embora a complexidade da não permita conclusões imediatas quanto à natureza dos dados e suas relações com os sujeitos individuais ou categorizados, da sua observação ressalta que um elevado número de compostos aparentam uma distribuição aleatória no universo da amostragem por estarem presentes apenas em algumas das amostras de forma não estruturada. A tabela mostra também que alguns dos compostos (variáveis) são apenas ocasionalmente detectados em alguns sujeitos (casos) individuais. Embora não se possa teoricamente excluir qualquer significado potencial ao nível individual, é razoável concluir que tais compostos em nada contribuem para o reconhecimento de padrões significativos no universo da amostragem.

De acordo com este critério empírico, a matriz inicial foi reduzida a 26 variáveis mais significativas. O conjunto está representado na Tabela 6.

Mantêm-se as abreviaturas anglo-saxônicas mais usadas em análise de multivariável por três ordens de razões: a) São mais facilmente apreendidas pelos leitores, habituados que estão à literatura inglesa, já que a portuguesa é praticamente insignificante; b) Se nacionalizadas, as abreviaturas tornam-se idênticas a outras mais comuns na linguagem coloquial (p.e. CP, ADL, ACP); c) A consistência entre texto e gráficos obtidos pelos programas de cálculo.

2.2.1. Técnicas

2.2.1.1. Análise de Componente Principal (PCA)

As análises foram conduzidas com todas as variáveis estandardizadas, centradas, com o mesmo peso, sem rotação, utilizando o algoritmo NIPALS.

2.2.1.2. Análise Discriminante Linear (LDA)

As análises foram conduzidas com todas as variáveis estandardizadas, com o mesmo peso, pelo método linear, com probabilidades à priori calculadas a partir do conjunto de treino.

2.2.1.3. Aglomerados (Clusters)

A construção de aglomerados foi obtida pelo método de Ward usando os quadrados das distâncias euclidianas.

Análise exploratória das potencialidades forenses do cabelo, com aplicação de técnicas de GC-MS.

Tabela 6 - Matriz de composição reduzida empiricamente às variáveis mais significativas.

Amostr ras	Carbon ato de etilo metilo	Carbon ato de dietilo	4- Hidroxi -2- penta na	C6 m	C7 m	2-Etil- hexano ato de metilo	C8 m	Decan al	C9 m	Tributil fosfato	C12 m	Ramific ado do C12 m	C13 m	Insatur ado do C14 m	C14 m	Ramific ado do C14 m	Mirista to de isopro pilo	C15 m	cis-Δ ⁹ - C16 m	C16 m	C17 m	Insatur ado do C18 m	cis,cis -Δ ^{9,12} - C18 m	cis-Δ ⁹ - C18 m	C18 m	1,2- Benzeno dicarboxi lato de diisocetil o
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	
14_1_F	6.77076	1.05945 9	0.65735 1				0.1689 34	0.0941 46			0.669377			0.3599	0.1676 39	0.58489	0.01338 8	0.9611 12	4.7787 92	5.7901 92				4.9374 5	1.3106 81	0.156361
14_2_F	11.9113 4	0.03699 4	0.48855 1			0.08773 4	0.3706 16		0.0596 14		1.709861	0.70188 4	0.5544 61	4.97986 3	7.1166 06	0.97037 5		4.3969 41	9.6535 39	13.441 59	0.5891 75	1.15744 2	1.3667 15	13.518 99	0.5851 08	0.010002
15_1_F	89.6176	1.67809 2	1.94908 1						0.1030 74						0.3858 99			0.1453 15		1.1570 17					0.9683 74	0.610036
15_2_M	10.9645 4	0.87747	0.11143 6								0.81872	0.39046 4	0.3919 88	0.84494 9	8.8013 48	0.74646		0.1785 43	6.4419 4	0.6693 72	0.8195 78	0.88733 7	1.4568 35	1.5338 35	1.7533 45	0.394547
15_3_M						0.04857 1		0.0755 52			0.880965	0.35375	0.4640 68	0.56390 5	9.5419 85	1.47799 9		6.0509 96	7.1304 31	3.1658 36	1.1403 9	1.84857	0.9178 48	18.155 5	0.4644 49	0.477546
15_4_F	50.4968 7	1.33857	0.70845 1				0.0339 16				0.803806			0.47005 5	0.4547 07	0.43566		1.3060 01		6.9157 81			1.5755 97	14.376 15	0.8539 73	1.339772
15_5_F	55.9809 5	1.08063	0.77605 5								0.646898		0.1094 38	0.39943 7	3.4388 79	0.45711 8		0.1743 39		10.998 06				8.6065 74	1.4309 58	1.867915
15_6_M	58.0669 8	0.63691 1	0.40471						0.0919 95		0.310718	0.09668 6	0.0750 96	0.64905 6	3.3164 33	0.57356 4		1.6594 68		6.5330 52				6.3015 68	0.4177 68	0.465418
16_1_F	39.3065 6	0.51759 7	0.34044 9						0.0341 88		0.877606	0.18394 4	0.1510 45	0.97595 8	4.3111 58	0.73899 7	0.03193 8	1.9141 3	15.555 45	11.988 9			0.5598 47	15.447 84	1.3075 03	0.694408
16_2_M	3.03846	0.39668 2	0.33877 4								1.557155	0.33117 4	0.1834 07	1.85814 4	4.0456 45	0.76381 2	0.03918 1	1.8613 84	7.7459 85	4.8748 6		0.60945 1		11.116 18	0.6510 14	0.579946
16_3_F	47.6453 7	0.67865 6	0.35515				0.5519 43				0.410004	0.44358	0.1818 09	1.13445 9	3.7076 12	0.86539 4	0.01006 3	1.8969 48		5.8791 96				8.4133 5	0.3756 87	0.649784
17_1_M	30.6658 9	0.61008 7	0.30170 7								0.681716	0.90884 7	0.5756 55	0.87986 9	7.1740 45	0.78136 1	0.00447 8	4.4933 94	0.8597 65	17.705 97	0.6576 56	0.53431 8		8.0038 34	1.4487 86	0.370631
17_2_F	56.9134 9	1.00149 5	0.77173 4				0.8168 87				0.538887	0.13163 6	0.0839 48	0.81494	0.7808 39	0.19555 5	0.56110 3	0.5503 16	4.3664 3	1.4088 47				10.537 91	0.5116 35	0.901764
17_3_M	39.8599 5	0.87016 2	0.50836 6				0.1760 01	0.0517 92			0.495372	0.18445 2	0.1698 84	1.41096 2	3.6079 71	0.67674 5	0.15116	1.6398 54	18.303 38	7.5668 75		0.54347	0.5900 8	1.9711 54	1.0161 33	1.8111
17_4_M	45.7874 7	1.05199 9	0.33917								0.580134	0.75694 4	0.4709 95	1.56356 4	3.8575 08	0.87816 4	0.06791 9	0.3858 08		8.7609 9	0.4413 7	0.59691 1		9.9131 95	1.8159	
18_1_F	66.5030 9	0.88193 5					0.5054 61	0.7171 59	0.4759 66		0.381685				3.1055 11		0.09131 5	1.3311 53		6.7060 45		4.07360 6			0.7768 2	
19_1_F	35.4806 6	0.50335					0.1850 44				0.704961	0.18131 8	0.3879 77	1.66383 8	6.7074	1.08840 1		3.9099 92	19.364 82	14.547 99	0.3389 94	0.40769 5		11.455 34	1.1680 43	0.576567
19_2_F	6.95075 7						0.4773 04	1.0065 65	0.6078 59	0.38374 8	3.134301	0.37600 6	0.3559 09	1.78644	9.7413 34	0.19647	0.19166	3.5351 19	16.637 86	3.0641 15	0.4697 79			11.478 78	0.8649 77	0.40884
20_1_F	0.45510 1			0.3880 78	0.0449 36	0.09949 9	0.5303 1	1.5949 59	0.6183 88	0.33338 9	1.17337		0.4951 6	1.44805 1	7.6190 12	0.19491 9	0.98141 6	0.3395 46	4.7646 83	18.710 66				13.675 93	3.8479 09	3.318377
20_2_M	0.78889 2						0.0387 39	0.3886 75	0.0980 33	0.45368 2	0.055452	0.59856 9	0.5716 63	0.30497 7	9.3479 96	1.67893 9		4.7914 96	34.573 8	13.940 84	0.5531 1	0.71043 8		16.793 99	1.1439 14	0.778737
20_3_M	0.18891			0.1536 56	0.0868 7	0.03664 2	0.1870 41	0.0558 74	0.1850 41	0.71836 6	0.353048	1.55677 1	0.9301 11	4.70346 8	9.8969 7	3.05731 9		4.5061 39	38.737 08	9.4007 73	0.3145 49	1.14675 1	0.8111 85	1.9154 84	0.8011 5	0.341674
20_4_M	0.89736			0.0065 67	0.0317	0.01108 8	0.1108 75	0.3788 94	0.1466 58	0.30084 8	0.460185	0.39397 6	0.3764 5	1.43836 6	8.8166 91	3.00861		6.3468 46	3.5195 2	16.604 18	0.6053 38	0.74550 5	0.4757 34	17.765 04	1.3198 14	0.901656

Análise exploratória das potencialidades forenses do cabelo, com aplicação de técnicas de GC-MS.

20_5_M	3.05594 1			0.3516 15	0.1446 37	0.05439 5	0.1307 32	0.1060 94	0.0797 74	0.84460 1	0.76106	0.50514 6	0.4473 6	1.93635 7	8.7391 83	1.85603 1		4.3044 4	34.668 7	14.086 94		0.69419 5	1.4546 81	18.978 64	1.3730 5	0.678936	
21_1_F	1.83178 2	0.00485 8					0.0807 17		0.1460 56		0.779754	0.39031 9	0.3803 1	0.56809 4	11.749 74		0.06900 4	6.1159 79		0.1155 86	1.1704 37		0.47318 4			0.8148 11	
21_2_F	0.07177 6			0.1614 81	0.0413 4	0.04184 6	0.1051 45	0.8653 4	0.0663 94	0.18654 4	4.573785	0.75119 9	0.5831 75	3.18044 8	9.9941 53	0.01417 6		3.5636 94	37.573 49	11.178 49		0.68446 8		16.044 99	1.6631 12	0.656861	
21_3_M	0.18069 5			0.0565 75	0.0159 54	0.00586 9	0.0455 43	0.0674 47	0.0733 03		1.63585	0.80760 6	0.7673 01	3.99378 1	1.5496 91	0.59138 7		6.1880 2	3.9445 57	17.814 32	0.6946 88	0.94950 6	0.8544 7	11.059 44	1.3335 08	0.01489	
21_4_F	0.07706 8			0.0736 74	0.0346 35	0.01518 3	0.1094 65	0.0935 17	0.0893 43	0.11578 5	1.083331	0.48540 2	0.3688 77	0.90316 2	5.3448 06	1.85483 6	0.01030 7	0.6608 05	9.7341 52	8.9888 87	0.3057 46	1.96051 4	0.9966 77	0.9364 39	0.4869 12	0.71461	
21_5_F	59.5596 6			0.3677 69	0.5590 51	0.60144 9	1.1481 07		0.7907 03						1.9786 46			1.3319 66		1.7865 65					1.8335 58	7.694763	
22_1_F	0.41144 9			0.0648 96	0.0338 97		0.1081 07	0.6406 76	0.9491 57	0.46816	4.997544	0.35755 2	0.4578 45	1.6308	1.5068 82	1.77952	0.01493 4	5.4855 81	8.3973 52	0.3169 57	0.7008 8			10.813 11	1.5989 79	0.459068	
22_2_F	0.86480 2	0.10586 6		0.0895 92				0.6665 65	0.1068 87	0.91307 1	3.069364	0.90533 9	0.3797 86	1.63609	11.061 57	0.31641 6	0.18903 5	5.1784 16	0.3744 83	6.0310 12	0.7569 41	0.15371 4		9.1644 98	3.9475 78	3.167631	
22_3_M	0.86751 5			0.0339 77	0.0068 5	0.01468 8	0.0508 88	0.0607 89	0.0309 46	0.09544 8	0.03181	1.15336 8	1.0776 37	4.77937 3	10.848 31	0.73107		7.0565 19	8.7535 78	14.765 49	1.0910 4	1.79014 1	0.6049 69	15.736 71	0.1144 83	0.477956	
22_4_M	0.87835 5			0.0540 97	0.0557 11	0.03087 4	0.1690 57	0.0630 81	0.4485 01	0.18004	1.14305	0.49583 4	0.9549 67	0.67056 9	15.334 64	0.07804 7	0.00740 3	8.6653 36	3.4474 09	3.1933 51	0.8364 48	0.80497 9		9.3764 31	1.1193 03	0.138703	
22_5_F	0.45846 4			0.3119 86	0.1514 98	0.06340 5	0.3099 4	0.8039 73	0.3515 55	0.61456 9	0.450494				5.4134 19	1.09005 5	0.45140 8	0.4741 84	8.7987 07	5.3170 38				3.4001 31	1.664418		
23_1_F	38.9019 6	1.05991 7	0.08558 6	0.1305 5					0.0100 44		0.671079	0.36639 9	0.3718 69	1.17001 9	8.8013 45	0.84417 2	0.03937 6	5.0377 07	17.487 8	13.846 35	7.0046 34			0.6831 66		0.593469	
23_2_F	11.5335			0.8634 67						0.14319 6	0.505715				5.5894 94	0.58144 5	0.19706 1	1.6080 43		14.493 93				1.6431 98			
23_3_F	13.4004 7	0.61158 2	0.35641 9	0.8401 73	0.3579 51	0.18476 9	0.7860 49	0.5768 18	0.9861 32		0.158604	0.30981 4	0.7799 61	1.97781 9	6.7155 11	0.99055 4	0.15089 3	1.8636 54	18.096 09	17.615 06				9.7667 68	0.3548 98	1.954431	
23_4_F	4.55556 6						0.0361 4		0.3767 75		1.190041	0.34371 5	0.4841 98	1.40483 1	4.8149 69	1.50737 5	0.11388 4	1.7315 75	7.4834 65	0.3487 67		0.68736 2	0.4309 5	13.414 11	0.6007 87	0.05055	
24_1_M	0.06540 4			0.0047 57	0.00639 5	0.0175 9		0.0479 18	0.18631 7	0.438744		0.50648 6	0.3376 74	3.11851 4	7.4485 16	4.60896		6.5756 42	1.9996 33	0.6784 91	1.3793 66	0.79508 7	0.4680 99	13.405 66	0.5969 57	0.915047	
24_2_F	0.13819 2			0.0940 79	0.0489 78	0.01968	0.1069 08	0.1866 69	0.1465 56		0.889848	0.3357	0.1756 51	0.40038 2	6.8195 19	1.58481 9	0.55467 2	0.8040 38	31.807 18	15.468 36	0.4636 76	0.85490 6	0.6707 88	0.7639 95	0.4097 63	0.974907	
24_3_F	0.08777 6	0.00783 7					0.0651 2	0.0476 98		0.177334		0.03111 5	0.0418 39	0.33804 9	1.1199 01	0.19168 3	0.10374 6	0.6014 13		3.6353 49	0.0459 44	0.11616 7	0.0870 65	4.7085 89	0.7070 72	0.414614	
24_4_F	0.15193 7			0.0618 97	0.0601 11	0.06760 4	0.0657 45		0.1014 68	0.14816 2	0.337413	0.34838 4		0.35018 3	5.7857 97	3.65749 7	0.00933 6	5.1531 58	7.7397 76	1.8117 47	1.5535 61	0.97138	0.7983 32	17.063 14	3.6046 87	1.197487	
24_5_F	0.43606 4			3.5015 17		0.61516 9	1.6311 35	3.3938 07	1.4460 51	0.549468					4.7800 78		0.43340 6	0.1181 91		0.4084 97							

A Tabela 6 contém um número elevado de valores em falta para muitas das variáveis. Frequentemente, cálculos de multivariável não se dão bem com um número excessivo de valores em falta. Estes foram substituídos pelo valor -999 (Saar-Tsechansky, et al., 2007). Esta operação tem por fim permitir que todos os pontos apareçam num gráfico de dispersão 2 -D ou 3 -D; permitir o uso de transformações que exigem que não existam valores em falta (por exemplo, derivadas); permitir o uso de métodos de análise que requerem a inexistência de valores ausentes como por exemplo MLR ou Análise de Efeitos. O elevado valor de -999 leva a que este, embora presente, seja ignorado nos cálculos ao mesmo tempo que torna a matriz independente dos métodos de imputação de valores em falta utilizados, tornando-a manejável por operadores independentes (Schafer, et al., 2002). A matriz é posteriormente modificada no sentido da standardização e centragem de valores.

Da observação da Tabela 6 ressalta de imediato que alguns compostos são exclusivamente detectados em amostras provenientes de adolescente (variáveis 2 e 3) enquanto outras são características de adultos (5, 6, 7, 10).

2.2.2. Redução de variáveis

Ainda assim, o número total de variáveis é ainda elevado, e torna-se interessante saber quais delas têm de facto importância significativa na caracterização de casos ou no estabelecimento de padrões. Para tal, recorreu-se á análise de componente principal (PCA).

A análise de componentes principais é uma técnica matemática que visa descrever os dados contidos numa matriz de m variáveis medidas para um conjunto de n objectos (casos). Possibilita investigar quais as medições responsáveis pelas maiores variações entre os casos observados sem perda de informação. O método transforma um conjunto original de variáveis num outro conjunto de variáveis de dimensões equivalentes – componentes principais – obtidas por combinação linear das variáveis iniciais. A técnica permite igualmente aceder a informação sobre a relevância das variáveis em cada componente. O objectivo é explicar a maior variância possível por um menor número de componentes possível, idealmente 2 ou 3, pois tal permite a interpretação gráfica com base nos seguintes parâmetros:

- Valores próprios (eigenvalues) – correspondem à variância total que pode ser explicada por cada componente. Avaliam a contribuição da componente no modelo.

- Contagens (Scores) – Representam a medida assumida pelos objectos estudados em cada uma das novas variáveis.
- Cargas (Loadings) – Representam a proporção da variação da variável explicada por cada componente, ou seja, a dimensão da contribuição de cada variável para a formação de cada componente.

Aplicada ao caso presente, a análise de componente principal permitiu chegar às conclusões seguintes:

2.2.2.1. Variabilidade entre os casos.

Os dois primeiros componentes principais apenas explicam 52% da variabilidade na curva de calibração. A curva de validação afasta-se significativamente deste valor: apenas 39,7% da variabilidade é explicada pelos dois primeiros componentes (Figura 11). Apenas ao oitavo componente o modelo atinge uma variabilidade explicada de 80% para a curva de calibração mas aí, o afastamento da curva de validação é ainda superior.

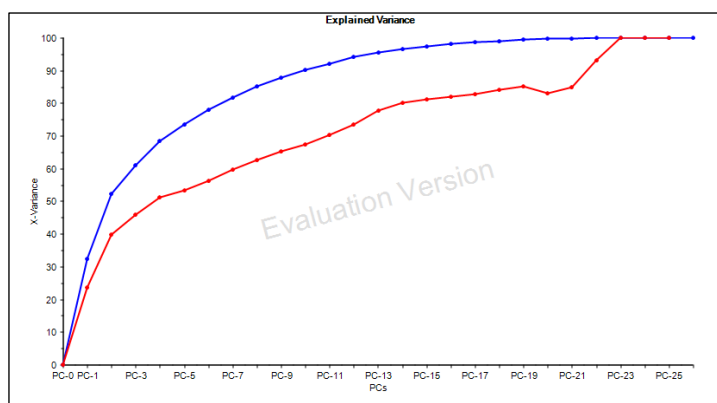
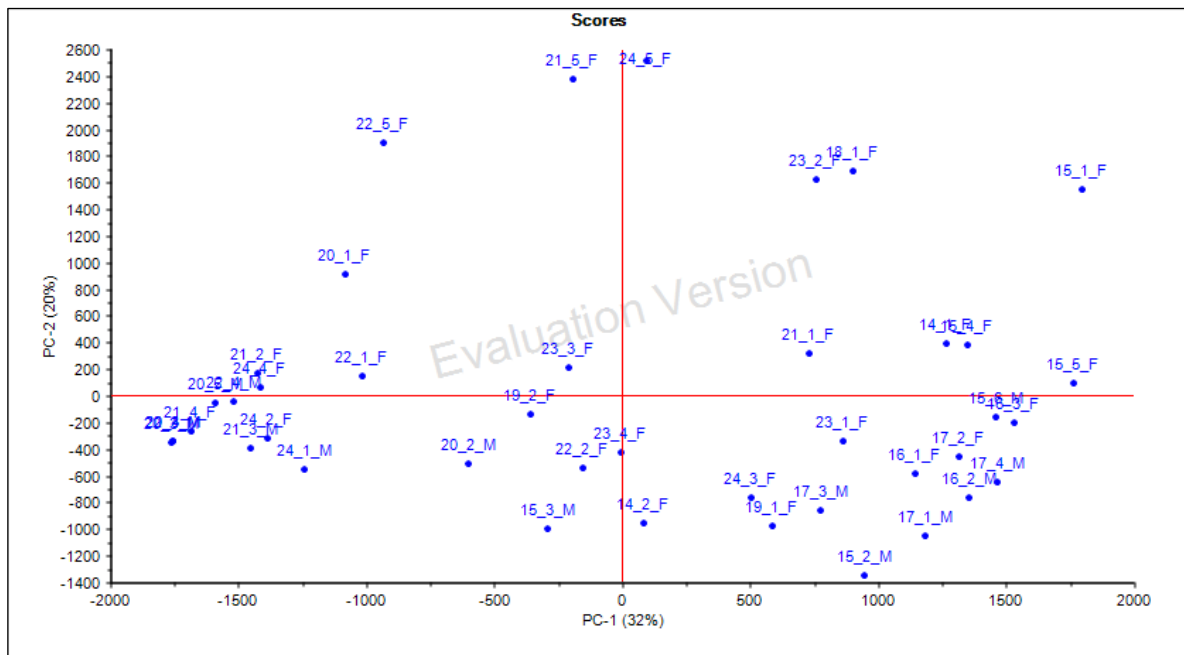


Figura 11 - Variabilidade explicada por análise de componente principal (PCA) da matriz constante da Tabela 4. Azul- Calibração; Vermelho – Validação

O modelo não é claramente adequado à estrutura dos dados.

2.2.2.2. Modelo de distribuição (“Scores”)

Tal é patente na projecção bidimensional do primeiro componente (PC-1) sobre o segundo (PC-2) onde não é perceptível qualquer estruturação útil dos casos, ilustrada pela sua elevada dispersão (Figura 12).



2.2.2.3. Peso das Variáveis (“Loadings”)

Quando uma análise PCA é realizada e uma projecção bidimensional de X cargas é obtida pode usar-se a projecção de Pesos Correlação (“loadings”) para descobrir a estrutura dos dados de forma mais clara.

Os pesos de correlação são calculados para cada variável para os componentes principais apresentados. A projecção nos planos PC-1 e PC-2 onde deve estar contido o peso significativo da variância explicada (p.e. >70-80%) contém duas elipses que indicam a quantidade de variância tomada em consideração. A elipse exterior é o círculo unitário que indica 100% de variância explicada. A elipse interna indica 50% da variância explicada (Figura 13).

A análise do peso das variáveis no modelo mostra que apenas as variáveis 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14 e 19 (Tabela 6) possuem um significado diferenciador entre os 50 e os 100% de Variância explicada para o conjunto dos casos.

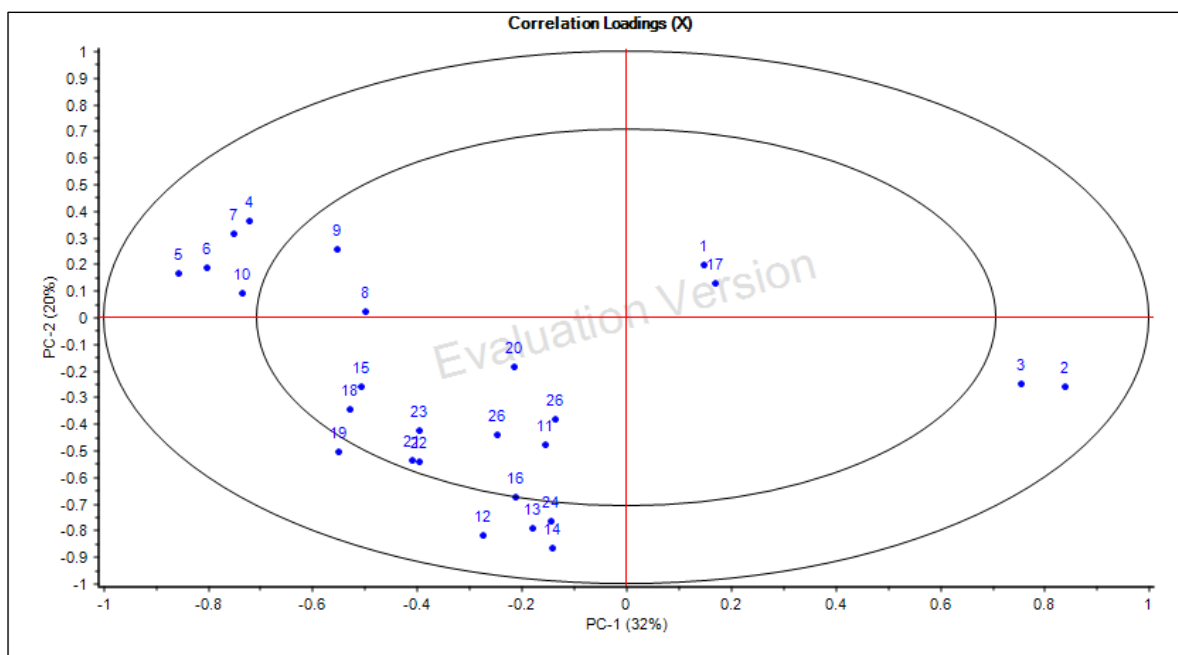


Figura 13 - Pesos de correlação (“Loadings”) das variáveis da Tabela 4 ao longo PC-1 e PC-2. Circulo exterior- 100% de variabilidade explicada. Circulo interior – 50% de variabilidade explicada.

Estes resultados mostram a conveniência de eliminar da matriz variáveis de pouca contribuição para a variabilidade inter-casos, produtoras de ruído. Põe-se a hipótese de o modelo poder ser convenientemente descrito por apenas 11 variáveis (Tabela 7).

A utilização destas 11 variáveis como descritores do universo dos sujeitos conduz aos resultados graficamente representados na Figura 14. Os dois primeiros componentes PC1 e PC2, explicam agora 68% da variabilidade. É agora visível uma clara estrutura no conjunto. A diferenciação de idade (adultos e adolescentes) ocorre ao longo do primeiro componente principal (PC1). A diferenciação de género (Masculino e Feminino) ocorre ao longo do segundo componente principal (PC2). Existe, porém, um conjunto de sujeitos que perturbam a distribuição levando a que as amostras de validação não ocupem a mesma região que as amostras de calibração, constituindo amostras de validação muito peculiares. São os casos dos sujeitos 19_2_F, 21_1_F, 22_1_F, 23_1_F e 24_3_F. A análise mais detalhada dos dados numéricos, indicou também que os sujeitos 15_1_F e 15_3_F apresentavam valores de variância residual elevados.

Estas indicações sugerem uma simplificação da matriz de modo a tornar o conjunto mais estável, tornando-se mais clara a estrutura escondida nos dados, com redução significativa de variáveis. Como se verá no seguimento do trabalho, estas simplificações não alteram significativamente a tendência do modelo.

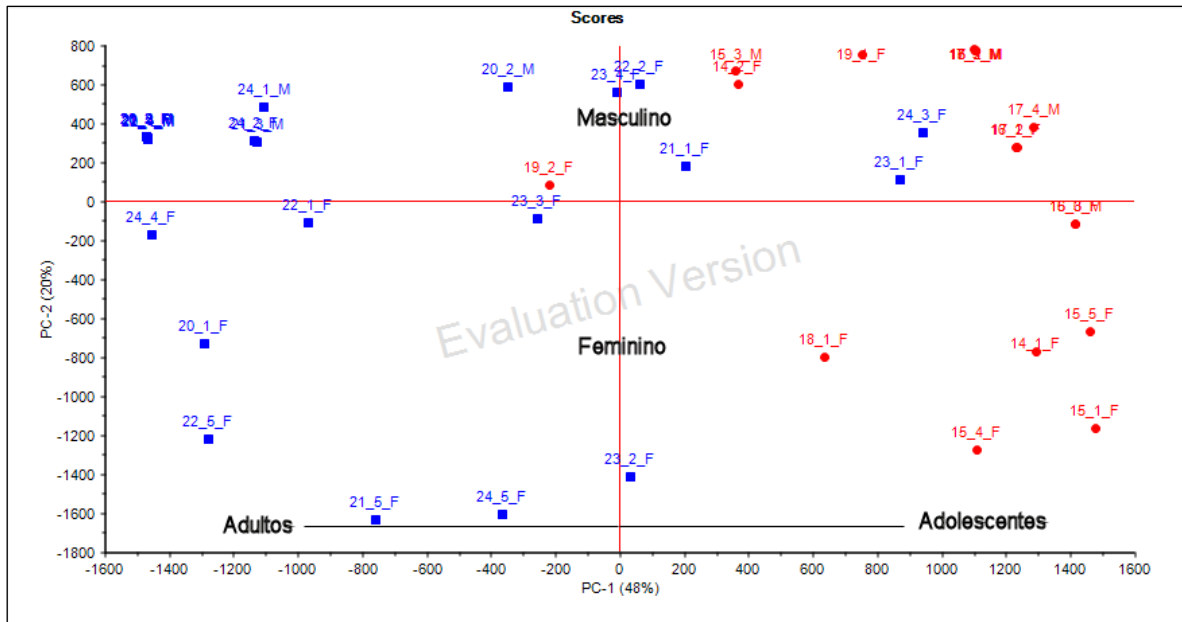


Figura 14 - Projecção bidimensional dos valores "Scores" relativos aos dois primeiros componentes principais (PC-1 e PC-2) após redução de variáveis, contendo 68 % de variância acumulada. Existem amostras que constituem casos individuais peculiares, responsáveis.

2.2.3. Adaptação da matriz de dados

Com base nestas conclusões, decidi proceder á reconstrução da tabela de dados eliminando as variáveis assinaladas como não informativas e produtoras de ruído no conjunto, bem como os casos individuais peculiares. A nova matriz está descrita na Tabela 7.

Tabela 7 - Matriz de dados reduzida em função dos resultados de PCA preliminares. A variável 14 foi substituída pela 22 após condução de análises subsequentes e consideração de valores discrepantes ("outliers"). Os valores em falta foram substituídos por -999 (Saar-Tschansky, et al., 2007).

Amostras	Carbonato de dietilo	4-Hidroxi-2-pentanona	C6 m	C7 m	2-Etil-hexanoato de metilo	C8 m	Tributilfosfato	Ramificado do C12 m	C13 m	cis-A ⁹ -C16 m	Insaturado do C18 m
	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(10)	(12)	(13)	(19)	(22)
14_1_F	1.059459	0.657351	-999	-999	-999	-999	-999	-999	-999	4.778792	-999
14_2_F	0.036994	0.488551	-999	-999	0.087734	0.370616	-999	0.701884	0.554461	9.653539	1.157442
15_2_M	0.87747	0.111436	-999	-999	-999	-999	-999	0.390464	0.391989	6.44194	0.887337
15_4_F	1.33857	0.708451	-999	-999	-999	0.033916	-999	-999	-999	-999	-999

Análise exploratória das potencialidades forenses do cabelo, com aplicação de técnicas de GC-MS.

15_5_F	1.08063	0.776055	-999	-999	-999	-999	-999	-999	0.109438	-999	-999
15_6_M	0.636911	0.40471	-999	-999	-999	-999	-999	0.096686	0.075096	-999	-999
16_1_F	0.517597	0.340449	-999	-999	-999	-999	-999	0.183944	0.151045	15.55545	-999
16_2_M	0.396682	0.338774	-999	-999	-999	-999	-999	0.331174	0.183407	7.745985	0.609451
16_3_F	0.678656	0.355151	-999	-999	-999	-999	-999	0.44358	0.181809	-999	-999
17_1_M	0.610087	0.301707	-999	-999	-999	-999	-999	0.908847	0.575655	0.859765	0.534318
17_2_F	1.001495	0.771734	-999	-999	-999	-999	-999	0.131636	0.083948	4.36643	-999
17_3_M	0.870162	0.508366	-999	-999	-999	-999	-999	0.184452	0.169884	18.30338	0.54347
17_4_M	1.051999	0.33917	-999	-999	-999	-999	-999	0.756944	0.470995	-999	0.596911
18_1_F	0.881935	-999	-999	-999	-999	0.505461	-999	-999	-999	-999	4.073606
19_1_F	0.50335	-999	-999	-999	-999	-999	-999	0.181318	0.387977	19.36482	0.407695
20_1_F	-999	-999	0.388078	0.044936	0.099499	0.53031	0.333389	-999	0.49516	4.764683	-999
20_2_M	-999	-999	-999	-999	-999	0.038739	0.453682	0.598569	0.571663	34.5738	0.710438
20_3_M	-999	-999	0.153656	0.08687	0.036642	0.187041	0.718366	1.556771	0.930111	38.73708	1.146752
20_4_M	-999	-999	0.006567	0.0317	0.011088	0.110875	0.300848	0.393976	0.37645	3.51952	0.745505
20_5_M	-999	-999	0.351615	0.144637	0.054395	0.130732	0.844601	0.505146	0.44736	34.6687	0.694195
21_2_F	-999	-999	0.161482	0.04134	0.041846	0.105145	0.186544	0.751199	0.583175	37.57349	0.684468
21_3_M	-999	-999	0.056575	0.015954	0.005869	0.045543	-999	0.807606	0.767301	3.944557	0.949506
21_4_F	-999	-999	0.073674	0.034635	0.015183	0.109465	0.115785	0.485402	0.368877	9.734152	1.960514
21_5_F	-999	-999	0.367769	0.559051	0.601449	1.148107	-999	-999	-999	-999	-999
22_1_F	-999	-999	0.064896	0.033897	-999	0.108107	0.46816	0.357552	0.457845	8.397352	-999
22_3_M	-999	-999	0.033977	0.00685	0.014688	0.050888	0.095448	1.153368	1.077637	8.753577	1.790141
22_4_M	-999	-999	0.054097	0.055711	0.030874	0.169057	0.18004	0.495834	0.954967	3.447409	0.804979
22_5_F	-999	-999	0.311986	0.151498	0.063405	0.30994	0.614569	-999	-999	8.798707	-999
23_2_F	-999	-999	0.863467	-999	-999	-999	0.143196	-999	-999	-999	-999
23_3_F	0.611582	0.356419	0.840173	0.357951	0.18477	0.786049	-999	0.309814	0.779961	18.09609	-999
23_4_F	-999	-999	-999	-999	-999	0.03614	-999	0.343715	0.484198	7.483465	0.687362
24_1_M	-999	-999	-999	0.004757	0.006395	0.01759	0.186317	0.506486	0.337674	1.999633	0.795087
24_2_F	-999	-999	0.094079	0.048978	0.01968	0.106908	-999	0.3357	0.175651	31.80718	0.854906
24_4_F	-999	-999	0.061897	0.060111	0.067604	0.065745	0.148162	0.348385	-999	7.739776	0.97138
24_5_F	-999	-999	3.501518	-999	0.615169	1.631135	-999	-999	-999	-999	-999

2.2.4. Análise exploratória da matriz da Tabela 7

A Figura 15 visualiza graficamente os resultados da análise de componente principal sobre a matriz reduzida da Tabela 7. Todas as variáveis são relevantes para o

modelo com valores muito elevados de variância explicada ao longo de ambos os componentes PC-1 e PC-2 (B). Contudo, alguns casos ajustam mal ao modelo no qual têm peso excessivamente elevado (C).

A variância explicada pelos dois primeiros componentes principais (PCs) é agora de 74% para a curva de calibração. Porém a variância explicada pela curva de validação (vermelha) é bastante inferior (61%) indicando baixa estabilidade do modelo, que se mostra pouco fiável para fins classificativos. Tal não é demasiado surpreendente se tivermos em consideração a natureza dos objectos de estudo. Tratam-se de amostras de cabelo humano onde não é possível dissimular os numerosos factores que podem contribuir, e seguramente contribuem, para altas variabilidades individuais. Uma outra limitação é o baixo número de observações muito inferior ao desejado para garantir distribuições normais.

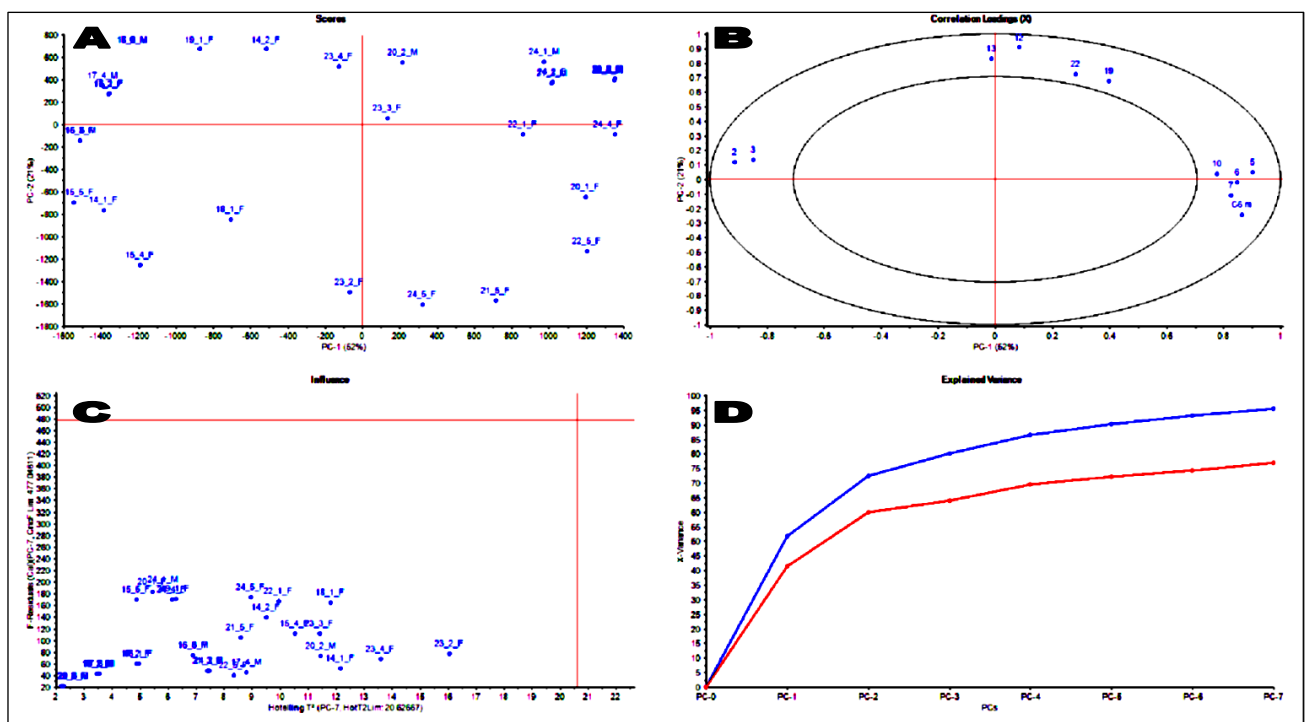


Figura 15 - Análise de componentes principais dos dados da Tabela 7 (11 variáveis). A- Distribuição dos casos em projecção bidimensional ao longo de PC-1 e PC-2. Os dois componentes explicam 74 % da variância (D). B- Pesos de correlação das variáveis ao longo de PC-1 e PC2. Todas as variáveis se encontram agora acima dos 50% de variância explicada. C- Gráfico de influência a 100% de variância explicada (PC-7). Alguns casos têm demasiada influência no modelo. D- Variância explicada. Os dois primeiros componentes são agora responsáveis por 74% da variância de calibração (curva azul). A variância de validação ainda se afasta (61%).

O modelo, porém mostra-se bastante adequado para mostrar tendências e tornar evidente informação não facilmente acessível a partir dos resultados analíticos iniciais.

A distribuição dos casos ao longo de PC-1 e PC-2 (Figura 15A) mostra agora alguma estrutura, da qual se podem tirar conclusões.

O campo de projecção está dividido em 4 quadrantes. Os dois quadrantes superior e inferior do lado esquerdo são ocupados pelos casos referentes a adolescentes, enquanto os dois quadrantes do lado direito são ocupados pelos casos referentes a adultos. Pode, pois, concluir-se que estes dois grupos etários possuem características capilares bem diferenciadas.

Os dois quadrantes inferiores são ocupados por casos de origem feminina, enquanto que os dois quadrantes superiores são dominados pelos casos de origem masculina. Contudo, os casos 19_1_F, 14_2_F, 23_4_F encontram-se claramente deslocados para o lado masculino, anomalia que resulta da sua má adaptação ao modelo já anteriormente detectada.

Uma mais detalhada observação da Figura 15 permite ainda retirar conclusões quanto à influência das variáveis nesta distribuição.

Assim, o grupo etário adolescente está fortemente correlacionado positivamente com as variáveis 2 e 3 que correlacionam negativamente com o grupo de adultos. Esta observação já havia sido retirada da análise à matriz inicial, onde estas variáveis se mostram ausentes nos adultos.

As variáveis 4, 5, 6, 7 e 10 correlacionam fortemente com os adultos.

A discriminação entre género masculino e feminino, mais ténue, é determinada pelas variáveis 11, 12, 19 e 22.

A estrutura dos dados é mais facilmente apreensível pelas representações ilustradas nas Figura 16, 17 e 18.

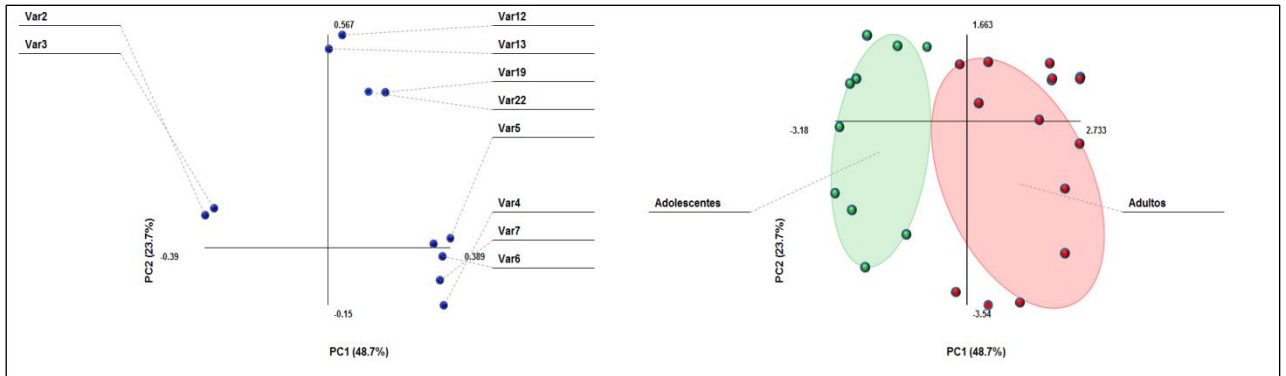


Figura 16 - Análise de componentes principais (Tabela 7). Distribuição dos casos em função da idade.

Área vermelha= Adultos; Área verde= Adolescentes.

Os casos correspondentes a adolescentes encontram-se bem separados dos casos correspondentes a adultos, nomeadamente ocupando o lado esquerdo e o lado direito ou seja, a diferenciação por idades ocorre ao longo do primeiro componente principal PC-1. É claramente perceptível a influência positiva das variáveis 2 e 3 na definição do grupo de adolescentes como anteriormente observado. Todos os casos se encontram mais dispersos ao longo do eixo PC-2. Esta dispersão tem a ver com a condição de género (Figura 18). De notar igualmente a maior dispersão de casos para o género feminino onde a variabilidade individual parece ser bem mais superior.

A Figura 17 ilustra a separação de casos em função do grupo etário ao longo dos 3 primeiros componentes principais PC-1, PC-2 e PC-3 que contêm 81% do total de variância explicada. Este valor é suficientemente elevado para dar credibilidade ao modelo quanto à caracterização dos grupos etários. É patente a dispersão também ao longo do eixo PC-3 (8% da variância explicada). Esta dispersão tem origem no facto de estarmos em presença de dois vectores que influenciam os casos em duas direcções quase ortogonais: o género e a idade.

De facto, como já se sugeriu anteriormente, a dispersão ao longo do eixo PC-2 parece ser dominada pela condição de género. A Figura 18 ilustra esta situação.

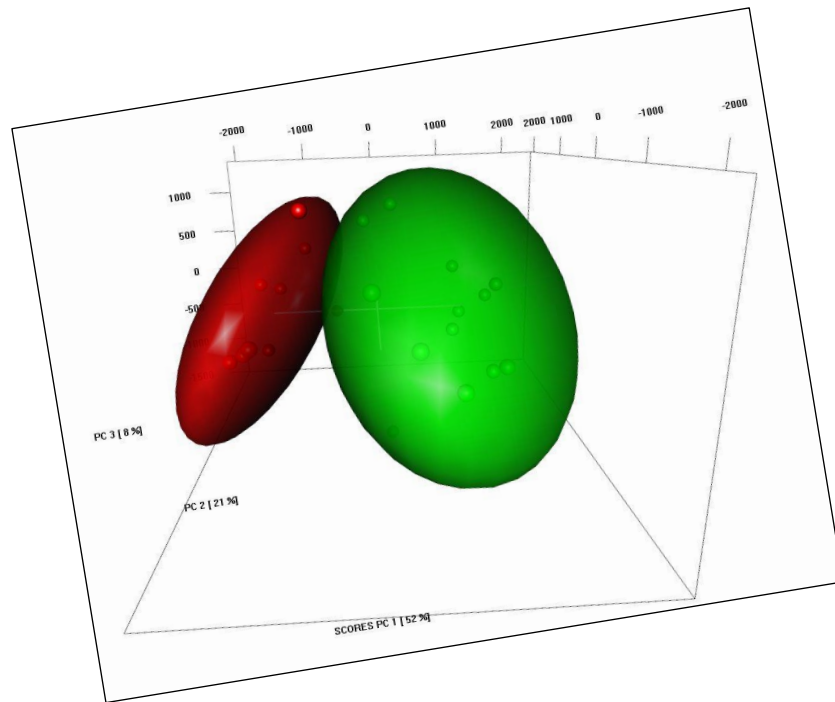


Figura 17 - Análise de componentes principais. Distribuição tridimensional de casos ao longo de PC-1, PC-2 e PC-3 (81% de variância explicada). Área vermelha= Adolescentes; Área Verde= Adultos.

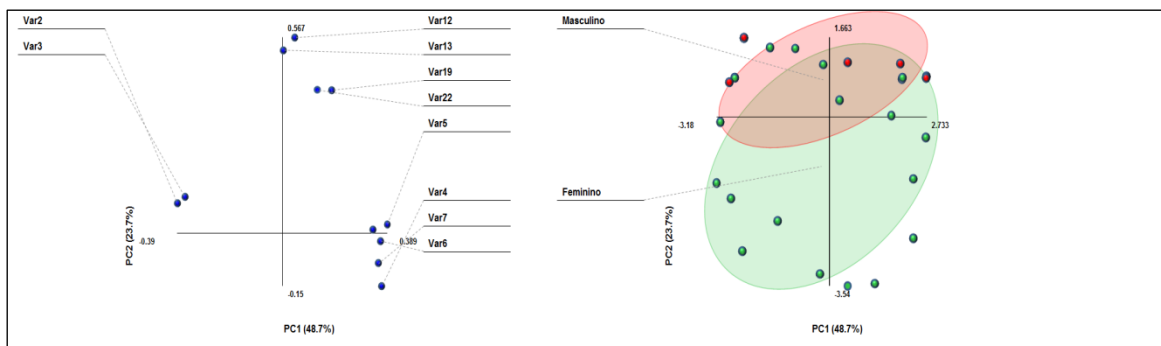


Figura 18 - Análise de componentes principais (Tabela 7). Distribuição dos casos em função do género. Área vermelha= Masculino; Área Verde= Feminino.

A análise da Figura 18 sugere que a condição de género é caracterizada por dois grupos de variáveis: as variáveis 5, 12, 13, 19 e 22 pesam na definição do género masculino, enquanto que as variáveis 4, 6 e 7 pesam na caracterização do género feminino.

No entanto, existe uma significativa zona de ambiguidade em que as duas áreas se interpenetram (Figura 19). Esta ambiguidade deve-se à grande dispersão do vector

género. Esta dispersão está associada a principalmente 4 casos, 19_1_F, 14_2_F e 23_4-F.

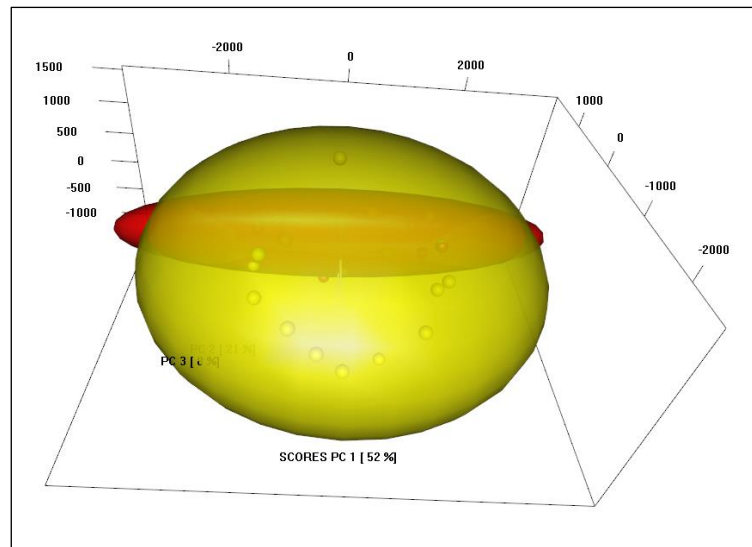


Figura 19 - Análise de componentes principais (Tabela 7). Distribuição tridimensional dos casos em função do género, ao longo dos PC-1, PC-2 e PC-3. Área vermelha= masculino; Área verde= Feminino.

A interpenetração deve-se à maior dispersão dos casos do género feminino.

2.3. Visão Global

A matriz inicial de 104 compostos resultantes da análise de cabelos provenientes de voluntários masculinos e femininos de idades entre os 14 e os 24 anos foi reduzida a 11 compostos contendo informação quanto ao grupo etário e ao género. O facto de algumas variáveis apresentarem pesos equivalentes sugere que a matriz poderia ainda ser mais reduzida. Porém, independente de investigações mais intensivas, as tentativas de reduzir o número de variáveis conduziu invariavelmente à perda de informação de género. A matriz utilizada na caracterização da população em estudo mostra que elas contêm informação quanto ao grupo etário e ao género. A combinação destes dois vectores influencia a distribuição dos casos em sentidos diferentes levando a uma distribuição do espaço tridimensional, definido pelos PC-1, PC-2 e PC-3, responsáveis por 81 % da variação total explicável, em quatro quadrantes, resultantes das quatro combinações possíveis: adultos masculinos, adultos femininos, adolescentes masculinos e adolescentes femininos, tal como ilustrado na Figura 20. É interessante verificar que

os centróides referentes a cada género estão bem definidos, sendo no género feminino onde se verifica uma maior variabilidade individual.

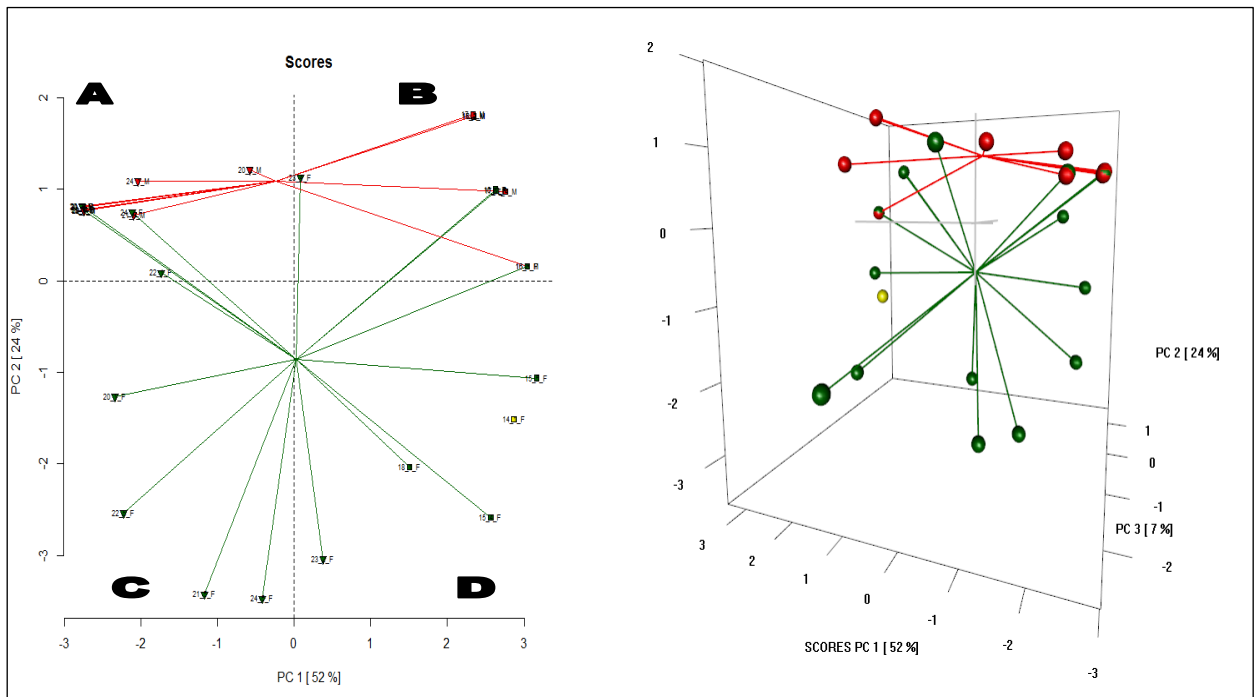


Figura 20 - Distribuição dos casos em função de género e grupo etário. À esquerda: Projecção bidimensional (PC-1 – PC2) com os quatro quadrantes definidos – A- Adultos masculinos; B - Adolescentes masculinos; C- Adultos femininos; D –Adolescentes femininos. À direita Projecção tridimensional (PC-1 – PC-2 – PC3). Vermelho – casos masculinos; verde – casos femininos.

2.3.1. Análise de aglomerados (Cluster analysis)

A Análise de agrupamentos é uma técnica de análise de multivariável que engloba um número de técnicas e algoritmos. O objectivo é encontrar, numa população descrita por um número de características, similaridades ou dissimilaridades em função de um determinado número de grupos em que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade fora do grupo. A análise de agrupamentos permite localizar com facilidade os casos deslocados que perturbam o modelo. Estes casos discrepantes poderiam ter sido tratados com tal (“outliers”) não fora o cuidado extremo a ter nestas situações. De facto a condição de “outlier” não implica que o caso seja descartado já que pode constituir um desvio aleatório ocasional, ou conter informação relevante sobre o sujeito. Nas actuais circunstâncias há que redobrar cuidados dado o universo relativamente pequeno de amostragem (42) bem como ao desequilíbrio entre os números de casos femininos e masculinos. Tal não se deve a menor cuidado na

amostragem, mas antes à dificuldade em recrutar voluntários. Existe uma resistência natural em ceder amostras de cabelo, em geral, e em particular por parte de elementos masculinos já que estes tendem a aceitar mal a eventual visibilidade da colheita, dado o menor volume de cabelo.

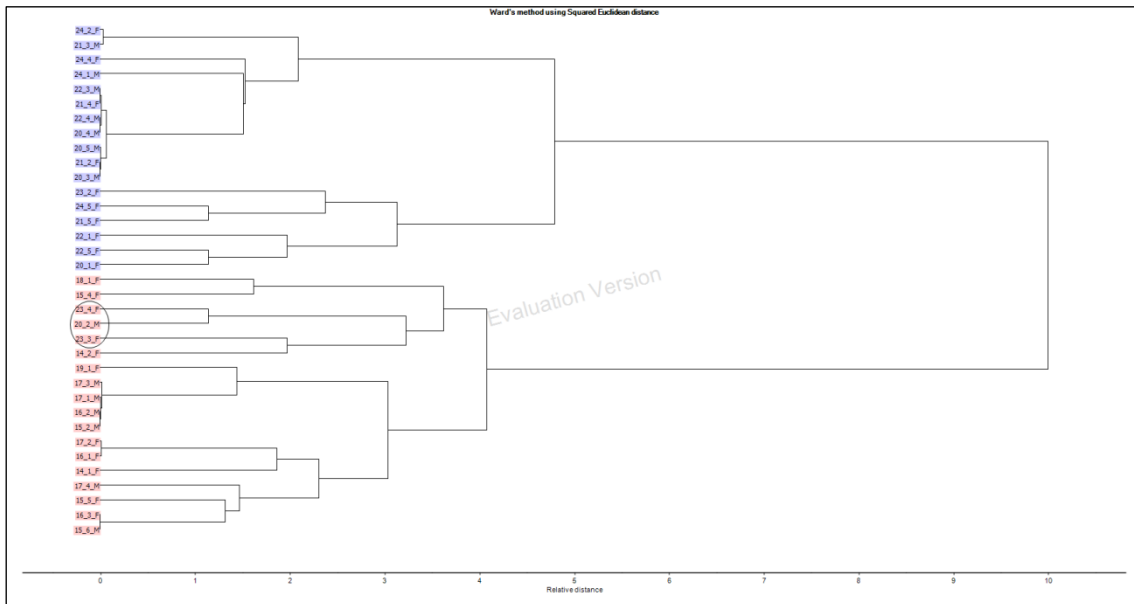


Figura 21 - Dendrograma de análise de aglomerado segundo o método de Ward usando distâncias euclidianas.

A Figura 21 mostra o dendrograma de aglomeração para a população de amostras segundo o método de Ward usando distâncias euclidianas. É visível a boa ordenação de adultos e adolescentes. Na ordem hierárquica alguns casos adultos tendem a ser mais próximos do grupo de adolescentes (elipse), provavelmente sob influência das variáveis que influenciam a condição de género. Note-se a tendência de similaridade entre géneros dentro de cada um dos grupos.

2.3.2. Análise discriminante Linear (LDA)

Análise Discriminante Linear (LDA) é um método de classificação que proporciona uma transformação linear dos vectores característicos n-dimensional (ou amostras) para um espaço m-dimensional ($m < n$), de modo a que as amostras que pertencem a mesma classe são juntas, mas amostras a partir de diferentes classes são afastadas umas das outras. LDA é um método de classificação supervisionada, dado que

as categorias segundo as quais os objectos devem ser classificados são conhecidas antes de o modelo ser criado. O objectivo de LDA é determinar os melhores parâmetros de ajuste para a classificação das amostras por um modelo desenvolvido. O modelo pode, em seguida, ser utilizado para classificar as amostras desconhecidas.

Fundamentalmente, a LDA maximiza as diferenças enquanto a PCA maximiza as semelhanças.

Os resultados obtidos na análise de componente principal para escala etária, levam a pensar que pode ser possível utilizar os dados da Tabela 7 para desenvolver um modelo classificativo baseado nessa mesma escala etária.

Assim, desenvolvi experiências com modelos de análise discriminante linear. Os resultados mostraram uma capacidade de previsão de 100% e uma capacidade de classificação de 100%.

A Figura 22 ilustra o modelo discriminante linear (LDA) aplicado ao universo dos casos com os dados da Tabela 7 em função da escala etária.

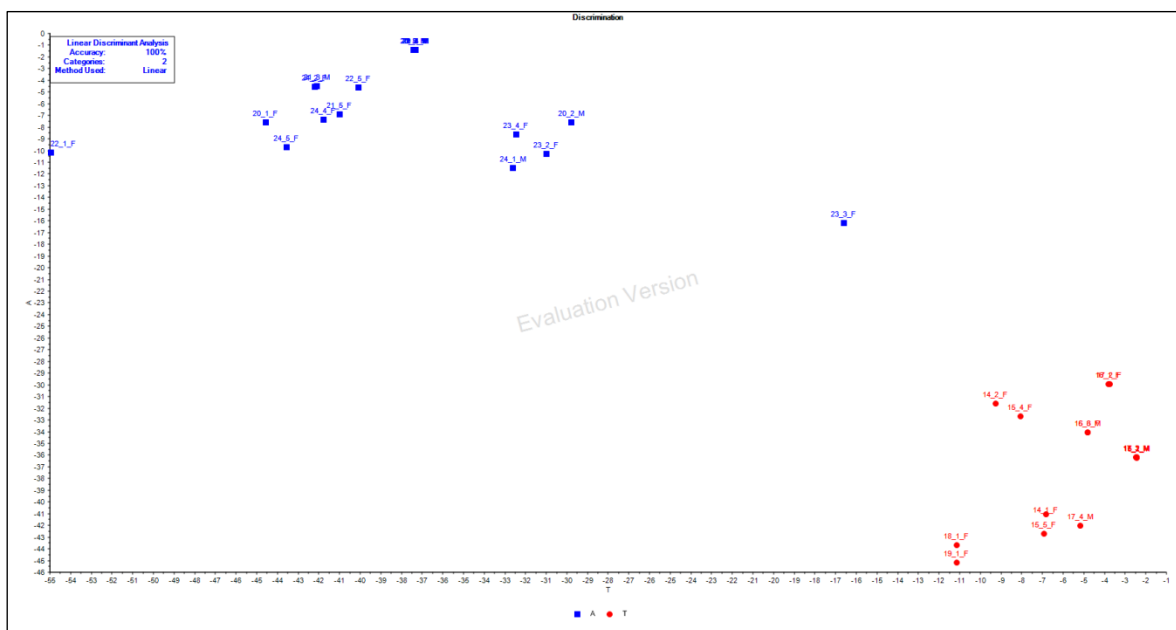


Figura 22 - Análise discriminante linear (LDA) para classificação por escala etária .- Adolescentes (vermelho) vs. Adultos (azul).

Os resultados mostram também uma elevada homogeneidade no grupo dos adolescentes mas uma maior dispersão no grupo dos adultos, entre os quais se distinguem os casos 22_1_F e 23_3_F muito afastados do centróide da função. A

eficiência da função discriminante torna-a adequada à classificação de desconhecidos. A aplicação a ciências forenses é forte candidata à utilização destes princípios.

Já no que se refere à classificação em função da condição de género, a situação, aliás esperada, não é tão favorável. A capacidade classificativa da função desce para 91,5%. Quatro casos femininos são erradamente classificados como masculinos (21_2_F, 21_4_F, 24_2_F e 24_4_F). Dos casos masculinos apenas um é erradamente classificado como feminino (15_6_M). A Figura 23 ilustra as capacidades classificativas da função. Estes resultados devem ser encarados com cuidado pois estão limitados pelo baixo número de amostras em geral.

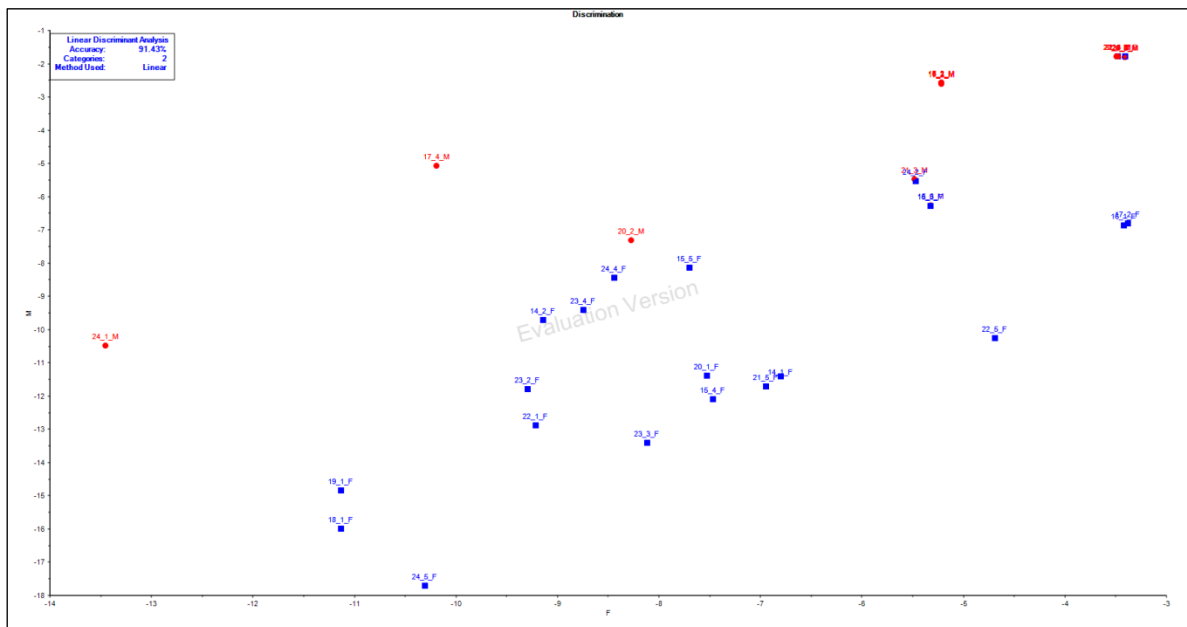


Figura 23 - Análise discriminante linear (LDA) para classificação em função da condição de género . - Feminino (azul) vs. Masculino (vermelho). Quatro casos femininos e um masculino são classificados erroneamente.

2.3.3. Desagregação da estrutura de dados

No grupo dos adultos é possível diferenciar entre condição de género como ilustra a Figura 24. Porém a dispersão é elevada e existe um número significativo de casos femininos fora do modelo. O baixo número de casos disponíveis e a desproporção entre o número de casos e o número de variáveis leva a olhar estes resultados com sérias reservas e à abstenção de mais comentários.

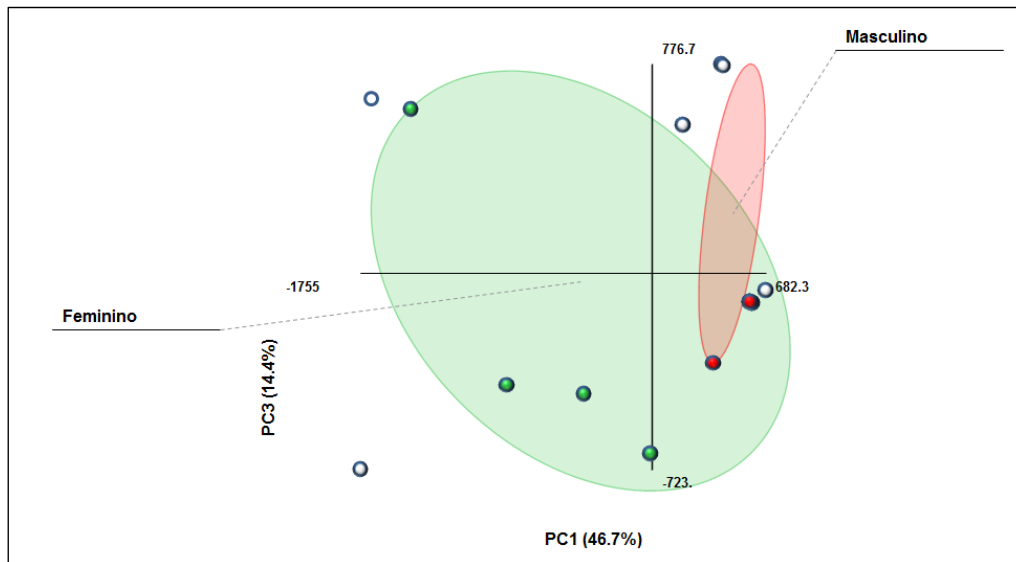


Figura 24 - Condição de género entre a população adulta.

Observações idênticas aplicam-se ao grupo dos adolescentes. Aqui todos os casos se encontram dentro do modelo e a dispersão é menor em cada um dos géneros. As reservas são as mesmas das já referidas para a população adulta (Figura 25).

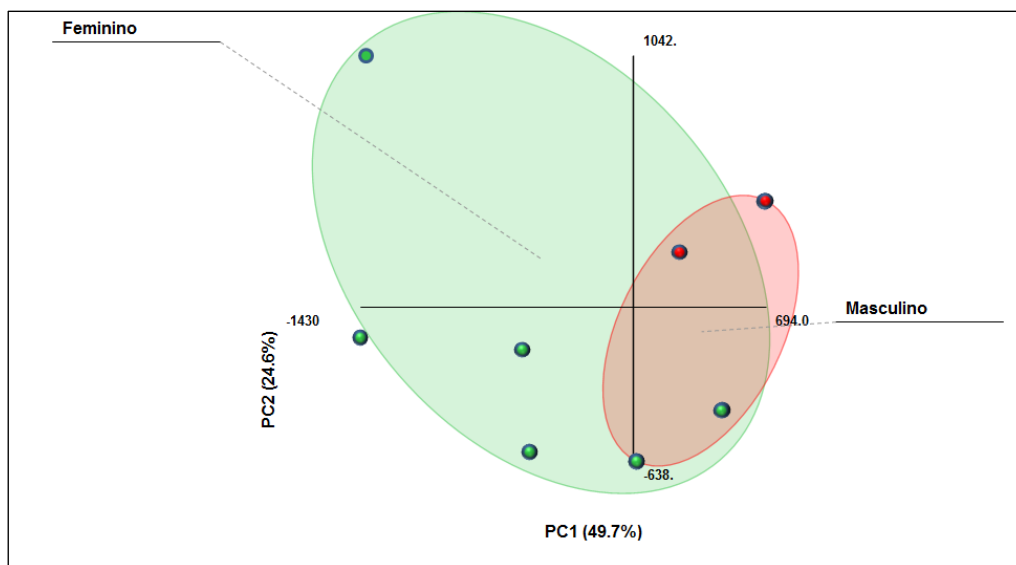


Figura 25 - Condição de género entre a população adolescente.

Pode postular-se que a condição de género é influenciada pela idade. Parece haver uma maior diferenciação na adolescência que tende a tornar-se menos nítida na idade adulta.

Esta tendência torna-se mais visível quando se modificam os valores da matriz, substituindo os valores quantitativos por um código apenas representativo da presença (1) ou ausência (2) de cada uma das variáveis em cada sujeito, utilizando o universo total em vez de subgrupos. Este artifício tem a vantagem de contornar as dificuldades em lidar com valores em falta, por um lado, e reduzir variações particulares individuais, por outro. A distribuição resultante está representada na Figura 26 e mostra mais claramente a diferenciação de género em cada um dos grupos etários. É interessante verificar que o modelo de distribuição ao longo de cada um dos PC1 e PC2 não apresenta alterações significativas. Continua a observar-se a distribuição em quatro quadrantes. A diferenciação etária tem lugar ao longo do PC1 e a diferenciação de género, ao longo do PC2.

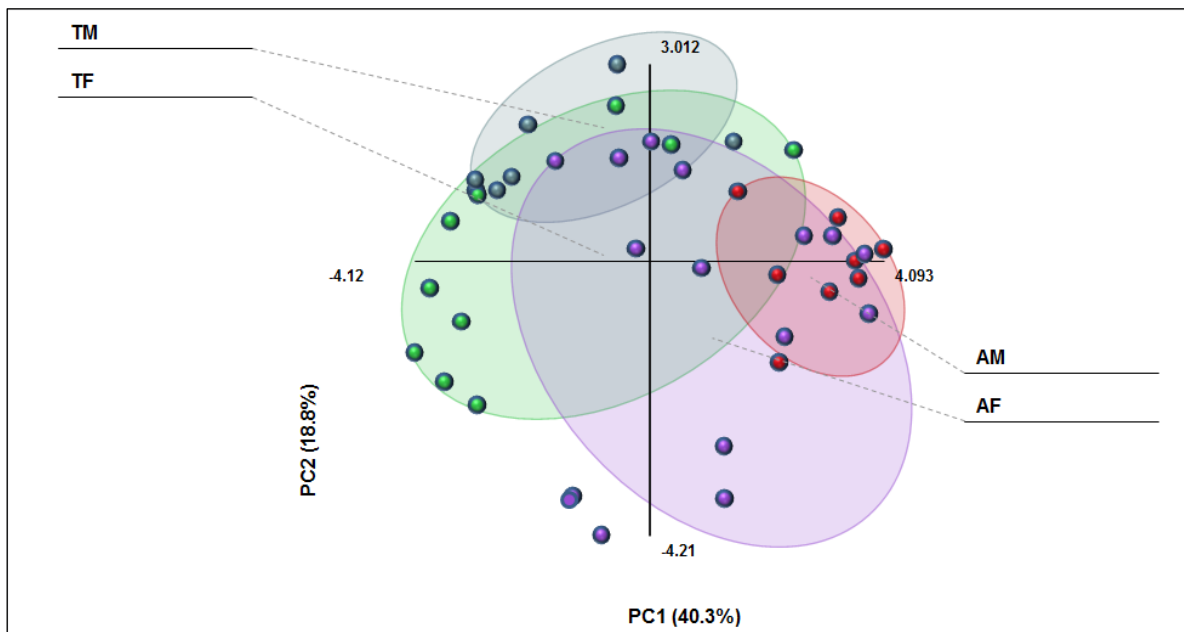


Figura 26 - Distribuição dos sujeitos por condição de género e condição etária utilizando como valores das variáveis apenas a condição de presente (1) ou ausente (2). TM- Adolescentes masculinos. TF- adolescentes femininos. AM- adultos masculinos. AF- Adultos Femininos.

A Figura 27 recorre à apresentação das linhas de tendência em cada conjunto tornando mais visível a tendência da evolução de género em função da idade.

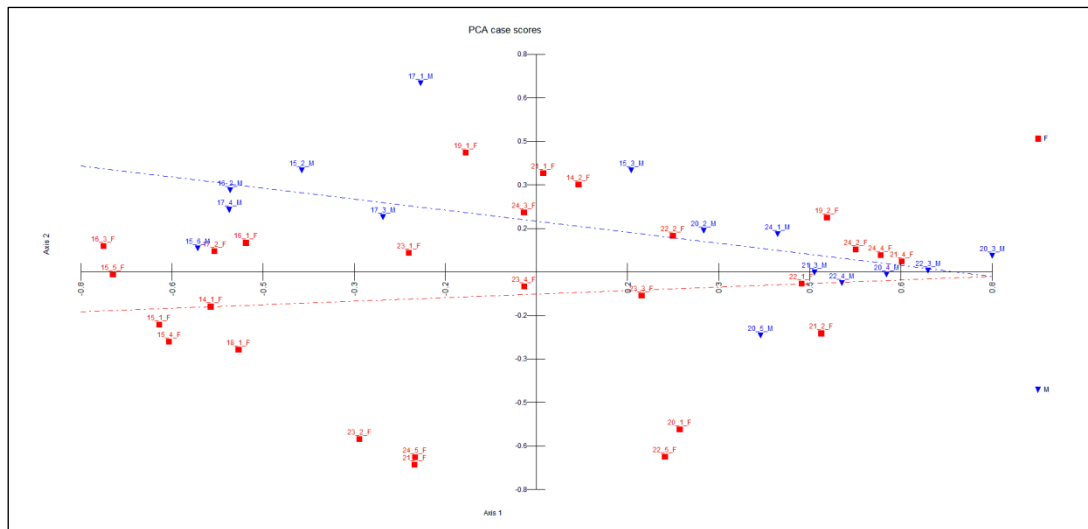


Figura 27 - Separação de género em função da idade ilustrada pelas correspondentes linhas de tendência.

Vermelho – Feminino (F); Azul – Masculino (M).

Esta tendência pode ser apenas aparente. O recálculo com base em análise factorial com extracção de factores pelo método “principal axis factoring” mostra que em ambos os grupos etários existe diferenciação entre os géneros bem clara na posição dos respectivos centroides. Porém, a diferenciação é prejudicada pela grande dispersão observada para o género feminino em geral, com particular expressão no grupo dos adultos (Figura 28), como já anteriormente observado.

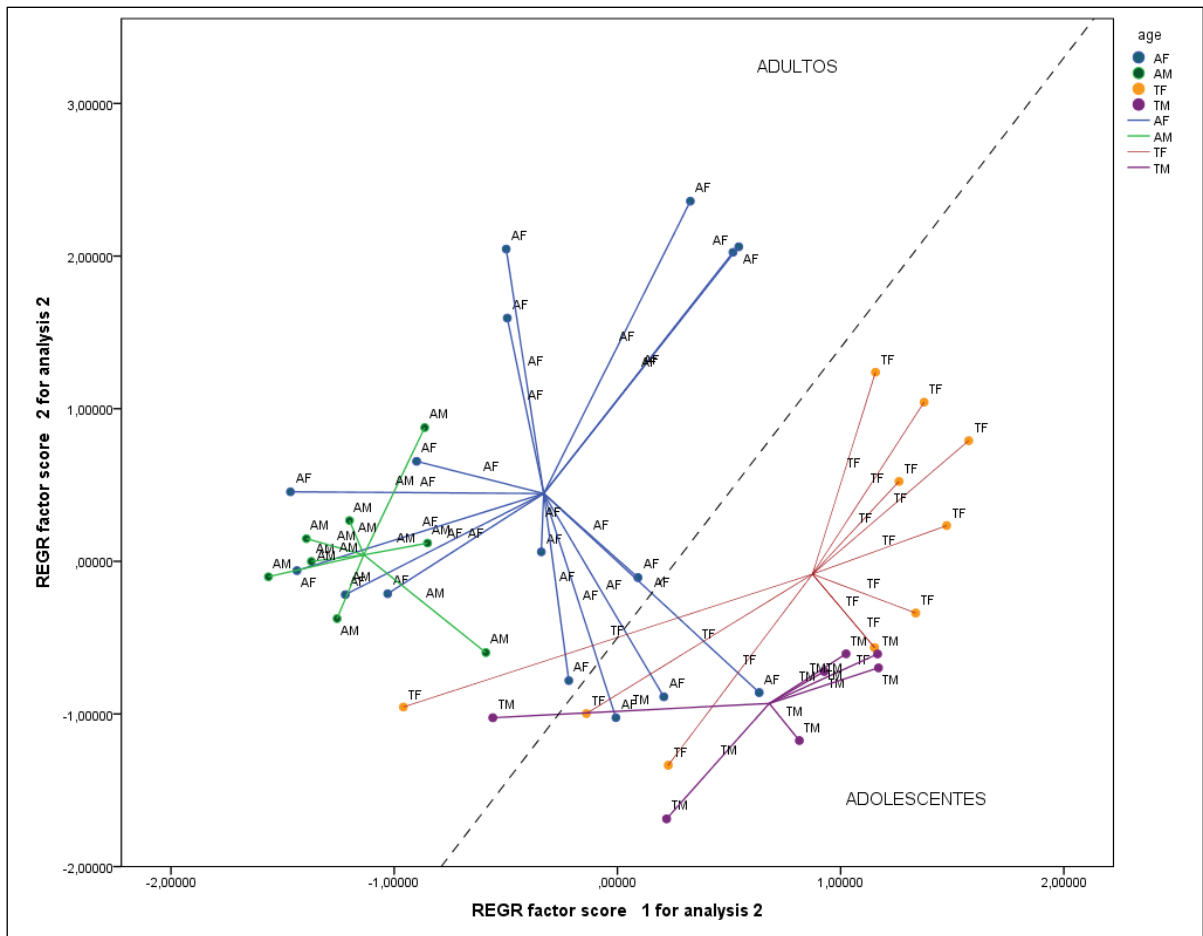


Figura 28 - Distribuição etária por condição de género (método da semelhança máxima), explicitando a posição dos centroides para cada grupo. TM- Adolescentes masculinos. TF- adolescentes femininos. AM- adultos masculinos. AF- Adultos femininos.

2.3.4. Simplificação da Matriz

A observação dos resultados descritos mostra que existem variáveis com pesos muito idênticos contendo informação redundante.

- Variáveis 2 e 3.
- Variáveis 12 e 13.
- Variáveis 4, 5, 6, 7 e 10.

Assim, a eliminação de variáveis, se efectivamente redundantes, não deveria ter influencia no modelo. A remoção das variáveis 2, 6, 7, 10 e 12, conduziu aos resultados seguintes, abaixo ilustrados graficamente.

2.3.4.1. PCA (Principal Componente Analysis – Análise de Componente Principal)

Mantem-se a distribuição por género e grupo etário, tal como atrás já mostrado. A variância explicada pelos PC-1 e PC-2 continua elevada- 77% do total. A dispersão dentro do grupo masculino em cada género é agora reduzida, mantendo-se a elevada dispersão dentro do género feminino. O padrão geral de distribuição mantém-se (Figura 29).

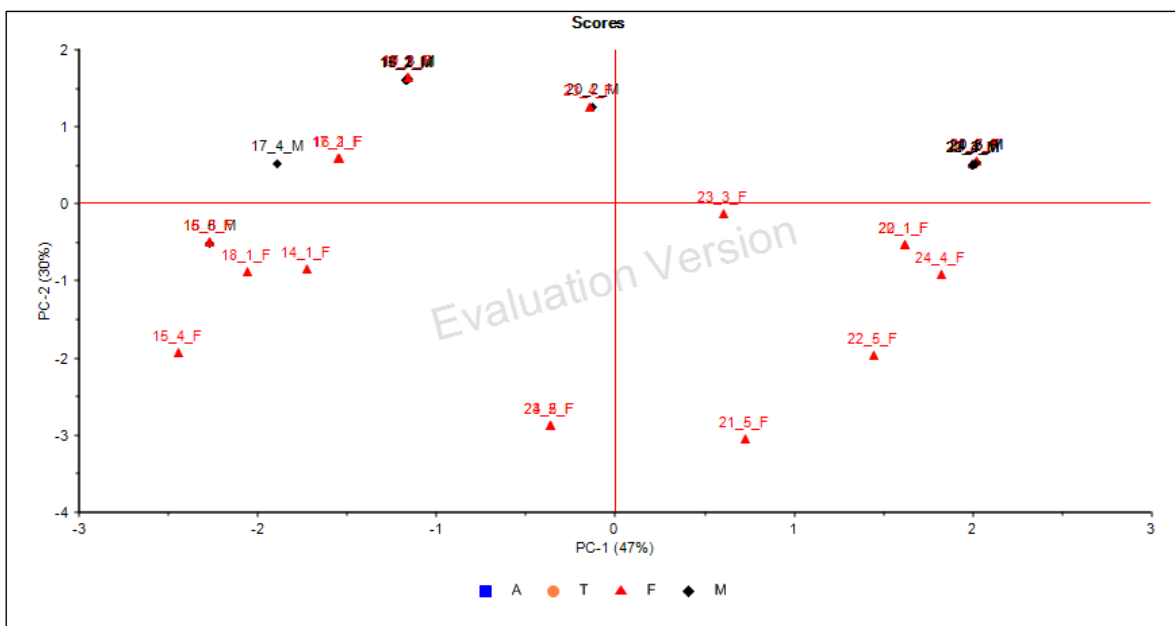


Figura 29 - Análise PCA (77% de variância) após remoção das variáveis 2, 6, 7, 10 e 12. Não existe alteração do modelo.

2.3.4.1. LDA (Linear Discriminant Analysis – Análise Discriminante Linear)

A capacidade de classificação e previsão entre adultos e adolescentes continua elevada (100%), como podemos observar na Figura 30.

Análise exploratória das potencialidades forenses do cabelo, com aplicação de técnicas de GC-MS.

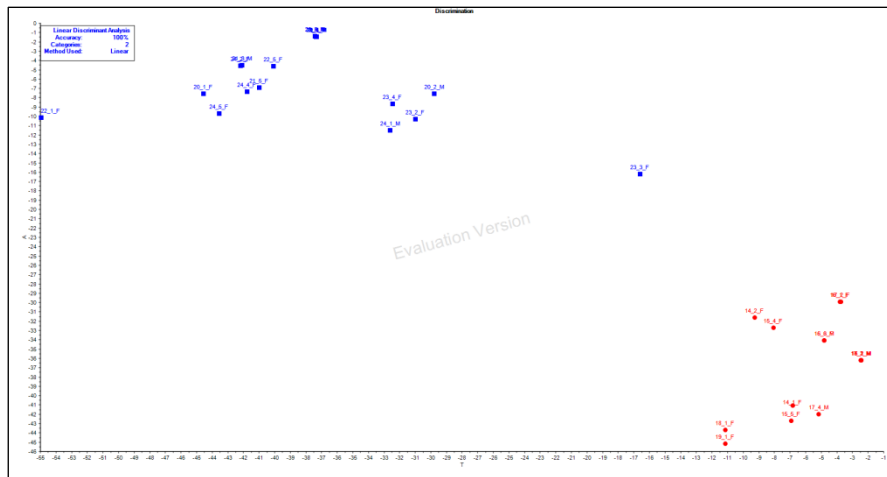


Figura 30 - Análise discriminante em função do grupo etário após eliminação das variáveis 2, 6, 7, 10, e 12. Vermelho=Adolescentes. Azul= Adultos.

As características discriminantes quanto à condição de género mantêm-se como anteriormente (Figura 31).

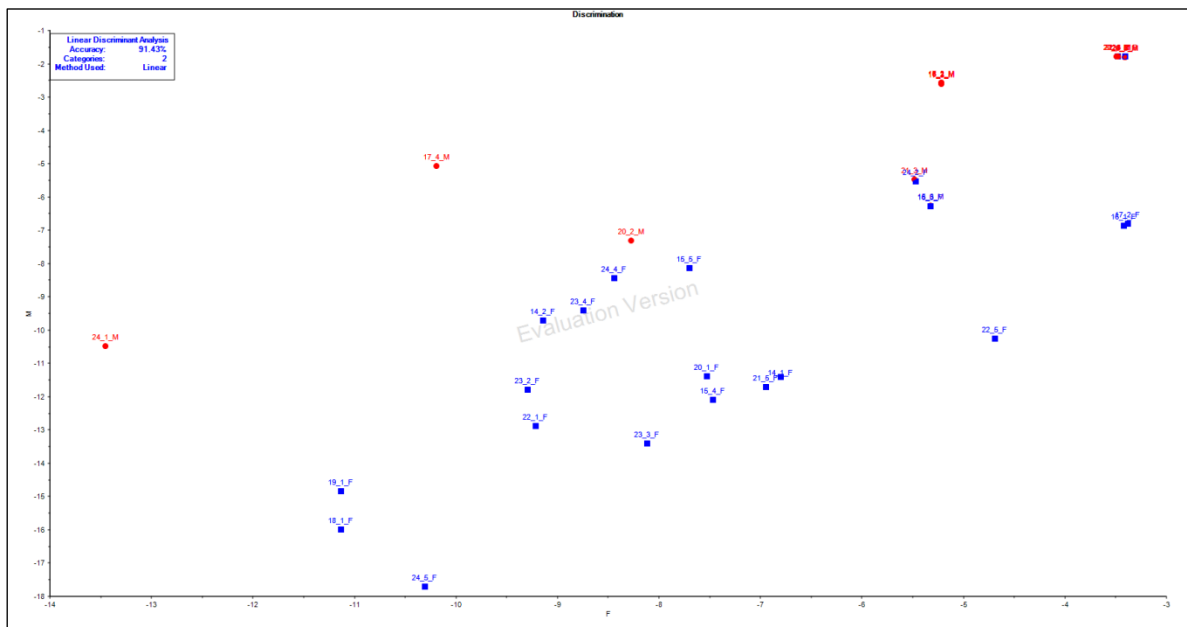


Figura 31 - Análise discriminante em função da condição de género após eliminação das variáveis 2, 6, 7, 10 e 12. Não existe alteração do modelo.

O significado prático destas observações não é de menor importância já que reduz a descrição do universo de observações seis variáveis : 3, 4, 5, 13, 19 e 22 das 11 iniciais. O impacto é ainda maior se se recordar que nas determinações iniciais foram

identificados 105 compostos nos extractos de cabelo analisados. A simplificação analítica introduzida na caracterização diferencial de extractos de cabelo é, assim, enorme. Trata-se de um exemplo significativo da importância das técnicas de redução de dados no reconhecimento de perfis característicos dentro de um universo de observações complexo.

2.4. Conclusão

A análise estatística de multivariável oferece um conjunto de técnicas de cálculo estatístico que permitem desconvolucionar estruturas de dados complexas de modo a permitir uma redução de variáveis, descortinar informação escondida em matrizes complexas, reconhecer padrões e desenvolver métodos de classificação de amostras e classificação de desconhecidos em grupos relevantes para o universo de amostras.

As técnicas de multivariável disponíveis (Componentes Principais, Análise Factorial, Análise Discriminante Linear) foram aplicadas a um conjunto complexo de variáveis, constituídas pelos compostos identificados em amostras de cabelo humano recolhidas de 42 voluntários de ambos os sexos com idades entre 14 e 24 anos, provenientes de condições ambientais e sociais e étnicas heterogéneas.

A análise de componente principal permitiu, numa fase inicial, reduzir o número de variáveis significativas simplificando, deste modo, o trabalho analítico necessário à caracterização das amostras em função da condição de género e do grupo etário. É possível, através da determinação dos compostos relevantes, reconhecer para cada amostra, o género masculino ou feminino e o grupo etário, adolescentes ou adultos, com elevado grau de probabilidade. Esta capacidade de reconhecimento de género é menor nos adultos, mas esta observação está fortemente condicionada pelo universo limitado de observações, nesta fase, e poderá apenas ser aparente devido à elevada dispersão intragrupos.

Os resultados obtidos permitiram ainda reduzir com segurança o número de variáveis descritivas a seis, dentro das 105 iniciais.

O método pode ser utilizado para fins classificativos na identificação de desconhecidos em função do grupo etário com probabilidade elevada e, com menor probabilidade, em função da condição de género. O composto *4-hidroxi-2-pentanona*, aparenta ser um marcador biológico do cabelo para o grupo dos adolescentes. Já os

ácidos hexanóico e heptanóico são potenciais biomarcadores da faixa etária dos adultos. Para a condição de género, os ácidos heptanóico, tridecanóico, *cis*-9-hexadecenóico e um ácido insaturado do ácido octadecanóico sobressaem para o grupo masculino, enquanto o ácido hexanóico destaca para o feminino.

Os resultados encontram-se limitados pelo número relativamente baixo de indivíduos/amostras, o qual condiciona o pressuposto de distribuição normal em cada subgrupo (etário e de género). Esta limitação deveu-se à dificuldade em obter voluntários com adesão ao projecto, nesta fase.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

O cabelo tem vindo a demonstrar ser uma amostra biológica de grande potencial na área da toxicologia forense, devido à sua estabilidade como matriz, pela facilidade de recolha e armazenamento e também por se tratar de uma matriz de recolha não-invasiva para os humanos.

Com o intuito de aumentar a fiabilidade dos resultados da análise do cabelo e conhecer os mecanismos de incorporação das substâncias nesta matriz, tornou-se evidente a necessidade de desenvolvimento de métodos de detecção e quantificação sensíveis e selectivos.

Para a determinação dos hábitos de consumo dos seres humanos mostrou-se interessante a utilização de cabelo porque, para além de não-invasiva, trata-se de uma matriz duradoura e estável no tempo. Contudo, há necessidade de usar procedimentos padronizados e de ser também conhecida a influência de diferentes parâmetros tais como a cor, a textura capilar e ainda os efeitos dos diferentes tratamentos capilares aos quais muitas vezes são sujeitos (alisamentos, permanentes, ondulação, entre outros). Há também a necessidade de conhecer o eventual efeito da incorporação dos poluentes ambientais. O objectivo é haver o maior conhecimento da composição química do cabelo para esta ser utilizada como referencial em análises e estudos.

O estudo realizado no âmbito desta dissertação de mestrado pretendia averiguar os hábitos de consumo dos jovens universitários nos dias de hoje. Contudo, esta análise não se demonstrou possível. Talvez porque o estudo não foi direccionado especificamente aos (potenciais) marcadores químicos, mas sim, por se haver estudado todos os compostos presentes nas amostras. Se o modo de aquisição tivesse sido o SIM (monitorização de ião selectivo) em vez do estudo alargado usando TIC (corrente iónica total), talvez se obtivesse outra informação, mais específica.

Não tendo sido detectados compostos tidos como eventuais/potenciais marcadores de consumo de álcool e/ou de tabaco, mostrou-se então importante a realização do estudo de multivariável. Este permitiu a desconvolução da composição de uma matriz que se mostrou complexa, de modo a reduzir as 104 variáveis iniciais (compostos) para 6, proporcionando a leitura/racionalização da informação obtida. Este estudo mostrou potencial para ser utilizado como ferramenta para fins classificativos, na identificação de desconhecidos (população) em função do grupo etário (com

probabilidade elevada) e, com menor probabilidade, em função da condição de género. No entanto, pode e deve ser aperfeiçoado/alargado para que sejam reunidas as condições de amostragem cientificamente aceites no respeitante ao número de indivíduos, sendo estes resultados considerados como exploratórios.

Os resultados obtidos são promissores quanto à sua aplicação, nomeadamente em ciência forense. Tal deverá vir a ser a continuação natural do presente trabalho, tendo em conta a necessidade de o reavaliar num universo populacional muito mais alargado, idealmente deverá ser superior a 100, para que os resultados possam ter um valor definitivamente conclusivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aderjan R. E. [et al.]** Ethyl Glucuronide A Non-Volatile Ethanol Metabolite in Human Hair [Jornal]. - [s.l.] : International Association of Forensic Toxicologists, 1994.
- Agius R. [et al.]** Validation of a headspace solid-phase microextraction–GC–MS/MS for the determination of ethyl glucuronide in hair according to forensic guidelines. [Jornal]. - Berlin : Forensic Science International, 2010. - Vol. 196. - pp. 3-9.
- Al-Delaimy Wael.** Hair as a biomarker for exposure to tobacco smoke [Artigo] // Tobacco Control. - 2002. - Vol. 11. - pp. 176–182.
- Alt A. [et al.]** Determination of ethyl- glucuronide in hair samples. [Artigo] // Alcohol & Alcoholism. - 2000. - Vol. 35. - pp. 313-314.
- Auwarter V. [et al.]** Fatty Acid Ethyl Esters in Hair as Markers of Alcohol Consumption. Segmental Hair Analysis of Alcoholics, Social Drinkers, and Teetotalers. [Jornal]. - Berlin : Clinical Chemistry, 2001. - Vol. 12. - pp. 2114–2123.
- Balíková Marie** Hair Analysis for Drugs of Abuse. Plausibility of Interpretation. [Artigo] // Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. - 2005. - pp. 199-207.
- Barroso M. [et al.]** Simultaneous quantitation of morphine, 6-acetylmorphine, codeine, 6-acetylcodeine and tramadol in hair using mixed-mode solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. [Jornal]. - Lisboa : Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. - 396.
- Baumgartner A.M. [et al.]** Radioimmunoassay of Hair for Determining Opiate-Abuse Histories [Jornal]. - Los Angeles : The Journal of Nuclear Medicine, 1979. - Vol. 20. - pp. 748-752.
- Boumba V. A., Ziavrou K. S. e Vougiouklakis T.** Hair as a Biological Indicator of Drug Use, Drug Abuse or Chronic Exposure to Environmental Toxicants. [Artigo] // International Journal of Toxicology. - 2006. - pp. 143-163.
- Carter Melissa [et al.]** Health outcomes in adolescence: Associations with family, friends and school engagement [Artigo] // Journal of Adolescence. - 2007. - pp. 51-62.
- Casper J.L..** Praktisches Handbuch der Gerichtlichen Medizin [Livro]. - Berlin : Hirschwald, 1858. - Vol. II.

- Chattopadhyay D. K. e C. Webster D.** Thermal stability and flame retardancy of polyurethanes [Artigo] // Progress in Polymer Science. - 2009. - Vol. 34. - pp. 1068–1133.
- Chattopadhyay D.K. and Raju K.V.S.N.** Structural engineering of polyurethane coatings for high performance applications [Journal] // Progress in Polymer Science. - 2007. - Vol. 32. - pp. 352-418.
- Chelliah H.K. [et al.]** Effect of sodium bicarbonate particle size on the extinction condition of non-premixed counterflow flames [Journal] // Combustion and Flame. - 2003. - Vol. 134. - pp. 261-272.
- Chetiyankornkul Thaneeya [et al.]** Hair analysis of nicotine and cotinine for evaluating tobacco smoke exposure by liquid chromatography–mass spectrometry [Artigo] // Biomed. Chromatogr.. - 2004. - Vol. 18. - pp. 655–661.
- Cooper G. A., Kronstrand R. e Kintz P.** Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. [Artigo] // Forensic Science International. - 2012. - pp. 20-24.
- Durães L., Campos J. and Portugal A.** Reaction Path of Energetic Materials [Journal] // AIP Conf. Proc.. - 1998. - Vol. 429. - pp. 341-344.
- Feijó Ricardo Becker e Oliveira Ércio Amaro.** Comportamento de risco na adolescência [Artigo] // Jornal de Pediatria. - 2001. - pp. 125-134.
- Furniss B.S. [et al.]** VOGEL'S Textbook of Practical Organic Chemistry [Livro]. - England : Longman Scientific & Technical, 1989.
- Gordo J. M. Oliveira** O cabelo como amostra biológica em toxicologia forense [Relatório]. - Porto : Universidade Fernando Pessoa, 2013.
- Gorrod J.W. e Jacob III P..** Analytical Determination of Nicotine and Related Compounds and Their Metabolites [Jornal]. - [s.l.] : Elsevier, 1999.
- Grapov D. e Newman J.W..** imDEV: a graphical user interface to R multivariate analysis tools in Microsoft Excel. [Jornal]. - [s.l.] : Bioinformatics, Setembro de 2012. - Vol. 28 (17). - pp. 2288-2290.
- Haley N. J. e Hoffmann D.** Analysis for Nicotine and Cotinine in Hair to Determine Cigarette Smoker Status. [Artigo] // Clinical Chemistry. - 1985. - pp. 1598-1600.
- Ionescu M.** Chemistry and Technology of Polyols for Polyurethanes [Livro]. - UK : Rapra technology, 2005.
- Ishiyama I., Nagai T. e Toshida S..** Detection of Basic Drugs (Methamphetamine, Antidepressants, and Nicotine) From Human Hair. [Jornal]. - [s.l.] : Journal of Forensic Sciences, 1983. - Vol. 28.

- Jurado C. [et al.]** Diagnosis of chronic alcohol consumption Hair analysis for ethyl-glucuronide [Artigo] // Forensic Science International. - 2004. - Vol. 145. - pp. 161–166.
- Jurado C. [et al.]** Diagnosis of chronic alcohol consumption Hair analysis for ethyl-glucuronide [Jornal] // Forensic Science International. - Sevilla : [s.n.], 15 de Junho de 2004. - 145. - pp. 161–166.
- Katzung B. G.** Farmacologia Básica e Clínica [Livro]. - São Paulo : McGraw-Hill Companies, Inc., 2007.
- Kijewski H.** Das Haar als Spur-Spuren in Haaren [Livro]. - [s.l.] : Schmidt Romhild, 1997. - Vol. 16.
- Klug E..** Zur Morphinbestimmung in Kopfhaaren [Jornal]. - Berlin : Zeitschrift für Rechtsmedizin, 1980. - Vol. 84. - pp. 189-193.
- Linley P. Alex e Joseph Stephen.** Positive Psychology in Practice [Livro]. - New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- Marsh A., Evans M. e Strang J.** Radioimmunoassay of drugs of abuse in hair Part 2: The determination of methadone in the hair of known drug users. [Artigo] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. - 1995. - pp. 829-839.
- Mendonca M. [et al.]** Aqueous Emulsion Explosive with TNT [Journal] // Energetic Materials -Technology, Manufacturing and Processing. - 1996. - Vol. P56. - pp. 1-13.
- Mizuno A. [et al.]** Analysis of nicotine content of hair for assessing individual cigarette-smoking behavior. [Jornal]. - [s.l.] : Therapeutic drug monitoring, Abril de 1993. - Vol. 15. - pp. 99-104.
- Musshoff F. [et al.]** Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of cannabinoids in hair samples. [Jornal]. - Bonn : Forensic Science International, 2003. - 133. - pp. 32–38.
- Musshoff F. e Madea B..** Analytical pitfalls in hair testing [Jornal]. - Bonn : Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. - 388.
- Myers Peter L. e Isralowitz Richard E..** Alcohol [Livro]. - Santa Barbara, California : Greenwood, 2011.
- Naka R. [et al.]** Rigid polyurethane foam and process for producing the same [Patente] : EP 0 443 158 B1. - 18 de December de 1990.
- Nakahara Y.** Detection and diagnostic interpretation of amphetamines in hair [Jornal]. - Tokyo : Forensic Science International, 1995. - 70.

Nakahara Y. Hair analysis for abused and therapeutic drugs [Artigo] // Journal of Chromatography B. - 1999. - pp. 161-180.

Neves Andreia Catarina Cardoso das Comportamento de Espumas de Poliuretano no Processo de Colagem à Chama [Relatório] : M.Sc. thesis / Departamento de Química ; Universidade de Aveiro. - Aveiro : [s.n.], 2010.

Oliveira C. D. [et al.] Recent Advances in Chromatographic Methods to Detect Drugs of Abuse in Alternative Biological Matrices. [Artigo] // Current Pharmaceutical Analysis. - 2007. - pp. 95-109.

Oliveira C. D. [et al.] Recent Advances in Chromatographic Methods to Detect Drugs of Abuse in Alternative Biological Matrices. [Artigo] // Current Pharmaceutical Analysis. - 2007. - pp. 95-109.

Oliveira C.B. [et al.] Estudo da Nicotina através da Quimioprevenção [Jornal]. - São Paulo : Revista da Universidade Ibirapuera, 2011. - Vol. 1.

Pichini Simona [et al.] Hair analysis for nicotine and cotinine: evaluation of extraction procedures, hair treatments, and development of reference material. [Artigo] // Forensic Science International. - 1997. - Vol. 84. - pp. 243-252.

Pinto Moisés L. Formulation, Preparation, and Characterization of Polyurethane Foams [Jornal] // Journal of Chemical Education. - 2010. - Vol. 87. - pp. 212-215. - 2.

Pragst F. [et al.] Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). [Jornal] // Forensic Science International. - Berlim : [s.n.], 2001. - Vol. 121. - pp. 76-88.

Pragst F. e Balikova M. A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. [Artigo] // Clinica Chimica Acta. - 2006. - pp. 17-49.

Pragst F. e Balikova M. A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. [Artigo] // Clinica Chimica Acta. - 2006. - pp. 17-49.

Pragst F.. Pitfalls in hair analysis // Analytical Pitfalls and Trends in Clinical and Forensic Toxicology. - Munich : [s.n.], 2004.

Pragst Fritz Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology [Artigo] // Anal Bioanal Chem. - 2007. - Vol. 388. - pp. 1393-1414.

Ribeiro José L.P. Introdução à Psicologia da Saúde [Livro]. - Coimbra : Quarteto Editora, 2007.

Rodrigues João FCIências [Online] // FCIências. - FCIências, 22 de Novembro de 2012. - 26 de Fevereiro de 2014. - <http://www.fciencias.com/2012/11/22/6257/>.

- Saar-Tsechansky M. e Provost F.** Handling missing values when applying classification models. [Jornal]. - [s.l.] : J. Machine Learn. Res., 2007. - Vol. 8. - pp. 1625-1657.
- Sachs H.** History of hair analysis. [Artigo] // Forensic Science International. - 1997. - pp. 7-16.
- Schafer J.L. e Graham J.W.** Missing Data: Our View of the State of the Art. [Jornal]. - [s.l.] : Psychological Methods, 2002. - Vol. 7 (2). - pp. 147-177.
- Singh H. e Jain A. K.** Ignition, Combustion, Toxicity, and Fire Retardancy of Polyurethane Foams: A Comprehensive Review [Jornal] // Journal of Applied Polymer Science. - 2009. - Vol. 111. - pp. 1115-1143.
- Skopp G. [et al.]** Ethyl Glucuronide in Human Hair [Jornal] // Alcohol and Alcoholism. - Mainz : [s.n.], 2000. - Vol. 35. - pp. 283-285.
- Sporkert F. & Pragst, F.** Determination of methadone and its metabolites EDDP and EMDP in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. [Jornal]. - Berlim : Journal of Chromatography B, 2000. - 746.
- Srogi K.** Hair Analysis as Method for Determination of Level of Drugs and Pharmaceutical in Human Body: Review of Chromatographic Procedures. [Artigo] // Analytical Letters. - 2006. - pp. 231–258.
- Toledo F. [et al.]** Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. [Jornal]. - São Paulo : Journal of Chromatography B, 2003. - 798. - pp. 361–365.
- Torobin L.** Hollow plastic microspheres [Patente] : US 4303736 A. - 1 de December de 1981.
- Turchini L. [et al.]** Method for the production of polyurethanes and of expanded polyurethane foams [Patente] : EP 0 682 050 A1. - 6 de April de 1995.
- UNESCO** United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization [Online] // UNESCO. - 07 de Junho de 2013. - <http://www.unesco.org/new/en/social-and-human-sciences/themes/youth/youth-definition/>.
- Valente D. [et al.]** Hair as the sample in assessing morphine and cocaine addiction. [Jornal]. - [s.l.] : Clinical Chemistry, 1981. - Vol. 27.

Wada M. [et al.] Analytical methods for abused drugs in hair and their applications. [Artigo] // Anal Bioanal Chem. - 2010. - pp. 1039-1067.

Wada M. [et al.] Analytical methods for abused drugs in hair and their applications. [Artigo] // Anal Bioanal Chem. - 2010. - pp. 1039–1067.

Wang F. Polydimethylsiloxane Modification of Segmented Thermoplastic Polyurethanes and Polyureas [Relatório]: Ph.D. thesis / Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University . - Virginia : [s.n.], 1998.

Wells D. Drug administration and sexual assault: sex in a glass. [Artigo] // Science & Justice. - 2001. - pp. 197-199.

WHO Social determinants of health and well-being among young people: Health Behaviour in School-Aged Children (HBSC) study : international report from the 2009/2010 survey [Relatório]. - Copenhagen : WHO Regional Office for Europe, 2012, 2012.

WHO Young people's health - a challenge for society [Relatório]. - Geneva : World Health Organization, 1986.

Yegles M. [et al.] Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotalers. [Jornal]. - Berlin : Forensic Science International, 2004. - Vol. 145. - pp. 167-173.

Yildiz D. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects [Jornal]. - Antakya : Elsevier, 2004. - Vol. 43.

Zahlsen K. e Nilsen O.G. Nicotine in hair of smokers and non-smokers:sampling procedure and gas chromatographic/mass spectrometric analysis. [Jornal]. - Norway : Pharmacology & Toxicology, 1994. - Vol. 75. - pp. 143–9.

ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS

1. Cromatogramas da lavagem.	p. III
2. Cromatogramas da hidrólise.	p. IV
3. Cromatogramas da extracção por solvente	p. VII
3.1. Metanol	p. VII
3.2. Diclorometano	p. XII
3.3. Hexano	p. XIV

1. CROMATOGRAMAS DA LAVAGEM.

O resultado obtido nos procedimentos de lavagem está apresentado nas figuras 1, 2 e 3. Como podemos observar, esta não demonstra a presença de nenhum composto. Nem após a concentração da amostra, recorrendo-se a uma corrente de azoto.

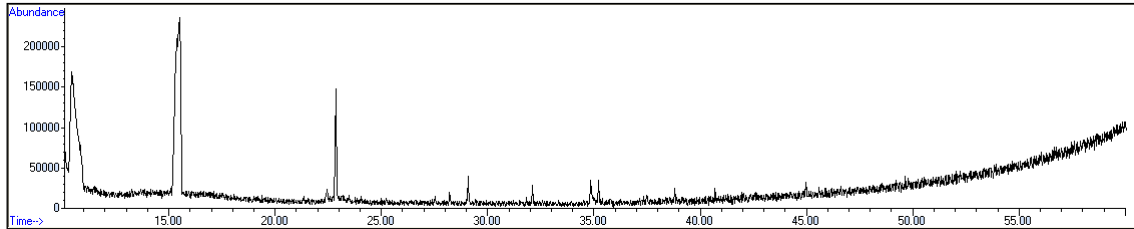


Figura 1 – TIC: Solvente_Hexano.

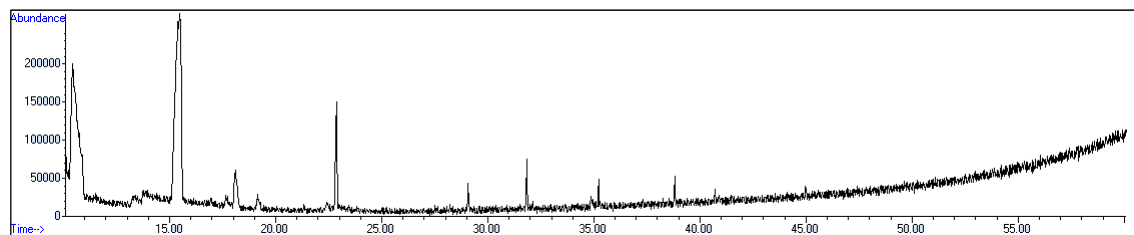


Figura 2 – TIC: Hexano utilizado na lavagem da amostra, antes concentrado.

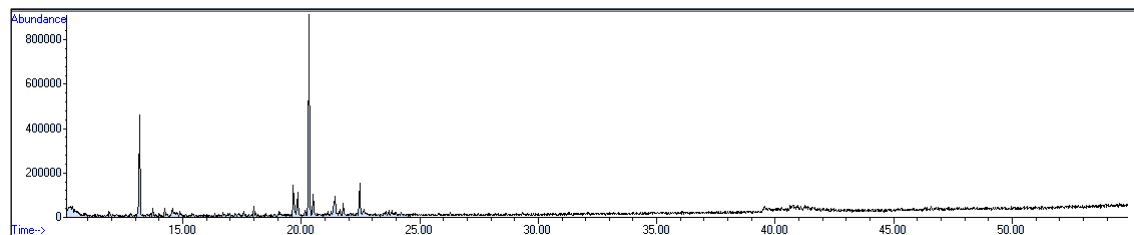


Figura 3 – TIC: Hexano utilizado na lavagem da amostra, depois de concentrado.

Maioritariamente, encontramos picos de coluna e os compostos encontrados não são de interesse, para o estudo. O cromatograma da lavagem é muito semelhante ao cromatograma do solvente (hexano).

Todos estes compostos foram identificados por comparação com os da biblioteca NIST05a (MS Library).

2. CROMATOGRAMAS DA HIDRÓLISE

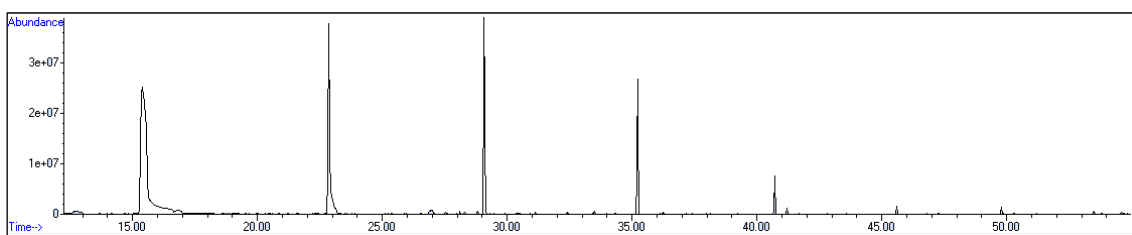


Figura 4 – TIC: HCL_extracção com diclorometano.

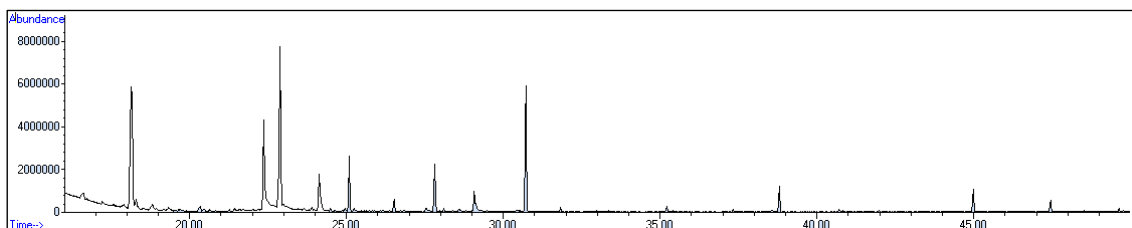


Figura 5 – TIC: HCL_extracção com diclorometano (após sililação).

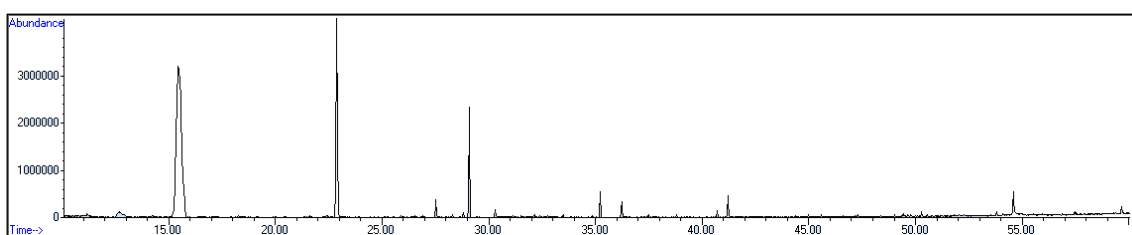


Figura 6 – TIC: HCL_extracção com hexano.

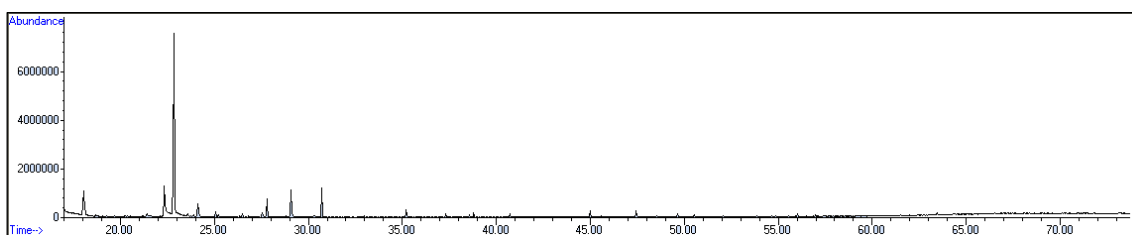


Figura 7 – TIC: HCL_extracção com hexano (após sililação).

Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos nos cromatogramas através do GC-MS foi realizada uma compilação, como podemos observar na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados obtidos das análises efectuadas após a extracção por ácido clorídrico com diclorometano e hexano.

RT	Composto	Ext. com diclorometano	Ext. c/ diclorometano (sililado)	Ext. com hexano	Ext. com hexano (sililado)
24,1	2-Etoxietil dietilamina		X		
26,52	Octano, 1-cloro		X		

Análise exploratória das potencialidades forenses do cabelo, com aplicação de técnicas de GC-MS.

27,82	Benzenamina, N,N-dimetil-	X	X
29,91	3,4-Dimetil fenol,	X	
30,3	Ácido benzóico		X
32,74	2-Fenoxi etanol,		X
33,36	Benzotiazole	X	X
36,23	1,2- Benzeno dicarboxilato		X
38,81	Tetradecano	X	
44,99	Hexadecano	X	

Na hidrólise básica obtiveram-se os resultados apresentados nas amostras 8, 9, 10 e 11.

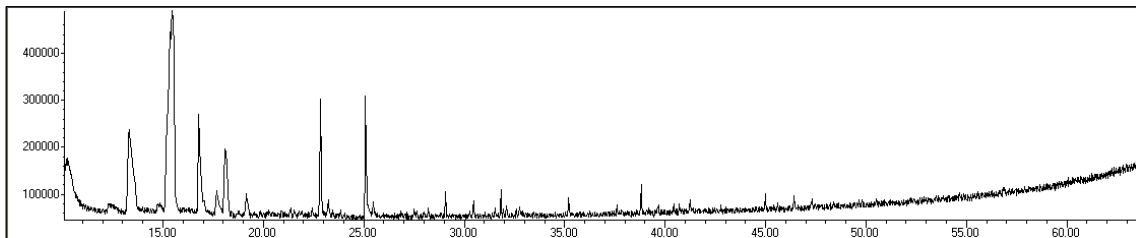


Figura 8 – TIC: NaOH_extracção com diclorometano.

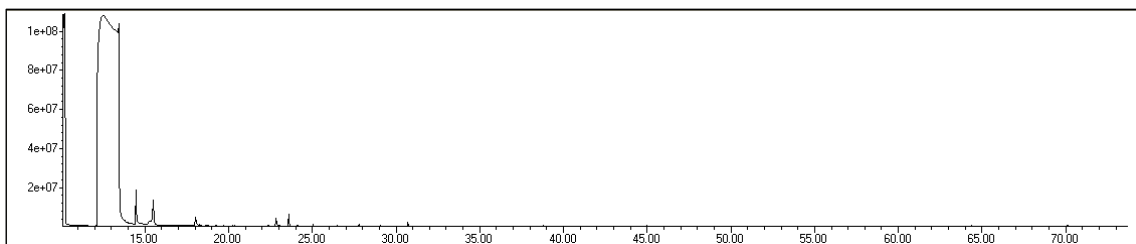


Figura 9 – TIC: NaOH_extracção com diclorometano (após silição).

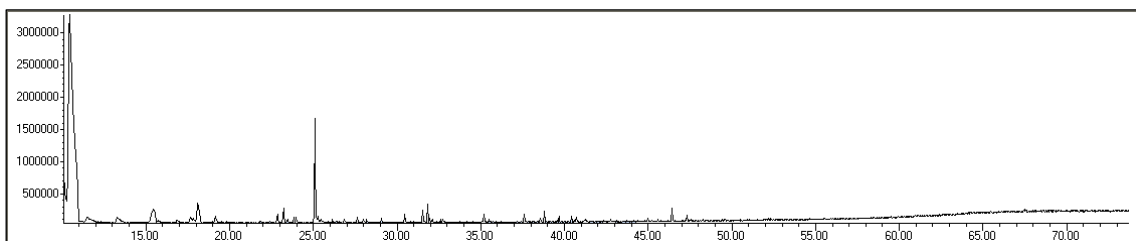


Figura 10 – TIC: NaOH_extracção com hexano.

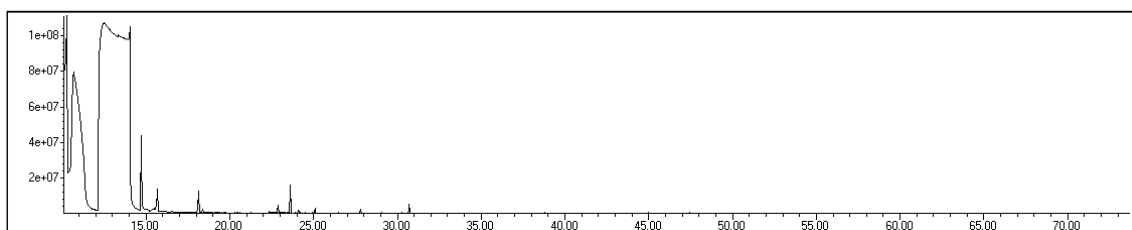


Figura 11 – TIC: NaOH_extracção com hexano (após sililação).

Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos na hidrólise básica, nos cromatogramas através do GC-MS, foi realizada uma compilação, como podemos observar na tabela 2.

Tabela 2 - Resultados obtidos na hidrólise por hidróxido de sódio com diclorometano e hexano.

RT	Composto	Ext. com diclorometano	Ext. c/ diclorometano (sililado)	Ext. com hexano	Ext. com hexano (sililado)
10,46	Heptano			X	
12,30	Dimetil dissulfeto			X	
13,28	Piridina		X		X
13,32	Tolueno	X		X	
16,76	Acetato de manganês (II)	X			
17,67	Etilbenzeno			X	
18,08	o-Xileno			X	
19,16	p-Xileno			X	
19,38	Nonanal			X	
21,93	Propil benzeno			X	
22,27	1-Etil-2-metil- benzeno,			X	
23,75	1,2,3-trimetil-Benzeno			X	
24,09	2-Etoxietyl, dietilamina		X		X
25,09	2-Octeno, (E)-	X			
25,09	2-Etil hexanol			X	
25,47	Fenilpropanolamina	X			
27,63	N-metil octadecanamina			X	
27,79	N,N-dimetil benzenamina,		X		
27,97	Undecano			X	
32,09	Octodrina	X			
35,20	N-metil- 2-amino propanamida,	X			
38,80	4-Enilamina metilpentano	X			

3. EXTRACÇÃO POR SOLVENTE

3.1. Metanol

Análise exploratória das potencialidades forenses do cabelo, com aplicação de técnicas de GC-MS.

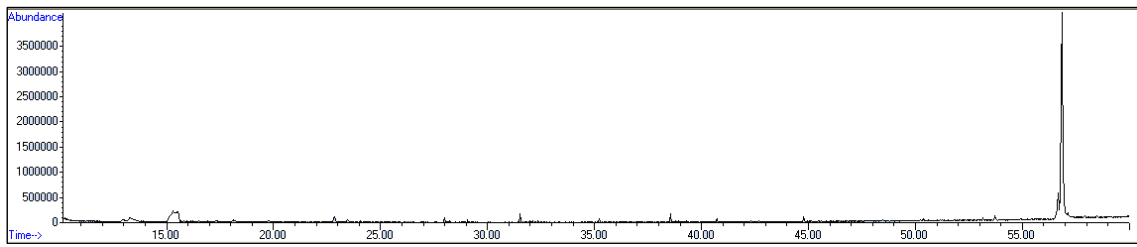


Figura 12 – TIC: do Metanol (solvente).

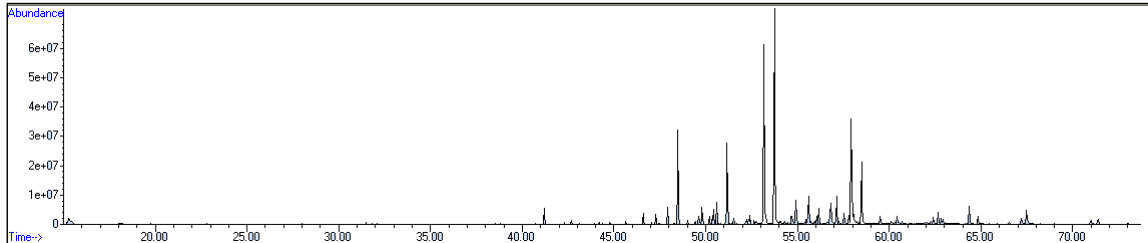


Figura – TIC: Tic do Metanol (após extração).

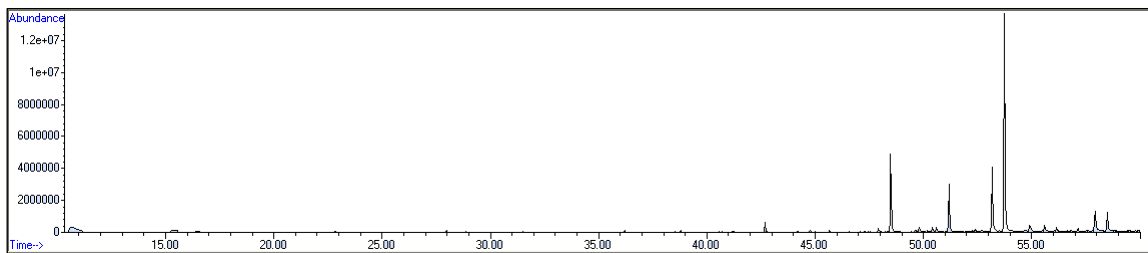


Figura – TIC: Tic do Metanol (após metilação).

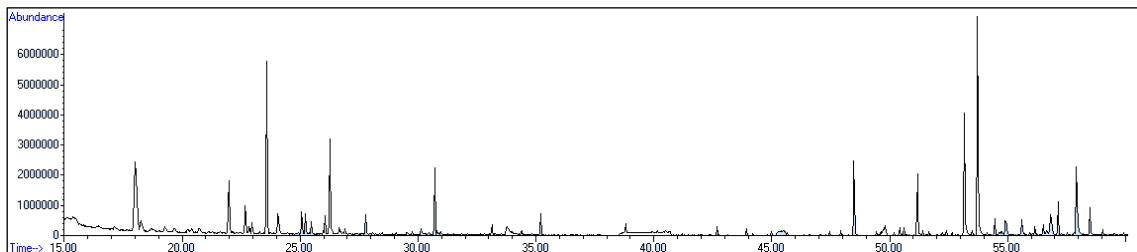


Figura 14 – TIC: do Metanol (após sililação).

A tabela 3 apresenta, detalhadamente, os compostos presentes na extração com metanol, nos respectivos tempos de retenção.

Tabela 3 - Lista de compostos encontrados na extração com metanol, com o respectivo RT.

RT	Composto	Extração Metilado	Sililado
10,62	Carbonato de etil metilo	X	
12,39	Piridina		X

Unconventional biological matrices for pattern recognition of Portuguese students' lifestyle

16,43	1,2-Dietoxi etanol			X
17,02	4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona	X		
17,65	Etilbenzeno	X		
24,05	N,N-dietilcarbamato etil			X
27,78	N,N-dimetil-benzenamina,			X
27,97	Benzoato de hidrazida	X		
28	Benzoato de metilo		X	
28,89	C8 m		X	
32,09	Decanal	X		
32,64	C9 m		X	
33,77	Metenamina			X
36,17	C10 m	X	X	
39,7	Etil pentametil-benzeno	X		
40,56	1-Etoximetil-4-tert-butil-benzeno		X	
40,69	2-Hidroxi-, benzoato de hidrazida	X		
42,32	2,4-Bis(1,1-dimetil etil)-fenol	X		
42,67	C12 m	X	X	X
42,85	Etilparabeno	X		
44,19	Ramificado do C12 m	X	X	X
44,81	Ramificado do C12 m	X		
45,66	C13 m	X	X	X
46,41	Benzofenona	X		
47,93	Insaturado do C14 m	X		
48,46	C14 m	X	X	X
50,41	Ramificado do C14 m	X	X	
51,14	C16 m	X		
51,19	C15 m		X	X
51,67	Tetradecanoato de trimetilsililo			X
52,41	Ramificado do C13 m	X		X
53,16	<i>cis</i> - Δ^9 -C16 m	X		
53,16	Ramificado do C16 m			X
53,17	Insaturado do C16 m		X	
53,73	C16 m	X	X	X
54,14	Pentadecanoato de trimetilsililo			X
56,05	Hexadecanoato de isopropilo	X		X
56,16	C17 m	X	X	X
56,51	Hexadecanoato de trimetilsililo			X
56,84	Esqualeno			
57,78	Insaturado do C18 m	X		
57,78	<i>cis,cis</i> -9,12-octadecadienoato de metilo ($\Delta^{9,12}$ -C18 m)	X		
57,91	Insaturado do C18 m			X
57,93	<i>cis</i> -9- octadecenoato de metilo (<i>cis</i> - Δ^9 -C18 m)	X		
57,93	Insaturado do C18 m		X	
58,49	C18 m	X	X	X
59,5	3-(4-metoxifenil), 2-propanoato de 2-etilhexilo	X		
60,43	Benzoato de undecil	X		
60,71	Ramificado do C18 m	X		

61,94	Insaturado do C19	X
62,3	Insaturado do C20	X
62,66	Benzoato de undecil	X
62,85	C20 m	X
62,93	3-(4-metoxifenil)-, 2- propanoaro de 2- etilhexilo	X
64,36	C21 m	X
67,47	1,2- Benzeno dicarboxilato de diisooctilo	X
73	C24 m	X

Pela análise da Tabela 3, podemos observar que a sililação não revelou compostos de interesse, para além dos compostos já encontrados, mas sililados. Com a metilação encontramos bastantes compostos, como ésteres metílicos, bem como alguns ésteres metílicos ramificados e insaturados. Contudo, podemos ainda observar que, apenas com a extracção, conseguimos identificar compostos metilados. Este facto pode sugerir que o metanol, metila os compostos. Assim, realizou-se um estudo, consoante o tempo a que as amostras estão sujeitas a temperatura - 1h, 2h e 15h – como podemos observar nas figuras 15, 16 e 17. Todos estes resultados foram previstos pela biblioteca do GC-MS, NIST05a.

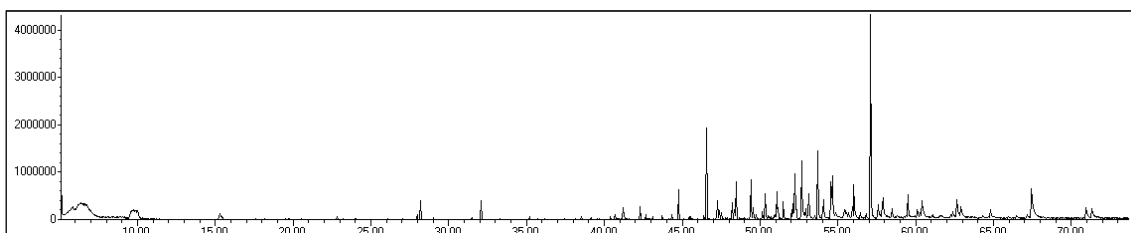


Figura 15 – TIC: do Metanol (após 1 hora de extracção).

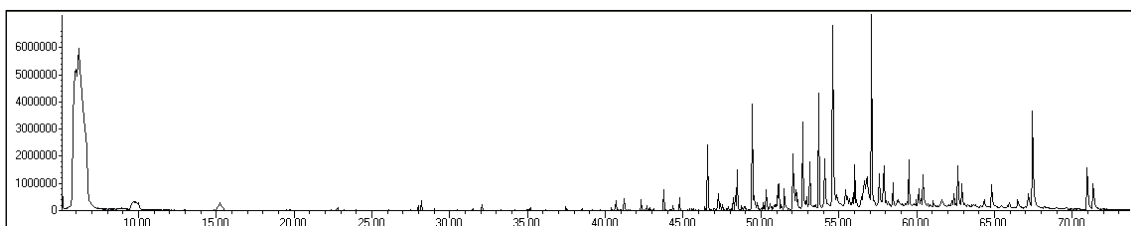


Figura 16 – TIC: do Metanol (após 2 horas de extracção).

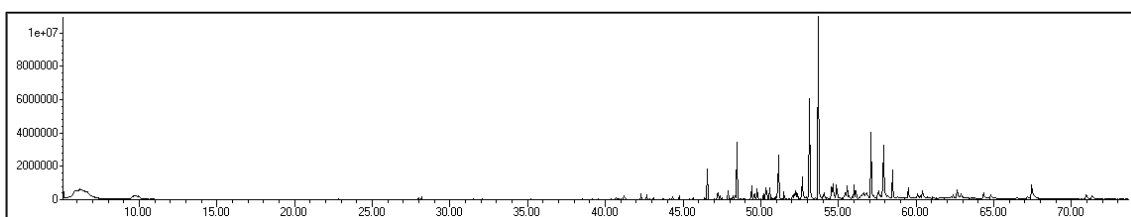


Figura 17 – TIC: do Metanol (após 15 horas de extracção).

A Tabela 4, apresentada, em baixo, compila os os compostos presentes na extracção com metanol, durante tempos diferentes, e os respectivos tempos de retenção.

Tabela 4 - Lista de compostos encontrados nas diferentes horas extracção com metanol (1, 2 e 15 horas), com o respectivo RT.

RT	Identificação	1h	2h	15h
27,97	Benzoato de metilo	x	x	x
28,19	Nonanal	x	x	x
30,48	Ácido octanóico		x	
32,07	Decanal	x	x	x
33,32	Benzotiazole		x	
35,02	7-Hidroxi-3,7-dimetil-octanal			x
36,17	Decanoato de metilo (C10 m)		x	
37,46	n-Ácido decanóico		x	
39,15	Dodecanal		x	
39,55	Insaturado do C18 m			x
39,64	Benzeno, etil pentametil	x	x	
40,40	5,9-Undecadieno-2-one, 6,10-dimetil	x	x	x
40,56	Benzeno, 1-etoximetil-4-tert-butil-			x
42,31	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- fenol	x	x	x
42,66	Dodecanoato de metilo	x	x	x
42,73	3-hidroxi-, octadecanoato de metilo		x	
42,83	4-Etoxi acido benzóico	x	x	
42,92	9-Tetradecenal, (Z)-	x		
43,1	Lilial	x	x	x
43,73	Ácido dodecanóico	x	x	x
44,17	4-Metil-dodecanoato de metilo,			x
44,36	α -metil, 1,3-Benzodioxole-5-propanal	x		
44,75	1-Hexadecanol	x		
45,64	Tridecanoato de metilo (C13 m)			x
46,4	Benzofenona	x	x	x
46,56	Cyclopentaneacetic acid, 3-oxo-2-pentyl-, methyl ester	x	x	x
47,54	Salicilato de n-hexilo	x		
47,74	3-hidroxi-, Octadecanoato de metilo	x		
47,91	Z-11-tetradecenoato de metilo		x	
48,46	Tetradecanoato de metilo (C14 m)	x	x	x
49,41	2-(Fenilmetileno)- Octanal	x		x
49,44	Ácido tetradecanóico		x	
50,17	Benzoato de benzilo	x		
50,39	12-metil Tetradecanoato de metilo			x
51,09	Tetradecanoato de isopropilo	x	x	x
51,15	Pentadecanoato de metilo (C15 m)	x	x	x
52,06	Ácido pentadecanóico	x	x	
52,23	bis(2-metilpropil) 1,2-Benzeno dicarboxilato	x		
52,31	7-Acetil-6-etil-1,1,4,4-tetrametil tetralina	x	x	x

52,39	4,8,12-trimetil, tridecanoato de metilo			X
52,67	1-Hexadecanol		X	X
52,93	3-Benziloxi-2-fluoro-4-methoxi-benzaldeido	X		
53,14	7-Hexadecanoato de metilo	X		
53,14	9- Hexadecanoato de metilo		X	X
53,70	Hexadecanoato de metilo (C16 m)	X	X	X
54,00	3,5-bis(1,1-dimetil etil)-4-hidroxi benzenepropanoato de metilo	X		X
54,09	9-Ácido hexadecanóico		X	
54,57	n- Ácido hexadecanóico	X	X	X
55,46	14-metil- hexadecanoato de metilo			X
56,03	Hexadecanoato de isopropilo	X	X	X
56,14	14-metil- hexadecanoato de metilo			X
56,44	Brassilato de etileno	X		
56,64	Esqualeno		X	
57,9	10-Octadecenoato de metilo		X	
57,90	9-Octadecenoato de metilo			X
58,46	16-Metil-heptadecanoato de metilo	X		
58,46	Octadecanoato de metilo			X
58,47	16-Metil-heptadecanoato de metilo		X	
59,5	3-(4-metoxifenil), 2- propanoato de 2-etilhexilo	X	X	X
60,41	Benzoato de undecilo	X	X	
62,64	Benzoato de undecilo		X	X
62,91	3-(4-metoxifenil)-, 2-propanoato de 2-etilhexilo	X	X	X
64,82	Benzoato de undecilo		X	
67,45	1,2- Benzeno dicarboxilato de diisooctilo	X	X	X

Pela análise da tabela 4, podemos observar que os compostos são metilados logo após a primeira hora da amostra, no ReactiTerm. Pelo que este método não deverá ser o melhor, na extracção de compostos de interesse.

3.2. Diclorometano

Para a extracção com Diclorometano, o procedimento foi o mesmo e os resultados encontram-se apresentados nas figuras 18, 19 e 20.

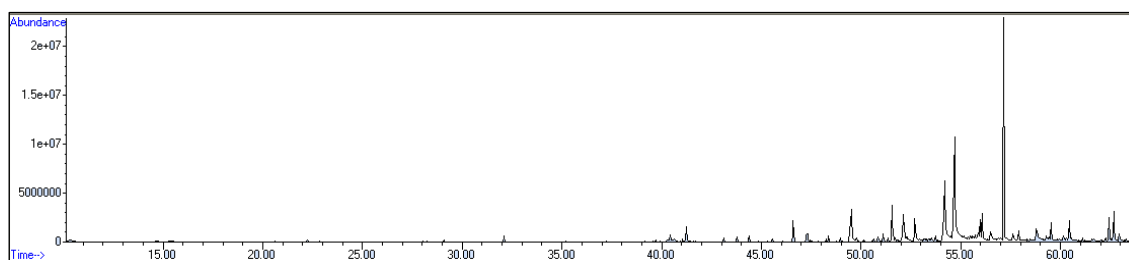


Figura 18 – TIC: do Diclorometano (após extracção).

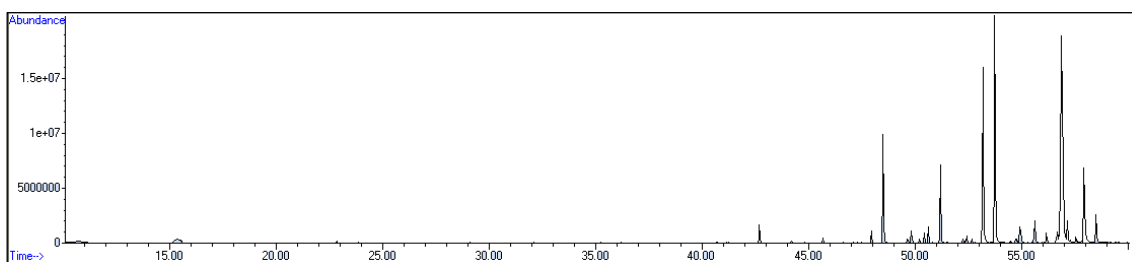


Figura 19 – TIC: do Diclorometano (após metilação).

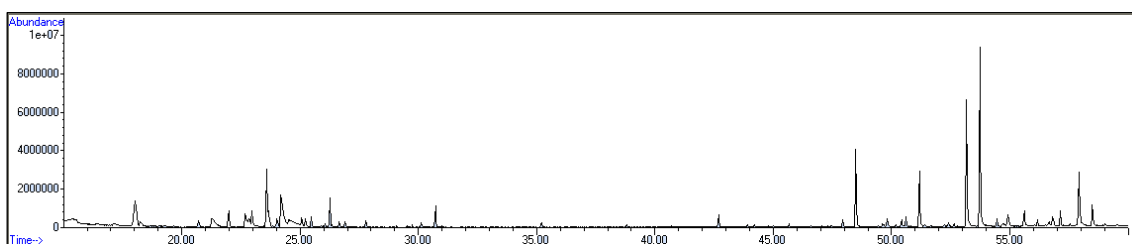


Figura 20 – TIC: do Diclorometano (após sililação).

À semelhança do estudo realizado à extracção com metanol, também para o diclorometano foi realizada uma tabela que contempla, detalhadamente, os compostos presentes na extracção com o solvente em questão, nos respectivos tempos de retenção (Tabela 5).

Tabela 5 - Lista de compostos encontrados na extracção com diclorometano, com o respectivo RT.

RT	Composto	Extracção	Metilado	Sililado
10,68	Carbonato de etil metilo		X	
12,46	Piridina			X
27,79	N,N-dimetil- benzenamina			X
29,52	3-trimetilsiloxi piridina			X
32,11	Decanal		X	
32,7	C12 m			X
36,2	C10 m		X	
36,24	Ácido ftalâmico	X		
39,53	C11 m		X	
41,06	3-(4-Isopropil fenil)-2-metil propionaldeido	X		
42,7	C12 m		X	
43,79	C12	X		
44,19	Ramificado do C12 m		X	X
44,82	Ramificado do C12 m		X	
44,83	Dietilftalato	X		
45,66	C13 m		X	X
46,41	Benzofenona	X		
47,94	Insaturado do C14 m		X	

48,48	C14 m		X	X
49,51	C14	X		
50,42	Ramificado do C14 m		X	X
51,11	Tetradecanoato de isopropilo	X		
51,19	C15 m		X	X
52,13	C15	X		
52,41	Ramificado do C13 m		X	
53,19	<i>cis</i> - Δ^9 -C16 m		X	X
53,73	Ramificado do C15	X		
53,73	C16 m		X	X
54,19	Z-11- hexadecenoato de metilo	X		
54,48	Ramificado do C16 m		X	
54,68	C16	X		
55,37	C16 e	X		
56,06	Hexadecanoato de isopropilo	X	X	
56,17	C17 m		X	X
56,48	Brasilato de etileno	X		
56,86	Esqualeno		X	
57,92	<i>cis</i> - Δ^9 -C18 m		X	X
58,5	C18 m		X	X
59,3	C18	X		
59,52	2-Ácido propanóico, 3-(4-metoxifenil)-, 2-etilhexil ester	X		
60,14	Colesterol			
62,94	3-(4-metoxifenil)-, 2-propanoato de 2-etilhexilo	X		
64,84	Benzoato de octilo	X		
67,21	Benzoato de undecilo	X		
67,45	1,2- Benzeno dicarboxilato de diisooctilo	X		

3.3. Hexano

Para a extracção com Hexano, o procedimento foi o mesmo e os resultados encontram-se apresentados nas figuras 21, 22 e 23.

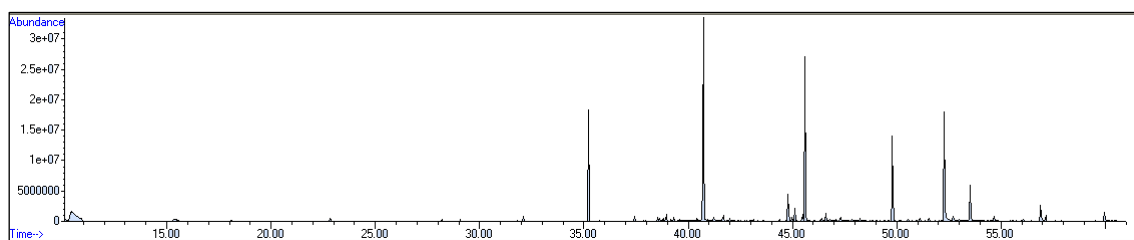


Figura 21 – TIC: do Hexano (após extracção).

Unconventional biological matrices for pattern recognition of Portuguese students' lifestyle

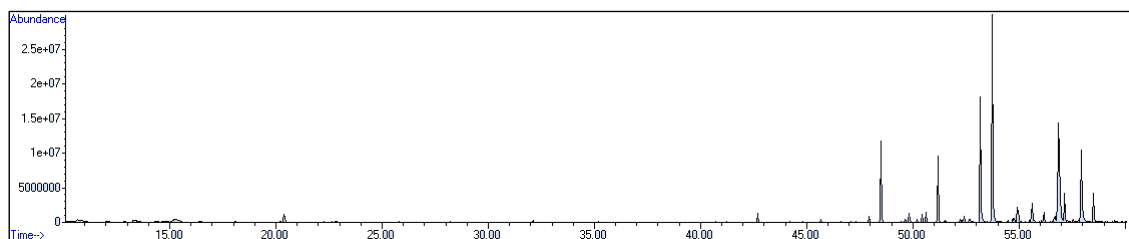


Figura 22 – TIC: do Hexano (após metilação).

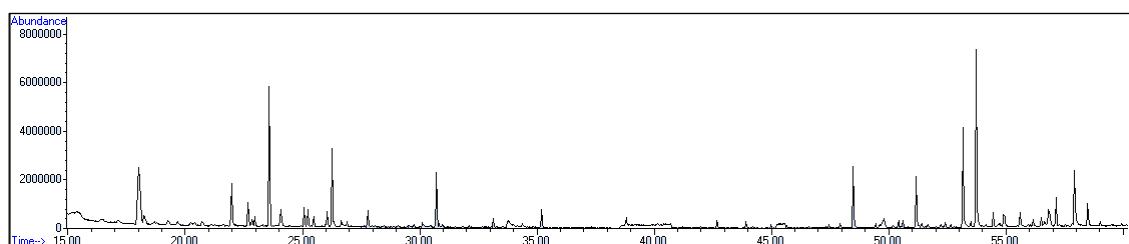


Figura 23 – TIC: do Hexano (após sililação).

Também para a extracção com hexano, foi realizada uma tabela que contempla, detalhadamente, os compostos presentes na extracção com o solvente em questão, nos respectivos tempos de retenção (Tabela 6).

Tabela 6 - Lista de compostos encontrados na extracção com hexano, com o respectivo RT.

RT	Composto	Extracção Metilado	Sililado
10,42	Heptano	X	
10,67	Carbonato de etil metilo		X
12,38	Piridina		X
13,3	Tolueno		X
16,84	4-metil-4-hidroxi-2-pentanona	X	
17,59	Etil benzeno		
17,66	m-Fenetil-benzonitrilo		
18,08	1,3-dimetil-Benzeno		
18,08	p-Xileno	X	
20,38	1,1,2,2-Tetracloro-etano		X
21,77	1-Metilpentil hidro peróxido		
22,39	Benzaldeído	X	
23,21	2-metil-1-Hepteno-6-one	X	
24,03	Octanal	X	
24,05	2-Etoxietil,dietil amina		X
25,09	2-etil-1-Hexanol	X	
25,23	3-Trimetilsiloxi-piridina		X
27,8	N,N-dimetil-benzenamina		X
31,83	Tetradecano		
32,1	Decanal	X	X
32,75	2-fenoxi-Etanol	X	

Análise exploratória das potencialidades forenses do cabelo, com aplicação de técnicas de GC-MS.

33,34	Benzotiazole	x		
33,76	Metenamina			x
34,86	3-fenil-2-Propenal			
36,2	C10 m	x	x	
37,34	Nonanoato de trimetilsililo			x
42,69	C12 m		x	x
44,2	Ramificado do C12 m		x	x
44,83	Ramificado do C12 m		x	x
45,67	C13 m		x	x
46,36	Dodecanoato de trimetilsililo			x
46,42	Benzofenona	x		
46,59	Hediona		x	x
47,94	Insaturado do C14 m			x
48,5	C14 m		x	x
50,18	Benzoato de benzilo	x		
50,2	Ramificado do C14 m		x	
50,43	Ramificado do C14 m		x	x
51,11	Tetradecanoato de isopropilo	x		
51,17	C15 m		x	x
51,67	Tetradecanoato de trimetilsililo			x
52,24	Ramificado do C15m		x	
52,36	Ramificado do C15m		x	
52,42	Ramificado do C13m		x	x
53,17	<i>cis</i> - Δ^9 -C16 m		x	
53,17	Insaturado do C16 m			x
53,73	C16 m		x	x
54,48	2-metil-hexadecanoato de metilo		x	
55,5	Ramificado do C16m		x	
56,06	Hexadecanoato de isopropilo	x	x	
56,16	C17 m		x	x
56,51	Hexadecanoato de trimetilsililo			x
57,55	Insaturado do C18m		x	
57,91	<i>cis</i> - Δ^9 -C18 m		x	x
58,49	C18 m		x	x