

Joana Raquel dos Santos Neves

Análise toxicológica de opióides em contexto forense

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2016



Joana Raquel dos Santos Neves

Análise toxicológica de opióides em contexto forense

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2016

Joana Raquel dos Santos Neves

Análise toxicológica de opióides em contexto forense

Atesto a originalidade do trabalho:

---

(Joana Raquel dos Santos Neves)

Projeto de Pós Graduação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob orientação da Professora Doutora Márcia Cláudia Dias de Carvalho.

Porto, 2016

## RESUMO

Apesar do inegável valor clínico dos opióides no tratamento farmacológico da dor moderada a severa, este grupo de compostos está também associado a diversos problemas sociais e para a saúde dos consumidores, devido à sua toxicidade e potencial de abuso. A depressão respiratória é uma das principais causas de morte em casos de sobredosagem. Deste modo, a determinação de opióides e dos respetivos metabolitos em amostras biológicas assume grande interesse em Toxicologia Forense. Neste trabalho será dada particular ênfase à tríade heroína, morfina e codeína por serem os opióides mais amplamente estudados e frequentemente envolvidos em intoxicações por opióides. Pretende-se efetuar uma descrição detalhada dos efeitos fisiológicos, farmacológicos e toxicológicos de opióides, e destacar as implicações forenses e médico-legais do uso destas drogas. Posteriormente, serão referidos vários aspetos relevantes em contexto forense, nomeadamente as matrizes biológicas tradicionais e alternativas usadas na deteção, os procedimentos de colheita e preservação dessas amostras, as metodologias empregues na análise toxicológica e possíveis áreas de aplicação dessas análises. Por último, serão apresentados alguns casos de estudo nesta temática.

**Palavras-Chave:** opióides, abuso, heroína, morfina, codeína, forense, toxicologia, prescrição de medicamentos.

## ABSTRACT

Despite the undeniable clinical value of opioids in the pharmacological treatment of moderate to severe pain, this group of compounds is also associated with many social problems and to consumers' health because of their toxicity and potential for abuse. Respiratory depression is a leading cause of death in cases of opioid overdose. Therefore, the determination of opioids and their metabolites in biological samples is of great interest in forensic toxicology. In this work, it will be given particular emphasis on the triad of heroin, morphine and codeine for being the most widely studied opioids and often involved in opioid poisoning. It is intended to make a detailed description of the physiological, pharmacological and toxicological effects of opioids, and highlight the forensic and legal implications of the use of these drugs. Then, a number of relevant aspects in forensic context will be presented, including traditional and alternative biological matrices used for detection of opioids use, sample collection and preservation procedures, analytical methodologies used in toxicological analysis and potential areas of application of these analysis. Finally, some case studies on this topic will also be presented.

**Keywords:** opioids, abuse, heroin, morphine, codeine, forensic, toxicology, prescription medications.

## AGRADECIMENTOS

É com muita alegria que aqui expresso os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que me ajudaram a tornar possível esta dissertação.

Desde logo, à minha orientadora, Prof. Doutora Márcia Cláudia Dias de Carvalho, pelo apoio e disponibilidade manifestada e por ter contribuído para o meu interesse na área da Toxicologia.

A todos os professores que fizeram parte do meu percurso académico.

À minha família e amigos pelas palavras de apoio incondicional e contribuição para ter chegado até aqui.

Aos meus pais, pela presença e apoio incondicional em todos os momentos, por terem confiado nas minhas capacidades e por se orgulharem da pessoa em que me tornei.

Ao Diogo, companheiro de todas as horas, um sincero obrigado.

## ÍNDICE GERAL

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
AGRADECIMENTOS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE TABELAS .....	xii
LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS .....	xiii
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS .....	2
III. ÓPIO E OPIÓIDES .....	2
3.1. Origem e enquadramento histórico .....	2
3.2. Conceitos básicos de opióides .....	5
3.2.1. Opiáceo <i>versus</i> opióide .....	5
3.2.2. Classificação dos opióides .....	6
3.2.3. Opióides emergentes .....	8
3.3. Farmacocinética .....	9
3.3.1. Absorção e distribuição .....	9
3.3.2. Metabolismo e excreção .....	10
3.4. Farmacodinâmica .....	12
3.4.1. Recetores $\mu$ , $\delta$ , $\kappa$ e nocicetina/orfanina .....	12
3.4.2. Mecanismo de ação .....	14
3.4.3. Efeitos farmacológicos .....	15
3.4.3.1. Ação analgésica .....	15
3.4.3.2. Ação antidiarreica .....	16
3.4.3.3. Ação a nível do sistema respiratório .....	16
3.4.3.4. Ação anestésica .....	17
3.5. Toxicidade dos opióides .....	17

3.5.1.	Efeitos respiratórios .....	17
3.5.2.	Efeitos cardiovasculares .....	18
3.5.3.	Efeitos neurológicos .....	18
3.5.4.	Efeitos oculares.....	19
3.5.5.	Efeitos gastrointestinais .....	19
3.5.6.	Efeitos renais .....	19
3.5.7.	Efeitos dermatológicos .....	20
3.5.8.	Dependência e síndrome de abstinência.....	21
3.5.9.	Tolerância .....	22
3.5.10.	Síndrome do “body packer” .....	23
3.6.	Tratamento de intoxicações .....	23
3.7.	Tratamento da dependência .....	25
IV.	OPIÓIDES EM TOXICOLOGIA FORENSE.....	26
4.1.	Áreas de aplicação da Toxicologia Forense .....	26
4.1.1.	Toxicologia <i>post mortem</i> .....	27
4.1.2.	Toxicologia comportamental.....	27
4.1.3.	Rastreio de drogas .....	29
4.2.	Investigação toxicológica.....	30
4.2.1.	Achados autópticos.....	30
4.2.2.	Aspetos pré-analíticos na análise toxicológica <i>post mortem</i> .....	31
4.2.2.1.	Recolha, envio e conservação de amostras .....	32
4.2.2.2.	Importância da cadeia de custódia .....	34
4.2.2.3.	Redistribuição <i>post mortem</i> .....	34
4.2.3.	Matrizes biológicas.....	36
4.2.3.1.	Sangue.....	37
4.2.3.2.	Urina .....	38
4.2.3.3.	Bílis.....	39

4.2.3.4.	Humor vítreo .....	39
4.2.3.5.	Fígado .....	40
4.2.3.6.	Matrizes alternativas .....	40
4.2.3.6.1.	Líquido cefalorraquidiano.....	40
4.2.3.6.2.	Suor.....	40
4.2.3.6.3.	Tecidos queratinizados .....	41
4.2.4.	Análise toxicológica .....	43
4.2.4.1.	Técnicas de rastreio .....	43
4.2.4.2.	Técnicas de confirmação.....	44
4.2.4.2.1.	Preparação da amostra .....	44
4.2.4.2.2.	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)...	44
4.2.4.2.3.	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS) .....	45
4.2.4.3.	Valores de <i>cut-off</i> .....	46
4.2.5.	Interpretação de resultados analíticos.....	47
4.2.5.1.	Concentrações terapêuticas, tóxicas e letais .....	47
4.3.	Importância da farmacogenética em contexto médico-legal .....	48
4.4.	Estudo de casos forenses.....	50
V.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS .....	58
VI.	BIBLIOGRAFIA .....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1:** Cápsula da planta *Papaver somniferum* (Fonte: Pathak *et al.*, 2013)..... 3

**Figura 2:** Obtenção de heroína por acetilação da morfina (adaptado de Guo *et al.*, 2012)  
..... 4

**Figura 3:** Classificação dos opióides quanto à sua origem e respetivas estruturas químicas (adaptado de Milone, 2012) ..... 7

**Figura 4:** Vias de metabolização para a codeína, heroína e morfina (adaptado de Bottemiller, 2012)..... 11

**Figura 5:** Interação dos opióides nas fibras C aferentes e nos neurónios pós-sinápticos provocando o efeito analgésico (adaptado de Santiago, 2015). NMDA- recetor N-metil-D-aspartato..... 15

ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classe dos diferentes recetores e respetivos efeitos clínicos (adaptado de Nelson <i>et al.</i> , 2011). .....	14
<b>Tabela 2:</b> Síndrome de abstinência de opióides (adaptado de Oliveira <i>et al.</i> , 2015) ....	22
<b>Tabela 3:</b> Tratamento de intoxicações por opióides (adaptado de Boyer, 2012) .....	24
<b>Tabela 4:</b> Drogas comumente pesquisadas em testes de rastreio utilizando urina como amostra biológica e respetivos valores de <i>cut-off</i> para o exame de rastreio na urina e para os testes de confirmação (adaptado de Poklis, 2010). .....	29
<b>Tabela 5:</b> Razão entre sangue cardíaco/sangue femoral para algumas substâncias psicoativas (adaptado de Kennedy, 2015). .....	36
<b>Tabela 6:</b> Amostras recomendadas para colheita em diferentes casos <i>post mortem</i> (adaptado de Whitley e Figarelli, 2009). .....	37
<b>Tabela 7:</b> Valores de <i>cut-off</i> para as drogas e metabolitos mais comumente analisados (adaptado de Tsanaclis <i>et al.</i> , 2011). .....	47
<b>Tabela 8:</b> Concentração da codeína e principais metabolitos em amostras dos gémeos (adaptado de Ferreirós <i>et al.</i> , 2009). .....	52
<b>Tabela 9:</b> Concentração de tramadol e principais metabolitos detetados nos órgãos e nas amostras biológicas recolhidas <i>post mortem</i> ( $\mu\text{g/mL}$ ) (adaptado de Barbera <i>et al.</i> , 2013). .....	53

LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS

6-AM – 6-acetilmorfina (ou 6-monoacetilmorfina)

AMPC – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ATP – Adenosina Trifosfato

BHE – Barreira hematoencefálica

C6G – Codeína-6-glucuronido

COMT – Catecol O-Metiltransferase

CYP450 – Citocromo P450 (do inglês *Cytochrome P450*)

DOP – Recetor  $\delta$  opióide

DPN – Dispneia paroxística noturna

FDA – *Food and Drug Administration*

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

GPCRs – Recetor acoplado a proteína G

HPLC-MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espetrometria de massa (do inglês *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

i.m. – Via intramuscular

i.v. – Via intravenosa

KOP – Recetor  $\kappa$  opióide

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa (do inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

M3G – Morfina-3-glucuronido

M3S – Morfina-3-sulfato

M6G – Morfina-6-glucuronido

M6S – Morfina-6-sulfato

MOP – Recetor  $\mu$  opióide

NK-1 – Neurocinina-1

NMDA – Recetor N-metil-D-aspartato

NOP – Recetor nocicetina/orfanina

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

pCO<sub>2</sub> – Pressão parcial de dióxido de carbono

P-gp – Glicoproteína P

s.c. – Via subcutânea

SAMHSA – *Substance Abuse & Mental Health Services Administration*

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês *Single nucleotide polymorphism*)

SPE – Extração de fase sólida (do inglês, *Solid Phase Extraction*)

SpO<sub>2</sub> – Saturação de oxigénio

TGI – Trato gastrointestinal

UGT2B7 – UDP glucuronosil transferase

UNODC – *United Nations Office on Drugs and Crime*

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

## I. INTRODUÇÃO

Os opióides pertencem a uma classe de fármacos utilizados no tratamento da dor aguda e crónica, apresentando uma eficácia variável (Kerrigan e Goldberger, 2003). O tratamento deverá ser realizado de acordo com a escala analgésica proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que sugere o uso dos opióides quando esta se caracteriza de dor moderada a intensa (Direção Geral da Saúde, 2008).

A morfina e os seus análogos atuam como agonistas no recetores opióides  $\mu$  localizados no sistema nervoso central (SNC), na medula espinal e nas terminações periféricas dos neurónios aferentes primários do tronco cerebral (Bogotte de Almeida, 2004). No entanto, apesar do efeito terapêutico analgésico, apresentam efeitos adversos graves como a depressão respiratória, obstipação, prurido e sedação (Fornasari, 2014). No outro extremo do grupo encontram-se os antagonistas que apresentam igual capacidade de ligação ao recetor  $\mu$ , bloqueando os efeitos agonistas. Entre estes dois grupos encontram-se os fármacos antagonistas-agonistas mistos (como a pentazocina) e um grupo designado de agonistas parciais (como a buprenorfina) (Bogotte de Almeida, 2004).

A Organização das Nações Unidas (ONU) estima que 246 milhões de pessoas entre os 15 e os 64 anos consumiram estupefacientes ilegais, o que representa um em cada 20 adultos a nível mundial. O seu relatório anual de drogas no mundo, indica que, um em cada 10 consumidores apresenta problemas sérios de dependência, sendo que o abuso de opióides muitas vezes se inicia após a prescrição médica (Fudala e Johnson, 2006). Segundo a *Substance Abuse & Mental Health Services Administration* (SAMHSA), o uso repetido de opióides provoca tolerância e a falta de recursos pode levar a substituir o medicamento prescrito por produtos mais baratos ou, ainda mais grave, pela heroína (SAMHSA, 2014).

Esta dissertação teve por objectivo realizar uma revisão da literatura científica sobre a importância dos opióides em contexto forense. Para um bom desempenho em Toxicologia Forense torna-se fundamental conhecer as propriedades farmacocinéticas específicas de alguns opióides, com particular relevância para a complexa tríade

heroína, morfina e codeína, os sinais e sintomas de intoxicação, os fatores que afetam a concentração *post mortem*, bem como assegurar a integridade das amostras recolhidas *post mortem* e a estabilidade no armazenamento durante a fase pré-analítica.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa bibliográfica foi efetuada em bases de dados científicas como a PubMed, B-on, Science Direct e Scopus utilizando as seguintes palavras-chave: “opioids”, “abuse”, “heroin”, “morphine”, “codeine”, “forensic”, “toxicology” e “prescription medications”. Os critérios de inclusão foram a respeito pelas palavras-chave, artigos científicos escritos em Português, Inglês e Francês e o acesso aos artigos na sua versão completa. Foi ainda recolhida informação em 28 livros didáticos e 3 websites governamentais, através do motor de busca “Google”. Esta pesquisa foi contínua ao longo do desenvolvimento deste trabalho, tendo-se realizado desde outubro de 2015 a setembro de 2016.

## III. ÓPIO E OPIÓIDES

### 3.1. Origem e enquadramento histórico

Os opióides são conhecidos como alcalóides analgésicos, inserido no grupo dos narcóticos, conhecido há mais de 200 anos. O ópio é obtido através do látex derivado da incisão na cápsula da papoila *Papaver somniferum* L. (*Papaveraceae*) (Figura 1) (Kerrigan e Goldberger, 2003). De entre as substâncias desta classe, destacam-se a morfina e a codeína, utilizadas na prática clínica devido aos efeitos analgésico (alívio da dor moderada a severa aguda e crónica) e antitússico; já a heroína (derivado semissintético da morfina) é utilizada como droga de abuso.

Através da cultura grega e depois da romana, o ópio começou a ser utilizado na terapêutica da Europa Medieval devido às suas propriedades hipnóticas, analgésicas, ansiolíticas, euforizantes, antitússicas e antidiarreicas (Karch, 2007). O ópio foi responsável pelo conflito internacional denominado “Guerra do Ópio” que durou cerca de dois anos entre Inglaterra e a China devido ao imperador chinês ter proibido o

consumo da mesma. A Inglaterra saiu vencedora levando à queda dos entraves e à livre exportação de ópio.



**Figura 1:** Cápsula da planta *Papaver somniferum* (Fonte: Pathak *et al.*, 2013).

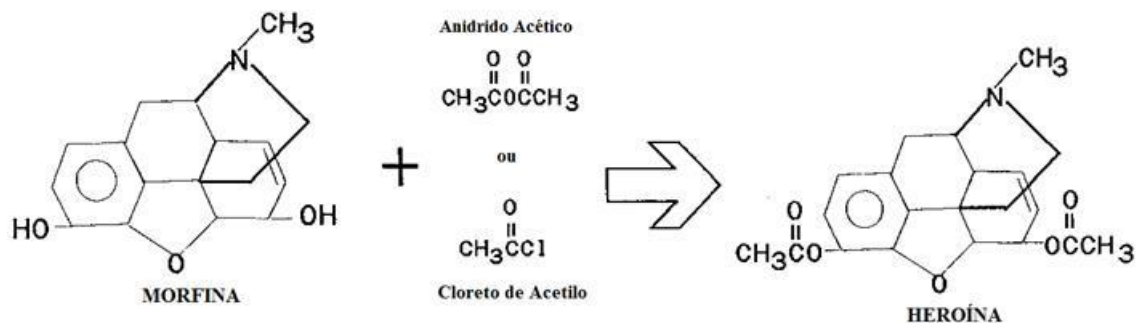
Como resultado, em 1900, metade da população chinesa adulta masculina estava viciada no ópio (Booth, 1998) e, após a 2ª Guerra Mundial, a produção do ópio expandiu-se e passou a ser usada em contrabando. Em 1965, o consumo de heroína tornou-se numa epidemia em jovens entre os 15 e os 24 anos, sendo que entre 1960 e 1970 o número de consumidores de heroína passou de 50.000 para 500.000 (Booth, 1998).

A morfina, cujo nome tem origem no deus grego dos sonhos, Morfeu, é o principal alcalóide proveniente do ópio, tendo sido isolado pela primeira vez em 1806 pelo farmacêutico Adam Sertürner. Inicialmente, a morfina era utilizada na forma pura por via parentérica para o tratamento da dor. Foi o ponto de partida para o desenvolvimento de muitos analgésicos opióides semissintéticos, mas o reconhecimento do potencial de abuso destas drogas só ocorreu aproximadamente 100 anos após o isolamento da morfina (Paice, 2007).

Mais tarde, em 1874, o farmacêutico inglês Alder Wright criou a heroína a partir da morfina. O nome adveio do seu heroísmo no combate à dor, sendo também conhecida como 3,6-diacetilmorfina. A heroína começou a ser comercializada pela farmacêutica alemã Bayer® e era igualmente usada no tratamento da tuberculose pela capacidade de

suprimir o reflexo da tosse e ainda no tratamento da dependência da morfina (Bono, 1998). Ironicamente, alguns anos após a sua criação, os especialistas acabaram por constatar que a heroína era ainda mais viciante do que a própria morfina, realidade esta que levou à proibição do seu uso, bem como da sua comercialização (Bono, 1998).

O método de produção de heroína mais conhecido é o Thiboumery e Mohr, ocorrendo com base na acetilação dos grupos de hidroxilo da morfina (Figura 2), resultando num aumento da potência analgésica e da capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (Kerrigan e Goldberger, 2003).



**Figura 2:** Obtenção de heroína por acetilação da morfina (adaptado de Guo *et al.*, 2012).

A heroína ilícita apresenta no máximo 10% de heroína pura uma vez que está sujeita a adulterações como a adição de produtos de corte (caféina, anfetaminas, lactose, glicose, farinha) de forma a aumentar o volume da sua produção (Ladron de Guevara e Moya Pueyo, 1995).

A heroína apresenta uma menor afinidade de ligação ao recetor opióide mas apresenta elevada lipofilia. É por vezes designada de pró-fármaco por facilitar a passagem da BHE. É rapidamente metabolizada pelas carboxilesterases existentes no fígado, no cérebro e no sangue dando origem a 6-monoacetilmorfina (ou 6-acetilmorfina; 6-AM), um metabolito mais potente que a morfina, mas com biodisponibilidade oral inferior. A heroína encontra-se na forma de sal (pó branco) ou na forma de base livre (cor castanha) (Selley *et al.*, 2001).

A heroína é habitualmente administrada por via i.v., sendo o pó colocado numa colher onde se mistura com água e umas gotas de sumo de limão (ácido orgânico) de forma a aumentar a sua solubilidade (Bono, 1998). Posteriormente é colocada sobre uma fonte de calor para que ocorra a dissolução e, por último, é filtrada utilizando o algodão ou filtro do cigarro diretamente para a seringa. Esta forma de administração provoca um “rush” intenso, sendo o pico de concentração plasmática atingido 2 minutos após a administração. Os fatores de risco de mortalidade após o consumo de heroína advêm do uso concomitante de outras drogas ou devido à baixa pureza da heroína (Risser *et al.*, 2000). Além da via parentérica (i.v, i.m., s.c.), a heroína também pode ser administrada via intranasal (“snifada”) ou inalada (fumada), atingindo o pico de concentração plasmática entre 1 a 5 minutos. A heroína apresenta um efeito depressor do SNC funcionando como um poderoso analgésico e euforizante, e ajudando no alívio da ansiedade. Está intimamente relacionada com casos de overdose, observando-se depressão respiratória e edema pulmonar que causam a morte (Karch, 2007).

A codeína apresenta apenas 10% da potência analgésica da morfina sendo maioritariamente utilizado como antitússico, tratamento de diarreia e alívio da dor fraca a moderada.

### 3.2. Conceitos básicos de opióides

#### 3.2.1. Opiáceo *versus* opióide

O termo opiáceo é utilizado quando as substâncias são derivadas do ópio, ou seja, alcalóides naturais que não sofrem nenhuma alteração estrutural. Como exemplos citam-se a morfina, a codeína e a tebaína. No entanto, neste termo também se incluem os derivados semissintéticos quando estes resultam de modificações parciais do alcalóide natural como é o caso da heroína (Brunton *et al.*, 2011).

O termo opióide foi proposto por George H. Acheson, professor de farmacologia, para designar todas as substâncias com ação semelhante à da morfina atuando nos mesmos recetores, independentemente da sua estrutura química (Duarte, 2005). Assim, este termo é usado para designar qualquer composto que exhiba as propriedades funcionais e

farmacológicas de um opiáceo, incluindo os opiáceos, os compostos semissintéticos, sintéticos e os compostos endógenos (encefalinas, endorfinas, dinorfinas). Este conceito baseia-se na ação farmacológica e vai desde a máxima afinidade e eficácia até ao bloqueio dos efeitos dos opióides pela ligação a recetores (estes últimos indicados para o tratamento da intoxicação por opióides) (Brunton *et al.*, 2011).

### 3.2.2. Classificação dos opióides

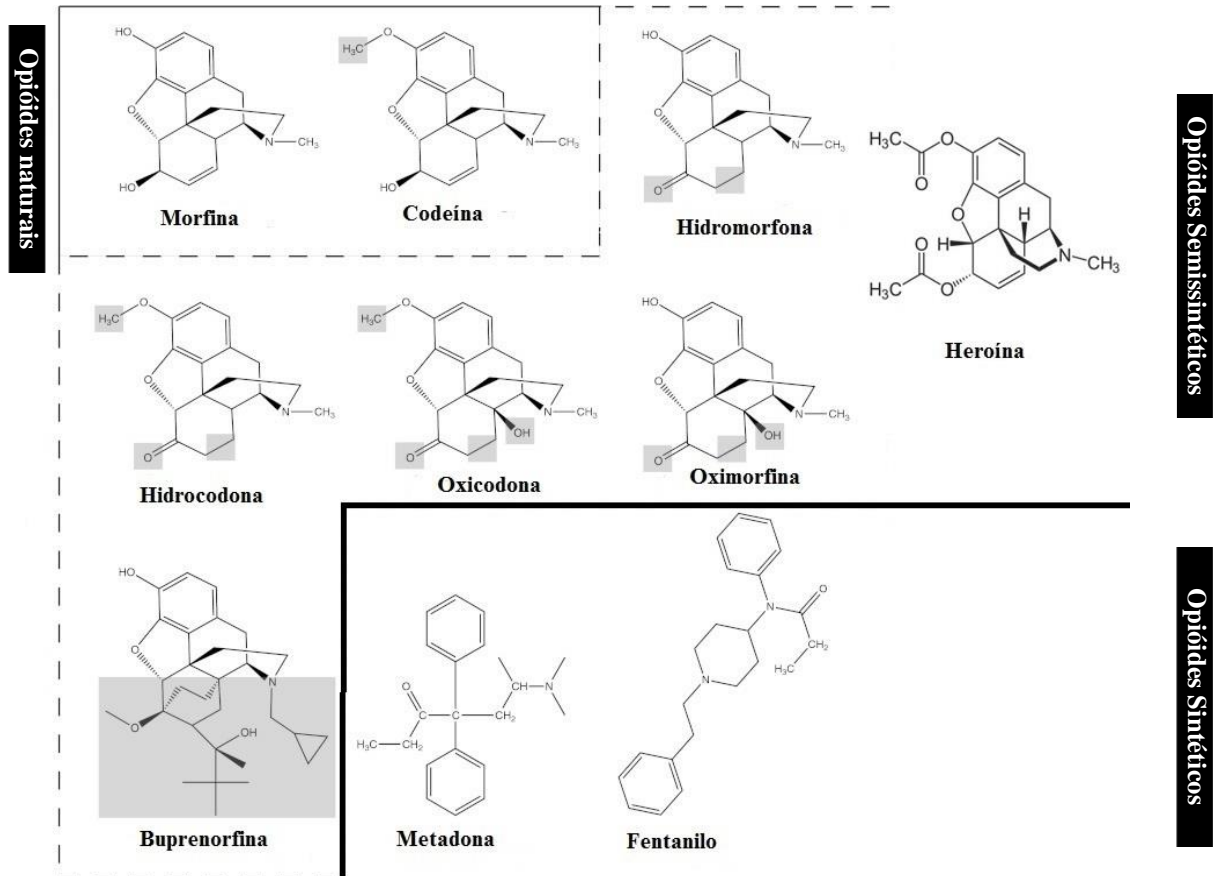
Os opióides são classificados tendo em conta alguns critérios como a origem, a seletividade e potência nos diferentes recetores (Brunton *et al.*, 2011).

Quanto à sua origem, os opióides podem ser classificados em naturais, semissintéticos e sintéticos (Figura 3). Os naturais são obtidos diretamente da planta do ópio (como a codeína e a morfina) ou produzidos pelo corpo humano (opióides endógenos). Os opióides semissintéticos (como a oxicodona e a heroína) são obtidos por modificação química de um opiáceo. Os opióides sintéticos não são derivados de opiáceos mas apresentam afinidade para o recetor opióide produzindo efeitos clinicamente semelhantes (Nelson *et al.*, 2010).

Dividem-se em quatro grupos de acordo com a ação nos diferentes recetores, nomeadamente: agonistas totais, agonistas parciais, agonistas-antagonistas e, por fim, os antagonistas opióides. A potência de estimulação dos recetores e as características cinéticas são a causa de dependência de cada fármaco, que pode ser mais ou menos intensa (Ladron de Guevara e Moya Pueyo, 1995).

Os agonistas opióides puros (como a morfina e o fentanilo) apresentam uma elevada afinidade e eficácia para os recetores opióides, principalmente para os recetores  $\mu$ , resultando na resposta máxima. O aumento da dose é proporcional ao aumento do efeito analgésico mas também dos efeitos adversos (fator limitante) (Trescot *et al.*, 2008).

Os agonistas parciais (como a buprenorfina) ligam-se aos recetores opióides ativando-os apenas parcialmente, quando comparados aos agonistas puros (Trescot *et al.*, 2008).



**Figura 3:** Classificação dos opióides quanto à sua origem e respetivas estruturas químicas (adaptado de Milone, 2012).

Os agonistas-antagonistas (como a pentazocina e a nalbufina) interagem com mais do que um recetor, atuando como agonistas numa classe de recetores opióides e como antagonistas noutra, não seguindo um comportamento proporcional entre o aumento da dose e dos efeitos (Trescot *et al.*, 2008).

Os antagonistas opióides (como a naloxona e naltrexona) apresentam afinidade competitiva para os recetores opióides, bloqueando desta forma o efeito dos opióides (Trescot *et al.*, 2008).

### 3.2.3. Opióides emergentes

O relatório anual do *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC) identifica as substâncias ilícitas e rotas de comércio. A diversificação das rotas comerciais levou à criação de novos mercados para os opióides em países que antes não eram consumidores (UNODC, 2015). Verificou-se em 2010 uma redução na plantação de ópio no Afeganistão, registando-se também uma redução da quantidade de heroína colocada nos mercados, o que motivou a procura de drogas alternativas com efeitos semelhantes e mais acessíveis (Shuster, 2011).

O *krokodil* foi a primeira droga a tornar-se popular e apresenta uma ação mais potente e mais duradoura que a heroína, causando elevada dependência. É administrado por via i.v. sem qualquer tipo de filtro. A pele torna-se acinzentada ou esverdeada e com descamação, daí a origem do nome *krokodil*, acabando por necrosar devido à isquemia periférica e à tromboflebite (Gahr *et al.*, 2012).

Esta droga apresenta na sua estrutura um núcleo de desomorfina, sendo também conhecida por dihidrodesoximorfina ou “heroína russa” (Gahr *et al.*, 2012). A potência analgésica da desomorfina é 8-10 vezes superior à da morfina, com um início de ação rápido, um tempo de semivida mais curto e eliminação lenta. A sua síntese é relativamente simples, sendo necessário codeína, iodo e fósforo vermelho, todos de fácil obtenção, o que resultou na sua produção clandestina em larga escala (Savchuk *et al.*, 2008; Gahr *et al.*, 2012). Desde o início de 2011 que se tem verificado um aumento dramático no número de casos associados ao fenómeno *krokodil*, tendo sido designada como “drug that eats junkies” ou ainda “Russia’s deadly designer drug” (Shuster, 2011).

O Kratom, o Kratun e o Ketum são novas drogas obtidas da planta *Mitragyna speciosa* Korth, da família Rubiaceae, originária do Sudoeste Asiático. É uma planta com propriedades psicoativas, cujo principal alcalóide é a mitraginina com afinidade para os recetores opióides  $\mu$ , apresentando efeito estimulante para doses mais baixas e efeito sedativo para doses mais elevadas (Oliveira *et al.*, 2015). A planta pode ser consumida de diversas formas, mastigando as folhas frescas, fumando ou na forma de chá (Tanguay, 2011). No sul da Tailândia existem cocktails denominados “4 x 100”

produzidos à base de folhas de *M. speciosa*, cafeína, codeína, difenidramina, podendo também incluir um ansiolítico, um antidepressivo ou um analgésico (Tanguay, 2011). A mitraginina pode ainda ser utilizada juntamente com o O-desmetiltramadol e, neste caso, passar a denominar-se Krypton (Oliveira *et al.*, 2015).

### 3.3. Farmacocinética

#### 3.3.1. Absorção e distribuição

Os opióides são bases fracas (pKa 6,5 a 8,7) e, quando em solução, ocorre a dissociação em fração ionizada e não ionizada numa proporção que depende do pH do meio e do pKa do opióide. Quando em contacto com um meio ácido como o estomacal, apresentam elevado grau de ionização, resultando na sua baixa absorção. No entanto, em meios básicos como no intestino, ocorre predomínio da forma não ionizada proporcionando elevada absorção (Kerrigan e Goldberger, 2003).

A morfina pode ser administrada via oral, via i.v., via s.c., via i.m. e intratecal (Karch, 1998), sendo que pela via s.c. ou i.m., após 30 min, metade da quantidade injetada já se encontra em circulação. A biodisponibilidade oral da morfina varia entre 25-30% devido ao efeito significativo da primeira passagem hepática e intestinal (Smith, 2009). O volume de distribuição é de 2 a 5 L/Kg e apresenta um tempo de semivida entre 2-3,5 h (Karch, 1998). A extensão de ligação às proteínas plasmáticas, em indivíduos saudáveis, varia entre 12-35% sendo independente da concentração, contudo há uma ligeira diminuição quando a concentração terapêutica é aumentada 60 vezes. A distribuição ocorre através dos tecidos com maior fluxo sanguíneo (pulmão, cérebro, fígado, rins, baço) e apenas 40-50% da dose oral da morfina chega ao cérebro, devido à baixa lipofilia (composto anfotérico com grupos ácidos e básicos), ao contrário dos metabolitos que são de natureza lipofílica, daí a capacidade de atravessar a BHE e placentária (Oliveira *et al.*, 2015).

A heroína é administrada por via i.v., i.m., oral, nasal ou inalatória. No entanto, a injeção intravenosa é a que provoca maior intensidade e início de ação mais rápido (1 minuto), responsável pelo “rush” de euforia que é característico. Devido ao aumento da

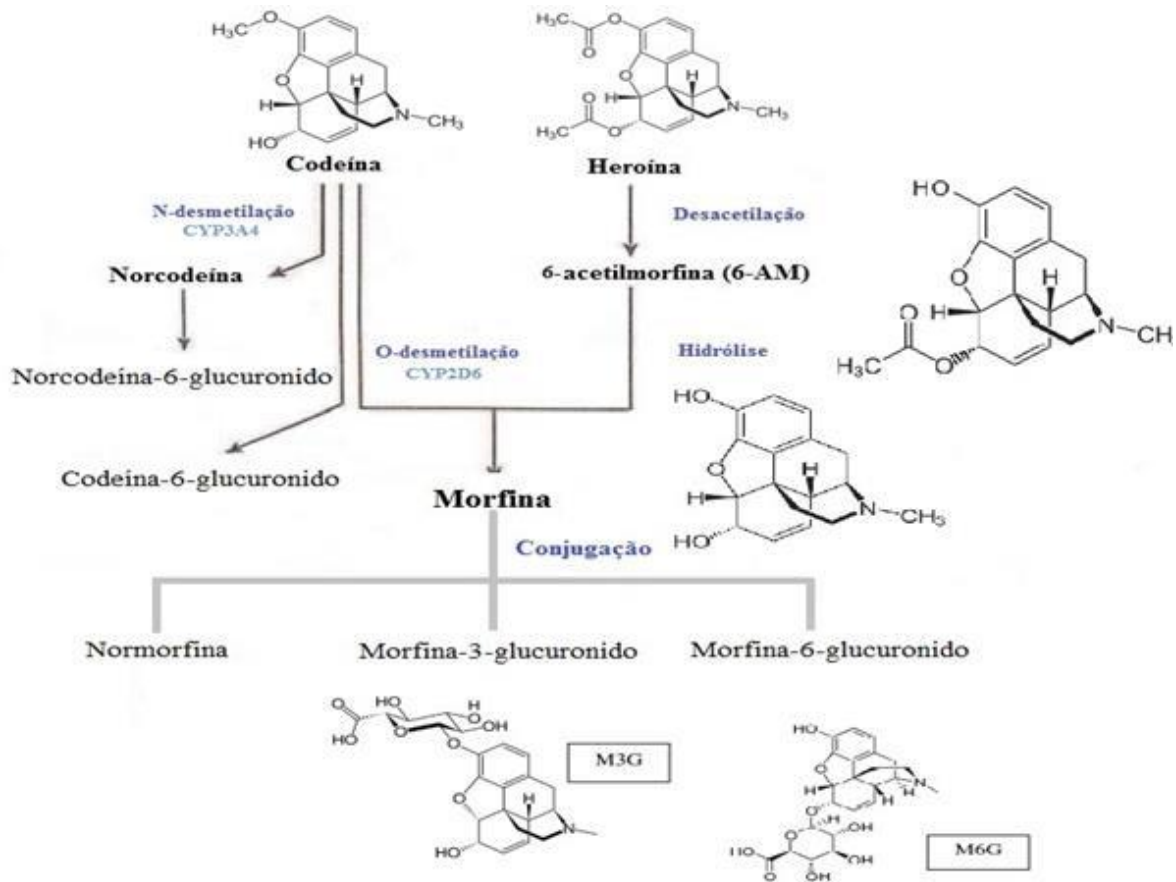
pureza das “drogas de rua” e à propagação de vírus como VIH surgiram alternativas para o seu consumo como a insuflação e inalação, em que o pico plasmático é atingido ao fim de 5 minutos para a heroína e 5-10 minutos para a 6-AM. Devido ao carácter lipofílico e ao elevado volume de distribuição, a heroína atravessa facilmente a BHE, produzindo efeito mais rápido quando comparada com a morfina (Kerrigan e Goldberger, 2003).

A codeína apresenta uma boa biodisponibilidade oral e parenteral com um efeito de primeira passagem reduzido. O tempo de semivida é de aproximadamente 2 a 4 horas (Oliveira *et al.*, 2015).

### 3.3.2. Metabolismo e excreção

A via de administração de um xenobiótico influencia o seu perfil de metabolização, afetando assim a natureza e os níveis de droga e metabolitos no plasma, nos tecidos e outras amostras biológicas. Em geral, os opióides são metabolizados no fígado através de reações de fase I (modificação) e fase II (conjugação) e posteriormente são eliminados por via renal.

Após administração de morfina, a metabolização ocorre essencialmente no fígado e a nível intestinal, por conjugação com ácido glucurónico pela enzima UDP-glucuronosil transferase (UGT2B7). Através deste metabolismo, a molécula de morfina, que contém um grupo hidroxilo fenólico livre na posição 3, sofre glucuronidação em minutos, dando origem morfina-3-glucuronido (M3G; 45-55%), que se apresenta como hidrossolúvel e desprovido de atividade. O outro metabolito formado 2 h após a administração é a morfina-6-glucuronido (M6G; 10-15%), através da glucuronidação do hidroxilo alcoólico na posição 6. A M6G, ao contrário da M3G, é farmacologicamente ativa e atua como agonista dos recetores opióides  $\mu$  com uma potência analgésica cerca de 2 vezes superior à da morfina (Figura 4) (Kerrigan e Goldberger, 2003; Oliveira *et al.*, 2015). Outros metabolitos são produzidos em menor número, cerca de 5% da morfina sofre desmetilação a normorfina (metabolito também ativo mas com menor potência), a M3S (morfina-3-sulfato) e a M6S (morfina-6-sulfato), no entanto apresentam menores efeitos farmacológicos (Loeb, 1993; Oliveira *et al.*, 2015).



**Figura 4:** Vias de metabolização para a codeína, heroína e morfina (adaptado de Bottemiller, 2012).

A morfina é excretada após conjugação com ácido glucurónico por via urinária (90%) e, devido à circulação entero-hepática, os restantes 10% são excretados via biliar podendo ser detetadas quantidades mínimas nas fezes durante alguns dias após o consumo (Brunton *et al.*, 2011). A morfina é excretada na urina até 72 horas após a administração, sendo 75% na forma de M3G, menos de 10% na forma morfina livre e a restante como M6G, M3S, normorfina e outros conjugados (Loeb, 1993). A clearance varia entre 1,2 a 1,9 L/min/70 kg. A presença de morfina livre ou conjugada pode indicar o consumo quer de heroína ou codeína, uma vez que é o principal metabolito ativo de ambas (Kerrigan e Golderger, 2003).

A heroína é considerada um pró-fármaco, sendo rapidamente metabolizada pelas esterases, por desacetilação, originando a 6-monoacetilmorfina, um metabolito farmacologicamente ativo e cerca de 4 a 6 vezes mais potente que a morfina. Assim sendo, a heroína raramente está presente nos fluidos corporais e em quantidades detetáveis, devido ao tempo de semivida de apenas alguns minutos (2-5 minutos). A 6-AM apresenta um tempo de semivida de 6-25 minutos, e é convertida em morfina e posteriormente em M3G, em M6G e em normorfina (Smith, 2009). Os metabolitos resultantes, a morfina e a 6-acetilmorfina, são os responsáveis pelos efeitos farmacológicos, uma vez que a heroína não apresenta afinidade para os recetores opióides a nível cerebral. A presença de 6-AM na urina é uma evidência conclusiva do consumo de heroína, mas apenas detetável até 8 horas após administração (Kerrigan e Goldberger, 2003). O M3G, M6G, normorfina e o M3S são igualmente detetáveis na urina, bem como a codeína, uma vez que é um adulterante utilizado na preparação de heroína (Oliveira *et al.*, 2015).

A codeína apresenta baixa afinidade para os recetores opióides, sendo que o poder analgésico apresentado advém da sua conversão a morfina. É metabolizada maioritariamente no fígado por três vias principais: conjugação com o ácido glucurónico (81% de metabolito inativo), O-desmetilação (10%) e restante por N-desmetilação (Figura 4) dando origem a codeína-6-glucuronido, morfina e norcodeína, respetivamente. Após administração oral, a excreção ocorre rapidamente e cerca de 2/3 da dose, é excretada na urina até 6 horas, após a administração sendo completamente excretada após 24 horas (Kerrigan e Goldberger, 2003).

### 3.4. Farmacodinâmica

#### 3.4.1. Recetores $\mu$ , $\delta$ , $\kappa$ e nocicetina/orfanina

Os quatro recetores opióides:  $\mu$  (MOP),  $\delta$  (DOP),  $\kappa$  (KOP) e nocicetina/orfanina (NOP) pertencem a uma superfamília de recetores acoplados à proteína G (GPCRs), constituídos por 7 domínios transmembranares com um grupo terminal amina (-NH<sub>2</sub>) e outro carboxílico (-COOH) (Waldhoer *et al.*, 2004). Existe uma homologia (cerca de 50-70%) entre as sequências transmembranares dos membros do trifosfato de guanósina

(GTP) da proteína de ligação e da superfamília dos recetores, o que explica a semelhança no mecanismo de ação. No entanto, os segmentos intracelulares e extracelulares diferem, apresentando alterações nas regiões de ligação e transdução de sinal, o que explica as alterações qualitativas e quantitativas nas respostas farmacológicas dos diferentes opióides (Tabela 1).

Os recetores apresentam diferentes níveis de distribuição tanto a nível do SNC como a nível periférico (coração, fígado, pulmões, trato gastrointestinal e sistema reprodutor) e são responsáveis principalmente pela modulação da dor via descendente. É fundamental saber a qual recetor o opióide se vai ligar, para que seja possível fazer a previsão dos efeitos farmacológicos, tendo em conta que a variação da eficácia e a da afinidade de ligação se pode traduzir em perfis de analgésicos diferentes (Asbjørn *et al.*, 2012).

Os recetores  $\mu$  localizam-se na região cerebral, mais precisamente na zona cinzenta periaquedutal, núcleo magno da rafe e tálamo medial, provocando essencialmente analgesia supraespinal e euforia devido aos recetores estarem na zona mesolímbica. Também atuam a nível respiratório e perifericamente a nível do trato gastrointestinal (TGI) e em determinadas terminações nervosas sensoriais (Henriksen e Willoch, 2008).

Os recetores  $\kappa$  encontram-se maioritariamente a nível da medula espinal daí causarem depressão respiratória e miose menos intensas (Nelson *et al.*, 2011).

Os recetores  $\delta$  são um local de ligação para a maioria dos péptidos endógenos e localizam-se maioritariamente na medula espinal e nas regiões cerebrais antinociceptivos e, ao contrário dos recetores  $\mu$ , não estão associados a depressão respiratória e obstipação (Nelson *et al.*, 2011).

O recetor nocicetina/orfanina foi identificado em 1994 com base na homologia da sequência dos genes dos recetores opióides e encontra-se distribuído a nível cerebral. Apresenta a capacidade de ligação tanto de agonista como de antagonista, porém apresenta insensibilidade à naloxona o que dificultou a aceitação de que seria um subtipo de recetor opióide (Nelson *et al.*, 2011).

**Tabela 1:** Classe dos diferentes recetores e respetivos efeitos clínicos (adaptado de Nelson *et al.*, 2011).

Nome convencional	Nome IUPHAR	Efeitos clínicos
$\mu_1$	OP <sub>3a</sub>	Analgesia supraespinal, analgesia periférica, sedação, euforia, libertação prolactina, obstipação
$\mu_2$	OP <sub>3b</sub>	Analgesia espinal, depressão respiratória, dependência física, alterações GI (motilidade GI reduzida), prurido, bradicardia, miose e euforia.
$\kappa_1$	OP <sub>2a</sub>	Analgesia espinal, miose, diurese (inibe libertação da hormona antidiurética), sedação
$\kappa_2$	OP <sub>2b</sub>	Psicomimese, disforia
$\kappa_3$	OP <sub>2b</sub>	Analgesia supraespinal, redução da inflamação
$\delta$	OP <sub>1</sub>	Analgesia supraespinal e espinal, disforia, alucinações, modulação da função do recetor $\mu$ , inibição da libertação de dopamina
<b>Nocicetina/orfanina</b>	OP <sub>4</sub>	Analgesia, ansiolítico

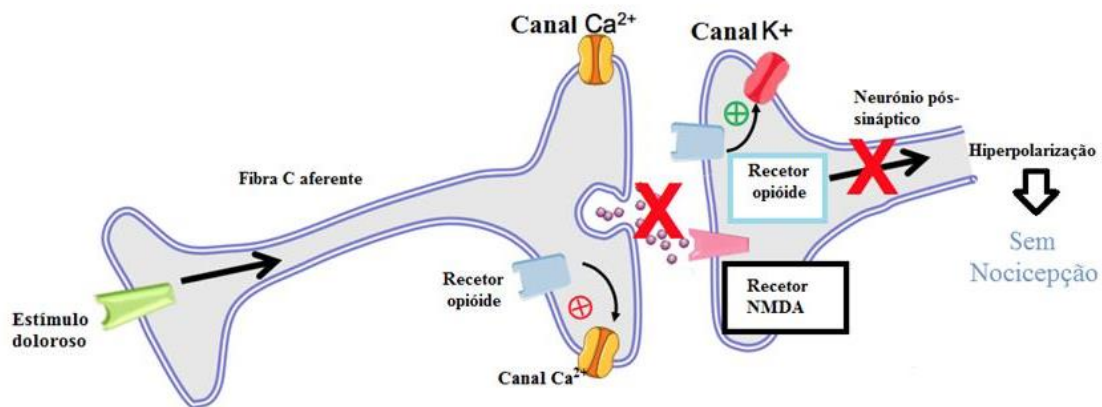
IUPHAR: *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*

### 3.4.2. Mecanismo de ação

Os opióides exercem a sua ação por ligação aos recetores opióides. A ativação do recetor desencadeia uma cascata de efeitos celulares, dissociando-se a proteína em subunidades ativas ( $G\alpha$  e  $G_{\beta\gamma}$ ), que por sua vez vão inibir a adenilciclase e, posteriormente, diminuindo os níveis de AMPc provocando alteração das vias de fosforilação das proteínas e modelação pré e pós-sináptica dos canais de cálcio levando à diminuição da condutância do  $Ca^{2+}$  e reduzindo desta forma a excitabilidade neuronal e/ou a libertação de neurotransmissores. Na membrana pós-sináptica, a ativação do recetor opióide conduz à abertura da proteína G acoplada, levando ao estímulo do efluxo de  $K^+$ , resultando na hiperpolarização da membrana celular, impedindo a excitabilidade neuronal e reduzindo a neurotransmissão de impulsos nociceptivos e, desta forma, a perceção da dor (Figura 5). A abertura dos canais de  $Cl^-$  também provoca

a hiperpolarização da célula resultando num processo sem nocicepção (Nockemann *et al.*, 2013).

O grau de complemento, afinidade e ajuste do opióide com o local de ligação ao recetor determina a extensão de analgesia e duração dos efeitos (Kerrigan e Goldberger, 2003).



**Figura 5:** Interação dos opióides nas fibras C aferentes e nos neurónios pós-sinápticos provocando o efeito analgésico (adaptado de Santiago, 2015). NMDA- recetor N-metil-D-aspartato.

### 3.4.3. Efeitos farmacológicos

#### 3.4.3.1. Ação analgésica

Os opióides têm capacidade de modular a percepção da dor cerebral a nível espinal e supraespinal, sendo a morfina o opióide mais utilizado no alívio de dores severas, tais como de enfarte do miocárdio, cólicas biliares, pós-cirúrgica e dor oncológica, sendo o tratamento de primeira linha (Katzung *et al.*, 2009). Os recetores  $\mu$  que se encontram a nível periférico, cerebral e da medula espinal são os principais responsáveis pelos efeitos analgésicos destes compostos.

Os recetores  $\kappa$  e  $\delta$  são igualmente responsáveis pela analgesia, maioritariamente ao nível da medula espinal (Nelson *et al.*, 2011).

#### 3.4.3.2. Ação antidiarreica

A ação antidiarreica está associada ao consumo de morfina, fentanilo, oxicodona e metadona, através da interação com o recetor  $\mu_2$  localizado na musculatura lisa intestinal. A utilização destas substâncias no tratamento da diarreia ocorre devido à capacidade de diminuição do peristaltismo e prolongamento do trânsito intestinal, diminuindo assim a motilidade intestinal (Karch, 1998).

Ao nível do estômago surgem alterações sobretudo ao nível das secreções glandulares que estão diminuídas, o esfíncter pilórico contrai, o tónus da musculatura lisa aumenta e a motilidade diminui, o que se traduz num atraso da passagem dos alimentos para o duodeno. Ocorre também um aumento da absorção de água e uma diminuição na libertação das secreções pancreáticas e da bÍlis. Desta forma, forma-se um conteúdo intestinal pouco fluido e, como existe baixo teor de água, as fezes tornam-se duras (Holzer, 2004).

#### 3.4.3.3. Ação a nível do sistema respiratório

A codeína e o dextrometorfano são dois exemplos de opióides com atividade supressora da tosse. O agonismo do recetor opióide  $\kappa$  e  $\mu_1$  e o antagonismo do recetor  $\delta$  são os mais frequentemente associados a esta ação devido à capacidade de supressão dos centros medulares da tosse. O efeito supressor da tosse com a toma de opióides é obtido com doses menores quando comparadas às necessárias para causar analgesia. No entanto, torna-se necessário alertar para o potencial efeito aditivo e abuso destes compostos (Oliveira *et al.*, 2015).

A morfina é utilizada no tratamento da dispnéia paroxística noturna (DPN) por causar analgesia, sedação, redução da pré-carga e a taxa respiratória normal. No edema pulmonar agudo, para além da terapêutica padrão, é comum a administração de opióides, como em casos de insuficiência cardíaca ventricular esquerda, uma vez que

leva à analgesia, sedação e redução da pré e pós carga cardíaca (Katzung *et al.*, 2009). A administração de morfina também apresenta ação hipotensora dependente da vasodilatação periférica, secundária à libertação de histamina, impedindo a progressão do edema.

#### 3.4.3.4. Ação anestésica

Os opióides são utilizados como medicação pré-anestésica em cirurgias, de forma a produzir analgesia, efeito ansiolítico e sedativo. O fentanilo é um opióide utilizado como indutor da anestesia em concentrações mais elevadas, sendo por vezes administrado durante a cirurgia (Katzung *et al.*, 2009).

### 3.5. Toxicidade dos opióides

Quando os opióides são usados corretamente para fins medicinais podem ser considerados extremamente seguros e eficazes. Contudo, a sobredosagem pode provocar efeitos tóxicos graves, que podem ser influenciados pelo metabolismo bem como pela via de administração. Os efeitos tóxicos são geralmente previsíveis embora, por vezes, se desenvolvam respostas atípicas.

#### 3.5.1. Efeitos respiratórios

A depressão respiratória é o principal efeito tóxico dos opióides e ocorre através da estimulação dos recetores MOP, localizados no centro respiratório do tronco cerebral, provocando a inibição direta dos neurónios envolvidos no controlo do ritmo respiratório, designado de “complexo de pré-Bötzinger” (Boom *et al.*, 2012).

A estimulação dos recetores  $\mu_2$  nos centros respiratórios provoca a redução da frequência respiratória, tornando-se lenta e irregular (com hipercapnia, hipoxia e apneia), e também o aumento das pausas entre os movimentos respiratórios e, conseqüentemente, o aumento da pressão parcial de dióxido de carbono arterial ( $pCO_2$ ), bem como a diminuição na saturação de oxigénio ( $SpO_2$ ) desenvolvendo um quadro de acidose respiratória (Pauwels *et al.*, 2001; Boom *et al.*, 2012).

No complexo de pré-Bötzinger, os neurónios expressam recetores da neurocinina-1 (NK-1) que estão ativos durante a inspiração mas dado que os opióides têm tropismo para este tipo de neurónios, inibem a expressão de NK-1, com possibilidade de ocorrer paragem no ritmo respiratório (Koo e Eikermann, 2011).

O edema pulmonar devido ao esforço respiratório contra a glote fechada leva à diminuição da pressão intratorácica e ao conseqüente extravasamento de líquidos (Boyer, 2012). O edema pulmonar também ocorre devido a lesão pulmonar aguda a partir de um mecanismo semelhante ao edema pulmonar neurogénico devido ao stress, que ocorre após a reversão da intoxicação provocando a congestão dos capilares pulmonares. O edema pulmonar neurogénico ocorre devido a uma descarga simpática a nível do SNC, causando edema pulmonar devido aos efeitos agudos das catecolaminas no miocárdio (Nelson *et al.*, 2011).

### 3.5.2. Efeitos cardiovasculares

Os opióides atuam nos recetores do tónus do sistema nervoso simpático, provocando a dilatação arteriolar e vasodilatação periférica secundária, levando à bradicardia. Os opióides ativam as proteínas G nos mastócitos, provocando a libertação de histamina e a conseqüente vasodilatação periférica (Barke e Hough, 1993). Mesmo em doses terapêuticas, a metadona pode interferir na repolarização cardíaca normal e conduzir ao prolongamento do intervalo QTc (intervalo QT corrigido pela frequência cardíaca), sendo este um efeito que predispõe o desenvolvimento de *torsades de pointes* (Nelson *et al.*, 2011).

### 3.5.3. Efeitos neurológicos

O consumo de heroína encontra-se associado à leucoencefalopatia espongiiforme. É uma doença rara, caracterizada pela degeneração progressiva da mielina após inalação de vapores de heroína, prática comumente conhecida por "*chasing of the dragon*" (Barceloux, 2012; Fernández-Vega *et al.*, 2016). A gravidade dos danos cerebrais é variável uma vez que depende do tempo de exposição. Os sintomas encontram-se divididos por estadios, que vão desde a síndrome pseudobulbar e ataxia até sintomas

mais graves como tremores, mioclonia, hiperpirexia e demência (Barceloux, 2012). A etiologia desta patologia não é totalmente explicável, no entanto, sabe-se que a heroína, devido ao caráter lipofílico, apresenta a capacidade de atravessar a BHE, depositando-se posteriormente na mielina, levando à destruição lenta e gradual dos tecidos (Ryan, 2005).

Em geral, doses elevadas de opióides causam maioritariamente sedação, confusão mental, alterações de humor e alucinações. As convulsões são frequentemente relacionadas com a administração de heroína e as lesões no SNC causadas pelo consumo da morfina, devido essencialmente à hipoxia cerebral.

#### 3.5.4. Efeitos oculares

A miose é provocada pela interação dos opióides nos recetores MOP e KOP. A mesma ocorre devido à capacidade de ativação do músculo do esfíncter da pupila, podendo induzir uma situação de hipercarbia significativa e hipoxia, resultando em constrição pupilar. O exame pupilar e a avaliação do reflexo de luz são úteis para a avaliação neurológica durante a intoxicação por opióides (Larson, 2008).

#### 3.5.5. Efeitos gastrointestinais

A maioria dos opióides, incluindo a morfina, atua na zona de gatilho quimio-recetora da medula onde se encontram os recetores opióides. Após a administração poderão ocorrer náuseas e vômitos, mesmo se respeitadas as doses terapêuticas (Karch, 1998; Nelson *et al.*, 2011).

#### 3.5.6. Efeitos renais

A morfina é comumente utilizada no tratamento pós-operatório. No entanto, apresenta como principal fator de risco a retenção urinária pós-operatória devido à inibição parcial do nervo parassimpático da bexiga, diminuindo o reflexo de micção. É também responsável pelo aumento do tónus do esfíncter da bexiga através da estimulação simpática excessiva, resultando no aumento da resistência à libertação de urina. A

combinação destes dois fatores aumenta o risco de retenção urinária (Elsamra e Ellsworth, 2012). Os opióides administrados via i.v. e epidural apresentam um risco de retenção urinária superior à dos opióides administrados oralmente (Dolin e Cashman, 2005).

### 3.5.7. Efeitos dermatológicos

A administração intravenosa de heroína está associada a várias alterações dermatológicas características do seu consumo, que representam achados autópticos importantes para a investigação toxicológica. A administração com uma agulha hipodérmica em zonas adjacentes às veias de grande calibre provoca cicatrizes lineares (*needle tracks*) e hemorragias devido aos fibrócitos e fibroblastos (Clatts *et al.*, 2007).

O fenómeno de “*skin popping*” é comum em toxicodependentes e ocorre quando a droga é injetada nos tecidos (por via subcutânea ou intradérmica) geralmente com o intuito de se evitar as marcas de punção venosa. A gravidade está associada ao facto de serem utilizadas seringas e materiais não esterilizados, introduzindo assim nos tecidos, juntamente com a droga, microorganismos que podem causar infeções graves, necrose, abscessos e úlceras (Del Giudice, 2004) e, quando atinge zonas mais profundas como o músculo, leva à miosite crónica (Saukko e Knight, 2004).

A flebotomia é importante na análise *post mortem* e é comumente observada em mortes relacionadas com a heroína (Maher e Ho, 2009; Benomran, 2008).

A fascite necrosante é uma infeção que ocorre nos tecidos moles e que evolui rapidamente para inflamação seguida de necrose muscular e gordura subcutânea (Asfar *et al.*, 1991; Dinis-Oliveira *et al.*, 2012). Está comumente relacionada com o abuso de heroína por via i.v., em especial a heroína de cor castanha devido à incompleta acetilação da morfina e na forma não purificada (Bucardo *et al.*, 2005). Este tipo de infeções são graves, podendo causar morte. O *Streptococcus pyogenes* é o agente patogénico mais frequentemente associado a esta infeção. No entanto, o *Clostridium* e *Staphylococcus aureus* foram encontrados após a injeção via i.m. ou s.c. (Miller, 2005).

Os nódulos escuros são facilmente identificados no exame *post mortem* (Dunbar *et al.*, 2007).

A síndrome de “*puffy hand*” ocorre com a administração de qualquer opióide via intravenosa. Manifesta-se como edema na região dorsal das mãos, podendo ser igualmente observado nos pés devido à oclusão venosa e/ou drenagem linfática (Andresz *et al.*, 2006). Agarwal *et al.* (2007) apresentam um caso em que após administração de pentazocina via i.v., o paciente desenvolveu a síndrome de mão inchada com úlceras irregulares e profundas, com hiperpigmentações e exsudados amarelados tanto nas mãos como pernas e pés. A fibromiosite observa-se no tecido muscular existente no local da injeção i.m. (Das *et al.*, 1999).

A dermatite de contacto ocorre em indivíduos previamente sensibilizados e que são re-expostos ao alergéno. A morfina, a heroína e a codeína apresentam uma estrutura química capaz de provocar a libertação de histamina, desencadeando a urticária, rubor, prurido e eritema. As reações anafiláticas foram descritas por Cygan *et al.* (2000), demonstrando uma situação de asma grave e insuficiência respiratória aguda, após inalação de heroína. Na análise *post mortem* foram encontrados níveis elevados de triptase, sendo este um indicativo de morte provocada por uma reação anafilática (Fineschi *et al.*, 2001).

A candidíase disseminada é responsável por lesões oculares e osteoarticulares que podem ser observadas após a administração via i.v. de heroína castanha (Dinis-Oliveira *et al.*, 2012).

#### 3.5.8. Dependência e síndrome de abstinência

A dependência é o resultado da adaptação dos mecanismos homeostáticos, como consequência do consumo crónico, que podem variar entre os diferentes opióides utilizados, normalmente associados a opióides agonista  $\mu$  totais, como morfina e a heroína (Katzung *et al.*, 2009). A administração contínua de opióides provoca alterações nos sistemas biológicos e, como consequência, o organismo estabelece um novo estado de equilíbrio, adaptando-se à presença do composto. Do ponto de vista clínico, a

redução do consumo, a interrupção abrupta de opióides e a administração aguda de um antagonista opióide, leva ao aparecimento de sinais e sintomas exacerbados designados de síndrome de abstinência, o que requer a necessidade de readministração continuada de forma a contrariar efeitos indesejáveis e a manter a normalidade das suas funções (Goldberg, 2014).

A síndrome de abstinência é uma consequência da perda do impacto inibidor a que o organismo está sujeito, provocando a libertação excessiva de neurotransmissores, resultando em sinais fisiológicos, comportamentais e cognitivos exacerbados (Kosten e George, 2002). Os sintomas variam dependendo do grau de dependência, e das características farmacocinéticas (tempo semivida) dos opióides (Tabela 2) (Karch, 1998). Normalmente a síndrome tem uma duração de 7 a 10 dias.

**Tabela 2:** Síndrome de abstinência de opióides (adaptado de Oliveira *et al.*, 2015)

<b>6 – 12h</b>	Lacrimação, rinorreia, sudorese, bocejo
<b>12–14h</b>	Irritabilidade, piloereção, sono agitado, fraqueza, midríase, tremores, anorexia e espasmos musculares
<b>36 – 72h (pico da síndrome)</b>	Ansiedade, taquicardia, midríase, insónia, hipertensão, câibras, anorexia severa, calafrios, arrepios, espirros, náuseas e vômitos, hiperventilação, cólicas abdominais e dores musculares

### 3.5.9. Tolerância

A dependência é por vezes acompanhada de tolerância, sendo um fenómeno comum dos opióides. Consiste na progressiva necessidade do aumento da dose e da frequência para se obter um efeito desejado constante. O desenvolvimento de tolerância pode ser explicado através de mecanismos neurológicos de adaptação aos recetores, uma vez que gradualmente se tornam menos sensíveis à estimulação. A readaptação do metabolismo, a distribuição da droga e a variabilidade individual estão igualmente envolvidos no desenvolvimento de tolerância (Bogotte de Almeida, 2004).

### 3.5.10. Síndrome do “body packer”

Atualmente, o tráfico de droga também ocorre através dos seres humanos, designados de “body packers”. São indivíduos que ingerem invólucros contendo drogas ilícitas com o objetivo de as transportar ilegalmente, de um país para outro, sendo igualmente apelidados de “correios da droga”. Além do tubo digestivo, os invólucros contendo a droga podem ser transportados por outras vias como a retal ou vaginal, sendo neste caso denominados de “body pushers” (Schaper *et al.*, 2007).

Os invólucros ingeridos através do TGI são expulsos com o auxílio de laxantes. A quantidade que a pessoa pode transportar é cerca de um quilograma estando embrulhada em plástico, preservativos, balões ou dedos das luvas de látex, sendo depois selados a quente e novamente enrolados em várias camadas de látex. Das complicações envolvidas destacam-se a obstrução intestinal, a permeabilidade do material de empacotamento à água, a difusão da droga para o TGI, a perfuração dos invólucros que levam à intoxicação aguda e por vezes à morte (Booker *et al.*, 2014; Jakhar *et al.*, 2013).

Quando há uma situação de morte devido à síndrome “body packer”, o mecanismo associado está relacionado com a insuficiência respiratória, devido aos efeitos supressores da heroína nos centros respiratórios que levam à hipoxia, à hipercapnia e ao edema pulmonar. A presença das “bolotas” e as análises toxicológicas efetuadas a amostras colhidas *ante-mortem* (no hospital) e *post mortem*, bem como os relatórios clínicos, são essenciais na interpretação destes casos (Booker *et al.*, 2014).

### 3.6. Tratamento de intoxicações

A intoxicação aguda por opióides ocorre com qualquer opióide, sendo, no entanto, mais frequente para a heroína devido à elevada prevalência do consumo ilícito deste opióide.

A intoxicação ocorre devido à sobredosagem, acidental ou intencional. Quando é observada a tríade de sintomas que inclui a miose, depressão respiratória (definida como taxa respiratória inferior ou igual a 12 num indivíduo que não esteja em repouso fisiológico) e coma, esta é indicativa de intoxicação aguda por opióides. No entanto,

outros sintomas poderão existir que indicam suspeita de consumo de opióides, nomeadamente náuseas, vômitos, sedação, euforia, pele azulada e hipotermia (Boyer, 2012).

Os tratamentos de intoxicação aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) são indicados na tabela 3 (Bart, 2012).

**Tabela 3:** Tratamento de intoxicações por opióides (adaptado de Boyer, 2012)

<b>1. Monitorização do sistema cardiovascular e sistema respiratório</b>
<b>2. Restabelecimento da função respiratória adequada através de ventilação assistida ou controlada.</b>
<b>3. Oxigenoterapia</b>
<b>4. Administração de naloxona de forma a controlar os efeitos a nível do SNC e respiratórios</b>
<b>5. Controlo da hipotensão através da administração de fluidos via i.v.</b>
<b>6. Intervenção terapêutica</b> <ul style="list-style-type: none"><li>a) Doxapram para tratamento da depressão respiratória</li><li>b) Vasopressores para tratamento de hipotensão</li><li>c) Anticonvulsivantes para tratamento de convulsões</li></ul>
<b>7. Outras medidas de suporte</b> <ul style="list-style-type: none"><li>a) Reaquecimento devido situações de hipotermia</li><li>b) Ventilação mecânica</li></ul>

A naloxona é administrada em terapêutica única, em associação com a anestesia geral, uma vez que inibe competitivamente a ligação do agonista opióide, revertendo de forma parcial ou total os efeitos depressivos induzidos pelos opióides. A dose administrada é empírica uma vez que depende da quantidade de opióide que o indivíduo consumiu; no entanto, pode variar entre 0,4 e 2 mg via i.v., e poderá ser repetida em intervalos de 2-3 minutos mas sempre com o apoio da ventilação assistida (no máximo podem ser administradas até 15 mg de naloxona). Deve-se iniciar com uma dose mínima e se for necessário ir aumentando de acordo com a resposta do intoxicado, dependendo sempre da situação clínica (Nelson *et al.*, 2011). A dose máxima não deve exceder os 10 mg e

em crianças, no tratamento de intoxicações, a naloxona administrada deve ser de 0,01 mg/Kg. Se necessário pode ser administrada uma injeção adicional de 0,1 mg/Kg de peso corporal (INFARMED, 2014).

A naloxona oral sofre um extenso efeito de primeira passagem, daí apresentar baixa biodisponibilidade, sendo no entanto bem absorvida por via parenteral. A naloxona apresenta um tempo de semivida que varia entre 60-90 min em adultos e 2-3 vezes mais em recém-nascidos. O início da ação ocorre 1 a 2 minutos após a administração i.v. e 2-5 min após administração via i.m. (Nelson *et al.*, 2011). É recomendado alertar para o risco de desencadeamento de síndrome de abstinência por opióides após a administração de naloxona.

### 3.7. Tratamento da dependência

A metadona, a buprenorfina e a naltrexona foram aprovadas pela FDA para o tratamento de substituição de primeira linha em casos de dependência de opióides, sendo o tratamento com a metadona o mais frequente (Bart, 2012).

A privação do opióide deve ser gradual de forma a evitar-se o aparecimento de uma síndrome de abstinência intensa.

Os três fármacos apresentam diferentes perfis farmacocinéticos favorecendo diferentes usos terapêuticos (Trescot *et al.*, 2008). A metadona é administrada via oral sendo um exemplo de agonista total, que se liga aos recetores  $\mu$ , sendo o efeito diretamente proporcional à dose administrada. No entanto, a metadona apresenta um diferente mecanismo de ação farmacológico e é utilizada para evitar a síndrome de abstinência e para bloquear o efeito eufórico característico do consumo de opióides. Assim, trata-se de um tratamento de manutenção que apenas estabiliza e controla os sintomas ao longo do tempo.

A naltrexona é antagonista, ou seja, liga-se aos recetores opióides bloqueando-os. É administrada por via i.v. mensalmente e é eficaz na redução de casos de recaídas em

indivíduos que se encontram em sistema de justiça criminal (Bogotte de Almeida, 2004).

A buprenorfina é um exemplo de agonista parcial dos recetores opióides, capaz de deslocar ou bloquear um agonista total dos recetores  $\mu$ , como a heroína, impedindo a euforia e analgesia (SAMHSA, 2014). A buprenorfina apresenta baixa biodisponibilidade oral mas, como apresenta solubilidade lipídica elevada, apresenta uma boa biodisponibilidade sublingual, um tempo de semivida elevado sendo utilizado em dose única diária quando se trata de terapêutica de manutenção (Trescot *et al.*, 2008).

Neste tipo de casos, apoia-se a tolerância cruzada, iniciando o tratamento com a administração de metadona ou buprenorfina (disponível em formulações transdérmica e sublingual), ambas com síndrome de abstinência ligeira, seguido da diminuição progressiva da dose.

#### IV. OPIÓIDES EM TOXICOLOGIA FORENSE

##### 4.1. Áreas de aplicação da Toxicologia Forense

A Toxicologia Forense é uma ciência de características essencialmente analíticas que tem por objetivo ajudar no esclarecimento de questões do âmbito judicial que possam estar relacionadas com intoxicações e suas potenciais consequências, fatais ou não fatais, no âmbito dos diversos domínios do Direito (penal, trabalho, civil ou outros). No âmbito das suas competências, são realizadas perícias e exames laboratoriais, químicos e toxicológicos, determinando os efeitos adversos dos xenobióticos no organismo, bem como a análise qualitativa e quantitativa de substâncias nas matrizes biológicas e não biológicas recolhidas ao indivíduo vivo ou *post mortem*. Além da colheita das amostras para estudos periciais, é da competência da Toxicologia Forense a compreensão da complexidade da atividade laboratorial e dos fundamentos da toxicocinética, da toxicodinâmica e dos sinais e sintomas de intoxicação dos diferentes xenobióticos. A Toxicologia Forense é igualmente responsável pela interpretação dos resultados em relação às alterações fisiológicas e comportamentais (Dinis-Oliveira *et al.*, 2015a).

As principais áreas de aplicação da Toxicologia Forense incluem a toxicologia *post mortem*, a toxicologia comportamental e o rastreio de drogas de abuso.

#### 4.1.1. Toxicologia *post mortem*

A análise toxicológica *post mortem* é um forte instrumento judiciário na persecução penal, uma vez que há uma crescente disponibilidade de drogas ilícitas. A análise toxicológica permite avaliar, qualitativamente e quantitativamente, se as substâncias encontradas nas amostras biológicas *post mortem* tiveram influência no óbito ou se foram a causa primária. As investigações toxicológicas *post mortem* auxiliam na determinação da causa e das circunstâncias da morte, ou seja, se ocorreu uma sobredosagem, suicídio, morte súbita (morte inesperada de um indivíduo reconhecido como saudável), morte violenta (acidente de viação, intoxicação medicamentosa), crime (intoxicação homicida), ou acidente de trabalho (intoxicação por pesticidas, solventes, metais pesados) (Moreau e Siqueira, 2008).

Durante a autópsia, o médico legista pode solicitar exames toxicológicos *post mortem* devido à observação de lesões anátomo-patológicas de doença natural que, apesar de serem interpretadas como causa de morte imediata (por exemplo, embolia pulmonar), poderá haver a existência de uma causa diferente, como o consumo de drogas, ou quando as lesões anátomo-patológicas indiciam que se trata de morte violenta (por exemplo, a cor carminada do cadáver) (Karch, 2008). Quando há suspeita de intoxicação é igualmente necessário verificar se há sinais de venopuncturas recentes ou antigas, verificar o odor exalado pelo cadáver, avaliar o conteúdo estomacal bem como realizar a perinecropsia, ou seja, a perícia ao local onde o cadáver foi encontrado. Os indícios que podem ser registados são a presença de seringas, agulhas, algodão, tampas de garrafas, colheres, embalagens de medicamentos, comprimidos, conteúdo estomacal, entre outros (Karch, 2008).

#### 4.1.2. Toxicologia comportamental

A toxicologia comportamental tem como objetivo principal o estudo das alterações em termos de aprendizagem, memória e comportamento do indivíduo após a exposição a

determinada droga, bem como analisar as implicações legais e económicas (Needleman, 1995). É também responsável pela avaliação das consequências médico-legais do uso de drogas ilícitas e lícitas (álcool), que inclui investigações de acidentes de viação, assaltos, homicídio e suicídios (Logan e Snirnow, 2010; Poklis, 2010).

Em Portugal, a avaliação do estado influenciado por substâncias psicotrópicas é essencial no cumprimento da lei da fiscalização rodoviária, tendo em conta o Decreto-Lei n.º 44/2005 que define que a condução rodoviária é estritamente proibida sob influência de substâncias psicotrópicas como opióides, canabinóides, cocaína e seus metabolitos, e anfetaminas. Em Novembro de 2001, a aquisição, a posse e o consumo de drogas foram descriminalizados mas não despenalizados uma vez que o consumo de substâncias psicoativas ilícitas é considerado um ato punível por lei, mas não é um comportamento alvo de processo-crime, representando assim uma contra-ordenação social (SICAD, 2007). Tal facto só se observa se as quantidades não ultrapassarem o consumo médico previsto na lei n.º 30/2000 no Diário da República. Para efeitos da presente lei, a aquisição e a posse para consumo próprio das substâncias não poderão exceder a quantidade necessária para o consumo médio individual durante o período de 10 dias. Após a deteção do suspeito, as entidades fiscalizadoras iniciam os exames de rastreio sendo a saliva, suor ou urina as matrizes mais utilizadas, por serem métodos não invasivos. Posteriormente, se o resultado for positivo, é necessário a recolha de sangue para proceder à análise quantitativa, sendo a matriz mais relevante, por permitir a correlação entre a alteração comportamental e a presença da substância psicoativa no sangue (Concheiro *et al.*, 2006). A urina apesar de ser a amostra de eleição para os testes de rastreio, na avaliação toxicológica comportamental não é uma mais-valia, uma vez que não há uma correlação direta entre a concentração da droga na urina e a alteração psicomotora, em que o resultado positivo apenas indica que o indivíduo consumiu a droga.

Os exames são realizados num estabelecimento da rede pública de saúde e confirmados através de cromatografia líquida ou gasosa pelo Serviço de Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal e o resultado é analisado tendo em conta o quadro n.º 2 do anexo v da Portaria n.º 902-B/2007, de 13 de Abril.

## 4.1.3. Rastreamento de drogas

Devido ao aumento colossal do consumo de drogas ilícitas e lícitas com intenções não terapêuticas, foi necessário redobrar os cuidados, realizando testes de controlo de drogas de abuso a populações alvo. Atualmente, estes são realizados rotineiramente em diversas situações, tais como o despiste do uso de drogas no ambiente de trabalho (por exemplo, militares, condutores de veículos que efetuam transporte especial e trabalhadores de indústrias nucleares), como pré-requisito para emprego, na prática desportiva, na prática clínica para avaliação do tratamento da dependência, em acidentes onde existe a suspeita de consumo excessivo (Passagli, 2011 e Poklis, 2010). Os testes de rastreio são imunoensaios aprovados pela FDA que permitem obter resultados rápidos, sensíveis e a baixo custo (Wright, 2014). Os peritos são responsáveis pela recolha de amostras, como a urina (que indica se o consumo foi recente) ou o cabelo (que fornece um historial do consumo da droga). As drogas pesquisadas neste tipo de rastreio encontram-se descritas na tabela 4.

**Tabela 4:** Drogas comumente pesquisadas em testes de rastreio utilizando urina como amostra biológica e respetivos valores de *cut-off* para o exame de rastreio na urina e para os testes de confirmação (adaptado de Poklis, 2010).

	Concentração (ng/mL)	
	Testes de rastreio (Imunoensaio)	Teste de confirmação
<b>Metabolitos de marijuana</b>	50	15**
<b>Metabolitos de cocaína</b>	300	150***
<b>Opióides</b>	2000*	—
<b>Morfina</b>	—	300
<b>Codeína</b>	—	300
<b>6-monoacetilmorfina</b>	—	15
<b>Fenciclidina</b>	25	25
<b>Anfetaminas</b>	1000	—
<b>Anfetamina</b>	—	500
<b>Metanfetamina</b>	—	500

(\*25 ng/mL, se o imunoensaio é específico para o opióide livre; \*\* ácido 11-nor-delta-9-tetraidrocanabinol carboxílico; \*\*\*benzoilecgonina).

## 4.2. Investigação toxicológica

A investigação toxicológica é um conjunto de processos analíticos com o objetivo de deliberar se as substâncias foram a causa da morte ou se contribuíram para esse fim. Inicia-se com o reconhecimento da história completa (cena do crime, achados autópticos, a elaboração de relatórios policiais, o resultado da autópsia, assim como, a história médica e social), seguindo-se a colheita das amostras *post mortem*, com as análises toxicológicas qualitativas e quantitativas dos tóxicos tendo em conta o intervalo de tempo decorrido entre a morte e a recolha das amostras e, por fim, um diagnóstico e a respetiva interpretação dos resultados para completar a investigação (Negrusz e Cooper, 2013).

Em pessoas que receberam cuidados médicos antes da morte, deve haver transparência em toda a informação relacionada com as técnicas adotadas e os tratamentos efetuados. Todos os casos, suspeitos de morte causada por xenobióticos, devem ser confrontados com todos os dados médicos e científicos para determinar se os xenobióticos e o efeito tóxico específico encontrados e analisados *post mortem* foram responsáveis pela morte, direta ou indiretamente. As concentrações nos tecidos, juntamente com uma estimativa da quantidade total de droga remanescente no estômago no momento da morte, fornecem informações sobre o grau de toxicidade esperada e auxiliam na determinação de intenções, ou seja, se foi acidental ou um caso de suicídio (Saferstein, 2015).

### 4.2.1. Achados autópticos

Os achados autópticos são evidências encontradas quer no indivíduo, quer no exame ao local, que permitem efetuar uma avaliação do caso mesmo antes da obtenção dos resultados dos exames complementares. Algumas evidências sugerem o envolvimento de determinados compostos específicos (por exemplo, colheres, seringas, embalagem de medicamentos prescritos vazios, entre outros, podem ser indicativos de overdose). No entanto, estes achados devem ser sempre confirmados com a análise toxicológica (Dinis-Oliveira *et al.*, 2012; Saukko e Knight, 2004).

O “*foam cone*”, cone de espuma de cor branca ou rosa expelido pela boca e narinas, é um achado autóptico comumente registado em casos de morte por overdose de heroína. Este fenómeno ocorre devido à anoxia que posteriormente evolui para edema pulmonar, não estando apenas associado ao consumo de heroína. Além da presença do “*foam cone*” deverão existir outros achados como, por exemplo, “*skin popping*”, a síndrome de “*puffy hand*”, marcas de venopunção nos braços, na fossa cubital ou nas veias do antebraço e dorso das mãos, entre outros, que permitam corroborar que a overdose ocorreu após administração de heroína (Dinis-Oliveira *et al.*, 2012; Saukko e Knight, 2004).

#### 4.2.2. Aspectos pré-analíticos na análise toxicológica *post mortem*

Os aspetos pré-analíticos apresentam um papel importante na qualidade e na fiabilidade dos resultados analíticos obtidos, uma vez que dependem do tipo e da qualidade da amostra recolhida. A fase pré-analítica abrange etapas como o pedido, a colheita, o armazenamento, o transporte e a preparação de amostras biológicas (Skopp, 2004).

A variação pré-analítica ocorre devido a interferências *in vivo* e *in vitro* existindo diversos fatores que podem provocar alterações na concentração dos xenobióticos entre o momento da morte e a subsequente autópsia, designadas de alterações autolíticas (destruição espontânea) e processos de putrefação (decomposição), que por sua vez, vão limitar a utilidade das amostras assim como, influenciar as concentrações durante a autópsia, resultando na degradação e conversão de alguns compostos. As amostras estão padronizadas para cada tipo de droga contudo também existem amostras alternativas quando as principais não estão disponíveis (Nelson *et al.*, 2011).

A escolha da matriz depende de fatores que se relacionam com a natureza, a integridade da matriz, tipo de investigação (*ante mortem* ou *post mortem*), considerações analíticas, é importante conhecer qual foi a via de administração, se é de uso recente ou de longo prazo, estimativa do intervalo de tempo entre a administração e a morte, a caracterização dos seus metabolitos, assim como a distribuição de ambos pelos vários tecidos e fluidos biológicos (Poklis, 2010). O conhecimento dos mecanismos de degradação das drogas permite que a Toxicologia Forense conheça bem a substância

alvo, particularmente das drogas mais lábeis, de forma a enquadrar melhor os métodos de conservação e estabilidade da substância em questão (Karch, 1998).

#### 4.2.2.1.Recolha, envio e conservação de amostras

A recolha e o armazenamento das amostras biológicas são das etapas mais importantes na análise toxicológica, para garantir a fiabilidade dos resultados e subsequente interpretação. A escolha da amostra por parte do toxicologista deve ser orientada pelo histórico do caso, pela disponibilidade e quantidade da(s) amostra(s), pela estabilidade do analito, pelos parâmetros toxicocinéticos, pelo tempo de deteção, pela presença de interferências e pelo estado de putrefação do cadáver (Negrusz e Cooper, 2013). As amostras disponíveis podem ser inúmeras e com qualidade variável, sendo que as principais são: sangue periférico (da veia femoral ou jugular), urina, líquido cefalorraquidiano, cabelo, unhas, materiais recolhidos dos orifícios do corpo através de cotonetes, pele, fluidos corporais e tecido (especialmente o fígado). Os fluidos biológicos devem ser recolhidos para recipientes estéreis de forma a evitar contaminação, com auxílio de pipetas ou seringas descartáveis de grande calibre ou seringas hipodérmicas, adequando-se a natureza dos materiais a cada uma das amostras (Dinis-Oliveira *et al.*, 2015b).

O recipiente escolhido deve apresentar o tamanho adequado, tendo em conta o volume e peso da amostra, de forma a minimizar as perdas por evaporação quando a droga é volátil e de forma a evitar perdas oxidativas. Há preferência do uso de tubos de plástico com rolha quando a amostra é fluida, uma vez que evita a quebra durante o transporte e congelação. Em relação à congelação, o recipiente utilizado deve assegurar que cerca de 20% do espaço fica livre (Skopp, 2004). Os tubos de vidro devem ser inertes e preenchidos de forma a diminuir o *headspace* evitando assim a perda por evaporação, perda oxidativa e a sua abertura só deve ocorrer quando necessário e após uma refrigeração a 4°C (Dinis-Oliveira *et al.*, 2015b).

Os recipientes de plástico são adequados na recolha de amostras de tecido sólido ou conteúdo gástrico uma vez que a natureza do tecido sólido reduz o contacto direto com o recipiente (Karch, 1998). Antes de a amostra seguir para o laboratório forense, o

recipiente deve ser colocado num saco plástico, selado, devidamente etiquetado de forma a garantir a cadeia de custódia e indicando se é de risco biológico ou químico e, se assim for, o transporte deve seguir as normas de saúde e segurança. O recipiente deve ser identificado com o número institucional do caso, a identificação da vítima, a data e a hora da colheita, o tipo de amostra, bem como o local anatómico em que foi recolhida (sangue cardíaco ou femoral) e, por fim, a rubrica do perito (Dinis Oliveira *et al.*, 2015b).

Para que a amostra seja analisada é necessário anexar a requisição toxicológica e a ficha de garantia da cadeia de custódia (Hepler e Isenschmid, 2008). As condições de conservação das amostras devem ser adequadas a cada analito. A maioria das amostras armazenadas a curto prazo é mantida a 4°C; no entanto, quando o armazenamento é de longo prazo, devem ser armazenadas a uma temperatura menor ou igual a -20°C. O cabelo, unhas e sangue seco são armazenados à temperatura ambiente (Skoop, 2009; Flanagan *et al.*, 2005). A preservação normalmente não carece de grandes cuidados, com exceção do sangue em que é utilizado um conservante apropriado, se assim se justificar. Os anticoagulantes não são recomendados nas amostras de sangue *post mortem* porque afetam a concentração da droga (Flanagan *et al.*, 2005).

Os mecanismos de degradação durante o armazenamento são semelhantes aos processos de autólise e putrefação. Dentre os processos mais comuns, destacam-se a hidrólise, a oxidação e a redução, que normalmente são mais lentas quando as temperaturas de armazenamento são baixas. Os processos ocorrem devido à presença de enzimas endógenas como esterases, glucuronidasas ou invasão bacteriana, ocorrendo durante o intervalo *post mortem*. As propriedades físico-químicas da droga, as características da amostra recolhida, o procedimento de recolha, a seleção do recipiente e a forma de armazenamento são os principais aspetos que vão determinar a estabilidade das substâncias (Negrusz e Cooper, 2013).

A heroína é rapidamente convertida em metabolitos devido à hidrólise. Em situações *post mortem*, mesmo após a recolha da amostra, ocorre a conversão em 6-acetilmorfina e morfina, à temperatura ambiente, mas quando armazenada a -20°C o composto é estável durante cerca de 12 meses (Drummer, 2004). É essencial ter em consideração

que a legitimidade da evidência baseia-se na forma como é obtida, ou seja, os cuidados tidos na colheita, metodologia, armazenamento, entre outros, que devem ser organizados no decorrer de uma cadeia de custódia assegurando assim a fiabilidade no resultado pericial (Dinis-Oliveira *et al.*, 2015b).

#### 4.2.2.2. Importância da cadeia de custódia

A Toxicologia Forense é responsável por documentar a manipulação das provas toxicológicas específicas, ou seja, todas as amostras e provas são manipuladas tendo em conta a cadeia de custódia de forma a verificar a integridade da amostra recolhida e a documentar a história cronológica da evidência bem como para permitir a rastreabilidade de todas as operações realizadas desde a colheita até eliminação da amostra. O facto de assegurar o registo de todas as fases do processo compõe um protocolo legal que facilita assim a garantia da competência do caminho que a amostra percorreu, demonstrando assim que a evidência permaneceu intacta e sem adulterações. A recolha é o primeiro elo da cadeia de custódia e deve compreender o número que indique o caso ou número do pedido, a identificação da vítima, a data e a hora da colheita da amostra, a identificação do perito que efetuou a recolha, a descrição da amostra, bem como quem fez o transporte para o laboratório e a confirmação da entrega da mesma. No laboratório procede-se à confirmação da requisição que acompanha a amostra de forma avaliar as condições de colheita e de transporte. Posteriormente é preenchido um formulário onde fica registado a forma de armazenamento e a data do início da análise (Karch, 2008; Flanagan *et al.*, 2005).

#### 4.2.2.3. Redistribuição *post mortem*

A redistribuição *post mortem* baseia-se na transferência de substâncias após a morte a favor do gradiente de concentração, resultando em variações da concentração do tóxico, dificultando significativamente a interpretação dos resultados analíticos, uma vez que pode não ser a exata em relação a altura da morte (Poklis, 2010). Para uma correta interpretação dos resultados, é necessário ter em consideração que as células iniciam o processo de morte celular e subsequentemente, a perda da integridade. Devido ao estado de hipoxia, inicia-se o metabolismo anaeróbio, aumentando assim as concentrações de

ácido láctico e fosfatos inorgânicos, resultando, na redução do pH intracelular. A bomba sódio-potássio deixa de exercer a sua função amentando o sódio intracelular seguindo de edema e uma cascata de acontecimentos que provocam danos na membrana celular, levando à difusão passiva dos xenobióticos (Yarema e Becker, 2005).

Este fenómeno engloba a difusão a partir de órgãos reconhecidos como reservatório (pulmão, coração, fígado), a difusão das substâncias dos órgãos para o sangue, a difusão passiva do conteúdo existente no estômago para os órgãos adjacentes, bem como a atividade metabólica residual (Skopp, 2004; Yarena e Becker, 2005; Karch, 2008; Jones, 2008).

As características físico-químicas dos xenobióticos podem afetar a concentração no momento da morte, destacando-se o volume de distribuição, a ligação a proteínas plasmáticas, a lipofilicidade e o pKa. As drogas básicas e lipofílicas com volume aparente de distribuição superior a 3 L/Kg apresentam elevada capacidade se serem sequestrados pelos tecidos e, por isso, apresentam alta probabilidade de sofrer redistribuição *post mortem* (Skopp, 2004).

A redistribuição a nível pulmonar afeta a cavidade cardíaca, o que explica a elevada concentração de xenobióticos na amostra de sangue proveniente da cavidade esquerda do coração. No fígado, a redistribuição ocorre através das veias hepáticas dirigindo-se para a veia cava inferior e posteriormente para a cavidade cardíaca direita, bem como por difusão direta para órgãos vizinhos, nomeadamente estômago, duodeno e vesícula biliar. Ocorre também a difusão passiva do conteúdo estomacal para o lobo esquerdo do fígado, lobo esquerdo do pulmão e ventrículo esquerdo (Drummer e Gerostamoulos, 2002). A razão entre a concentração do tóxico no sangue cardíaco e no sangue periférico auxilia na avaliação da redistribuição *post mortem* e, em geral, as substâncias que apresentam esta razão superior a um, apresentam maior probabilidade de sofrer redistribuição *post mortem*. Na tabela 5 encontra-se a razão entre as concentrações no sangue cardíaco e no sangue femoral para algumas substâncias psicoativas (Kennedy, 2015).

**Tabela 5:** Razão entre sangue cardíaco/sangue femoral para algumas substâncias psicoativas (adaptado de Kennedy, 2015).

<b>Substâncias psicoactivas</b>	<b>Razão sangue cardíaco/sangue femoral</b>	<b>Intervalo</b>
<b>Amitriptilina</b>	3,1	0,6-15
<b>Diazepam</b>	1,6	0,2-12
<b>Clorpromazina</b>	4,0	1,0-8,0
<b>Cocaína</b>	2,3	1,5-3,2
<b>Metadona</b>	1,8	0,4-7,3
<b>Morfina</b>	2,2	1,0-5,8
<b>Propoxifeno</b>	2,6	0,8-12

A morfina apresenta um volume de distribuição entre 3 e 5 L/kg e uma percentagem de ligação a proteínas plasmáticas entre 20 a 35%, sendo estes os fatores que justificam a ocorrência de redistribuição *post mortem*. No entanto, Gerostamoulos e Drummer (2000) avaliaram a redistribuição *post mortem* em 40 casos de morte relacionados com a heroína, quantificando a M3G, a M6G e a morfina total. Este estudo demonstrou a tendência para concentrações mais elevadas destes metabolitos no sangue cardíaco, quando comparado com sangue femoral ou recolhido na subclávia.

#### 4.2.3. Matrizes biológicas

A seleção e a recolha do material biológico para a realização de análises toxicológicas é um dos passos mais importantes na interpretação dos resultados. A escolha deve ter em conta todas as características da substância a pesquisar, todas as modificações possíveis do analito devido a alterações metabólicas e, principalmente, a toxicocinética, a estabilidade na matriz, bem como a disponibilidade da amostra no cadáver. A ocorrência de fenómenos de redistribuição *post mortem* deve ser tida em consideração aquando da seleção das matrizes de forma a garantir a confiabilidade e fidedignidade nos resultados obtidos para posterior interpretação (Jones, 2008). Na tabela 6 são apresentadas as amostras preferencialmente recolhidas na análise *post mortem* tendo em conta o tipo de caso observado. O sangue e a urina são as matrizes convencionais mais prevalentes nas análises toxicológicas, porém, as matrizes biológicas alternativas têm

vindo a ser cada vez mais solicitadas devido às vantagens da sua utilização (Bordin *et al.*, 2015).

**Tabela 6:** Amostras recomendadas para colheita em diferentes casos *post mortem* (adaptado de Whitley e Figarelli, 2009).

<b>Tipo de caso</b>	<b>Amostra recolhida</b>
<b>Suicídio, acidentes industriais, acidentes de viação</b>	sangue, urina, humor vítreo, fígado
<b>Suspeita de homicídio</b>	sangue, urina, humor vítreo, fígado, bÍlis
<b>Drogas</b>	sangue, urina, humor vítreo, fígado, bÍlis, conteúdo gástrico
<b>Abuso de substâncias voláteis</b>	sangue, urina, humor vítreo, líquido pleural, pulmão
<b>Intoxicação por metais pesados</b>	sangue, urina, humor vítreo, fígado, cabelo, rim

#### 4.2.3.1.Sangue

O sangue é a matriz de eleição nas análises toxicológicas para a deteção, quantificação e interpretação das concentrações dos compostos, uma vez que permite efetuar a correlação entre a quantidade e os efeitos do tóxico no organismo (Skopp, 2004). Quando o resultado é positivo, indica o uso ou exposição recente uma vez que as substâncias desaparecem da circulação sanguínea de forma bastante rápida. Na análise *post mortem* é recomendada a colheita de sangue cardíaco e periférico para efetuar a avaliação da suscetibilidade de redistribuição *post mortem* (Drummer, 2004). Apesar do sangue cardíaco ser mais abundante e de fácil colheita, é afetado pela redistribuição *post mortem* por se localizar numa região central e próximo de órgãos com capacidade de acumular elevadas quantidades de compostos. O sangue periférico é colhido através da veia femoral ou subclávia, sendo menos suscetível a fenómenos de redistribuição, por se encontrar afastado da região central e devido à presença de válvulas que impedem o movimento do sangue de outros locais (Cook *et al.*, 2000).

Quando ocorre morte devido ao consumo de heroína, esta raramente é quantificada no sangue devido ao seu tempo de semivida muito reduzido, sendo detetada a presença de morfina livre no sangue. O período de deteção da morfina é cerca de 12 horas e o pico da concentração plasmática de morfina surge 1 hora após a administração oral e 5 minutos após a administração por via i.v. (Drummer, 2004).

#### 4.2.3.2. Urina

A urina é composta por aproximadamente 98% de água e é sujeita ao processo de filtração renal, tornando-a na amostra de eleição para a identificação dos compostos tóxicos e respetivos metabolitos. É a matriz que permite identificar uma exposição recente a drogas de abuso, sendo utilizada rotineiramente no *screening* de agentes tóxicos através da realização de imunoensaios (Drummer e Gerostamoulos, 2002; Baselt, 2004; Karch, 2008).

A filtração renal permite a eliminação de proteínas, lípidos e outros interferentes endógenos, facilitando o processo de preparação da amostra. Quando a morte ocorre rapidamente, o resultado da pesquisa pode ser negativo e não é possível correlacionar a concentração da droga na urina e os efeitos farmacológicos e tóxicos devido à taxa de excreção dos tóxicos e ao volume de urina. Assim, a deteção da droga na urina apenas indica que esta estava presente no organismo algum tempo antes da morte (Stephens *et al.*, 2004; Poklis, 2010).

A urina é a matriz de eleição para o rastreio do uso de opióides. É necessário ter em conta que o tempo de deteção depende da via de administração e da dose administrada mas, em geral, a morfina e a codeína apresentam tempos de deteção na urina entre 1 a 3 dias, utilizando valores de *cut-off* de 200 ng/mL (Drummer, 2004). O uso crónico de heroína permite a deteção da morfina nesta matriz até 11 dias após o consumo da droga (Verstraete, 2004). As concentrações urinárias de morfina podem indicar o consumo de codeína ou heroína (Kerrigan e Goldberger, 2003), sendo que a presença de 6-AM na urina é conclusiva do abuso de heroína, visto que a 6-AM não é metabolito da morfina ou da codeína. No entanto, este metabolito só é detectável na urina até 8 horas após a administração (Drummer, 2004).

#### 4.2.3.3. BÍLIS

A bÍlis é um líquido complexo e variável, recolhida através da vesícula biliar por aspiração com seringa ou por incisão (Skopp, 2004). Funciona como reservatório de xenobióticos sujeitos a excreção biliar e a circulação entero-hepática (como a morfina), sendo importante na excreção de algumas drogas e metabolitos, que são posteriormente eliminados através das fezes (Tassoni *et al.*, 2007). Em Toxicologia Forense, é uma alternativa excelente quando a droga não é detetável no sangue e alguns métodos analíticos foram adaptados e/ou validados especificamente para permitir a quantificação de morfina e 6-acetilmorfina nesta matriz, reduzindo a interferência da matriz (elevada concentração de ácidos biliares e outras substâncias endógenas) (Bévalot *et al.*, 2014).

Vários estudos demonstraram que algumas drogas, como a morfina, estão presentes em concentrações superiores na bÍlis quando comparadas às sanguíneas, o que se torna particularmente relevante especialmente na análise de drogas com tempo de semivida curto (Tassoni *et al.*, 2007; Vanbinst *et al.*, 2002).

#### 4.2.3.4. Humor vítreo

O humor vítreo é um líquido gelatinoso localizado no globo ocular, num ambiente isolado e protegido. É constituído por uma solução aquosa salina (cerca de 99%), que apresenta uma baixa atividade enzimática (ausência de esterases responsáveis pela rápida degradação de heroína) e é menos propensa à decomposição bacteriana, o que justifica a sua maior resistência aos fenómenos de putrefação e redistribuição *post mortem* (Karch, 2008).

É colhida por aspiração através de seringa inserida no centro do globo ocular (Skopp, 2004). Devido à sua natureza aquosa, os xenobióticos com alta afinidade de ligação às proteínas e com carácter lipófilico encontram-se em concentrações inferiores quando comparadas às sanguíneas (Drummer e Gerostamoulos, 2002). Nesta matriz é mais provável a deteção da droga no estado original (não metabolizada) (Bordin *et al.*, 2015). Num caso de morte por overdose de heroína, Wyman e Bultman (2004) demonstraram que o humor vítreo foi a amostra de eleição na pesquisa de 6-acetilmorfina, uma vez que

apresentou maior concentração quando comparada com as encontradas no sangue e no fígado.

#### 4.2.3.5.Fígado

O fígado é um tecido sólido comumente utilizado em casos *post mortem* para completar os dados toxicológicos obtidos no sangue. É o principal órgão responsável pela metabolização de fármacos e drogas, o que explica as elevadas concentrações observadas neste órgão, permitindo que os tóxicos sejam facilmente detetados mesmo quando presentes em baixas concentrações no sangue (Pounder *et al.*, 1996; Dinis-Oliveira *et al.*, 2010). Na interpretação dos resultados é necessário ter em conta o fenómeno de redistribuição *post mortem*, devendo ser recolhido preferencialmente tecido do lobo direito que está menos sujeito a este fenómeno (Skopp, 2004).

#### 4.2.3.6.Matrizes alternativas

##### 4.2.3.6.1. Líquido cefalorraquidiano

O líquido cefalorraquidiano apresenta uma aparência transparente e está localizado num ambiente protegido, estando menos sujeito a contaminação bacteriana. O uso desta amostra é limitado uma vez que existem poucos dados na literatura acerca dos valores de referência, dificultando a interpretação dos resultados analíticos. É recolhido através da punção suboccipital ou pode ser aspirado através dos ventrículos depois do crânio ter sido removido. Em relação aos opióides, é uma matriz alternativa excelente por estar perto do local de ação destes compostos (Skopp, 2004). Estudos demonstram a sua utilidade na deteção de 6-acetilmorfina para determinação de exposição recente a heroína (Jenkins *et al.*,1994).

##### 4.2.3.6.2. Suor

O suor é libertado por glândulas sudoríparas apócrinas e écrinas e é composto por 99% de solução hipertónica e outros constituintes, tais como lactato, ureia e compostos orgânicos. Um dos mecanismos de incorporação de substâncias inclui a difusão passiva

através dos capilares sanguíneos ou a passagem transdérmica. Em geral, as drogas pai (não alteradas metabolicamente) são encontradas no suor, ao contrário dos seus metabolitos polares que normalmente predominam na urina (Bordin *et al.*, 2015). O suor possui a vantagem de não ser invasivo e de facilitar a colheita em indivíduos internados. As principais desvantagens dizem respeito à falta de dados na literatura sobre a toxicocinética e relação dose-resposta das drogas nesta matriz, e às variações interindividuais na quantidade de suor que é excretada. A concentração de opióides no suor representa cerca de 1 a 2% da dose total administrada (Karch, 1998).

#### 4.2.3.6.3. Tecidos queratinizados

O cabelo e as unhas são amostras excelentes uma vez que retêm as drogas durante um longo período de tempo, fornecendo assim informações que excedem a obtida a partir de matrizes convencionais como o sangue e a urina, definindo um histórico do uso ou mudança de hábitos em relação às drogas. O cabelo é considerado um órgão excretor secundário e apresenta diversas vantagens como a indicação da exposição repetida ou crónica, a monitorização clínica e a facilidade na colheita. O cabelo apresenta uma janela de deteção para opióides que pode ir de 5 dias a meses (Karch, 1998).

A baixa atividade metabólica do eixo do cabelo e a proteção exercida pelos componentes da matriz contribuem para a estabilidade dos componentes incorporados (Tagliaro *et al.*, 1998). A pigmentação, os fatores individuais, ambientais e metodológicos (como os procedimentos pré-analíticos e a colheita da amostra) também dificultam a interpretação dos resultados. No entanto, há critérios que permitem observar se a contaminação é externa, através da análise de solução de lavagem avaliando a cinética de *washout* repetida, em que a contaminação é rapidamente removida (Stout *et al.*, 2006). A diminuição da concentração de fármaco nas secções proximais do cabelo pode indicar uma situação de abstinência ou de diminuição do seu consumo, sendo útil em casos de recaída relacionados com a morte. (Dinis-Oliveira *et al.*, 2010).

Para a pesquisa de opióides no cabelo, este deve ser recolhido da região do vértice posterior do couro cabeludo e, em seguida, descontaminado, sendo as soluções de lavagem também utilizadas para análise (Skopp, 2004).

Os opióides e outras drogas incorporam-se no cabelo através da circulação sanguínea em torno do centro de germinação, passando por difusão passiva intracelular durante a queratinização e ficando aprisionados no núcleo do cabelo à medida que ele cresce. A incorporação também pode ocorrer externamente devido à excreção da droga sobre a superfície do cabelo a partir do sebo e do suor (Villain *et al.*, 2010). Esta matriz auxilia na distinção entre o consumo de heroína ou morfina pois torna-se difícil quantificar o metabolito 6-AM em amostras de sangue ou urina devido à reduzida janela de deteção nestas matrizes (Dolan *et al.*, 2004).

Para verificar o tempo de exposição ao consumo, é cortado cerca de 1 a 3 centímetros de cabelo, sendo que cada centímetro corresponde a 1 mês de crescimento.

O cabelo tem tendência a acumular a droga original (sem sofrer metabolização), sendo esta uma vantagem para a deteção de drogas que são rapidamente metabolizadas como é o caso da heroína. De acordo com a literatura, o valor de 0,5 ng/mL encontrado na amostra de cabelo é indicativo do consumo de heroína (Kerrigan e Goldberger, 2003).

As unhas também acumulam drogas durante a exposição a longo prazo fornecendo uma retrospectiva do consumo (Risser *et al.*, 2000). A 6-acetilmorfina foi identificada nas unhas, bem como a morfina, a codeína, a hidroximorfona, a oxicodona e a hidrocodona (Engelhart e Jenkins, 2002).

#### 4.2.4. Análise toxicológica

A seleção do método analítico deve ser feita perante as alternativas disponíveis, tendo sempre em conta a sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão dos métodos. Inicialmente a autoridade judicial emite uma requisição para que sejam recolhidas amostras que, dependendo da situação, poderão ser recolhidas durante a autópsia ou quando os indivíduos estão no hospital. Após a colheita segue-se a preparação da amostra onde é efetuada a análise qualitativa através de métodos de rastreio. Se o resultado da pesquisa for positiva, o resultado é em seguida confirmado por método de quantificação (Rangel, 2003). Este método de quantificação deve ser sensível e basear-se num princípio analítico diferente de forma a evitar que o método de confirmação apresente os mesmos interferentes do método de rastreio (De cássia Mariotti *et al.*, 2015). Por fim, o resultado é interpretado face às variáveis envolvidas e o relatório é enviado às autoridades judiciais.

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

##### 4.2.4.1. Técnicas de rastreio

Os imunoensaios são técnicas de rastreio muito utilizadas nos laboratórios de Toxicologia Forense e são métodos padronizados e validados pelo fabricante. Esta técnica permite a automatização, uma resposta qualitativa rápida, com sensibilidade razoável, a capacidade de analisar um só metabolito ou vários metabolitos em simultâneo e, geralmente, permitem a deteção da droga na urina até 3 dias após a exposição. No entanto, os resultados são apenas presuntivos, necessitando de serem validados por testes de confirmação (Karch, 1998).

Apresentam como principais limitações uma aplicação restrita a matrizes biológicas menos complexas (como plasma, soro ou urina), apresentarem limites de deteção baixos e possibilidade de reação cruzada (Passagli, 2011). A urina é a matriz mais utilizada

para testes de rastreio e, como referido anteriormente, o resultado positivo apenas indica a exposição recente não possibilitando a correlação com a quantificação.

Os ensaios imunoenzimáticos apresentam seletividade semelhante e reagem com uma ampla gama de opióides. A *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays* (ELISA) e a *Enzyme Multiplied Immuno Technique* (EMIT) são maioritariamente utilizadas de forma rotineira na análise de fluídos biológicos e outras matrizes; destacam-se também as imunocromatografias (IC), os radioimunoensaios (RIA) e a imunofluorescência (IF). Estes *kits*, além de serem simples e rápidos, necessitam de uma pequena quantidade de amostra e detetam valores na ordem dos pg/mg; no entanto, os valores analíticos de *cut-off* variam entre os fabricantes (Gerostamoulos e Drummer, 2002).

#### 4.2.4.2. Técnicas de confirmação

##### 4.2.4.2.1. Preparação da amostra

Antes de iniciar as técnicas de confirmação, a amostra deve ser devidamente preparada devido à complexidade inicial. Os opióides podem ser extraídos a partir da matriz biológica recorrendo à extração líquido-líquido usando solventes orgânicos (Drummer, 2004; Moffat *et al.*, 2011) ou à extração em fase sólida (SPE). Esta última apresenta como principais vantagens uma recuperação eficiente do analito, boa seletividade e eficácia da extração (Bosch *et al.*, 2007).

##### 4.2.4.2.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

É um dos procedimentos padrão em laboratórios forenses baseando-se na distribuição do analito entre a fase móvel gasosa (N<sub>2</sub>, He, Ar, H<sub>2</sub>) e a fase estacionária sólida (Karch, 1998). É necessário que o analito seja naturalmente volátil ou que possa ser convertido num derivado volátil, termoestável, de baixo peso molecular e derivatizável. A derivatização tem como objetivo aumentar a volatilização do analito (Grob e Barry, 2004). A GC apresenta elevada eficiência e permite efetuar a análise de volumes reduzidos de amostras e a sua automatização. A principal limitação reside na

incapacidade da análise de substâncias não voláteis e termolábeis (McNair e Miller, 2009).

A GC-MS é um método sensível para a quantificação de opióides. Trata-se de um método adequado para análise forense mesmo para uma pequena quantidade de amostra e possibilita a detecção de diversas substâncias em simultâneo (Tiscione *et al.*, 2011).

Os analitos são separados de acordo com as suas propriedades físico-químicas, através de métodos cromatográficos sendo posteriormente analisados no espectrómetro de massa. O espectro obtido apresenta a informação estrutural de cada analito sendo comumente utilizado na análise de matrizes complexas, uma vez que produz um espectro de fragmentação para cada analito eluído, ou seja, informações relevantes que permitem a identificação e a quantificação mediante o uso de padrões adequados (Kitson *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 2014).

#### 4.2.4.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS)

Este método tem o mesmo princípio que o GC-MS, mas apresenta algumas vantagens uma vez que o analito não necessita de ser volátil nem necessita de derivatização.

No entanto, apresenta algumas restrições devido ao efeito da matriz originando complexidade na interpretação e na análise dos resultados. Estes efeitos da matriz podem provocar o realce ou a anulação de picos, afetando o limite de detecção, de quantificação, a linearidade, a exatidão e a precisão. Assim, é necessário ter sempre em consideração estas possíveis interferências para que haja validação dos resultados (Baciu *et al.*, 2015).

A HPLC-MS utiliza um suporte sólido com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, sendo um método adequado para separação de espécies iónicas e macromoléculas. A fase móvel deve ser um solvente que dissolva a amostra sem ocorrência de interações e a principal diferença em relação à CG é que a fase móvel é líquida. A fase móvel deve ser compatível com o detetor, possuindo a polaridade

adequada de forma a permitir uma correta separação dos componentes da amostra. A coluna cromatográfica é composta por material inerte e após a separação, os compostos seguem para espectrómetro de massa onde sofrem ionização e separação de acordo com a razão massa/carga (Ardrey, 2003).

#### 4.2.4.3. Valores de *cut-off*

Os valores de *cut-off* são valores numéricos utilizados em análises toxicológicas, no processo de validação dos métodos. Estes valores têm como principal objetivo evitar situações de falsos positivos, diminuindo a deteção por contaminação externa ou por ingestão passiva (Tsanaclis *et al.*, 2011). No entanto, estes valores também podem ser sugeridos por sociedades científicas como, por exemplo, a SAMHSA.

Na interpretação dos resultados, quando o valor obtido é inferior aos valores de *cut-off*, o resultado é considerado negativo ou então “não detetável”; quando o valor é superior ao valor de *cut-off* são considerados positivos (Tsanaclis *et al.*, 2011).

Cada droga ou seu metabolito apresenta um valor de *cut-off* próprio (Tabela 7). Além disso, este varia com o tipo de amostra e metodologia utilizada.

**Tabela 7:** Valores de *cut-off* para as drogas e metabolitos mais comumente analisados (adaptado de Tsanaclis *et al.*, 2011).

Grupo	Xenobióticos e metabolitos	Valores de Cut-off		
		Cabelo (ng/mg)	Saliva (ng/mL)	Urina (ng/mL)
Anfetaminas	Anfetamina	0,2	40	500
	Metanfetaminas	0,2	40	500
	MDA	0,2	40	500
	MDMA (Ecstasy)	0,2	40	500
Canabinóides	THC	0,1	1	-
	THC-COOH	15	0,5	0,0002
Cocaína	Cocaína	0,2	2	-
	BZE	0,2	2	-
Opióides	Morfina	0,2	10	2000
	Codeína	0,2	10	2000
	6-Acetil morfina	0,2	1	10
	Heroína	0,2	1	-
Benzodiazepinas	Diazepam	0,05	1	1000
	Lorazepam	0,05	1	1000
	Nordiazepam	0,05	1	1000
	Oxazepam	0,05	1	1000

BZE: Benzoilecgonina; MDA: Metildioxianfetamina; MDMA: Metilendioximetanfetamina; THC: Delta 9-tetrahydrocannabinol; THC-COOH: Ácido-11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-carboxílico.

#### 4.2.5. Interpretação de resultados analíticos

##### 4.2.5.1. Concentrações terapêuticas, tóxicas e letais

Não existe uniformidade na literatura no que concerne às concentrações terapêuticas, tóxicas e letais para as várias drogas. De acordo com Schulz *et al.* (2012), a morfina apresenta uma concentração terapêutica de 0,01-0,1 mg/L, uma concentração tóxica de 0,1 mg/L e uma concentração letal entre 0,1-4 mg/L, sendo que os valores da concentração terapêutica encontram-se sobreponíveis com os da concentração tóxica e letal. A morfina apresenta uma dose letal 50 (DL<sub>50</sub>) de 900 mg/kg *per os* (Dinis-Oliveira *et al.*, 2015a).

A dose terapêutica da codeína encontra-se no intervalo de 0,03-0,25 mg/L e a concentração tóxica entre 0,5-1 mg/L. A concentração letal é de 1,8 mg/L e a dose letal mínima é de cerca 800 mg/Kg. No entanto, as intoxicações com codeína são raras e ocorrem com o uso concomitante de outras substâncias psicoativas (Schulz *et al.*, 2012).

#### 4.3. Importância da farmacogenética em contexto médico-legal

A farmacogenética é a ciência que investiga as bases genéticas que explicam a variabilidade interindividual na resposta aos fármacos, permitindo responder a questões como o porquê de alguns indivíduos apresentarem alterações farmacocinéticas (nas enzimas responsáveis pela metabolização, alterações no alvo e/ou transportadores) ou farmacodinâmicas (alteração dos recetores) após a administração da mesma dose padrão de determinado fármaco (Nebert *et al.*, 2008).

Desta forma, considerando que os fatores genéticos possam estar na base das alterações, tanto na eficácia como na toxicidade de um medicamento, a abordagem da análise farmacogenética, incluindo a genotipagem de ADN, apresenta elevada relevância nas investigações médico-legais em contexto forense (Musshoff *et al.*, 2010).

As alterações genéticas observadas na variabilidade da resposta opióide estão relacionadas com a variação de um único par de bases da cadeia de ADN, sendo o polimorfismo mais frequente designado de *Single Nucleotide Polimorphism* (SNP), ou seja, polimorfismo de nucleótido único (Charles e Argoff, 2009).

Os SNPs quando ocorrem em regiões responsáveis pela codificação de genes têm maior probabilidade de modificar o seu funcionamento e, conseqüentemente, a proteína que vai dar origem vai sofrer alterações. Como consequência, estes polimorfismos ocorrem em produtos de expressão genética, como em enzimas, proteínas, transportadores e alvos farmacológicos resultando na alteração da farmacocinética e farmacodinâmica (Charles e Argoff, 2009).

Devido ao polimorfismo das enzimas de fase I do citocromo P450 e das enzimas de fase II responsáveis pela conjugação, os indivíduos podem ser classificados em quatro

fenótipos principais tendo em conta a expressão e a atividade enzimática (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007). Os “metabolizadores pobres” são indivíduos que apresentam a ausência da enzima funcional devido à deleção no gene ou homozigotia para alelos responsáveis e subsequente diminuição do processo de metabolização. Os “metabolizadores intermédios” são indivíduos heterozigóticos para um alelo funcional, responsáveis pela redução de atividade enzimática da enzima metabolizadora. Os “metabolizadores extensivos” são indivíduos homozigóticos para os alelos funcionais, podendo apresentar dois genes funcionais e, por fim, os “metabolizadores ultra-rápidos” são indivíduos que apresentam elevada expressão enzimática devido às múltiplas cópias do gene responsável pela codificação da enzima, aumentando assim a sua produção (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007).

As classes de enzimas envolvidas no metabolismo dos opióides são a UGT, COMT, CYP450, sendo o CYP2D6, uma das principais enzimas sujeita a polimorfismo (Totah *et al.*, 2008). Em relação à codeína, o fenótipo de “metabolizador ultra-rápido” para a CYP2D6 promove níveis séricos elevados de morfina resultando em toxicidade aguda (Musshoff *et al.*, 2010).

A variabilidade na resposta aos opióides, para além de estar associada aos polimorfismos das enzimas metabólicas, está igualmente associada ao polimorfismo que ocorre nas SNP dos genes responsáveis pela codificação do recetor  $\mu$  opióide, ou seja, no gene OPRM1 (Kadiev *et al.*, 2008; Campa *et al.*, 2008). O resultado desta alteração pode traduzir-se na redução da resposta farmacológica analgésica em indivíduos submetidos a terapia com morfina (Stamer e Stuber, 2007).

Os polimorfismos genéticos também ocorrem ao nível das proteínas de transporte e a inibição ou indução destas está associada a alterações ao nível do transporte para o tecido alvo ou da eliminação do composto. A glicoproteína P (P-gp), pertencente à família dos transportadores *ATP-binding cassette* (ABC), é codificada pelo gene de resistência a múltiplos fármacos (MDR1 ou ABCB1), que é igualmente sujeito a polimorfismo. Este transportador está presente em diversos tecidos (fígado, rins, cérebro, intestino), apresentando a função de barreira biológica, protegendo o organismo dos efeitos tóxicos dos xenobióticos (Musshoff *et al.*, 2010).

Ao nível lúmen gastrointestinal, a P-gp funciona como bomba de efluxo limitando a absorção e promovendo a redução da acumulação de xenobióticos nos tecidos mais suscetíveis. No entanto, este gene apresenta variações interindividuais, ocorrendo a inibição ou indução da P-gp, resultando na alteração da biodisponibilidade de alguns opióides (Musshoff *et al.*, 2010).

Em alguns casos *post mortem*, mesmo após a realização da autópsia e dos exames complementares toxicológicos, a causa da morte pode permanecer inconclusiva. Quando a morte é decorrente de intoxicação por um opióide, a genotipagem *post mortem*, como por exemplo, da CYP2D6 auxilia na interpretação, determinando a responsabilidade do polimorfismo genético nos efeitos adversos mediante a análise da proporção de metabolitos no sangue (Charles e Argoff, 2009; Musshoff *et al.*, 2010). É igualmente importante em situações de intoxicação acidental, devido a um erro na dose de um indivíduo com um fenótipo de “metabolizador ultra-rápido”, o que poderá ter sido responsável pela morte (Musshoff *et al.*, 2010).

Com base na evidência quantitativa e após o conhecimento das SNP específicas individuais é possível otimizar a prescrição de determinado opióide de forma a implementar uma terapia individual (Charles e Argoff, 2009).

#### 4.4. Estudo de casos forenses

São descritos seguidamente alguns casos representativos da relevância dos opióides nas várias áreas de atuação da Toxicologia Forense.

**Caso 1.** Gémeos com 3 anos e 4 meses, homozigóticos, apresentavam febre há 6 dias e estavam medicados com uma suspensão de codeína de libertação lenta como agente antitússico, uma vez ao dia. Por volta das 22h00, a mãe administrou-lhes 10 gotas da suspensão. Às 02h40, uma das crianças encontrava-se com vômitos e dificuldades respiratórias e a outra sem sintomas. Os pais transportaram a criança para o hospital onde iniciaram imediatamente a ventilação mecânica. Passadas 2,5h da admissão da criança no hospital, o irmão que ficou em casa foi encontrado morto e a reanimação não teve êxito.

A autópsia revelou edema cerebral difuso. Foram recolhidas as seguintes amostras para a análise toxicológica: soro, urina, fluido cerebrospinal (a ambos os irmãos) e tecido cerebral (apenas ao irmão que faleceu) para a determinação das concentrações de codeína, morfina e dos seus principais metabolitos por LC-MS/MS. Foi igualmente efetuada a genotipagem para as variantes alélicas CYP2D6 \*3, \*4, \*5, \*6 em ambas as crianças.

A tabela 8 apresenta os resultados das análises toxicológicas realizadas. As concentrações de morfina e codeína no sangue da criança que sobreviveu encontravam-se dentro do intervalo terapêutico, enquanto que no caso da criança que faleceu ultrapassaram os níveis terapêuticos.

De forma a diferenciar a sobredosagem aguda da intoxicação crónica, foi analisada a razão codeína/morfina, sendo esta de 3 na amostra de soro e de 7 na amostra de urina, o que é indicativo de intoxicação aguda de codeína (valor da razão superior a 1).

A genotipagem do CYP2D6 concluiu que os irmãos apresentavam um fenótipo de “metabolizador extensivo”, o que explica as concentrações elevadas de morfina mas não explica as concentrações altas de codeína no caso da criança que faleceu.

Algumas discrepâncias verificadas entre os gémeos como, por exemplo, o valor de M6G poderá ser resultado da redistribuição *post mortem*, uma vez que a formulação era de libertação lenta e durante a reanimação cardiopulmonar pode ter ocorrido absorção e distribuição.

Após a simulação farmacocinética, concluiu-se que as alterações nos parâmetros farmacocinéticos, tais como biodisponibilidade elevada, a diminuição do volume de distribuição e a eliminação renal, ocorreram devido ao estado patológico que as crianças apresentavam, o que explica os níveis elevados de codeína. Assim sendo, a análise quantitativa para a codeína, morfina e seus metabolitos demonstrou que a intoxicação foi causada pela acumulação de codeína e dos seus metabolitos ativos durante o tratamento de vários dias (6 dias).

**Tabela 8:** Concentração da codeína e principais metabolitos em amostras dos gémeos (adaptado de Ferreirós *et al.*, 2009).

Composto	Criança que sobreviveu			Criança que faleceu			
	Soro (ng/mL)	Fluido cerebroespinal (ng/mL)	Urina (µg/mL)	Soro <sup>a</sup> (ng/mL)	Soro <sup>b</sup> (ng/mL)	Urina (µg/mL)	Cérebro (ng/mL)
Codeína	174,0	79,1	10,1	436,3	461,2	18,5	547,6
Norcodeína	7,6	5,1	1,1	20,5	20,6	3,1	ND
C6G	449,8	20,4	52,3	610,9	663,6	82,8	32,4
Morfina	25,6	9,7	2,7	138,7	153,9	6,2	70,8
Normorfina	30,0	ND	3,0	66,6	80,0	6,9	3,9
M6G	23,5	ND	3	39,5	58,4	3,4	ND
M3G	154,3	ND	15,3	134,8	167,6	18,7	ND

M6G Morfina-6-glucuronido, M3G Morfina-3-glucuronido, C6G codeína-6-glucuronido, ND não detetável (LLOQ: 5 ng/mL para M3G, morfina, norcodeína, C6G; E 10 ng/mL for M6G e normorfina; e 2 ng/mL for codeína). Soro<sup>a</sup>: Sangue cardíaco Soro<sup>b</sup>: Sangue femoral

Desta forma, os valores elevados de codeína e metabolitos encontrados na criança que faleceu podem ser explicados pela alteração dos parâmetros farmacocinéticos, do fenótipo de metabolizador extensivo, juntamente com a redistribuição *post mortem*. O medicamento foi retirado do mercado.

**Caso 2.** Indivíduo do sexo feminino com 48 anos, caucasiana, encontrada morta em casa sem a presença de achados autópticos que indicassem a ingestão de medicamentos. História clínica de desordem mental com internamento em clínica psiquiátrica e tentativa de suicídio. Encontrava-se medicada com carbamazepina e tramadol.

A autópsia não revelou sinais de crime nem processos patológicos e foram recolhidos fluidos biológicos como sangue femoral, bÍlis, urina, conteúdo gástrico e órgãos (cérebro, fígado, pulmão e rins) para determinação de fármacos por GC-MS. As análises toxicológicas realizadas nas diferentes amostras revelaram a presença de tramadol e seus metabolitos (Tabela 9). O exame histológico revelou a presença de trombos e coágulos nas artérias e aurículas do coração, edema pulmonar hemorrágico, enfisema

pulmonar mas não associados a patologias. Uma amostra de cabelo foi recolhida mais tarde para análise, tendo dado positivo para a presença de tramadol e carbamazepina.

**Tabela 9:** Concentração de tramadol e principais metabolitos detetados nos órgãos e nas amostras biológicas recolhidas *post mortem* ( $\mu\text{g/mL}$ ) (adaptado de Barbera *et al.*, 2013).

	<b>T</b>	<b>M<sub>1</sub></b>	<b>M<sub>2</sub></b>	<b>M<sub>3</sub></b>	<b>M<sub>5</sub></b>
<b>Sangue femoral</b>	61,83	14,13	134,25	32,61	3,71
<b>Cérebro</b>	44,21	7,86	90,43	9,72	1,49
<b>Pulmão</b>	106,06	18,24	181,20	30,35	5,31
<b>Fígado</b>	56,19	16,21	148,24	28,06	7,90
<b>Rins</b>	88,04	23,01	161,15	17,08	18,51
<b>Conteúdo gástrico</b>	690,91	11,41	130,73	9,74	-
<b>Bílis</b>	107,94	13,27	82,54	6,04	10,57
<b>Urina</b>	85,49	16,30	115,30	21,7	8,5

T: Tramadol; M<sub>1</sub>: O-desmetiltramadol; M<sub>2</sub>: N-desmetiltramadol; M<sub>3</sub>: N-didesmetiltramadol; M<sub>5</sub>: N,O-didesmetiltramadol.

A metabolização do tramadol envolve 2 vias distintas: a O-desmetilação mediada pelo CYP2D6 com formação do metabolito farmacologicamente ativo O-desmetiltramadol (M<sub>1</sub>) e a N-desmetilação via CYP3A4 originando o N-desmetiltramadol (M<sub>2</sub>), que é inativo. O M<sub>1</sub> e o M<sub>2</sub> são seguidamente metabolizados originando metabolitos secundários que incluem o N-didesmetiltramadol (M<sub>3</sub>), o tri-N,O-desmetiltramadol (M<sub>4</sub>) e o N,O-didesmetiltramadol (M<sub>5</sub>) (Costa *et al.*, 2013). A toma de tramadol em simultâneo com a carbamazepina diminui a atividade do CYP2D6 e aumenta a atividade do CYP3A4, o que explica os resultados observados quanto à quantidade de M<sub>2</sub>.

A concentração de carbamazepina no cabelo foi de 3,2 mg/L, ou seja, inferior ao intervalo terapêutico (4-12 mg/L) mas mesmo assim foi suficiente para induzir o CYP3A4 e originar M<sub>2</sub> em quantidades elevadas.

A concentração terapêutica do tramadol é de 0,1-0,8  $\mu\text{g/mL}$  e os efeitos tóxicos iniciam-se quando a concentração no sangue é superior a 1  $\mu\text{g/mL}$ ; as mortes descritas na literatura por sobredosagem de tramadol apresentam valores de 2  $\mu\text{g/mL}$  ou mais altos.

Neste caso a concentração encontrada no sangue femoral foi de 61,83 µg/mL, ou seja, 30 vezes superior à concentração letal.

Em relação aos metabolitos, o rácio  $M_1/M_2 >1$  é indicativo de morte aguda. Pelo contrário, quando a razão  $M_1/M_2 <1$  sugere que a morte ocorreu muito tempo após a ingestão do fármaco. Neste estudo de caso, os resultados toxicológicos indicam  $M_1/M_2 <1$  o que sugere que a mulher ainda sobreviveu durante algum tempo, sendo compatível com os resultados histopatológicos. Devido à intoxicação aguda mediada pelos recetores  $\mu$ , a mulher desenvolveu um quadro de depressão respiratória prolongada e posteriormente bradipneia e bradicardia, levando a paragem cardíaca e morte.

**Caso 3.** Criança, sexo masculino, saudável nasceu de parto normal. A partir do dia 7 de Abril começou a apresentar alguma dificuldade em amamentar e sinais de letargia. Dia 12 de Abril, apresentava uma cor cinzenta e tinha diminuído a ingestão de leite. Dia 13 foi encontrado morto.

A mãe estava medicada no pós-parto com codeína (30 mg) e paracetamol (500 mg) para alívio da dor devido a episiotomia, com posologia de 2 comprimidos de 12 em 12 h, e passados 2 dias diminuiu a dose para metade devido a sonolência e obstipação.

Na análise *post mortem* não foram identificadas anomalias anatómicas. Contudo a análise realizada ao sangue através de CG-MS detetou a presença de morfina (metabolito ativo da codeína) numa concentração de 70 ng/mL. Quando as mães amamentam e ao mesmo tempo estão a fazer terapêutica com codeína, apresentam níveis séricos de morfina de 0,2-2 ng/mL, uma vez que normalmente os recém-nascidos apresentam a capacidade de metabolizar e eliminar a morfina.

Devido alimentação neonatal não estar a ser suficiente, a mãe armazenou leite no dia 10, tendo sido este também analisado por GC-MS. Foi detetada a presença de morfina numa concentração de 87 ng/mL, sendo que a concentração típica é de 1,9-20,5 ng/mL com doses de 60 mg a cada 6 horas.

Foi realizada uma genotipagem do CYP2D6 da mãe, ou seja, à enzima responsável pela O-desmetilação da codeína a morfina. A mãe era heterozigótica para o alelo CYP2D6\*2, com duplicação do gene CYP2D6\*2x2, resultando num fenótipo metabolizador ultra-rápido, o que provocou o aumento da O-desmetilação da codeína a morfina, que justifica aos sintomas de sonolência e obstipação apresentados. A morfina foi transferida para o leite materno, acumulando no recém-nascido e provocando a sua morte. O relatório toxicológico indicou a morte acidental provocada por opióides.

**Caso 4.** Homem com 39 anos, consumidor crónico de heroína, há cerca de dois anos, deu entrada no hospital em coma devido a insuficiência cardiorrespiratória. Após 6 dias internamento, faleceu devido a uma paragem cardíaca.

Foram recolhidas amostras de sangue, urina, bÍlis, cabelo e fÍgado, procedendo-se à sua análise toxicológica. Inicialmente foi realizado um teste de rastreio com urina que apresentou resultado negativo para opióides. Todas as amostras foram seguidamente analisadas por GC-MS e os resultados revelaram morfina (21,3 µg/mL) na bÍlis, enquanto que as análises ao sangue e ao fÍgado foram negativas. A morfina foi igualmente detetada no cabelo com o valor de 4,8 ng/mg.

A ausência de morfina no sangue, fÍgado e urina pode ser explicado pelo tempo que decorreu entre a administração da última dose e a morte (144 horas), tendo em conta que a morfina e os seus metabolitos apenas são detetáveis no sangue e urina até 48-72h após a última administração.

A presença de morfina na bÍlis, após um longo período de tempo, deve-se à capacidade de armazenamento da vesícula biliar, sendo que a presença de morfina na bÍlis indica o consumo crónico de heroína. O resultado foi corroborado com a quantidade de morfina encontrada no cabelo.

**Caso 5.** Um polícia de 46 anos a trabalhar há 21 anos na unidade de repressão a narcóticos e responsável pela destruição de drogas de uma cidade francesa e uma mulher de 37 anos, funcionária no tribunal da mesma cidade e especializada no tráfico de drogas de abuso, aproveitaram as suas posições administrativas para lucrar com a

revenda das drogas apreendidas. Outro indivíduo, de 30 anos, era responsável pela venda de droga na rua a mando do referido polícia mas devido a problema com dinheiro denunciou o caso. Foram ambos presos e submetidos a investigação sobre as acusações de tráfico de drogas.

Foram recolhidas amostras de cabelo e pêlos do peito da mulher e do polícia, respetivamente, seguindo para a análise por GC-MS que revelou a presença de 6-AM e morfina. Foram igualmente analisadas amostras recolhidas a 11 polícias do departamento de narcóticos da mesma unidade, para determinar a possibilidade de contaminação externa visto que estão em contacto permanente com as drogas, tendo os resultados sido negativos. O polícia apresentou 0,5 ng/mg de 6-AM e 0,2 ng/mg de morfina, e a funcionária apresentou 0,8 ng/mg de 6-AM e 0,4 ng/mg de morfina, sendo consideradas positivas as amostras que se encontravam acima do valor de *cut-off*, ou seja, 0,1 ng/mg. Foi possível concluir que a presença da droga não se deveu a contaminação passiva.

**Caso 6.** Anestesta com 40 anos, trabalhava numa clínica privada e era suspeita de dependência de narcóticos. Realizou-se a análise toxicológica à urina e o resultado foi negativo. Contudo, como apresentava baixo rendimento no trabalho, seguiu-se a análise do cabelo por CG-MS que permite evidenciar a exposição crónica. Foi recolhido um segmento proximal de 0-4 cm de cabelo, que permitiu a identificação de alfentanilo (30 pg/mg), codeína (210 pg/mg) e midazolam (160 pg/mg). A anestesta foi demitida.

**Caso 7.** Homem com 35 anos foi encontrado morto, em estado de decomposição avançada, sem evidência de traumas, na berma de uma estrada. Foi transportado para o Departamento de Medicinal Legal. A autópsia e as análises toxicológicas foram realizadas aproximadamente 3 dias após a morte.

Durante a autópsia, foram retirados 50 pacotes contendo droga do trato gastrointestinal: 42 do estômago, dos quais 2 estavam danificados; 6 do intestino delgado (jejuno e íleo) e 2 do intestino grosso (cólon descendente), sem evidência de obstrução intestinal. Os achados encontrados durante a autópsia foram edema pulmonar, edema cerebral e congestionamento dos vasos cerebrais.

A análise toxicológica ao conteúdo dos pacotes indicou a presença de heroína, codeína e cafeína. Os dois pacotes danificados continham 4,96 e 2,53 g de pó.

A análise ao conteúdo estomacal revelou morfina, cafeína e codeína. No intestino, fígado, baço e rins foram detetadas morfina e codeína. A causa de morte foi intoxicação aguda por heroína devido à rutura de dois dos 50 pacotes ingeridos pelo “body packer”.

## V. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A morfina, apesar de ser muito antiga, é ainda hoje um dos opióides mais utilizados na terapêutica da dor com intensidade moderada a intensa. No entanto, a buprenorfina transdérmica tem-se apresentado como uma excelente alternativa terapêutica devido ao perfil metabólico mais favorável. Com o início da terapêutica, se não houver um controlo na administração de opióides, a dependência e tolerância desenvolvem-se rapidamente, o que leva os doentes a procurar alternativas mais potentes. O consumo de heroína, opióide semissintético ilícito, tem vindo aumentar não apenas em toxicod dependentes mas também em indivíduos que procuram uma alternativa mais potente à morfina.

Devido aos seus efeitos nefastos, a heroína é uma das drogas que se destaca na Toxicologia Forense, associada a casos de morte por sobredosagem, além de ser uma das substâncias psicoativas pesquisadas em situações de rastreio de drogas. As matrizes biológicas recolhidas para análise de opióides são diversas, destacando-se a urina, o sangue e o cabelo como amostras de eleição. A escolha da amostra deve ser adequada à análise toxicológica de forma a se obter resultados fidedignos e de fácil interpretação. As técnicas de quantificação mais utilizadas são a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa e a cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massa, ou *in tandem*, devido à sensibilidade e compatibilidade com o tipo de matrizes selecionadas na identificação de opióides.

No entanto, a interpretação dos dados toxicológicos em casos de morte por sobredosagem de opióides deve ter em consideração vários fatores incluindo a via de administração, metabolismo dos diferentes compostos e a redistribuição *post mortem* a que estes compostos são sujeitos.

Após a realização da autópsia, o relatório deverá reunir toda a informação do processo e a interpretação deve ser integrada, numa perspetiva multidisciplinar. A interpretação dos resultados toxicológicos deve ser sempre enquadrada pela informação prévia (informação recolhida pela investigação policial, dados clínicos e sociais da vítima), pelos achados autópticos e também pelos resultados de outros exames complementares.

Vários estudos visam a obtenção de novos fármacos que apresentem maior segurança farmacológica, com maior seletividade para os subtipos de recetores opióides  $\delta$  e  $\kappa$ , os quais apresentam menor tendência ao desenvolvimento de efeitos aditivos, tolerância, dependência, euforia e depressão respiratória. Outra alternativa é a pesquisa de opióides agonistas com ação periférica uma vez que os efeitos adversos dos opióides são decorrentes da sua ação no sistema nervoso central. Além disso, têm sido recentemente estudados novos subtipos de recetores como o  $\epsilon$  (épsilon), com localização nos linfócitos, e o  $\zeta$  (zeta) com localização nas células da pele, córnea e cérebro, o que constitui um ponto de partida para estudos futuros na prática clínica.

Com este trabalho foi possível reunir informação científica sobre os opióides, esclarecendo aspetos *post mortem* e outros relativos às investigações forenses. Desta forma, conclui-se que:

1. como opióides de maior consumo destacam-se a heroína, a codeína e a morfina;
2. na análise toxicologia, é fundamental conhecer-se as vias de metabolização dos opióides. No caso da heroína, o composto-pai é rapidamente metabolizado no organismo, daí a importância de reconhecer quais os seus metabolitos;
3. os fenómenos de redistribuição *post mortem* devem ser tidos em conta na interpretação dos resultados;
4. a variabilidade genética altera a concentração dos compostos farmacologicamente ativos, resultando numa variação da resposta farmacológica ou dos efeitos adversos dos opióides, particularmente importante para os que sofrem metabolização pela via CYP2D6;
5. é fundamental o conhecimento da tríade presente na sobredosagem de opióides: depressão respiratória, miose e coma;
6. é importante o conhecimento do potencial tóxico dos opióides emergentes, destacando-se o krokodil, o kratom e o krypton.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Agarwal, S. e Trivedi, M. (2007). Cutaneous complications of pentazocine abuse. *Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology*, 73, p. 280.
- Andresz, V., Marcantoni, N., Binder, F., *et al.* (2006). Puffy hand syndrome due to drug addiction: a case-control study of the pathogenesis. *Addiction*, 101, pp. 1347–1351.
- Ardrey, R. E. (2003). *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*. John Wiley & Sons.
- Asbjørn, M., Jensen, R. D., Nielsen, L. M., *et al.* (2012). Differences between opioids: pharmacological, experimental, clinical and economical perspectives. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75, pp. 60–78.
- Asfar, S. K., Baraka, A., Juma, T., *et al.* (1991). Necrotizing fasciitis. *British Journal of Surgery*, 78, pp. 838–840.
- Baciu, T., Borrull, F., Aguilar, C., *et al.* (2015). Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair. *Analytica Chimica Acta*, 856, pp. 1–26.
- Barbera, N., Fisichella, M., Bosco, A., *et al.* (2013). A suicidal poisoning due tramadol. A metabolic approach to death investigation. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 20, pp. 555–558.
- Barceloux, D. G. (2012). *Medical Toxicology of Drug Abuse: Synthesized chemical and Psychoactive Plants*. 1ª ed. Wiley, pp. 553–556.
- Barke, K. E. e Hough, L. B. (1993). Opiates mast cells and histamine release. *Life Sciences*, 53, pp. 1391–1399.

Bart, G. (2012). Maintenance medication for opiate addiction: the foundation of recovery. *Journal of Addictive Diseases*, 31, pp. 207–225.

Baselt, R. C. (2004). Morphine. In: Baselt, R. C. (ed.). *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*. 7<sup>a</sup> ed. Foster City, Biomedical Publications.

Benomran, F. (2008). Postmortem sole incisions - a new sign of heroin overdose? *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 15, pp. 59–63.

Bévalot, F., Bottinelli, C., Cartiser, N., *et al.* (2014). Quantification of five compounds with heterogeneous physicochemical properties (morphine, 6-monoacetylmorphine, cyamemazine, meprobamate and caffeine) in 11 fluids and tissues, using automated solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 38, pp. 256–264.

Bogotte de almeida, L. (2004). *O sortilégio de pandora: o sistema nervoso e tóxicos*. Lisboa, 1<sup>a</sup> ed, pp. 122–126.

Bono, J. P. (1998). Criminalistics—Introduction to controlled substances. In: Karch, S. B. (ed.). *Drug Abuse Handbook*. São Francisco, California, CRC Press, pp. 20–24.

Booker, R. J., Smith, J. E. e Rodger, M. P. (2014). Packers, pushers and stuffers—managing patients with concealed drugs in UK emergency departments: a clinical and medicolegal review. [Em Linha] Disponível em <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.504.4614&rep=rep1&type=pdf>> [Consultado a 18/6/2016].

Boom, M., Niesters, M., Sarton, E., Aarts, L., *et al.* (2012). Non-analgesic effects of opioids: opioid-induced respiratory depression. *Current Pharmaceutical Design*, 18, pp. 5994–6004.

Booth, M. (1998). *Opium: a history*. 2<sup>a</sup> ed. New York, St. Martin's Press.

Bordin, D., Monedeiro, F., Campos, E., Alves, M., *et al.* (2015). Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. *Scientia Chromatographica*, 7, pp. 125–143.

Bosch, M. E., Sánchez, A. R., Rojas, F. S., *et al.* (2007). Morphine and its metabolites: Analytical methodologies for its determination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, pp. 799–815.

Bottemiller, S. (2012). Opioid-Induced Hyperalgesia: An Emerging Treatment Challenge. *US Pharmacist*, 37, pp. 2–7.

Boyer, E. W. (2012). Management of Opioid Analgesic Overdose. *The New England Journal of Medicine*, 367, pp. 146–155.

Brunton, L., Chabner, B. e Knollmann, B. (2011). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York, The McGraw-Hill Companies.

Bucardo, J., Brouwer, K. C., Magis-Rodriguez, C., *et al.* (2005). Historical trends in the production and consumption of illicit drugs in Mexico: implications for the prevention of blood born infections. *Drug Alcohol Depend*, 79, pp. 281–293.

Campa, D., Gioia, A., Tomei, A., *et al.* (2008). Association of ABCB1/MDR1 and OPRM1 gene polymorphisms with morphine pain relief. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83, pp. 559–566.

Charles, E. e Argoff, M. D. (2009). Clinical implications of Opioid Pharmacogenetics. *The Clinical Journal of Pain*, 26, pp.16–20.

Clatts, M. C., Giang Le, M., Goldsamt, L. A., *et al.* (2007). Novel heroin injection practices: implications for transmission of HIV and other bloodborne pathogens. *American Journal of Preventive Medicine*, 32, pp 226–323.

Concheiro, M., De Castro, A., Quintela, Ó., *et al.* (2006). Determination of drugs of abuse and their metabolites in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry: An application to 156 road fatalities. *Journal of chromatography B*, 832, pp. 81–89.

Cook, D. S., Braithwaite, R. A. e Hale, K. A. (2000). Estimating antemortem drug concentrations from postmortem blood samples: the influence of postmortem redistribution. *Journal of Clinical Pathology*, 53, pp. 282–285.

Costa, I., Oliveira, A., Guedes de Pinho, P., *et al.* (2013). Postmortem redistribution of tramadol and O-desmethyltramadol. *Journal of Analytical Toxicology*, 37, pp. 670–675.

Cygan, J., Trunsky, M. e Corbridge, T. (2000). Inhaled heroin-induced status asthmaticus: five cases and a review of the literature. *Chest Journal*, 117, pp. 272–275.

Das, C. P., Thussu, A., Prabhakar, S., *et al.* (1999). Pentazocine induced fibromyositis and contracture. *Postgraduate Medical Journal*, 75, pp. 361–362.

De Cássia Mariotti, K., Ortiz, R. S. e Limberger, R. P. (2015). Recomendações Gerais de Amostras Biológicas em Toxicologia Forense. *In: Dinis-Oliveira, R.J., Carvalho, F., Magalhães, T. (Eds.). Toxicologia Forense. 1ª ed. Lisboa, Lidel, pp. 109–126.*

Del Giudice, P. (2004). Cutaneous complications of intravenous drug abuse. *British Journal of Dermatology*, 150, pp. 1–10.

Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., Duarte, J. A., *et al.* (2010). Collection of biological samples in forensic toxicology. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20, pp. 363–414.

Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., Moreira, R., *et al.* (2012). Clinical and Forensic Signs Related to Opioids Abuse. *Current Drug Abuse Reviews*, 5, pp. 273–290.

Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., Duarte, J. A., *et al.* (2015b). Recomendações gerais para colheita de amostras biológicas em Toxicologia Forense. *In: Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., Bastos, M. L. (Eds.). Toxicologia Forense. 1ª ed. Lisboa, Lidel, pp. 103–107.*

Dinis-Oliveira, R. J., Magalhães, T. e Carvalho, F. D. (2015a). Introdução À Toxicologia Forense. *In: Dinis-Oliveira, R.J., Carvalho, F., Bastos, M. L. (Eds.). Toxicologia Forense. 1ª ed. Lisboa, Lidel, pp. 1–6.*

Direção Geral da Saúde. (2008). Circular informativa - Utilização dos medicamentos opióides fortes na dor crónica não oncológica. Nº: 09/DSCS/DPCD/DSQC. Ministério da Saúde, Lisboa.

Dolan, K., Rouen, D. e Kimber, J. (2004). An overview of the use of urine, hair, sweat and saliva to detect drug use. *Drug and Alcohol Review, 23*, pp. 213–217.

Dolin, S. J. e Cashman, J. N. (2005). Tolerability of acute postoperative pain management: Nausea, vomiting, sedation, pruritus and urinary retention. Evidence from published data. *British Journal of Anaesthesia, 95*, pp. 584–591.

Drummer, O. H. (2004). Postmortem toxicology of drugs. *Forensic Science International, 142*, pp. 101–113.

Drummer, O. H. e Gerostamoulos J. (2002). Postmortem drug analysis: analytical and toxicological aspects. *Therapeutic Drug Monitoring, 24*, pp. 199–209.

Duarte, D. F. (2005). Uma breve história do ópio e dos opióides. *Revista Brasileira de Anestesiologia, 55*.

Dunbar, N. M. e Harruff, R. C. (2007). Necrotizing fasciitis: manifestations, microbiology and connection with black tar heroin. *Journal of Forensic Sciences, 52*, pp. 920–923.

Elsamra, S. E. e Ellsworth, P. (2012). Effects of analgesic and anesthetic medications on lower urinary tract function. *Urologic Nursing Journal*, 32, pp. 60–67.

Engelhart, D. A. e Jenkins, A. J. (2002). Detection of cocaine analytes and opiates in nails from postmortem cases. *Journal of Analytical Toxicology*, 26, pp. 489–492.

Fernández-Vega, I., Pérez de Heredia-Goñi, K., Santos-Juanes, J., *et al.* (2016). Sporadic adult-onset leucodystrophy with axonal spheroids and pigmented glia with no mutations in the known targeted genes. *Histopathology*, 68, pp. 308–312.

Ferreirós, N., Dresen, S., Hermanns-Clausen., *et al.* (2009). Fatal and severe codeine intoxication in 3-year-old twins—interpretation of drug and metabolite concentrations. *International Journal of Legal Medicine*, 123, pp. 387–394.

Fineschi, V., Cecchi, R., Centini, F., *et al.* (2001). Immunohistochemical quantification of pulmonary mast-cells and post mortem blood dosages of tryptase and eosinophil cationic protein in 48 heroin-related deaths. *Forensic Science International*, 120, pp. 189–194.

Flanagan, R. J., Connally, G. e Evans, J. M. (2005). Analytical Toxicology Guidelines for Sample Collection Postmortem. *Toxicological Reviews*, 24, pp. 63–71.

Fornasari, D. (2014). Pain pharmacology: focus on opioids. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 11, pp. 165–168.

Fudala, P. J. e Johnson, R. E. (2006). Development of opioid formulations with limited diversion and abuse potential. *Drug and Alcohol Dependence*, 83, pp. 40–47.

Gahr, M., Freudenman, R., Hiemke, C., *et al.* (2012). Desomorphine goes crocodile. *Journal of Addictive Diseases*, 31, pp. 407–412.

Gerostamoulos, J. e Drummer, O. H. (2000). *Postmortem* redistribution of morphine and its metabolites. *Journal of Forensic Sciences*, 45, pp. 843–845.

Goldberg, S. D. (2014). *The Bioethics of Pain Management: Beyond Opioids*. Routledge, Nova Iorque.

Grob, R. L. e Barry, E. F. (2004). *Modern Practice of gas chromatography*. 4ªed. New Jersey, John wiley & Sons, Inc.

Guo, Z., Zheng, H., Lu, Y., *et al.* (2012). Isolation and purification of heroin from heroin street samples by preparative high performance liquid chromatography. *Forensic Science International*, 221, pp. 120–124.

Henriksen, G. e Willoch, F. (2008). Imaging of opioids receptors in the central nervous system. *Brain*, 131, pp. 1171–1196.

Hepler, B. R. e Isenschmid, D. S. (2008). Specimen Selection, Collection, Preservation, and Security. *In*: Karch, S. B. (ed.). *Postmortem Toxicology of Abused Drugs*. 2ª ed. New York, CRC Press, pp. 13–30.

Holzer, P. (2004). Opioids and opioid receptors in the enteric nervous system: from a problem in opioid analgesia to a possible new prokinetic therapy in humans. *Neuroscience Letters*, 361, pp. 192 – 195.

INFARMED (2014). Resumo das características do medicamento - Naloxona **[Em linha]** **Disponível em** [http://www.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=43840&tipo\\_doc=fi](http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=43840&tipo_doc=fi) **[Consultado a 18/06/2016]**.

Ingelman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez. A., *et al.* (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetics, pharmaco epigenetic and clinical aspects. *Pharmacology and Therapeutic*, 116, pp. 496–526.

Jakhar, J. K., Dhatarwal, S. K., Aggarwal, A. D., *et al.* (2013). Heroin body packer's death in Haryana; India: A case report. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 20, pp. 693–696.

Jenkins, A. J., Keenan, R. M., Henningfield, J. E., *et al.* (1994). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of smoked heroin. *Journal of Analytical Toxicology*, 18, pp. 317–330.

Jones, G. R. (2008). Postmortem Toxicology. *In: Jickells, S., Negrusz, A. (Eds.). Clarke's analytical forensic toxicology*. London, Pharmaceutical Press, pp. 191–217.

Kadiev, E., Patel, V., Rad, P., *et al.* (2008). Role of pharmacogenetics in variable response drugs: focus on opioid. *Expert opinion drug metabolism & toxicology*, 4, pp. 77–91.

Karch, S. B. (1998). *Drug Abuse Handbook*. São Francisco, CRC Press.

Karch, S. B. (2007). *Drug Abuse Handbook*. USA, CRC Press.

Karch, S. B. (2008). *Postmortem Toxicology of Abused Drugs*. New York, CRC Press.

Katzung, B. G., Masters, S. B. e Trevor, A. J. (2009). *Basic & Clinical Pharmacology*. New York, The McGraw-Hill Medical.

Kennedy, M. (2015). Interpreting postmortem drug analysis and redistribution in determining cause of death: a review. *Department of Clinical Pharmacology & Toxicology, St Vincent's Hospital, University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia*, 7, pp. 55–62.

Kerrigan, S. e Goldberger, A. B. (2003). Opioids. *In: Levine, B. (ed.). Principles of Forensic Toxicology*. 2<sup>a</sup>ed. Washington, American Association for Clinical Chemistry, pp. 225–242.

Kintz, P., Villain, M., Dumestre, V., *et al.* (2005). Evidence of addiction by anesthesiologists as documented by hair analysis. *Forensic Science International* 153, pp. 81–84.

Kitson, F. G., Larsen, B. S. e Mcewen, C. N. (1996). *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. United Kingdom, Academic Press.

Koo, Y. C. e Eikermann, M. (2011). Respiratory Effects of Opioids in Perioperative Medicine. *The Open Anesthesiology Journal*, 5, pp. 23–34.

Koren, G., Cairns, J., Chitayat, D., *et al.* (2006). Pharmacogenetics of morphine poisoning in a breastfed neonate of a codeine-prescribed mother. *The Lancet*, 368, p. 704.

Kosten, T. R. e George, T. P. (2002). The Neurobiology of Opioid Dependence: Implications for Treatment. *Science & Practice Perspectives*, 1, pp. 13–20.

Ladron de Guevara, J. e Moya Pueyo, V. (1995). *Toxicología Medica Clinica y Laboral*. Interamericana – Mcgraw-Hill.

Larson, M. D. (2008). Mechanism of opioid-induced pupillary effects. *Clinical Neurophysiology*, 119, pp. 1358–1364.

Loeb, S. (1993). *Physician's Drug Handbook*. 5<sup>a</sup> ed. Pennsylvania, Springhouse Corporation.

Logan, B. K. e Snirnow, D. (1996). Postmortem distribution and redistribution of morphine in man. *Journal of Forensic Sciences*, 41, pp. 37–46.

Maher, L. e Ho, H. T. (2009). Overdose beliefs and management practices among ethnic Vietnamese heroin users in Sydney, Australia. *Harm Reduction Journal*, 6, p. 6.

- McNair, H. M. e Miller, J. M. (2009). *Basic Gas Chromatography*. 2ª ed. Wiley.
- Miller, L. G., Perdreau-Remington, F., Rieg, G., *et al.* (2005). Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *The New England Journal of Medicine*, 352, pp. 1445–1453.
- Milone, M. C. (2012). Laboratory testing for prescription opioids. *Journal of Medical Toxicology*, 8, pp. 408–416.
- Moffat, A. C., Osselton, M. D. e Widdop, B. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. USA, Pharmaceutical Press.
- Moreau, R. e Siqueira, M. (2008). *Toxicologia Analítica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 318.
- Musshoff, F., Stamer, U. M. e Medea, B. (2010). Pharmacogenetics and forensic toxicology. *Forensic Science International*, 203, pp. 53–62.
- Nebert, D.W., Zhang, G. e Vesell, E. S. (2008). From human genetics and genomics to pharmacogenetics and pharmacogenomics: past lessons, future directions. *Drug Metabolism Reviews*, 40, pp. 187–224.
- Needleman, H. L. (1995). Behavioral Toxicology. *Environmental Health Perspectives*, 103, pp. 77–79.
- Negrusz, A. e Cooper, G. (2013). *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*. London, Pharmaceutical Press.
- Nelson, L. S., Lewin, N. A., Howlan, M. A., *et al.* (2011). *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*. 9ª ed. The McGraw-Hill.

Nockemann, D., Rouault, M., Labuz, D., *et al.* (2013). The K channel GIRK2 is both necessary and sufficient for peripheral opioid-mediated analgesia. *EMBO Molecular Medicine*, 5, pp. 1263–1277.

Oliveira, A., Dinis-Oliveira, R. J. e Carvalho, F. D. (2015). Opióides. *In: Dinis-Oliveira, R.J., Carvalho, F., Bastos, M. L. (Eds.). Toxicologia Forense*. 1ª ed. Lisboa, Lidel, pp. 141–164.

Paice, J. A. (2007). Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenomics of Opioids. *Pain Management Nursing*, 8, pp. 2–5.

Passagli, M. (2011). *Toxicologia Forense - Teoria e Prática*. 3ª ed. Millennium Editora.

Pathak, S., Lakhwani, D., Gupta, P., *et al.* (2013). Comparative Transcriptome Analysis Using High Papaverine Mutant of *Papaver somniferum* Reveals Pathway and Uncharacterized Steps of Papaverine Biosynthesis. **[Em linha]. Disponível em** <<http://journals.plos.org/plosone/article/related?id=10.1371/journal.pone.0065622>> **[Consultado em 15/03/2016]**.

Pauwels, A., Buist, S., Calverley, A., *et al.* (2001). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): executive summary. *Respiratory Care*, 46, pp. 798–825.

Poklis, A. (2010). Analytic/Forensic Toxicology. *In: Casarett & Doull's. (eds.). Essentials of Toxicology*. 2ª ed. Mc Graw Hill, pp. 1237–1255.

Pounder, D. J., Adams E., Fuke C., *et al.* (1996). Site-to-site variability of postmortem drug concentrations in liver and lung. *Journal of Forensic Sciences*, 41, pp. 927–32.

Rangel, R. (2003). Noções Gerais sobre outras ciências forenses. Porto: *Faculdade de medicina da Universidade do Porto*.

Risser, D., Uhl, A., Stichenwirth, M., *et al.* (2000). Quality of heroin and release-related deaths from 1987-1995 in Vienna, Austria. *Addiction*; 95, pp. 375–382.

Ryan, A. (2005). Fatal toxic leukoencephalopathy: clinical, radiological, and necropsy findings in two patients. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 76, pp. 1014–1016.

Saferstein, R. (2015). *Criminalistics: an introduction to forensic science*, 11ªed. Pearson Education Limited.

SAMHSA (2014). *Adult Drug Courts and Medication-Assisted Treatment for Opioid Dependence. In Brief*, Volume 8, Issue 1.

Santiago, V. (2015). Neural mechanisms of analgesia: Spinal analgesia [**Em Linha**] **Disponível em** <<https://www.studyblue.com/notes/n/mt2-opioid-analgesics/deck/15540420>> [**consultado a** 14/06/2016].

Saukko, P. e Knight, B. (2004). *Knight's Forensic Pathology*. 3ª ed. Hodder Arnold, pp. 577–580.

Savchuk, S., Barsegyan, S., Barsegyan, I., *et al.* (2008). Chromatographic study of expert and biological samples containing desomorphine. *Journal of Analytical Chemistry*, 63, pp. 361–370.

Schaper, A., Hofmann, R., Bargain, P., *et al.* (2007). Surgical treatment in cocaine body packers and body pushers. *International Journal of Colorectal Disease*, 22, pp. 1531–1535.

Schulz, M., Iwersen-Bergmann, S., Andresen, H., *et al.* (2012). Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Critical Care*, 16, p. 136.

Selley, D. E., Cao, C. C., Sexton, T., *et al.* (2001).  $\mu$ -receptor-mediated G-protein activation by heroin metabolites: evidence for greater efficacy of 6-monoacetylmorphine compared with morphine. *Biochemical Pharmacology*, 62, pp. 447–455.

Shuster, S. (2011). The curse of the crocodile: Russia's deadly designer drug. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.time.com/world/article/0,8599,2078355,00.html>> **[Consultado a 20/06/2016].**

SICAD (2007). Descriminalização do consumo **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.sicad.pt/PT/Cidadao/DesConsumo/Paginas/default.aspx>> **[Consultado em 16/06/2016].**

Skopp, G. (2004). Preanalytic aspects in *postmortem* toxicology. *Forensic Science International*, 142, pp. 75–100.

Smith, H. S. (2009). Opioid Metabolism. *Mayo Clinic Proceedings*, 84, pp. 613–624.

Stamer, U. M. e Stuber, F. (2007). Genetic factors in pain and its treatment. *Current Opinion in Anesthesiology*, 20, pp. 478–484.

Stephens, B. G., Jentzen, J. M., Karch, S., *et al.* (2004). Criteria for the interpretation of cocaine levels in human biological samples and their relation to the cause of death. *The American journal of forensic medicine and pathology*, 25, pp. 1–10.

Stout, P. R., Roper-Miller, J. D., Baylor, M.R., *et al.* (2006). External contamination of hair with cocaine: evaluation of external cocaine contamination and development of performance-testing materials, *Journal of Analytical Toxicology*, 30, pp. 490–500.

Tagliaro, F., De Battisti, Z., Smith, F. P., *et al.* (1998). Death from heroin overdose: findings from hair analysis. *The Lancet*, 351, pp. 1923–1925.

Tanguay, P. (2011). Kratom in Thailand: Descriminalisation and community control? *Legislative Reform of Drug Policies*, 13, pp. 1–16.

Tassoni, G., Cacaci, C., Zampi, M., *et al.* (2007). Case report: Bile Analysis in Heroin Overdose. *Journal of Forensic Sciences*, 52, 1405–1407.

Tiscione, N. B., Shan, X., Alford, I., *et al.* (2011). Quantitation of opioids in whole blood by electron impact-gas chromatography-mass Spectrometry. *Journal Analytical Toxicology*, 35, pp. 99–107.

Totah, R. A., Sheffels, P., Roberts, T., *et al.* (2008). Role of CYP2B6 in stereoselective human methadone metabolism. *Anesthesiology*, 108, pp. 363–374.

Trescot, A. M., Datta, S., Lee, M., *et al.* (2008). Opioid pharmacology. *Pain Physician*, 11, pp. 133–153.

Tsanaclis, L. M., Wicks, J. e Chasin, A. (2011). Análise de drogas em cabelos ou pêlos. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, 4, pp. 6–46.

UNODC (2015). *World Drug Report 2015*. New York, United Nations.

Vanbinst, R., Koenig, J., Di Fazio, V., *et al.* (2002). Bile analysis of drugs in postmortem cases. *Forensic Science International*, 128, pp. 35–40.

Verstraete, A. G. (2004). Detection times of drugs of abuse in body fluids. *Therapeutic drug monitoring*, 26, pp. 200–205.

Villain, M., Muller, J. F. e Kintz, P. (2010). Heroin markers in hair of a narcotic police officer: Active or passive exposure? *Forensic Science International*, 196, pp. 128–129.

Waldhoer, M., Bartlett, S. E. e Whistler, J. L. (2004). Opioid receptors. *Annual Review of Biochemistry*, 73, pp. 953–990.

Whitley, R e Figarelli, D. (2009). *A simple guide to Forensic Toxicology*. National Forensic Science Technology Center.

Wright, M. (2014). Assessment of Drug Dependence [**Em Linha**]. Disponível em <http://patient.info/doctor/assessment-of-drug-dependence> [**Consultado a 14-06-2016**].

Wyman, J. e Bultman, S. (2004). Postmortem distribution of heroin metabolites in femoral blood, liver, cerebrospinal fluid, and vitreous humor. *Journal Analytical Toxicology*, 28, pp. 260 – 263.

Yarema, M. C e Becker, C. E (2005). Key concepts in *postmortem* drug redistribution. *Clinical Toxicology*, 43, pp. 235–241.

Yuan, C., Chen, D. e Wang, S. (2014). Drug confirmation by mass spectrometry: Identification criteria and complicating factors. *Clinica Chimica Acta*, 438, pp. 119 – 125.