

José Miguel de Oliveira Gordo

**O cabelo como amostra biológica em toxicologia forense: colheita,
análise e áreas de aplicação**

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2013

José Miguel de Oliveira Gordo

**O cabelo como amostra biológica em toxicologia forense: colheita,
análise e áreas de aplicação**

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2013

José Miguel de Oliveira Gordo

**O cabelo como amostra biológica em toxicologia forense: colheita,
análise e áreas de aplicação**

Atesto a originalidade do trabalho:

(José Miguel de Oliveira Gordo)

Projeto de Pós Graduação apresentado à Universidade Fernando

Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do

grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Professora Doutora Márcia Cláudia Dias de Carvalho

Porto 2013

Resumo

Nos últimos anos, a utilização do cabelo como matriz biológica para análises toxicológicas forenses revelou ser uma amostra alternativa importantíssima e, em muitas situações, complementar às matrizes tradicionalmente empregues como o sangue e a urina. A sua capacidade em fornecer ao toxicologista um historial dos compostos consumidos por determinado indivíduo, num período de meses a anos anteriores ao período de colheita, confere a esta matriz propriedades únicas. Atualmente, as análises toxicológicas ao cabelo são aplicadas em diversas áreas tais como crimes facilitados por drogas, controlo de *doping*, toxicologia *post mortem*, determinação da exposição a xenobióticos durante a gestação, programas terapêuticos de substituição para toxicodependentes, entre outros.

Neste trabalho é feita uma revisão das características anatómicas e fisiológicas do cabelo, procedimentos de colheita, metodologias de análise, vantagens e desvantagens da sua utilização na análise de xenobióticos, comparativamente a outras matrizes, bem como possíveis áreas de aplicação dessas análises. Ainda referente a cada uma das áreas de aplicação pretende-se dar ênfase aos principais xenobióticos encontrados.

Abstract

In recent years, the use of hair as biological matrix for forensic toxicology analysis was found to be an important alternative sample and, in many situations, complementary to traditionally used matrices as blood and urine. Its ability to provide toxicologist with a historical profile of an individual's exposure to drugs or analytes of interest over a period of months to years prior to the harvest period, confers this matrix unique properties. Currently, hair toxicological analysis are applied in various areas such as drug-facilitated crimes, doping control, postmortem toxicology, in utero exposure to xenobiotics, compliance with drug substitution/maintenance therapy, among others.

This work is a revision of the hair anatomical and physiological characteristics, sample collection procedures, the analytical methodologies, the advantages and disadvantages of hair use for the analysis of xenobiotics compared to other matrices, as well as the possible applications of hair testing. Still referring to each of the application areas, it is intended to give emphasis to the main xenobiotics found.

Agradecimentos

Nesta nova e importante etapa da minha vida não podia deixar de agradecer a todos aqueles, que de uma forma ou de outra, contribuíram para que os meus objetivos fossem atingidos.

Quero começar por agradecer, à minha orientadora, Prof. Doutora Márcia Cláudia Dias de Carvalho, por toda a disponibilidade, compreensão e paciência comigo e, por ter sido sempre um exemplo de rigor e empenho.

Um agradecimento especial aos meus pais e irmã, pela força e confiança que me deram ao longo da minha vida académica e pelo amor incondicional.

À Magna Vieira, um obrigado pelo apoio e disponibilidade que demonstraste ao longo destes cinco anos.

Por fim, gostaria ainda de agradecer à Liliana Lopes pelo apoio e carinho prestados.

Índice

Resumo	i
Abstract.....	ii
Agradecimentos	iii
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	vii
Abreviaturas.....	viii
I. INTRODUÇÃO	1
II. O CABELO, MATRIZ PARA ANÁLISE TOXICOLÓGICA	2
2.1. Características anátomo-fisiológicas do cabelo	2
2.2. Incorporação de xenobióticos no cabelo	6
2.3. Vantagens do cabelo como matriz numa análise toxicológica.....	12
III. COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	15
3.1 Colheita da Amostra	15
3.2 Preparação da amostra	18
3.2.1. Análise segmentar.....	18
3.2.2. Descontaminação ou lavagem	20
3.2.3. Homogeneização da amostra	22
IV. ANÁLISE.....	23
4.1. Extração dos compostos da matriz	23
4.2. Teste de rastreio.....	26
4.3. Limpeza de Extratos	28
4.4. Técnicas de Confirmação	30
4.4.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).....	30
4.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS)	34

4.4.3. Eletroforese Capilar (EC)	35
4.5. Valores de <i>cut-off</i>	35
4.6. Controlo de qualidade da metodologia analítica	37
V. ÁREAS DE APLICAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS	40
5.1. Crimes facilitados por drogas	40
5.1.1. Benzodiazepinas	41
5.1.2. Hipnóticos.....	41
5.1.3. Gama-hidroxitirato (GHB)	42
5.1.4. Outras drogas	44
5.2. Controlo de doping	44
5.2.1. Esteroides anabolizantes.....	44
5.2.2. Corticosteroides	46
5.2.3. Beta-Adrenérgicos	47
5.3. Toxicologia post mortem.....	47
5.4. Determinação da exposição a xenobióticos durante a gestação	49
5.4.1. Opióides.....	50
5.4.2. Álcool	50
5.4.3. Tabaco	51
5.4.4. Cetamina.....	53
5.5. Toxicodependentes em programas de substituição	54
5.5.1. Programas de reabilitação de consumidores de heroína	54
5.6. Consumo de drogas no local de trabalho.....	55
5.7. Outras aplicações.....	55
VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	57
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
VIII. ANEXOS.....	73

Índice de Figuras

Figura 1. Folículo piloso (adaptado de Young e Heath, 2000).....	3
Figura 2. Formação do folículo piloso a partir das células matriz presentes na membrana basal até à haste permanente do cabelo (adaptado de Pragst e Balikova, 2006).....	5
Figura 3. Incorporação e eliminação de xenobióticos no cabelo (adaptado de Pragst e Balikova, 2006).....	9
Figura 4. Comparação entre diversas matrizes relativamente ao período médio de deteção de canabinóides e ao tempo necessário para o aparecimento dos compostos na matriz, após o consumo de marijuana (adaptado de Moffat <i>et al.</i> , 2004).....	14
Figura 5. (a) O cabelo deve ser retirado da região vértice posterior da cabeça, o mais próximo possível do couro cabeludo. A amostra de cabelo deve ser firmemente apertada e amarrada com fio de algodão. (b) Ainda segurando a amostra com força, alinhar as raízes da amostra e colocar cuidadosamente sobre um pedaço de folha de alumínio, que é dobrado (adaptado de Dinis <i>et al.</i> , 2010).....	16
Figura 6. Etapas do processo de microextração em fase sólida (adaptado de Gallardo <i>et al.</i> 2009).....	29

Índice de Tabelas

Tabela 1. Valores de cut-off propostos pela SoHT (adaptado de Cooper 2011, SoHT).....36

Tabela 2. Concentrações de nicotina e cotinina presentes em amostras de cabelo (adaptado de Jacqz-Aigrain et al., 2002).....52

Abreviaturas

CBN – Canabinol

CI – Ionização química (*Chemical ionization*)

CZE – *Capillary zone electrophoresis*

DHEA – Desidroepiandrosterona

DI-SPME – *Direct immersion solid phase microextraction*

EC – Eletroforese capilar

ELISA – *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays*

ESI – Ionização por *electrospray* (*Electrospray ionization*)

FAEE – Ésteres etílicos de ácidos gordos (*fatty acid ethyl esters*)

GBL – Gama-butirolactona

GC – Cromatografia gasosa (*Gas chromatography*)

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (*Gas chromatography–mass spectrometry*)

GC-MS/MS – *Gas chromatography–tandem mass spectrometry*

GHB – Gama-hidroxiacetato

GTFCh – *German Society of Toxicological and Forensic Chemistry*

HS-SPME – *Headspace solid phase microextraction*

HS-SPDE – *Headspace solid phase dynamic extraction*

IE – Ionização por impacto de elétrons (*Electron impact*)

LC – Cromatografia Líquida (*Liquid chromatography*)

LC-QTOF-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com um analisador do tipo quadrupolo *time of flight* (*Liquid chromatography–quadrupole time of flight–mass spectrometry*)

MDMA – Metilenodioximetanfetamina

MEKC – *Micellar electrokinetic capillary chromatography*

MS/MS – Espectrometria de massas em modo *tandem*

NCI – Ionização química negativa (*Negative chemical ionization*)

PCI – Ionização química positiva (*Positive chemical ionization*)

PI – Padrão interno

RIA – Radioimunoensaio

SIM – *Selected ion monitoring*

SNC – Sistema Nervoso Central

SoHT – *Society of Hair Testing*

SPME – Microextração em fase sólida (*solid phase microextraction*)

THC – Δ^9 -tetrahydrocannabinol

TOF – *Time of flight*

UV – Ultravioleta

WADA – *World Anti-Doping Agency*

1,4-BD – 1,4-butanodiol

I. Introdução

A análise do cabelo não é uma preocupação recente pois há várias centenas de anos que os investigadores se debruçam sobre este tema. O primeiro estudo foi publicado em 1858 por Hoppe e documentava a deteção de arsénio no cabelo de cadáveres exumados 11 anos após a sua morte (*cit in* de Lima e da Silva, 2007). A partir de então e ao longo das décadas de 60 e 70, a análise ao cabelo era utilizada de modo a avaliar a exposição de indivíduos a metais pesados, tais como arsénio, chumbo ou mercúrio. Os metais tornaram-se assim os primeiros xenobióticos analisados no cabelo (Potsch *et al.*, 1997). Por esta altura, a deteção de substâncias orgânicas, tais como drogas, era impossível, em consequência das limitações existentes na metodologia analítica (Kintz, 2004).

As limitações metodológicas viriam a ser contornadas no início da década de 80 do século XX, com a introdução de métodos mais específicos e sensíveis, nomeadamente os radioimunoensaios (RIA) e, mais tarde, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (Villain *et al.*, 2004d ; Kintz, 2004). Em 1979, Baumgartner e seus colaboradores publicaram o primeiro estudo onde a morfina era detetada por RIA em amostras de cabelo provenientes de consumidores de heroína (Baumgartner *et al.*, 1979). Nesse estudo, Baumgartner demonstrou que a concentração dos xenobióticos variava ao longo da haste do cabelo, permitindo deste modo avaliar a exposição do indivíduo em determinados períodos de tempo (Balikova, 2005). O segundo método para análise de xenobióticos orgânicos surgiu em 1980 por Klug recorrendo a métodos cromatográficos para deteção de opióides no cabelo (*cit in* Pragst e Balikova, 2006).

Este avanço tecnológico permitiu que, nos últimos vinte anos, as análises efetuadas em amostras de cabelo fossem dotadas de uma maior sensibilidade, alcançando baixos limites de deteção, e proporcionando uma melhor compreensão relativa ao método de incorporação de xenobióticos no cabelo (Cooper, 2011).

A vantagem do emprego do cabelo como matriz de ensaio em análises forenses consiste na sua capacidade em fornecer detalhes históricos da exposição de um indivíduo a drogas após a sua administração crónica ou isolada. De maneira a compreender e

interpretar os resultados dos testes de cabelo, é importante ter algum conhecimento básico de como os xenobióticos são incorporados na haste do cabelo em crescimento e quais os fatores que afetam a sua estabilidade. Existem vários princípios fundamentais que devem ser considerados quando se introduz cabelo num laboratório de análises, incluindo a recolha e tratamento de amostras, a seleção e validação das metodologias adequadas, e a compreensão e posterior interpretação dos resultados.

Neste trabalho é feita uma revisão das noções fisiológicas básicas de crescimento do cabelo, dos mecanismos de incorporação de substâncias, métodos analíticos, interpretação dos resultados e aplicações práticas da análise do cabelo de drogas e outros xenobióticos.

II. O cabelo, matriz para análise toxicológica

2.1. Características anátomo-fisiológicas do cabelo

Com este trabalho, pretende-se dar ênfase ao cabelo como matriz biológica para análise toxicológica forense. Para uma melhor compreensão dos mecanismos de incorporação de xenobióticos é necessário ter em conta as características do cabelo que fazem dele uma amostra fiável na avaliação do grau de exposição a determinadas substâncias (Drummer, 2010).

Embora o cabelo pareça uma estrutura primitiva e as suas propriedades anatómicas, fisiológicas e químicas tenham sido descritas é, na verdade, dotado de uma elevada complexidade e a sua biologia ainda não está plenamente esclarecida (Pragst e Balikova, 2006).

O cabelo encontra-se dividido em duas partes: a haste capilar, que se projeta para fora da superfície da pele, e o folículo piloso, que se encontra sob a superfície, apresentando uma dilatação terminal denominada por bulbo piloso. Ambas são constituídas por colunas de células epiteliais queratinizadas dispostas, de dentro para fora, em camadas concêntricas: a medula, o córtex e a cutícula (Fig. 1) (Carneiro e Junqueira, 2008).

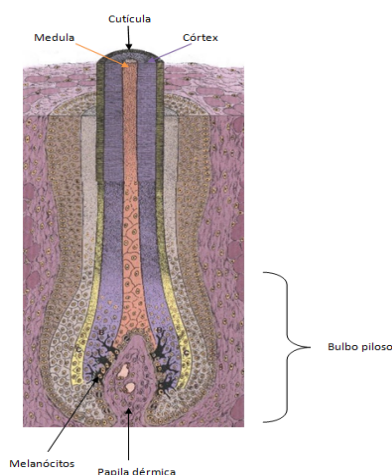


Figura 1. Folículo piloso (adaptado de Young e Heath, 2000).

A medula constitui a camada central do cabelo, sendo rodeada por uma camada muito queratinizada denominada por córtex que confere volume ao cabelo (Barbara Young e John W Heath, 2000) e onde se podem encontrar células contendo grânulos de melanina. O córtex é revestido por uma cutícula constituída por células não pigmentadas que além da sua envolvência no brilho do cabelo, conferem resistência química e física (Pragst e Balikova, 2006). A cutícula constitui a camada mais externa encontrando-se melhor preservada na porção proximal do fio de cabelo (Nakahara, 1999), sofrendo uma degradação gradual devido a radiações ultravioleta, uso de químicos e ações mecânicas (Karch, 2006).

Quanto à sua origem, o cabelo provém do folículo piloso situado entre 3 a 5 milímetros da superfície da pele. O bolbo piloso, dilatação terminal e local de síntese celular, encontra-se em contacto com os capilares através da papila dérmica. O centro germinativo que rodeia a papila dérmica é formado por células da matriz (queratinócitos), presentes na membrana basal. Durante a fase de crescimento ativo do cabelo, as células da matriz proliferam e diferenciam-se para formar as três camadas internas (medula, córtex e cutícula), que vão sendo empurradas a partir do bolbo piloso para a superfície da pele, devido às rápidas divisões mitóticas (Pragst e Balikova, 2006).

À medida que os queratinócitos ascendem no folículo vão sofrendo importantes alterações morfológicas e estruturais passando por diferentes estágios até à maturação do cabelo (Randall e Botchkareva, 2009). Logo acima do bolbo piloso, surge a zona queratogénica onde ocorre a ativação de genes responsáveis pela expressão da queratina, dando assim origem ao processo de queratinização das células, e ainda a incorporação de pigmentos de melanina, produzidos pelos melanócitos existentes na membrana basal do córtex e incorporados pelos queratinócitos num processo denominado de citocrinia. Na zona queratogénica, as queratinas formam longas fibras estabelecendo ligações entre si através de pontes de dissulfureto (S-S), e com outras proteínas através de ligações cruzadas (Pragst e Balikova, 2006).

Mais acima, na zona de endurecimento, as células vão morrendo gradualmente, tornando-se anucleadas, desidratadas, sofrendo coalescência, resultando na formação de

uma massa densa. A última zona é constituída pela haste permanente do cabelo (Figura 2) (Boumba *et al.*, 2006).

Para além de uma rede de capilares que fornece as necessidades metabólicas ao cabelo em crescimento, o folículo piloso encontra-se também associado a um músculo eretor do pelo e a uma glândula sebácea que contém um ducto associado à parte superior da raiz, de modo a garantir a lubrificação do cabelo dois a três dias antes de atingir a superfície. Nas redondezas do folículo piloso encontram-se glândulas sudoríparas écrinas, cujo conteúdo banha a haste do cabelo (Figura 2) (Pragst e Balikova, 2006).

Da constituição química do cabelo fazem parte proteínas (65 - 95%) ricas em glicina, treonina, ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e cisteína; água (15 - 35%), lípidos (1 - 9%); e minerais (< 1%) (Barroso *et al.*, 2011). A proteína mais abundante é a queratina, a qual é muito rica em cisteína (aminoácido rico em enxofre).

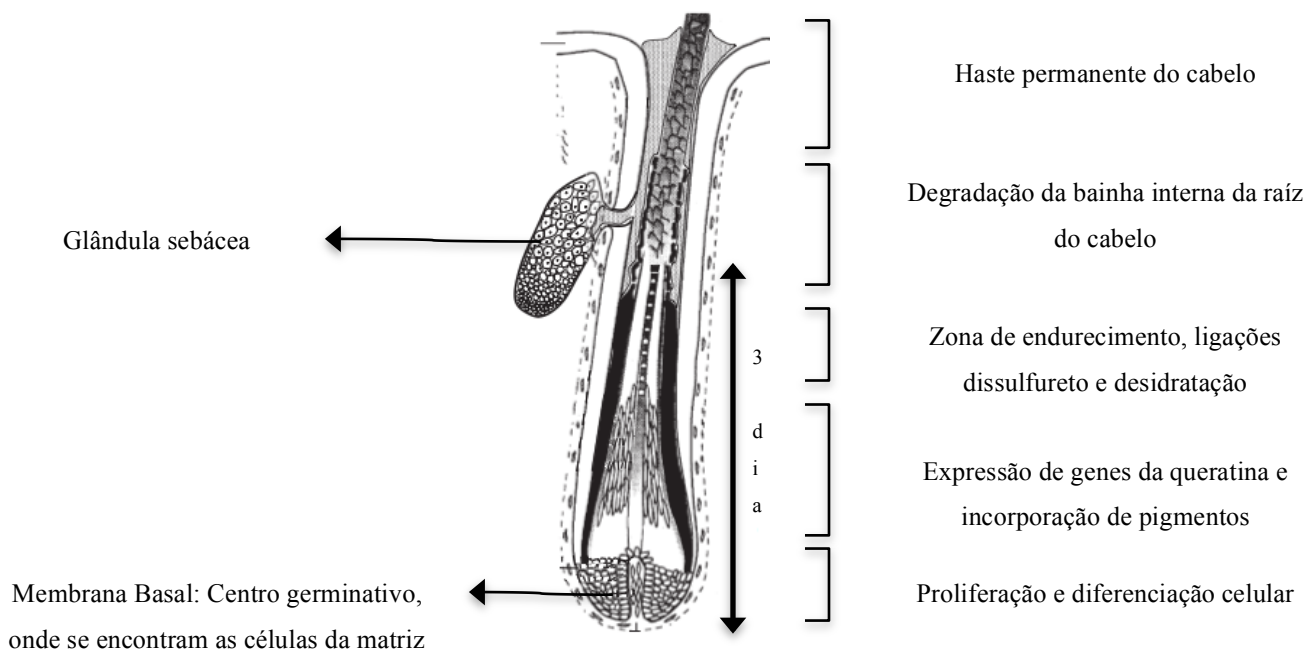


Figura 2. Formação do folículo piloso a partir das células matriz presentes na membrana basal até à haste permanente do cabelo (adaptado de Pragst e Balikova, 2006).

O crescimento do cabelo não é efetuado de forma contínua, mas em ciclos não sincrónicos, alternando entre fases de crescimento e repouso. Estima-se que a dada altura no couro cabeludo de um adulto aproximadamente 85% do cabelo se encontra na fase de crescimento encontrando-se os restantes 15% na fase de repouso. Cada ciclo do cabelo humano compreende três fases ou estádios: anagénesse (crescimento), catagénesse (transição) e telogénese (expulsão do cabelo), onde a duração de cada fase pode influenciar o tamanho e a densidade do couro cabeludo (Wennig, 2000).

Na fase de anagénesse que dura, aproximadamente entre quatro a oito anos, o folículo responsável pela produção do cabelo produz entre 0,22 a 0,52 milímetros de cabelo por dia, ou seja, 0,6 a 1,4 centímetros por mês (Kintz, 2004). O crescimento do cabelo é acompanhado pela síntese das células da matriz no bolbo piloso, ascensão no canal folicular, diferenciação em medula, córtex e cutícula, seguidas de queratinização (Boumba *et al.*, 2006). Para além disso, nesta fase, a rede de capilares encontra-se a nutrir o folículo. Fatores como a raça, patologias, gravidez, deficiências nutricionais, alterações genéticas, metabólicas e idade influenciam a taxa de crescimento (Cooper, 2011).

Após este período, e durante cerca de duas semanas, ocorre uma fase de transição entre o crescimento ativo e a fase de repouso denominada por estádio de catagénesse, altura em que a haste do cabelo se encontra totalmente queratinizada e, terminando a divisão celular, o bolbo começa a degenerar (Cooper, 2011). Segue-se uma fase de repouso - telogénese - que dura sensivelmente 10 semanas e na qual o crescimento do cabelo cessa por completo, podendo facilmente ser removido por ação mecânica. Dá-se início ao crescimento de um novo fio de cabelo, no centro germinativo, sendo assim expulso o fio que se encontrava em repouso (de Lima e da Silva, 2007). O período de tempo que o cabelo permanece nesta fase depende do tipo de cabelo e da idade.

2.2. Incorporação de xenobióticos no cabelo

Os mecanismos envolvidos na incorporação de drogas e outros xenobióticos ao longo do cabelo não se encontram totalmente esclarecidos. O modelo multicompartimental proposto por Henderson em 1993, que ainda hoje é aceite, sugere a incorporação de

substâncias no cabelo em diferentes estádios: (i) na altura da sua formação, por difusão passiva a partir do sangue para a base do folículo piloso; (ii) após a sua formação, através do suor e secreções sebáceas; e (iii) por deposição de xenobióticos resultante da exposição ambiental (Kintz, 2004). O mecanismo dominante de incorporação de compostos depende da natureza da substância a incorporar e das características físicas e fisiológicas do indivíduo (Pragst e Balikova, 2006).

Relativamente à incorporação de xenobióticos a partir do sangue, esta pode ocorrer por difusão passiva através da corrente sanguínea que nutre o folículo piloso para as células da matriz em crescimento localizadas entre o centro germinativo e o fim da zona de queratinização, de acordo com solubilidade lipídica da molécula e o gradiente de pH entre o plasma e a célula (Pragst e Balikova, 2006).

Um outro mecanismo aceite sugere a incorporação de substâncias no cabelo resultante da difusão das secreções corporais (sebo e suor) durante a formação da haste do cabelo (de Lima e da Silva, 2007; Pragst e Balikova, 2006). Os poros existentes no cabelo permitem a absorção de líquidos, podendo ocorrer facilmente a transferência de xenobióticos através do suor para o cabelo, proporcionando um aumento de cerca de 18% do seu peso (Kintz, 2004). Este mecanismo pode ser corroborado através da variabilidade de procedimentos de lavagem e extração inter-laboratoriais, onde drogas transferidas destas secreções para o cabelo já formado são mais facilmente removidas devido ao estabelecimento de ligações menos fortes, quando comparadas às ligações estabelecidas aquando a formação do cabelo, evidenciando um mecanismo alternativo à difusão do sangue para a base do folículo (Boumba *et al.*, 2006). Henderson e colaboradores (*cit in* Kintz, 1996) corroboraram a transferência de drogas através deste mecanismo, onde cabelo ausente de drogas ao ser colocado nas mãos de indivíduos que previamente tinham consumido cocaína, surgiu contaminado após duas horas, mesmo após lavagem, em níveis bastante superiores aos encontrados no cabelo nos meses seguintes (Kintz, 1996). Em estudos *post mortem*, a presença de drogas como a metilendioximetanfetamina (MDMA) e a morfina no cabelo foi associada a suor excessivo fruto da hipertermia e a processos anafiláticos, o que evidencia a transferência destes compostos através do suor para o cabelo (Kintz, 2012).

Desde que este modelo foi proposto, uma grande variedade de compostos foram já encontrados no cabelo provenientes do suor e sebo, em concentrações por vezes mais elevadas do que no sangue. De um modo geral, quanto maior for a lipofilia do composto provenientes do sebo e suor, maior será a sua capacidade para atravessar as membranas e se acumular no cabelo (Barroso *et al.*, 2011).

A deposição de xenobióticos resultante da exposição ambiental como mecanismo alternativo para incorporação de substâncias pode ocorrer por contacto com vapores, fumos, ou mãos contaminadas. Apesar dos elementos metálicos serem os compostos encontrados em maior proporção no cabelo decorrentes de exposição ambiental, uma grande variedade de compostos têm sido descritos (Wilhelm e Idel, 1996). Estes compostos ao serem depositados no cabelo através de exposição ambiental podem ser banhados por meios aquosos, tais como suor, secreções sebáceas ou líquidos usados em higiene normal (Kintz, 1996), promovendo a sua dissolução e incorporação (Barroso *et al.*, 2011).

Os estudos demonstraram que a exposição por curtos períodos de tempo ao fumo de marijuana é capaz de atingir valores detetáveis de canabinóides como o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) e canabinol (CBN) no cabelo humano (Thorspecken *et al.*, 2004). Análises efetuadas a amostras de cabelo provenientes de ambientes onde ocorreu o manuseamento e armazenamento de metadona permitiram detetar a sua presença (Kintz *et al.*, 2010).

Um mecanismo alternativo para a incorporação de xenobióticos no cabelo inclui a transferência transdérmica de xenobióticos com elevada lipofilia, tais como o THC, acumulados em camadas da pele para o cabelo. Uma possível explicação para a eliminação não usual de cocaína e seus metabolitos do cabelo tem por base este modelo (Boumba *et al.*, 2006).

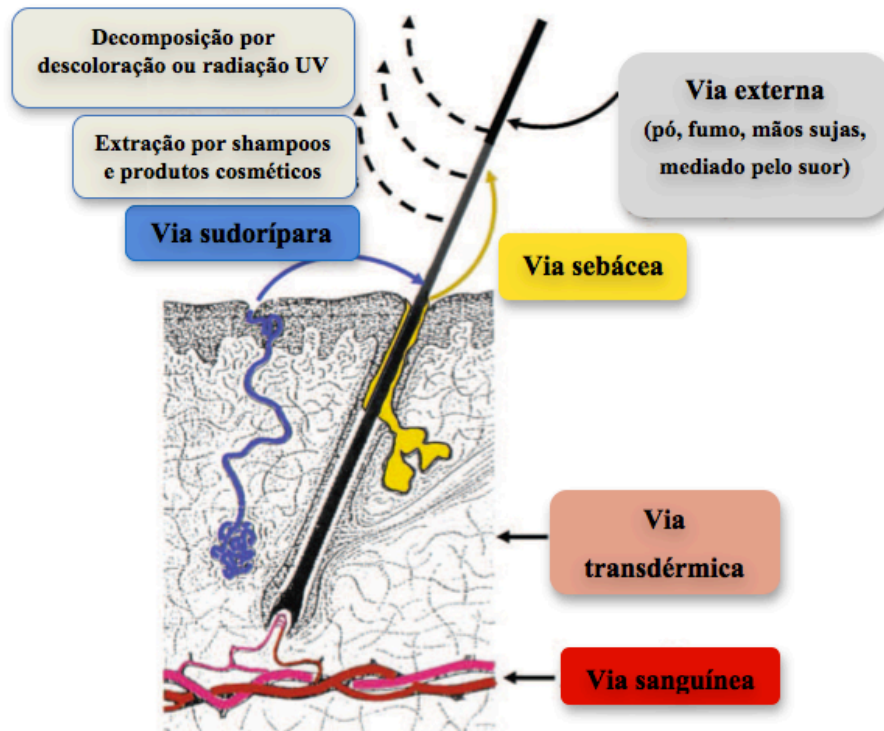


Figura 3. Incorporação e eliminação de xenobióticos no cabelo (adaptado de Pragst e Balikova, 2006).

Existem então três fatores chave que influenciam a incorporação e a extensão com que os xenobióticos são incorporados no cabelo. Um dos fatores importantes é a lipofilicidade da molécula. Moléculas lipofílicas não carregadas penetram facilmente membranas e difundem-se de acordo com o gradiente de concentração para as células da matriz (Pragst e Balikova, 2006). Vários estudos concluíram que metabolitos mais polares, resultantes de reações metabólicas, como a benzoilecgonina, morfina ou anfetamina penetram o cabelo em menor proporção que as respectivas drogas precursoras como a cocaína, 6-monoacetilmorfina ou metanfetamina, dotadas de uma maior lipofilia (Balikova, 2005). No entanto, para moléculas hidrofílicas ou iões orgânicos de massa molecular média a membrana é impermeável (Pragst e Balikova, 2006).

O segundo fator é a basicidade da molécula. Enquanto o pH do plasma é aproximadamente 7, o pH dos queratinócitos (ligeiramente mais ácido que o plasma) e dos melanócitos é mais ácido (entre 3 a 5), resultando num gradiente de pH que favorece a transferência de bases relativamente a moléculas neutras e ácidas (Balikova, 2005). As substâncias básicas, após difusão do sangue, atravessam a membrana das células de matriz na forma não ionizada, sofrendo protonação devido ao pH ácido

existente no interior das células, o que as impede de se difundirem novamente para o plasma, acumulando-se nas mesmas, uma vez que a difusão destas substâncias para as células se encontra favorecida pelo gradiente de pH. No que concerne a substâncias ácidas, tais como o ácido valpróico e o THC, estas atravessam a membrana na forma não-ionizada e devido ao meio ácido das células da matriz, estas têm tendência a não se fixarem significativamente nas células, difundindo-se novamente para o meio extracelular, daí que sejam encontrados em concentrações muito baixas no cabelo (Balikova, 2005).

Em suma, o pKa do composto, assim como o pH no interior das células da matriz, revelam-se importantes para a taxa de incorporação de compostos no cabelo (Pragst e Balikova, 2006).

O último fator correlaciona a basicidade da molécula com a afinidade à melanina. Apesar do mecanismo pelo qual as moléculas se ligam a componentes celulares do cabelo não estar totalmente esclarecido, a ligação das moléculas a componentes como a melanina é suportada por alguns estudos realizados tanto em animais como em humanos (Cooper, 2011). Relativamente à melanina, forças eletrostáticas e forças de Van der Waals são significativas para a ligação dos xenobióticos. Supõe-se que drogas de abuso, como alguns opióides e cocaína, na sua forma catiónica interajam através de ligações eletrostáticas com grupos negativos da melanina, possivelmente derivados da ionização de ácidos carboxílicos (Miyaguchi *et al.*, 2007). As forças de Van der Waals podem também estar presentes na interação entre as estruturas aromáticas dos xenobióticos e o núcleo aromático indol da melanina (de Lima e da Silva, 2007). Acredita-se assim que os xenobióticos são incorporados na melanina à medida que esta é sintetizada, sendo parte dos xenobióticos incluídos nos grânulos de melanina (Miyaguchi *et al.*, 2007).

Para além da ligação de xenobióticos à melanina, foram propostos outros mecanismos pelos quais os xenobióticos estabelecem ligações e permanecem na estrutura capilar, envolvendo cadeias laterais de aminoácidos como ácido aspártico e glutâmico, e grupos sulfato existentes nas fibras de queratina (Kintz, 1996).

Segundo Kintz (1996), a fixação das moléculas ao cabelo estará relacionada com o ponto isoelétrico do cabelo, sendo este predominantemente neutro a pH baixo (aproximadamente 3,8), perto do seu ponto isoelétrico. As fibras de queratina contêm aminoácidos cujas cadeias laterais de ácido aspártico e ácido glutâmico variam de acordo com o pH. A um pH ácido, os ácidos carboxílicos existentes nas cadeias laterais dos aminoácidos encontram-se protonados e os xenobióticos com propriedades hidrofóbicas e carga semelhantes ligam-se na mesma extensão ao cabelo através de interações hidrofóbicas. A um pH superior ao ponto isoelétrico do cabelo, gerado por exemplo pela presença de uma base, as cadeias laterais (ácidos carboxílicos) do ácido aspártico e glutâmico encontram-se desprotonadas que, aliados ao facto das moléculas de NH_3^+ perderem a sua carga, contribuem para que o cabelo fique carregado negativamente. Isto é, quanto mais carregado positivamente estiver o xenobiótico, maior é a sua capacidade de se fixar a grupos carboxílicos livres existentes no cabelo. Pelo que moléculas básicas, ao sofrerem protonação devido ao pH ácido dentro das células, vão ficar carregadas positivamente, facilitando a sua ligação. Como geralmente o cabelo encontra-se carregado negativamente devido à ação recorrente a produtos cosméticos, a ligação de xenobióticos carregados positivamente encontra-se facilitada. (Henderson, 1993).

Este mecanismo foi corroborado com a exposição do cabelo a soluções de pré-tratamento ácidas, básicas e soluções acídicas metanólicas, realçando a importância do ácido aspártico e glutâmico como locais de ligação. As soluções básicas ionizavam as cadeias laterais aumentando a ligação de compostos carregados positivamente como a cocaína, em comparação com o cabelo que não tinha sofrido qualquer tipo de tratamento. Em soluções ácidas só uma pequena quantidade de cocaína se ligava. Em soluções acídicas metanólicas os ácidos carboxílicos sofriam esterificação, perdendo a capacidade de se ionizarem e ligarem à cocaína por ligações iónicas, sendo a capacidade de ligação inicial reestabelecida com adição de uma base, responsável pela hidrólise dos ésteres. Apesar da esterificação a cocaína continuava a ligar-se a grupos carboxílicos dos ácidos aspártico e glutâmico, resultantes de uma esterificação incompleta, e/ou a grupos sulfatos resultantes da oxidação da cistina (Kintz, 1996).

Outro mecanismo de ligação proposto relaciona a abundância de aminoácidos contendo grupos sulfato, como a cistina existentes nas fibras de queratina, e o estabelecimento de ligações cruzadas do tipo dissulfureto (S-S) com o xenobiótico que levam à estabilização das fibras. Estes grupos apresentam uma maior prevalência em cabelos danificados ou alvo de químicos (Kintz, 2004).

Segundo Breuer (*cit in* Kintz, 1996), os xenobióticos polares podem também utilizar ligações peptídicas existentes nas cadeias polipeptídicas de queratina para se ligarem ao cabelo. As ligações peptídicas consistem na ligação de um grupo carboxílico a um grupo amina, criando um dipolo permanente e suficientemente grande para que as moléculas polares possam ser atraídas estabelecendo assim interações do tipo dipolo-dipolo. Este mecanismo permite explicar como algumas moléculas como o benzeno se encontram ligadas numa maior extensão ao cabelo em comparação com o ciclohexano (molécula menos polar) (Kintz, 1996).

Kintz, em 1998, publicou também vários estudos de sua autoria e de outros autores onde evidenciava o papel dos lípidos existentes no cabelo na ligação a xenobióticos. Apesar dos lípidos estarem presentes no cabelo em baixa proporção (1-9%), os xenobióticos poderiam ligar-se de forma não específica a estes componentes. Exemplo de um desses componentes é a fosfatidilcolina, ácido gordo existente na membrana celular. A fosfatidilcolina possui grupos fosfato negativos e grupos colina carregados positivamente capazes de estabelecer ligações catiónicas e aniónicas, respetivamente, com xenobióticos (Kintz, 1996).

2.3. Vantagens do cabelo como matriz numa análise toxicológica

O cabelo como matriz alternativa em análises toxicológicas forenses destaca-se, comparativamente às principais matrizes utilizadas (sangue e urina), nas várias etapas de amostragem e análise toxicológica (de Lima e da Silva, 2007).

Relativamente ao processo de amostragem, o método de colheita é de cariz não invasivo sendo efetuado sob supervisão, tornando o método mais cómodo, não infringindo a privacidade do indivíduo a ser examinado e promovendo a sua colaboração no momento

de colheita (Kintz, 1998). O fato de poder ser efetuada a colheita de uma segunda amostra similar à primeira para posterior análise constitui outra importante vantagem deste tipo de matriz (de Lima e da Silva, 2007).

Um problema muitas vezes associado a amostras habituais, tais como sangue e urina, reside na adulteração ou substituição de amostras. Esse risco associado ao uso de cabelo como matriz, encontra-se muito reduzido por não se encontrarem razões válidas para a manipulação por parte do indivíduo após a colheita (Barroso *et al.*, 2011).

Outra importante vantagem do cabelo face a outros tecidos e fluidos corporais reside no fato desta não requerer refrigeração e poder ser armazenada por tempos indefinidos mantendo a sua estabilidade (Cooper *et al.*, 2012).

Outra vantagem da matriz cabelo em análises toxicológicas é a sua grande janela de detecção, entre 3 dias a meses/anos, dependendo do tamanho da haste do cabelo, quando comparada a matrizes habituais como sangue ou urina, cujo tempo de residência da maioria dos compostos se situa entre dois a quatro dias. Deste modo, a análise do cabelo permite a investigação retrospectiva de uma exposição crónica a determinados xenobióticos que normalmente desaparecem rapidamente do sangue (Boumba *et al.*, 2006; LeBeau *et al.*, 2011). Nos casos em que o sangue e urina foram usados para a pesquisa de drogas que alteram o consentimento de atividade sexual da vítima, verificou-se que a burocracia e os atrasos frequentes por parte da polícia limitavam o uso deste tipo de amostras, pelo que o recurso a amostras com maior janela de detecção, tais como o cabelo, pelos e unhas, para a detecção destes compostos já se encontra descrito na literatura (Kintz *et al.*, 2005a).

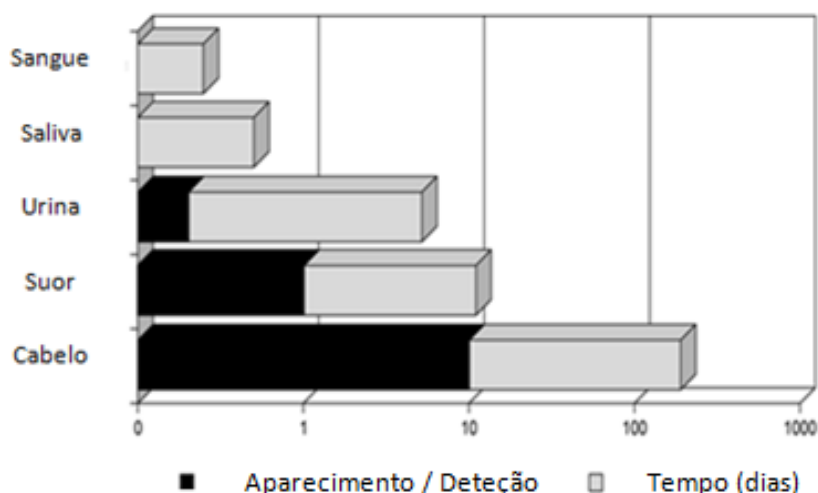


Figura 4. Comparação entre diversas matrizes relativamente ao período médio de detecção de canabinóides e ao tempo necessário para o aparecimento dos compostos na matriz, após o consumo de marijuana (adaptado de Moffat *et al.*, 2004),

Apesar das análises à urina e ao sangue fornecerem informações relativas ao uso recente de determinados compostos, devem, para fins práticos, ser associadas a análises ao cabelo, que apresentam uma maior janela de detecção (Kintz, 2004).

Em estudos post mortem, as análises ao cabelo revelaram ser o único método que possibilita a obtenção de forma precisa do historial de consumo de substâncias semanas ou meses antes da morte (Paterson *et al.*, 2009). A possibilidade de utilização desta amostra mesmo em cadáveres em estado de decomposição avançado constitui outra vantagem do uso deste tipo de matriz em estudos post mortem (Flanagan *et al.*, 2005). Exemplo disso são as benzodiazepinas, tais como o diazepam, que, por serem compostos lábeis e se degradarem em condições de putrefação, podem não ser detetadas em casos de elevada decomposição, sendo assim recomendada a análise ao cabelo onde a retenção destes compostos é mais provável (Drummer, 2004).

Estas vantagens tornam a análise toxicológica em amostras de cabelo uma ferramenta útil como evidência em contexto forense (Pragst e Balikova, 2006).

III. Colheita e Preparação da amostra

3.1. Colheita da Amostra

A colheita deve ser realizada por indivíduos competentes, caso contrário devem ser seguidos rigorosamente protocolos que auxiliam o processo de colheita, obedecendo aos procedimentos da cadeia de custódia e evitando qualquer tipo de contaminação (Pragst e Balikova, 2006).

Apesar da colheita e análise da amostra serem procedimentos importantes, os aspetos pré-analíticos são dotados de grande importância, contribuindo para a obtenção de um resultado plausível e devidamente enquadrado no caso clínico. Desta forma, a informação relativa ao historial deve ser devidamente obtida e registada, apresentando um breve resumo do caso e o objetivo da investigação, bem como o xenobiótico e período que se suspeita que o indivíduo tenha sido exposto (Pragst e Balikova, 2006).

O indivíduo responsável pela colheita deve estar munido de um *kit* contendo formulários referentes à cadeia de custódia (anexo 1) (que pode variar consoante o fim a que se destina a análise), uma folha para envolver o cabelo (geralmente, de alumínio), envelope de colheita, selos de segurança, saco para evidências, envelope de transporte (opcional) e o procedimento para a recolha da amostra (Cooper *et al.*, 2012).

Para que o procedimento de colheita seja efetuado de forma eficiente é da maior importância que vários passos sejam seguidos. O primeiro passo consiste em fixar o cabelo que se pretende cortar com um elástico ou fio de algodão. De seguida efetua-se o corte com o auxílio de uma tesoura de uma porção de cabelo o mais próxima possível do couro cabeludo, na região do vértice posterior, situado na região distal da cabeça conforme ilustra a figura 5 (LeBeau *et al.*, 2011). O facto desta região, comparativamente a outras do couro cabeludo, evidenciar (i) uma menor proporção de cabelo em fase telogénica, (ii) uma taxa de crescimento constante (sensivelmente 1 cm/mês), (iii) um número de fios de cabelo mais constante, (iv) estar sujeito a menos interferências individuais tais como o sexo e a idade, e (v) ser esteticamente menos visível após a colheita, tornam-na de eleição para análise (de Lima e da Silva, 2007).

Por outro lado, esta região encontra-se exposta a secreções sudoríparas, bem como a contaminantes ambientais provenientes do ar, água e poeira, o que implicará posteriormente uma lavagem da amostra. Esta zona encontra-se também sujeita à ação de produtos cosméticos, podendo ser modificada pelos mesmos (Boumba *et al.*, 2006).

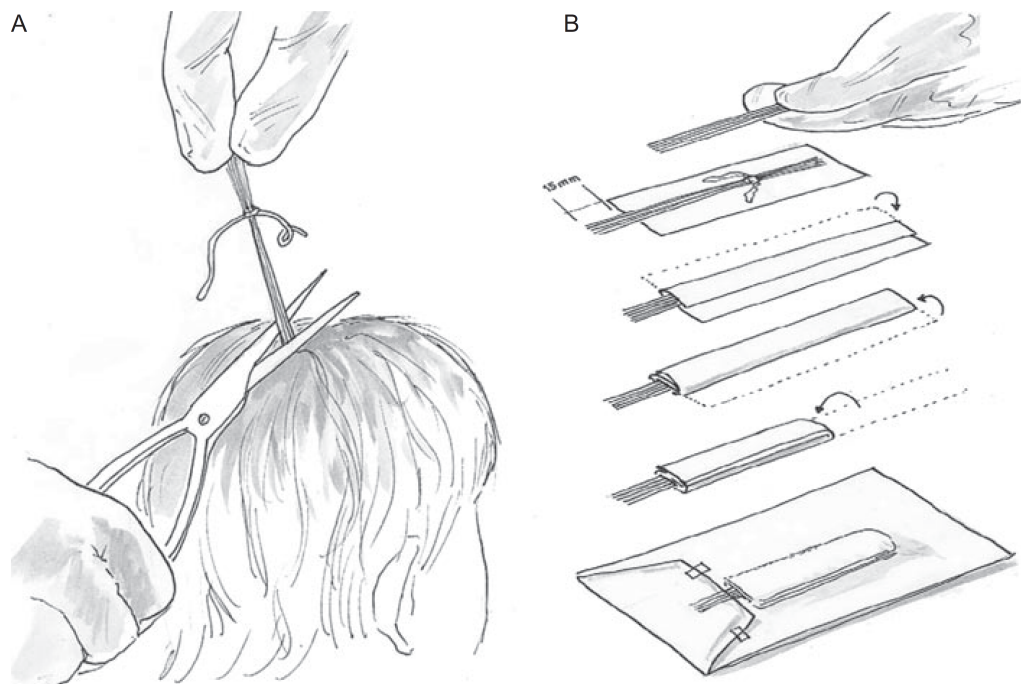


Figura 5. (a) O cabelo deve ser retirado da região vértice posterior da cabeça, o mais próximo possível do couro cabeludo. A amostra de cabelo deve ser firmemente apertada e amarrada com fio de algodão. (b) Ainda segurando a amostra com força, alinhar as raízes da amostra e colocar cuidadosamente sobre um pedaço de folha de alumínio, que é dobrado (adaptado de Dinis *et al.*, 2010).

Em análises rotineiras, a quantidade de cabelo necessária para a realização de uma análise é geralmente descrita como a quantidade de cabelo equivalente à espessura de um lápis. Para propósitos forenses, é aconselhada a colheita de duas amostras separadas (Pragst e Balikova, 2006). Uma primeira amostra cuja quantidade possibilite a análise de testes de rotina e que permita a repetição de análise ou confirmação de resultados por parte de um segundo laboratório (Cooper *et al.*, 2012). A segunda amostra é armazenada separadamente podendo ser usada mais tarde para outros fins, tais como em casos onde se verifica a objeção do resultado final (Pragst e Balikova, 2006). Na etapa de colheita é importante ter cuidado para não deixar visível a pele da cabeça

principalmente em crianças e pessoas calvas. Caso se verifique alguma destas situações, a colheita de pequenas porções de cabelo em zonas próximas do vértice posterior é igualmente aceite (Cooper, 2011). Após ter sido cortado, o cabelo deve ser alinhado numa folha geralmente de alumínio para identificação da ponta da raiz (porção proximal) e estabilização da amostra de cabelo (Figura 5).

O passo seguinte consiste em dobrar a folha longitudinalmente de maneira a segurar o cabelo anteriormente alinhado. A folha é então colocada dentro do envelope de colheita selado, rubricado e datado. No quarto e último passo, o envelope de colheita juntamente com os formulários da cadeia de custódia são colocados dentro do saco de evidências e enviados para o laboratório para ser analisado (Cooper, 2011).

As amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente, em locais secos e escuros (Cooper *et al.*, 2012). O envolvimento numa folha de alumínio e sua colocação em envelopes apropriados é a maneira mais simples e prática de armazenar uma amostra de cabelo, pois este ao ser submetido a este procedimento permite que a maioria dos xenobióticos e seus metabolitos permaneçam estáveis, tornando possível a sua deteção anos após o seu armazenamento (Pragst e Balikova, 2006). Amostras húmidas que sejam submetidas para análise devem obrigatoriamente ser secas antes de armazenadas e analisadas. O armazenamento das amostras em frigoríficos e congeladores não é aconselhado visto que pode ocorrer turgescência e libertação do conteúdo. O armazenamento em sacos de plástico é igualmente desaconselhado, devido à capacidade do saco em extrair as substâncias lipofílicas presentes nas amostras de cabelo (Pragst e Balikova, 2006).

Segundo Cooper (2012), em casos post mortem, a colheita de uma amostra de cabelo deve ser efetuada antes da autópsia. As amostras de cabelo recolhidas devem encontrar-se secas e com a ponta da raiz identificada, o que muitas vezes não se torna possível pois em casos como acidentes rodoviários, crimes facilitados por drogas ou cadáveres em decomposição, o cabelo encontra-se muitas vezes embebido em sangue ou em fluidos corporais. Assim sendo, o uso de folha de alumínio para envolver o cabelo e o envelope podem não ser os mais apropriados, podendo necessitar de outro tipo de recipientes mais robustos (Cooper, 2011). Caso sejam necessárias informações relativas

ao consumo recente de drogas que antecederam a morte, para além da colheita realizada com o auxílio de uma tesoura (procedimento standardizado), os cabelos devem ser retirados por ação mecânica com as respectivas raízes intactas (Cooper *et al.*, 2012). Caso seja efetuada uma análise segmentar, os segmentos mais afastados da superfície corporal correspondem aos consumos menos recentes.

Relativamente a crimes facilitados por drogas, a colheita da amostra deve ocorrer no mínimo entre quatro a seis semanas após o alegado incidente. Aos resultados positivos é recomendada uma segunda colheita de modo a corroborar os resultados. Para um resultado plausível, o queixoso não deve efetuar nenhum tratamento cosmético nem proceder ao corte do seu cabelo entre as colheitas ou até que as investigações se encontrem concluídas (Cooper *et al.*, 2012).

3.2. Preparação da amostra

A análise segmentar, a lavagem e homogeneização da amostra são processos essenciais que antecedem a análise toxicológica propriamente dita (Cooper, 2011).

3.2.1. Análise segmentar

A concentração dos xenobióticos ao longo do fio de cabelo não é uniforme, sendo condicionada pelos diferentes graus de exposição ao longo das diferentes etapas de crescimento do cabelo (Baysal e Akman, 2010). Deste modo, um historial de exposição mais preciso relativo a um determinado xenobiótico é efetuado através da análise segmentar do cabelo, que por sua vez permite averiguar o período em que o indivíduo foi exposto a determinado composto (Baysal e Akman, 2010).

A análise segmentar do cabelo tem por base dois pressupostos: o crescimento de forma linear para a zona do vértice posterior (cerca de um centímetro por mês) e a sua colheita efetuada o mais próximo possível da porção proximal do cabelo que emerge à superfície da pele (LeBeau *et al.*, 2011).

Para a escolha do tamanho apropriado dos segmentos é importante ter em consideração a quantidade de amostra disponível, o período em que se suspeita que o indivíduo tenha tido contacto com o xenobiótico, e, por último, os custos da análise (Pragst e Balikova, 2006).

Dependendo do tipo de caso, diferentes estratégias na análise segmentar podem ser adotadas, sendo que a precisão da análise depende tanto do processo de colheita como do processo de segmentação do cabelo (Cooper *et al.*, 2012). Visto que, geralmente, a concentração do xenobiótico decresce com o aumento da distância à raiz do cabelo, é recomendada a análise de segmentos de tamanho cada vez maior à medida que se distanciam da mesma (Pragst e Balikova, 2006). Exemplo disso foi o estudo publicado por Druid (2007) que pretendia avaliar a capacidade da análise segmentar avaliando o grau de abstinência num grupo de indivíduos. Para a análise segmentar utilizou três segmentos de 5 milímetros para os segmentos de cabelo mais recentes, ou seja mais próximos da raiz do cabelo, e dois segmentos de 10 milímetros para as porções mais distais. Deste modo e tendo em conta o crescimento de 1 centímetro/mês para a região do vértice posterior da cabeça, os segmentos de cabelo mais próximos da raiz correspondem aproximadamente à exposição a determinado xenobiótico nas duas semanas anteriores à colheita (LeBeau *et al.*, 2011).

Apenas os cabelos que foram cortados rentes ao couro cabeludo, devidamente alinhados e com a porção terminal da raiz identificada podem ser submetidos para análise segmentar. A SoHT recomenda que o tamanho dos segmentos de cabelo varie entre 1 a 3 centímetros (Cooper *et al.*, 2012). Contudo, nos casos em que se suspeita que foi cometido um crime facilitado por drogas, como por exemplo aquando do uso de dose única de gama-hidroxibutirato (GHB) em crimes sexuais (droga que promove a atividade sexual sem consentimento), a análise de segmentos ainda mais pequenos pode contribuir para um resultado positivo num menor período de tempo (Cooper *et al.*, 2012). A análise segmentar assume especial importância quando se procede à análise de GHB, uma vez que se trata de um composto produzido endogenamente, sendo por isso importante a discriminação entre os níveis endógenos e exógenos. Comparando as concentrações encontradas em diferentes segmentos torna-se possível essa discriminação (Cooper *et al.*, 2012).

Em casos post mortem muitas vezes existe dificuldade na identificação da porção terminal da raiz, o que implica que a análise segmentar seja preterida à análise do material em bloco. Nestas situações, o historial de exposição a um determinado xenobiótico deixa de ser tão preciso (Cooper, 2011).

3.2.2. Descontaminação ou lavagem

A descontaminação da amostra que antecede a análise assume particular atenção devido a dois fatores. Em primeiro lugar, dado que a presença de resíduos de produtos de tratamento do cabelo (como ceras e champôs), sujidade depositada no cabelo, sebo e suor (que podem veicular o xenobiótico), contribuem para um aumento das interferências e afeta a exequibilidade do resultado analítico. Segundo, devido à deposição de xenobióticos no cabelo resultante da exposição ambiental que se encontram adsorvidos por ligações fracas à superfície do cabelo, podendo deste modo ser removidos através da lavagem das amostras (Pragst e Balikova, 2006). Na análise de cabelo de recém-nascidos os procedimentos de descontaminação adquirem um papel de destaque, não por terem sido alvos de contaminação externa, dado o curto período em que foram expostos ao ambiente exterior, mas sim devido à capacidade do líquido amniótico em excretar xenobióticos maternos passíveis de serem depositados no cabelo (Lozano *et al.*, 2007).

Não existe, atualmente, consenso e uniformidade nos procedimentos de descontaminação para amostras de cabelo em análises toxicológicas. A SoHT recomenda que o processo de lavagem inclua uma lavagem inicial com solvente orgânico de modo a remover os compostos contaminantes insolúveis em água, uma segunda com água ou solução tampão que permite a turgescência do cabelo e difusão dos compostos contaminantes para a solução de lavagem e, por último, uma lavagem com solvente orgânico. Amostras que tenham estado em contacto com fluidos corporais implicam procedimentos adicionais de lavagem (Cooper *et al.*, 2012).

No processo de descontaminação as amostras de cabelo são então mergulhadas durante alguns minutos em soluções de lavagem, as quais serão posteriormente analisadas (Cooper, 2011)

Para que o procedimento de lavagem seja satisfatório as soluções têm que ser dotadas de determinadas características, destacando-se a sua capacidade em remover de forma eficiente as impurezas externas, partindo do pressuposto que estas soluções têm a capacidade para remover a sujidade e xenobióticos resultantes da deposição ambiental, sem que a sua ação conduza à extração dos compostos existentes na matriz do cabelo resultantes da incorporação endógena (de Lima e da Silva, 2007).

No entanto, as soluções de lavagem não conseguem desempenhar na totalidade as funções referidas pelo que a contaminação externa deve representar um papel importante aquando da interpretação dos resultados (Cooper, 2011). A ineficácia das soluções de lavagem na completa eliminação da contaminação externa foi corroborada por um estudo envolvendo vários laboratórios que utilizando diferentes programas de lavagem não conseguiram eliminar a cocaína introduzida previamente como contaminante nas amostras de cabelo (Stout *et al.*, 2006). A ineficácia dos processos de lavagem foi também descrita por Boumba (2006) expondo vários estudos onde diferentes procedimentos de lavagem das amostras tinham sido adotados com o intuito de remover não só a sujidade, mas também os compostos depositados externamente. Todavia, esses procedimentos conduziram igualmente à remoção de compostos incorporados resultantes do consumo individual (Boumba *et al.*, 2006).

A ineficácia dos procedimentos de lavagem conduz a resultados positivos nas soluções de lavagem (associados à perda de xenobióticos incorporados), indicando geralmente contaminação externa. Entre os fatores que podem contribuir para a presença nas soluções de lavagem de xenobióticos incorporados na matriz do cabelo podem referir-se o número de lavagens, os tempos de contacto muito elevados e o uso de solventes orgânicos com elevado poder de lavagem (Cooper, 2011).

Dentro das soluções de lavagem mais comuns destacam-se os detergentes como champôs, surfatantes como o lauril sulfato de sódio a 0,1%, tampão fosfato, ou

solventes orgânicos, tais como acetona, éter dietílico, metanol, etanol, diclorometano, entre outros (Kintz, 2012).

De modo a evitar a perda de compostos do cabelo, torna-se importante que o laboratório responsável pela análise avalie a extensão dos procedimentos de lavagem na remoção dos contaminantes de origem externa (Cooper *et al.*, 2012).

3.2.3. Homogeneização da amostra

A homogeneização tem por objetivo diminuir o tamanho da amostra e consequente aumento da sua área superficial, o que contribui para um maior potencial de recuperação de compostos (Cooper, 2011). A amostra a ser submetida para análise deve ser homogênea e representativa, quer seja analisada em bloco ou em segmentos (Cooper *et al.*, 2012).

De acordo com a SoHT, cada amostra deve ser cortada em pequenos pedaços (2 a 3 milímetros) com o auxílio de uma tesoura ou pulverizada (pó), efetuando-se de seguida a pesagem de 10 a 50 miligramas de amostra (Cooper *et al.*, 2012).

O método de pulverização para homogeneização da amostra recolhe opiniões contraditórias quanto à sua eficácia. De acordo com Pragst e Balikova (2006) o método de pulverização não acarreta melhorias relevantes que possam auxiliar o processo de extração, para além de estar muitas vezes associado a perda de amostra. Em contraste, Miyaguchi (2007) salientou as vantagens do método de micropulverização. Este autor constatou que ao pulverizar 2 miligramas de amostra durante 1 minuto, a cutícula ficaria danificada, o que facilita a permeação do solvente de extração para o interior de cabelo e consequente saída dos compostos incorporados na medula e córtex. Se a técnica de pulverização fosse mais prolongada (tempo superior a 3 minutos) verificava-se, para além da danificação da cutícula, uma desintegração das fibras do córtex. As fibras corticais possuem no seu interior grânulos de melanina (principal local de ligação de compostos básicos), pelo que uma desintegração das fibras corticais pode favorecer o processo de extração dos compostos (Miyaguchi *et al.*, 2007).

IV. Análise

4.1. Extração dos compostos da matriz

Numa análise toxicológica em amostras de cabelo, a quantidade de amostra disponível bem como a concentração de xenobióticos e metabolitos existentes no cabelo é muito reduzida. Desta forma, as amostras devem ser submetidas a um pré-tratamento através de soluções adequadas para um determinado grupo de compostos, permitindo, deste modo, concentrar os compostos incorporados após a libertação dos mesmos da matriz do cabelo (Kintz, 1996).

O pré-tratamento da amostra pode ser realizado através da incubação do cabelo em determinadas soluções sem que estas o danifiquem, ou através da digestão da matriz do cabelo (Cooper, 2011). O tratamento com ureia e tioglicolato, bem como o uso de fluidos supercríticos, encontram-se igualmente mencionados na literatura (Pragst e Balikova, 2006).

Apesar de estarem descritos vários métodos, não existe um de eleição que possibilite a libertação dos compostos da matriz. Contudo, e independentemente do método escolhido, é importante ter em conta a estrutura química do xenobiótico a analisar bem como a informação relativa à estabilidade do analito em diferentes soluções de extração empregues (Pragst e Balikova, 2006). Nos casos em que o cabelo seja usado para rastreio de vários grupos de compostos, os procedimentos de extração devem ter em conta as características químicas dos diferentes grupos, evitando deste modo, uma extração pouco eficiente e o comprometimento da sensibilidade do método (Pragst e Balikova, 2006).

No que concerne às técnicas de incubação descritas na literatura que usam solventes, constata-se que as extrações utilizando o metanol acidificado como solvente extrator (entre 5-18 horas) em banho de ultrassons são as mais empregues, devido à elevada compatibilidade deste solvente com a maioria dos compostos (de Lima e da Silva, 2007). O metanol sendo hidrofílico penetra na matriz do cabelo, dilatando-a com

consequente libertação dos compostos por difusão. Sendo um solvente orgânico, o metanol tem a capacidade para solubilizar compostos neutros e de natureza lipófila presentes no interior da matriz. O processo extrativo é também facilitado pela ultrasonicação que promove uma forte degradação da estrutura do cabelo (Pragst e Balikova, 2006). Apesar do metanol ser dotado de uma capacidade que lhe permite a extração de compostos sensíveis a hidrólise, apresenta algumas desvantagens. Entre as principais, destacam-se a sua baixa e incompleta capacidade de recuperação de compostos, aliada a uma baixa pureza do extrato metanólico (Cooper, 2011). Compostos presentes em elevadas concentrações nos extratos metanólicos podem ser diretamente injetados em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), permitindo deste modo a confirmação do resultado analítico (Pragst e Balikova, 2006).

Quanto à extração efetuada através de soluções tampão, a sua principal vantagem assenta na elevada capacidade de extração de compostos de natureza básica, sendo que os extratos aquosos obtidos apresentam menos impurezas quando comparados aos extratos metanólicos (Pragst e Balikova, 2006).

O isolamento de compostos através da desintegração da estrutura do cabelo pode ser efetuada por digestão enzimática ou por soluções aquosas de hidróxido de sódio (Pragst e Balikova, 2006). Relativamente à digestão enzimática, Moeller e seus colaboradores (*cit in* Nakahara, 1999) descreveram o tratamento enzimático de uma amostra de cabelo usando a beta-glucuronidase/arilsulfatase. Mais recentemente têm sido usadas enzimas como a pronase e proteínase K cujo mecanismo de atuação assenta na hidrólise das proteínas do cabelo. A atividade destas enzimas é aumentada na presença de ditiotreitol (Boumba *et al.*, 2006). Para além do ditiotreitol, também a sonicação favorece a digestão enzimática facilitando a extração de compostos (Bermejo *et al.*, 2004).

Se os compostos a serem extraídos forem dotados de uma boa estabilidade em meio alcalino, a extração destes através de soluções de hidróxido de sódio é a mais adequada. A morfina, anfetaminas e canabinóides são compostos cuja extração é favorecida por este método. A extração é, geralmente, realizada através da incubação das amostras numa solução de hidróxido de sódio de concentração entre os 0,1 e 2,5 M, a 37°C

durante o período noturno (Boumba *et al.*, 2006). Os estudos *in vitro* demonstraram que, em condições alcalinas, ocorre a hidrólise de algumas substâncias tais como a cocaína e heroína ou outros compostos contendo grupos éster, pelo que este método deve ser preterido relativamente a outros que possibilitem também a libertação de compostos incorporados (Pragst e Balikova, 2006).

Tanto a digestão enzimática, como a alcalina apresentam tempos de extração diminutos quando comparados à extração usando metanol ácido. No entanto, as soluções resultantes são caracterizadas por uma elevada quantidade de interferentes, principalmente moléculas de baixo peso molecular, pelo que se torna necessário recorrer a lavagens adicionais para que se possa realizar a análise qualitativa e quantitativa dos xenobióticos (Miyaguchi *et al.*, 2007).

A extração através de fluidos supercríticos, apesar das vantagens relativas à rápida recuperação de compostos e elevado rendimento, não é das mais utilizadas devido ao seu custo elevado (Pragst e Balikova, 2006). Dada a pureza dos extratos obtidos, estes não necessitam de ser submetidos a procedimentos de limpeza, podendo ser confirmados diretamente através da técnica de GC-MS (Pragst e Balikova, 2006). A extração de compostos como as metanfetaminas usando fluidos supercríticos encontra-se descrita na literatura como sendo uma boa alternativa aos processos convencionais de extração (Allen e Oliver, 2000).

O tratamento da amostra com tioglicolato e ureia sob condições ácidas provoca a quebra das pontes de hidrogénio e pontes dissulfureto existentes no cabelo, contribuindo para a extração de compostos incorporados no cabelo (Pragst e Balikova, 2006). Este método é eficientemente aplicado quando os compostos que se pretendem extrair fazem parte do grupo das benzodiazepinas (Yegles *et al.*, 2000).

4.2. Teste de rastreio

Após a libertação dos compostos da matriz do cabelo, os extratos obtidos são submetidos a testes de triagem, principalmente quando não se conhece o xenobiótico a pesquisar, permitindo deste modo a distinção das várias classes de xenobióticos (Bulcão *et al.*, 2012).

A disponibilidade limitada para determinados compostos aliado à sua fraca especificidade, fizeram com que o método de RIA, outrora muito utilizado em testes de rastreio, fosse substituído por técnicas de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays*) (Pragst e Balikova, 2006). A automatização do método de ELISA permitiu a realização dos testes para uma grande quantidade de amostras e para variados xenobióticos, identificando e eliminando de forma rápida as amostras cujo resultado tenha sido negativo e que não sejam necessárias para análises posteriores (Cooper, 2011).

O uso deste método para a realização de testes de rastreio de forma rápida, deve ter em conta determinadas recomendações. Segundo a SoHT, o método adotado deve ser dotado de uma boa sensibilidade (da ordem das pg/mg de cabelo), capaz de detetar não só o composto pai mas também os seus metabolitos em baixas concentrações, permitindo desta forma obter um perfil de exposição do indivíduo ao xenobiótico e evitando falsos-positivos. Outra recomendação a ter em conta assenta na eliminação da interferência da matriz do cabelo nos testes de despiste, através da desnaturação dos anticorpos (Cooper *et al.*, 2012).

Vários kits têm sido comercializados tendo por base diferentes métodos. No entanto, a sua sensibilidade varia, devido ao fornecedor, técnica usada para identificação e anticorpos usados (Drummer, 2010). Ainda assim, ao longo do tempo, a metodologia analítica tem progredido no sentido de uma maior sensibilidade, permitindo a deteção de compostos em concentrações cada vez mais baixas. Testes de despiste como o *One-Step™* ELISA, comercializado pela *International Diagnostic Systems Corporation*, têm sido utilizados com sucesso na pesquisa de drogas de abuso tais como canabinóides,

anfetaminas, opiáceos e cocaína. Estes *kits*, para além de serem simples, rápidos (tempo inferior a duas horas para os quatro testes em simultâneo) e necessitarem de uma pequena quantidade de amostra, são também dotados de uma elevada sensibilidade da ordem das ng/mg de amostra, concentração esta mais baixa que os habituais testes de despiste (pg/mg) (Pujol *et al.*, 2007).

Quanto ao resultado do teste de despiste, se este for negativo para a presença de determinado composto, e se os procedimentos tiverem sido efetuados de forma correta, a amostra não necessita de ser submetida a técnicas de confirmação (Cooper, 2011).

Contudo, a aplicação exclusiva do método de ELISA em testes de despiste não permite a confirmação de um resultado positivo, pelo que devem ser adotados procedimentos mais específicos (Cooper *et al.*, 2012).

A grande variedade de xenobióticos existentes, a quantidade de amostra disponível e a complexidade da matriz do cabelo conduziram à introdução por parte de alguns laboratórios de técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massa *time of flight* (TOF) na realização de testes de rastreio (Cooper *et al.*, 2012). Um exemplo dessas técnicas é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com um analisador do tipo quadrupolo TOF (LC-QTOF-MS) para a realização deste tipo de testes, podendo ser utilizado como um método de rotina, dada a sua elevada sensibilidade e possibilidade de deteção qualitativa para uma grande variedade de substâncias tóxicas e drogas de abuso (Broecker *et al.*, 2012). O uso destes métodos, apesar de não serem facilmente exequíveis para um grande número de amostras, apresenta como principal vantagem a sua capacidade para detetar e identificar uma grande quantidade de analitos numa só análise, o que se torna vantajoso quando se pretende analisar volumes pequenos de amostra (Cooper *et al.*, 2012).

4.3. Limpeza de Extratos

Após a extração dos xenobióticos da matriz, os extratos resultantes, à exceção dos metanólicos e os resultantes de fluidos supercríticos, necessitam de ser separados dos interferentes (compostos endógenos ou outras substâncias administradas concomitantemente com os xenobióticos alvo) através de técnicas também usadas em amostras de sangue e urina, tais como extração líquido-líquido ou extração em fase sólida, para que possam ser confirmados os testes de rastreio e efetuada a análise qualitativa e quantitativa dos compostos presentes pelas técnicas de confirmação (Cooper, 2011).

A microextração em fase sólida (SPME ou *solid phase microextraction*) é o método mais usado na eliminação de interferentes e preparação da amostra para as técnicas de confirmação devido à sensibilidade e possibilidade de automatização (Moller *et al.*, 2010). A utilização desta técnica manifesta-se num elevado poder de concentração dos xenobióticos adequando-se de forma eficiente à sensibilidade dos detetores de cromatografia gasosa, podendo ser usada em amostras que contenham um baixo teor de xenobióticos e uma elevada quantidade de impurezas, o que permite integrar numa única etapa os procedimentos de extração, concentração e limpeza (Salquèbre *et al.*, 2012). Ao invés das técnicas tradicionais que necessitam de grandes quantidades de solventes, a microextração não necessita de qualquer tipo de solvente (Emídio *et al.*, 2010).

O dispositivo básico de SPME consiste numa fibra (que contém a fase extratora) capaz de adsorver os xenobióticos diretamente do extrato aquoso (DI-SPME - *direct immersion solid phase microextraction*) ou da fase de vapor sobre a solução de extração (HS-SPME - *headspace solid phase microextraction*) (Salquèbre *et al.*, 2012).

Na DI-SPME a extração ocorre até que o equilíbrio de partição do xenobiótico entre a solução extrativa e a fibra (fase extratora) seja atingido, sendo considerado um sistema de duas fases (Figura 6). O curto tempo de vida das fibras usadas constitui uma importante desvantagem no método de imersão direta (Pragst e Balikova, 2006).

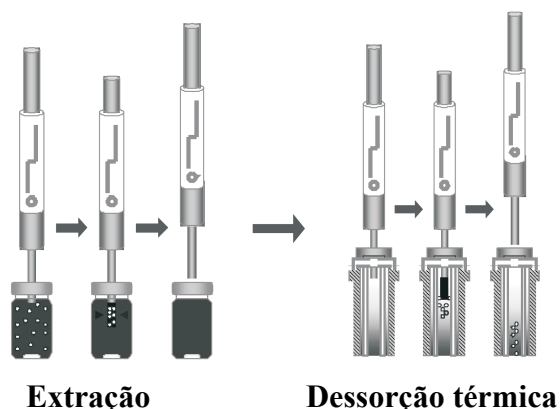


Figura 6. Etapas do processo de microextração em fase sólida (adaptado de Gallardo et al. 2009).

Na HS-SPME, efetuada a uma temperatura elevada, os xenobióticos voláteis e semi-voláteis são transportados para a fibra através da fase gasosa gerada pelo aquecimento da solução extrativa e por gotas de água de tamanho reduzido, até que seja estabelecido um equilíbrio entre a solução de extração, a fibra e a fase de vapor (Pragst e Balikova, 2006). Quando a técnica analítica utilizada é a cromatografia gasosa a fibra de sílica fundida é retirada da amostra e inserida diretamente no injetor do cromatógrafo gasoso, onde os xenobióticos são termicamente transferidos por ação do fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica para separação e quantificação (Valente e Augusto, 2000). Substâncias lipofílicas mesmo apresentando uma baixa volatilidade (antidepressivos tricíclicos, fenotiazidas, lidocaína, metadona e seus metabolitos) podem ser extraídos da fase de vapor acima da solução extrativa ou *headspace* (resultante da digestão com hidróxido de sódio, pois são estáveis em condições alcalinas) através desta técnica (Pragst e Balikova, 2006). Compostos que não sejam considerados voláteis, tais como os opióides, devem apenas ser utilizados pelo método acima proposto depois de derivatizadas através de reações de sililação, como o objetivo de alcançar a volatilidade necessária, sendo um dos requisitos essenciais para posterior quantificação por GC-MS (Moller *et al.*, 2010).

Em alguns casos, variações da técnica de HS-SPME tais como a extração dinâmica em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME) demonstraram eficácias de extração superiores à técnica base. Ao contrário das fibras de HS-SPME, as fibras utilizadas em HS-SPDE são muito difíceis de serem danificadas mecanicamente. Compostos como as

anfetaminas têm sido eficientemente extraídos segundo esta técnica (Musshoff *et al.*, 2003).

As técnicas acima descritas permitiram que as várias etapas de extração de compostos, pré-concentração e a limpeza dos extratos fossem efetuadas numa única etapa, possibilitando a eliminação de substâncias interferentes. A sua eliminação é um requisito importante na realização de técnicas cromatográficas, contribuindo para uma melhor sensibilidade e seletividade das técnicas analíticas (Bulcão *et al.*, 2012).

4.4. Técnicas de Confirmação

De acordo com as recomendações da SoHT numa análise ao cabelo, independentemente do método usado, os laboratórios devem garantir que as técnicas de confirmação empregues sejam dotadas de uma sensibilidade suficiente que permita a deteção de níveis baixos de xenobióticos no cabelo, refletindo o perfil de exposição ao mesmo. A determinação do xenobiótico deve, se possível, incidir no xenobiótico pai e nos seus metabolitos, auxiliando a distinção entre uma exposição decorrente de uma contaminação externa, ou de uma exposição por ingestão ou administração do xenobiótico (Cooper *et al.*, 2012).

Dentro das técnicas analíticas de confirmação, aquelas que se encontram acopladas a espectrómetros de massa são as que recebem maior destaque. Os espectrómetros de massa apresentam um interface para sistemas cromatográficos gasosos, líquidos e de eletroforese capilar, permitindo ao sistema acoplado a separação e identificação e quantificação de determinados componentes presentes em quantidades mínimas em misturas complexas (Skoog *et al.*, 2002).

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

Entre os métodos mais utilizados para a análise de xenobióticos no cabelo, a GC-MS é a que adquire maior notoriedade (Pragst e Balikova, 2006). A associação destas duas importantes técnicas é justificada pelas vantagens que daí advêm. A separação prévia

dos componentes da amostra através do sistema cromatográfico faz com que estes sejam analisados no espectrómetro de massa individualmente (excetuando os casos de co-eluições cromatográficas). Esta vantagem aliada à elevada rapidez de análise para amostras em baixas quantidades, faz com que esta técnica exiba um lugar de destaque na análise de xenobióticos no cabelo (O. Pombeiro, 1998). O acoplamento do cromatógrafo gasoso ao espectrómetro de massa pode ser efetuado de maneira relativamente mais simples que no caso do cromatógrafo líquido pois as características de funcionamento do cromatógrafo gasoso são compatíveis com a necessidade de uma velocidade reduzida da admissão do gás no espectrómetro de modo a manter um vácuo suficientemente elevado no seu interior (Skoog *et al.*, 2002).

Para a quantificação de um xenobiótico numa amostra é recomendado o uso de um padrão interno, que poderá ser deuterado. As características químicas de um padrão interno (PI) deuterado são similares às do xenobiótico que se pretende analisar. Por este motivo, o composto a analisar e o PI apresentam o mesmo tempo de retenção, podendo no entanto ser diferenciados com base nas massas dos fragmentos obtidos no analisador de massas. O sinal produzido pelo PI é comparado com o sinal do xenobiótico a analisar, o que permite quantificar o xenobiótico e avaliar a eficiência da análise (Chiaradia *et al.*, 2008).

A técnica de GC-MS inicia-se então com a introdução da amostra no injetor do cromatógrafo gasoso, onde as moléculas são volatilizadas e posteriormente separadas na fase estacionária da coluna cromatográfica. No interior desta ocorre uma separação de compostos por interação diferencial entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária (coluna). Os compostos devido às suas características químicas são separados na coluna cromatográfica de acordo com as suas polaridades e pontos de ebulição o que vai determinar os seus tempos de retenção. Após a separação dos compostos estes são transferidos para o analisador de massas onde primariamente sofrem ionização por uma das seguintes técnicas: ionização por impacto de eletrões (EI), ionização química (IC) e ionização por *electrospray* (De Grande e Aquino Neto, 1990).

Na EI, as moléculas são bombardeadas com elétrons de elevada energia, normalmente 70 eV. A energia é absorvida pelas moléculas e estas sofrem ionização, resultando na formação de iões moleculares que devido ao excesso de energia interna fragmentam total ou parcialmente. Tal como os tempos de retenção, os fragmentos resultantes (m/z – massa/carga) são característicos de cada composto, sendo por isso muitas vezes designados por *molecular fingerprint*, devido à sua elevada especificidade (Chiaradia *et al.*, 2008). O método de ionização através de elétrons de elevada energia é atualmente o método mais empregue na GC-MS devido à possibilidade de obtenção de uma informação mais detalhada sobre cada molécula, resultante da intensa fragmentação a que é sujeita. O limite de deteção para a maioria dos compostos é cerca de 0,03 ng/mg (Pragst e Balikova, 2006). A técnica de EI é marcada por algumas desvantagens, nomeadamente o seu uso limitado para moléculas termicamente instáveis, a sua fraca utilidade para compostos de elevado peso molecular, e o baixo grau de ionização das moléculas (apenas 1 em 10^6 moléculas são ionizadas) (Elias Paulo, s/d).

O processo de IC, ao contrário da IE, implica a presença de um gás-reagente em excesso. Esta técnica promove uma fragmentação leve ou quase ausente, resultando num espectro mais limpo, tornando esta técnica ideal quando se pretende obter apenas o ião molecular (correspondendo à massa molecular do composto). A ionização química pode ser de dois tipos: ionização química positiva (PCI) e ionização química negativa (NCI). Se as moléculas a serem analisadas apresentarem grupos funcionais que rapidamente aceitam um próton, o método empregue deve ser a PCI. Se as moléculas apresentarem grupos eletronegativos e ácidos na sua constituição (por exemplo, as benzodiazepinas) a NCI deve ser o método de escolha. As moléculas que são submetidas a ionização química, na sua maioria das vezes, originam iões positivos ao invés de negativos (Santos Baptista, 2005). Devido ao menor grau de fragmentação a técnica de CI é dotada de uma menor especificidade quando comparada à IE. No entanto a sua sensibilidade é mais elevada, resultando em limites de deteção entre os 0,2 e 15 pg/mg (Pragst e Balikova, 2006)

A ionização por *electrospray* (ESI) é caracterizada por uma fragmentação mais branda, cujos iões formados apresentam uma baixa energia interna o que permite por sua vez a

observação da espécie iónica com pouca ou nenhuma fragmentação (Manisali *et al.*, 2006).

Após a ionização das moléculas, os iões são separados pelo analisador de massas do espectrómetro de acordo com a relação massa/carga (m/z). Os analisadores de massa mais comumente usados nas análises de compostos incorporados no cabelo são: TOF, quadrupolo e *Ion trap* (Chiaradia *et al.*, 2008). Na técnica de GC-MS aplicada à análise de cabelo, o analisador de massas é ajustado para que sejam observados apenas os iões de razão m/z de interesse, fazendo apenas a monitorização dos iões selecionados (SIM – *selected ion monitoring*) (Pragst e Balikova, 2006).

Posteriormente os iões positivos ou negativos por ação de um detetor multiplicador de eletrões são convertidos em eletrões por um díodo de conversão, originando um sinal elétrico proporcional ao número de iões que incide sobre o detetor, indicando que o ião foi detetado. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados que gera os espectros de massa correspondentes. A divisão do cromatograma em diferentes períodos de tempo e usando diferentes massas na SIM permite a análise de um número alargado de xenobióticos numa única análise (Pragst e Balikova, 2006).

Tal como a maioria das técnicas analíticas, também a GC-MS apresenta alguns pré-requisitos. A técnica de GC-MS implica que o composto a analisar seja dotado de uma volatilidade satisfatória e que conserve a sua estabilidade a temperaturas elevadas. Xenobióticos contendo grupos amina livres, grupos hidroxilo ou grupos carboxilo não preenchem os requisitos para que possam ser analisados por este método, pelo que se torna necessário proceder a uma derivatização prévia destes compostos (Pragst e Balikova, 2006). Para a análise simultânea de xenobióticos que apresentem na sua constituição grupos que necessitam ser protegidos, podem ser utilizadas reações mistas de derivatização. Exemplo de reações de derivatização com compostos como o anidrido pentafluoropropiónico e pentafluoropropanol encontram-se descritas para a análise simultânea de canabinóides (Han *et al.*, 2011).

O aparecimento da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em modo *tandem* (GC-MS/MS) possibilitou um aumento de sensibilidade e especificidade da metodologia analítica, sendo hoje amplamente usada como técnica de confirmação na identificação e quantificação de xenobióticos (Pragst e Balikova, 2006). Na técnica de GC-MS/MS, as moléculas após a primeira separação pelo analisador de massas (cujo objetivo é isolar o íon de interesse) ficam sujeitas a uma fragmentação através de fenómenos de colisão provocados por um gás. Os fragmentos obtidos podem então ser separados num segundo separador de massas e detetados (Pragst e Balikova, 2006).

A utilização da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em modo *tandem* adquiriu um carácter importante na análise do cabelo, ao fornecer uma maior informação estrutural relacionada com o xenobiótico de interesse e assegurando a sua identificação com maior exatidão relativamente a outras técnicas cromatográficas, cuja identificação assenta nas características de retenção dos compostos analisados. Além disso, para compostos que não podem ser totalmente separados através de técnicas cromatográficas, o emprego da metodologia de GC-MS/MS permite a sua deteção individual caso apresentem diferentes massas molares, ou gerem diferentes espectros de massa. O emprego desta técnica em detrimento de outras permitiu a obtenção de baixos limites de deteção e quantificação, contribuindo para um resultado analítico mais fiável (Chiaradia *et al.*, 2008).

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

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa apresenta também um papel de destaque no que respeita à análise do cabelo. O emprego desta técnica permite fazer face às desvantagens da CG-MS, sendo que algumas dificuldades associadas ao método de CG-MS como a volatilidade dos analitos, estabilidade à temperatura elevada e problemas de derivatização, são facilmente ultrapassadas, resultando numa análise mais rápida e económica (Cruces-Blanco e García-Campaña, 2012). Em contraste, a sua resolução é significativamente menor quando comparada à cromatografia gasosa, pelo que a sua união a sistemas de massas em modo *tandem* deve ser efetuada (Pragst e

Balikova, 2006). Dado o seu custo excessivo, o uso de HPLC-MS encontra-se limitado a um pequeno número de amostras (Pragst e Balikova, 2006). Compostos termolábeis como as benzodiazepinas, cuja identificação e quantificação se encontravam comprometidas pela técnica de cromatografia gasosa, foram eficazmente separados utilizando esta metodologia analítica (Musshoff e Madea, 2007).

4.4.3. Eletroforese Capilar (EC)

Para além das técnicas cromatográficas, as técnicas de eletroforese capilar conquistaram o seu espaço na metodologia analítica para separação e identificação de xenobióticos no cabelo (de Lima e da Silva, 2007). A técnica de eletroforese capilar opera principalmente em dois modos: eletroforese capilar de zona (*CZE- capillary zone electrophoresis*) (Gottardo *et al.*, 2012) e cromatografia capilar eletrocinética micelar (*MEKC- micellar electrokinetic capillary chromatography*) (Gibson *et al.*, 2005), ambas descritas na análise de xenobióticos em amostras de cabelo. Um dos problemas associados à eletroforese capilar reside na sua moderada sensibilidade, no entanto este problema pode ser contornado submetendo a amostra a métodos de pré-concentração, diminuindo os limites de deteção e quantificação (Gottardo *et al.*, 2007).

Relativamente ao tipo de detetores utilizados, o sistema de deteção ultravioleta (UV) é o mais empregue, apresentando como alternativa a deteção por fluorescência e por espectrometria de massa (Cruces-Blanco e García-Campana, 2012). O uso de sistemas de deteção por espectrometria de massa acoplados a técnicas de eletroforese capilar combina as vantagens da eletroforese capilar (eficiência, uso de pequenas quantidades de amostra, rapidez, facilidade de execução) com as vantagens da espectrometria de massa (elevada sensibilidade e seletividade), resultando num método de elevada sensibilidade, cujo preço é bastante dispendioso (Gottardo *et al.*, 2007).

4.5. Valores de *cut-off*

Os valores *cut-off*, termo usado comumente pela comunidade científica, são:“ (...) valores numéricos determinados no processo de validação dos métodos analíticos ou

sugeridos por sociedades científicas aos quais são comparados os resultados analíticos e que orientam as conclusões para a interpretação final dos resultados. Quando os resultados da análise se encontram abaixo dos valores estabelecidos como sendo os de *cut-off*, os mesmos são considerados como “Não detetados” ou “Negativos”, sendo que valores acima são considerados “Detetados” ou “Positivos”. ” (Tsanacelis *et al.*, 2011).

Apesar de atualmente os valores de *cut-off* na análise do cabelo ainda não estarem estabelecidos, a SoHT, tendo por base a literatura disponível referente às concentrações de xenobióticos encontradas no cabelo, recomenda determinados valores para os xenobióticos mais comumente encontrados no cabelo, permitindo por sua vez a identificação do seu uso crónico (Cooper *et al.*, 2012).

Tabela 1. Valores de cut-off propostos pela SoHT (adaptado de Cooper 2011, SoHT).

Grupo	Xenobióticos e metabolitos	Cut-off (ng/mg)
Anfetaminas	Anfetamina	0,2
	Metanfetamina	0,2
Canabinóides	MDA	0,2
	MDMA	0,2
	THC	0,5
	THC-COOH	0,0002
	Cocaína	0,5
Cocaína	BZE, EME, CE, NC	0,05
	Morfina	0,2
Opióides	Codeína	0,2
	6-acetilmorfina	0,2
	Heroína	0,2
Metadona	Metadona	0,2
	EDDP	0,05
Buprenorfina	Buprenorfina	0,01
	Norbuprenorfina	0,01
Etanol	Etil glucuronido	0,03
	FAEEs	0,5
Benzodiazepinas	Diazepam	0,05
	Lorazepam	0,05
	Nordiazepam	0,05
	Oxazepam	0,05

BZE: Benzoilecgonina; CE: Cocaetileno; EDDP: 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolideno; EME: Éster metílico de ecgonina; FAEE's: Ésteres etílicos de ácidos gordos; MDA: Metildioxianfetamina; MDMA: Metilendioximetanfetamina; NC: Norcocaína; THC: Delta 9 – tetrahydrocannabinol; THC-COOH: Ácido-11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol

De um modo geral, após exposição única a um determinado xenobiótico o indivíduo irá apresentar concentrações na ordem das pg/mg desse mesmo composto no cabelo, pelo que em casos de crimes facilitados por drogas ou casos resultantes de uma única

exposição devem ser considerados valores de *cut-off* mais baixos e a sensibilidade dos métodos analíticos verificada (Cooper *et al.*, 2012).

4.6. Controle de qualidade da metodologia analítica

Um dos princípios fundamentais dos laboratórios responsáveis pelas análises de cabelo é a implementação de sistemas de qualidade que assegurem a eficácia e precisão do resultado analítico. Muitas vezes, questões relacionadas com o método analítico utilizado e a fiabilidade do resultado analítico são questionadas em interrogatórios pelo tribunal, ou por indivíduos que submeteram as suas amostras para análise (Cooper *et al.*, 2008). Deste modo, encontram-se disponíveis procedimentos internacionais estandardizados que aferem a qualidade dos resultados (ISO/IEC 17025), fornecendo aos laboratórios importantes diretrizes. Estas diretrizes incluem certos requisitos que permitem aos laboratórios aprimorar a prática da análise, possibilitando, assim, a validação da metodologia analítica empregue através da atribuição de competências técnicas com consequente publicação de resultados analíticos válidos (Cooper *et al.*, 2012). Dentro dos procedimentos de validação estandardizados estão incluídos os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão, limites analíticos (limite de deteção e limite de quantificação) e estabilidade. Laboratórios que pretendam publicar estudos em revistas científicas devem submeter o método analítico utilizando os parâmetros de validação estandardizados (Musshoff e Madea, 2007).

A acreditação da metodologia pela norma ISO/IEC 17025 para análise de xenobióticos na matriz cabelo representa um desafio para os laboratórios responsáveis pela análise, dada a escassez de material de referência certificado, diretrizes limitadas e descrença por parte de algumas identidades relativamente à eficácia dessas análises. Num estudo conduzido pela SoHT em 2008, representando de forma significativa os laboratórios existentes na Europa (90% dos laboratórios incluídos no estudo), foi possível verificar que 83% dos laboratórios têm conhecimento das diretrizes existentes e tencionam implementar a acreditação. No entanto, apenas 9 de 52 laboratórios se encontravam acreditados, resultado pouco surpreendente visto que por ano um laboratório analisa em média menos de 500 amostras de cabelo, representando uma pequena fração quando comparada a outras análises toxicológicas forenses. Outra contrariedade é o elevado

compromisso financeiro por parte dos laboratórios que se comprometem para a acreditação. Apesar destes obstáculos, e segundo a *SoHT Proficiency Testing Program*, os resultados qualitativos e quantitativos têm progredido (Cooper *et al.*, 2008).

De modo a contornar essa desconfiança e melhorar a prática na análise, a SoHT publicou, além das recomendações que devem ser tidas em conta para a boa prática da análise, vários programas anuais que avaliam a competência das várias metodologias empregues por diferentes laboratórios, de modo a que os resultados obtidos sejam comparáveis, ou que pelo menos sejam detetados os mesmos compostos (Jurado e Sachs, 2003). Estes programas adquirem uma grande importância, pois possibilitam aos laboratórios avaliar a performance relativamente a outros, no que à análise do cabelo diz respeito. Para além da SoHT, também a *HAIRVEQ* e a *German Society of Toxicological and Forensic Chemistry* (GTFCh) atuam sobre os mesmos pressupostos. Qualquer que seja a entidade responsável na realização deste tipo de programas, as amostras de cabelo utilizadas como controlos positivos provêm de consumidores conhecidos, sendo portanto amostras autênticas (Cooper *et al.*, 2012). O uso deste tipo de amostras permite avaliar a eficácia dos procedimentos de extração adotados. Estas amostras são separadas de acordo com o seu conteúdo em xenobióticos (por exemplo, divisão das amostras em opiáceos e cocaína), seguindo-se uma homogeneização por laboratórios de referência, e em seguida os laboratórios participantes, conforme a sua metodologia analítica, procedem a análise das amostras (Sachs, 1997).

Relativamente ao controlo de qualidade interno, este é independente de entidades externas e engloba as atividades que ocorrem no interior dos laboratórios. A sua função consiste na monitorização de todas as etapas analíticas e na deteção de alterações da performance durante as análises rotineiras, tendo como comparação a performance obtida pelo aparelho corretamente calibrado e ajustado. Para que esta comparação seja exequível tanto as amostras como os controlos devem sofrer o mesmo tipo de tratamento (Ferrara *et al.*, 1998).

A elaboração de controlos negativos é de fácil execução. No que concerne à realização de controlos positivos, a sua preparação é mais complexa. Idealmente, o controlo positivo deve ter a sua origem nos próprios consumidores, o que nem sempre é possível.

As alternativas incluem amostras de cabelo embebidas em soluções aquosas de xenobióticos seguidas de uma lavagem minuciosa (Pragst e Balikova, 2006).

Como os controlos de qualidade internos apenas são capazes de detetar erros relacionados com fatores variáveis, ao controlo interno devem ser associados programas inter-laboratoriais no sentido de uma maior credibilidade e uniformidade dos resultados analíticos obtidos em análises de cabelo (Ferrara *et al.*, 1998).

V. Áreas de aplicação das análises ao cabelo e interpretação dos resultados

As circunstâncias em que são solicitadas análises de drogas ou outros xenobióticos em matriz cabelo são diversas e dependem do quadro legal vigente em cada país. A aplicabilidade é decorrente da possibilidade em se obter um registo das exposições repetidas ou crónicas, tornando possível o estabelecimento do perfil de consumo de um indivíduo a longo termo e a sua evolução. Referem-se, de seguida, as situações em que as análises ao cabelo foram mais frequentemente aplicadas.

5.1. Crimes facilitados por drogas

Xenobióticos que sejam rapidamente absorvidos, inodoros, solúveis em álcool, e cujos efeitos se manifestem em sedação e perda de memória são os que se encontram mais comumente associados a casos de violação, rapto ou violação de menores, sendo que a violação é a que adquire maior notoriedade (Scott, 2009).

À exceção do álcool e dos canabinóides, as benzodiazepinas e os hipnóticos são os xenobióticos mais utilizados em crimes sexuais. A ação sedativa destas substâncias é responsável pela alteração das capacidades cognitivas e de memória do indivíduo, resultando na documentação tardia do crime. Dado que a maioria dos compostos é eliminada no sangue e urina 72 horas após a administração, o uso de amostras de cabelo adquire um papel fundamental na pesquisa destes compostos, dada a capacidade em identificar os xenobióticos nesta amostra meses após a sua administração (Cooper, 2011).

Para crimes que sejam reportados tardiamente, entre cinco dias a um mês, é recomendada a colheita de amostras de cabelo um mês após ter ocorrido o alegado crime, permitindo deste modo que o xenobiótico incorporado apareça no primeiro centímetro medido desde a base da haste do cabelo. Quando o crime é reportado um mês após a alegada ofensa, as amostras de cabelo devem ser recolhidas o mais rapidamente possível (Scott, 2009).

5.1.1. Benzodiazepinas

A presença de alprazolam (Xanax®), fármaco com atividade ansiolítica, tem sido associada a crimes de violação (Kintz *et al.*, 2005a).

Caso Clínico 1: Uma rapariga de 16 anos foi sequestrada e levada para um quarto num apartamento onde foi agredida e obrigada a prostituir-se. Foi-lhe administrado várias vezes ao jantar um xenobiótico que lhe provocava sedação, sonolência e perda de memória. Um dia conseguiu fugir e reportou o crime às autoridades policiais. Foram recolhidas amostras de cabelo que foram depois analisadas pelo laboratório segundo o princípio de análise segmentar (Kintz *et al.*, 2005a).

Resultado: A análise ao cabelo revelou a presença de alprazolam nos 4 segmentos proximais consecutivos (de um centímetro cada), com concentrações de 3,1, 0,8, 0,4 e 0,4 pg/mg, respetivamente (Kintz *et al.*, 2005a). Desta forma, foi possível confirmar a administração desta substância, o que seria impossível recorrendo às matrizes biológicas habituais.

Na literatura encontram-se descritas várias outras benzodiazepinas detetadas em amostras do cabelo de vítimas de crimes sexuais, entre as quais citam-se: flunitrazepam (Balikova, 2005, Chèze *et al.*, 2005, 2010); bromazepam (Chèze *et al.*, 2004 ; Villain *et al.*, 2004a); clonazepam (Chèze *et al.*, 2005, 2010); 7-aminoclonazepam (Xiang *et al.*, 2011) e lorazepam (Chèze *et al.*, 2010).

5.1.2. Hipnóticos

Para além das benzodiazepinas, também os fármacos da nova geração como o zolpidem (Stilnox®), utilizados terapêuticamente no tratamento da insónia, têm sido utilizados em crimes de violação (Chèze *et al.*, 2010 ; Kim *et al.*, 2011) devido à rapidez com que exercem os seus efeitos hipnóticos, amnésicos, causando também distúrbios visuais e alucinações (Villain *et al.*, 2004c).

Caso Clínico 2: Uma rapariga de 21 anos foi hospitalizada devido a problemas gástricos. Numa das noites, um enfermeiro ofereceu-lhe um café que a deixou inconsciente. Após recuperação, e mesmo tendo noção que havia sido violada, não reportou de imediato o crime às autoridades policiais, fazendo-o apenas seis dias após a violação. Nessa altura, as amostras de urina e sangue já não eram apropriadas, pelo que foram colhidas amostras de cabelo 15 dias após o alegado crime, tendo sido efetuada uma análise segmentar (Villain *et al.*, 2004c).

Resultado: Os primeiros dois centímetros deram resultado positivo para o zolpidem numa concentração de 4,4 pg/mg, enquanto os segmentos seguintes deram resultado negativo, evidenciando que no período anterior à violação o xenobiótico não se encontrava no organismo (Villain *et al.*, 2004c).

Outras substâncias hipnóticas tais como a zopiclona (Villain *et al.*, 2004b ; Chèze *et al.*, 2010), e a N-desmetil-zopiclona (Irving e Dickson, 2007) foram igualmente identificadas em amostras de cabelo de vítimas de crimes facilitados por drogas.

5.1.3. Gama-hidroxitirato (GHB)

O GHB, também conhecido por “droga da violação”, é bastante utilizado em crimes sexuais. O GHB é produzido endogenamente pelo organismo, o que por si só não permite afirmar que a exposição a esta substância tenha ocorrido fruto de administração exógena. Diferentes doses de GHB induzem efeitos distintos. O GHB provoca amnésia na dose de 10 mg/kg, entre 20 e 30 mg/kg induz o sono, e em doses superiores a 50 mg/kg provoca anestesia. Quando administrado exogenamente é rapidamente eliminado do organismo, tornando a sua identificação em amostras de sangue e urina pouco provável, dado que doses superiores a 60 mg/kg são eliminadas em menos de seis horas no sangue, e entre 10 a 12 horas na urina (Kintz *et al.*, 2003).

A colheita de amostras de cabelo três a quatro semanas após o crime revela-se uma alternativa fiável para a identificação deste composto, visto que um aumento na concentração de GHB consistente com a altura em que se supõe que tenha ocorrido a

administração permite a diferenciação de concentrações endógenas e exógenas (Kintz *et al.*, 2004).

Caso Clínico 3: Uma rapariga de 19 anos alegou ter sido vítima de violação após ter ingerido uma bebida que continha GHB. A rapariga alegou também que não tinha qualquer recordação do sucedido e apenas reportou o crime cinco dias após a violação. O laboratório recomendou que fossem recolhidas amostras de cabelo, tendo sido, no entanto, necessário esperar cerca de um mês, de modo a que o cabelo fosse dotado do comprimento necessário para analisar corretamente o intervalo em que supostamente teria ocorrido a violação. Procedeu-se à análise segmentar do cabelo (Kintz *et al.*, 2003).

Resultado: Como o xenobiótico já não era passível de ser identificado em amostras de sangue ou urina, após o crescimento do cabelo durante um mês, foi possível detetar a presença do composto no segmento de cabelo correspondente à altura em que ocorreu o crime, na concentração de 2,4 ng/mg. Dado que os outros segmentos apresentavam concentrações consideradas correspondentes a níveis endógenos, entre as 0,6 a 0,8 ng/mg, foi possível confirmar a administração exógena de GHB (Kintz *et al.*, 2003).

Outra aplicação forense possível baseia-se na distinção entre o GHB e a gama-butirolactona (GBL) e o 1,4-butanodiol (1,4-BD). Tanto a GBL como o 1,4-BD são rapidamente metabolizados a GHB, sendo excretados intactos em baixa extensão na urina (Kintz *et al.*, 2003). Do ponto de vista forense é importante identificar o tipo de xenobiótico que foi administrado, sendo que a sua distinção em amostras de urina torna-se impossível visto os metabolitos serem comuns. Nestas circunstâncias, as amostras de cabelo, para além de serem capazes de confirmar a exposição, são capazes de identificar a natureza do xenobiótico pai, uma vez que este é o composto incorporado em maior extensão no cabelo (Kintz, 2010).

Na literatura encontram-se descritos vários outros casos de violação em que a análise ao cabelo revelou a presença de GHB (Kintz *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2009; Scott, 2009; Gouille *et al.*, 2003).

5.1.4. Outras drogas

Relativamente ao grupo dos opiáceos encontrados em crimes de violação, a morfina adquire alguma notoriedade devido às suas propriedades analgésicas (Rossi *et al.*, 2009). Para além deste grupo também a buprenorfina (Kintz, 2004), pentobarbital e tiopental (Frison *et al.*, 2003), glibenclamida, clozapina, escopolamina, codeína, difenidramina e promazina encontram-se documentados em crimes facilitados por drogas (Kintz, 2007).

5.2. Controlo de doping

Apesar das análises de controlo antidoping serem efetuadas preferencialmente em amostras de urina, quando efetuadas conjuntamente em amostras de cabelo, torna-se possível obter informação complementar relativa aos períodos que antecederam o momento da análise (semanas a meses). Esta informação permite não só averiguar se foram administrados xenobióticos nas semanas ou meses que antecederam a análise antidoping mas também se essa exposição terá ocorrido através de uma administração única ou crónica (Kintz, 1998).

Para além dos fatores acima referidos, a presença de numerosos resultados falsos negativos em análises de urina torna a análise do cabelo uma peça chave. O recurso a esta matriz permite a deteção de xenobióticos administrados durante o período de treino e no período de abstinência, ultrapassando os problemas relacionados com a diminuição da concentração dos xenobióticos em consequência de uma elevada ingestão de líquidos (Kintz, 1998).

5.2.1. Esteroides anabolizantes

O uso de esteroides anabolizantes encontra-se predominantemente associada a atletas de alta competição como forma de aumentar a sua performance. Estes compostos são derivados da testosterona, aumentando deste modo não só o tecido muscular mas também os níveis proteicos a nível genital, ósseo e dérmico, acelerando o processo de

recuperação muscular. De modo a evitar o consumo destes esteroides anabolizantes endógenos (testosterona e desidroepiandrosterona (DHEA)) e exógenos (nandrolona, estanozolol) por parte dos atletas, foram criadas a *World Anti-Doping Agency* (WADA) a nível internacional e o Conselho Nacional de Antidopagem a nível nacional (Van Eenoo e Delbeke, 2006). Fazem parte dos esteroides anabolizantes:

a) Esteroides sintéticos

Caso Clínico 4: Um atleta apresentou resultados positivos para os metabolitos da nandrolona (norandrosterona e noreticolanolona) em amostras de urina. A sua carta de atleta foi retirada, mesmo depois deste ter alegado que nunca tinha usado nandrolona. Várias foram as explicações propostas como forma de provar a presença dos metabolitos na urina, tais como contaminação de comida que envolvesse chocolate ou até mesmo secreção endógena. Para os esteroides anabolizantes exercerem os seus efeitos de forma eficiente seria necessário que estes tivessem sido administrados de forma crónica. Como tal, o atleta requereu uma análise ao cabelo para que deste modo fosse provada a sua inocência (Kintz, 1998).

Resultado: Usando limites de deteção da ordem de 1 pg/mg e um limite de quantificação de 10 pg/mg, as amostras de cabelo apresentaram resultados negativos, provando deste modo que a administração não tinha sido efetuada de forma crónica, pelo que os esteroides não poderiam ter sido usados para benefício desportivo (Kintz, 1998).

Tal como no caso do GHB, a nandrolona e outros 19-noresteroides quando metabolizados originam os mesmos metabolitos. Recorrendo à análise de amostras de cabelo torna-se possível a identificação do xenobiótico pai (maior concentração no cabelo) (Kintz, 2010). Para além da nandrolona e seus metabolitos, outros esteroides anabolizantes de origem exógena têm sido identificados no cabelo, tais como o estanozolol (Kintz *et al.*, 1999; Kintz, 2004).

b) Esteroides endógenos

Dentro dos principais xenobióticos encontrados em análises antidoping, a testosterona continua a ser um dos preferidos por parte dos desportistas. A administração da testosterona ocorre sobre a forma de ésteres de testosterona. Com base na sua estrutura química, estes compostos são passíveis de serem identificados em amostras de cabelo dada a facilidade com que são incorporados em consequência do seu caráter lipófilo, permitindo deste modo a sua distinção da testosterona produzida endogenamente (Thieme *et al.*, 2000).

Esteroides similares à testosterona, tais como os seus precursores e metabolitos, podem ser identificados em amostras no cabelo. No entanto, é necessário ter em conta diversos fatores capazes de influenciar a análise o que tornam a interpretação dos resultados bastante complexa. Exemplo disso é a incorporação de testosterona endógena como forma de controlar as diversas fases relativas ao ciclo do cabelo (anágena e telógena) (Thieme *et al.*, 2000).

5.2.2. Corticosteroides

Derivados sintéticos da cortisona e da hidrocortisona têm sido usados pelos desportistas como forma de aumentar a performance, criando euforia e estimulando a atividade motora. A análise de amostras de cabelo contendo corticosteroides revela-se útil quando se pretende averiguar se o corticosteroide foi administrado de forma terapêutica, ou de forma crónica com o objetivo de atingir melhores performances desportivas. Em 2000, Bévalot e seus colaboradores efetuaram análises em amostras de cabelo de 19 atletas tendo sido detetada a presença de hidrocortisona (0,43 ng/mg), metilprednisolona (1,35 ng/mg), acetónico de triancinolona (0,28 ng/mg) e dexametasona (1,31 ng/mg) (Bevalot *et al.*, 2000c). Estudos envolvendo o uso crónico de prednisolona também se encontram associados a práticas de doping (Cirimele *et al.*, 2000).

5.2.3. Beta-Adrenérgicos

Os beta-adrenérgicos encontram-se banidos da prática desportiva não só devido às suas propriedades simpaticomiméticas, nomeadamente os seus efeitos estimulantes, mas também devido à sua atividade anabólica quando usados em elevadas concentrações. Dentro do grupo dos beta-adrenérgicos encontram-se os beta-bloqueadores que suportam a coordenação psicomotora e os beta-agonistas como o salbutamol responsável pelo aumento da atividade respiratória ou o clenbuterol capaz de incrementar a massa muscular. Contudo, o uso de salbutamol como broncodilatador, na terapêutica de indivíduos com asma, deve ser declarado antes da competição (Villain *et al.*, 2004d).

Segundo Ventura e colaboradores (*cit in Dumestre-Toulet et al.*, 2000), a análise de beta-adrenérgicos deve ser efetuada principalmente nas modalidades de tiro ao arco, mergulho, natação sincronizada e tiro. Apesar da literatura referente à pesquisa de beta-adrenérgicos em amostras de cabelo ser relativamente escassa, Gleixner e colaboradores detetaram a presença de clenbuterol em indivíduos praticantes de culturismo (Gleixner *et al.*, 1996). Também Kintz relatou um caso de uma nadadora de 24 anos que, após ter negado um resultado positivo de salbutamol na urina, apresentou uma concentração de 71 pg/mg na análise do cabelo. A análise evidenciou também a administração crónica do fármaco (Kintz *et al.*, 2000).

5.3. Toxicologia post mortem

Numa análise toxicológica post mortem é necessário ter em atenção os inúmeros processos que ocorrem no cadáver capazes de influenciar o resultado toxicológico. Um dos fenómenos que mais afeta a análise é a redistribuição post mortem. Este fenómeno traduz-se na alteração da concentração de xenobióticos presentes no sangue em consequência da difusão dos mesmos a partir de compartimentos vizinhos, nomeadamente tecidos e órgãos. As anfetaminas sintéticas, a metadona e outros opióides potentes vêm deste modo a sua concentração aumentada no sangue post mortem (Skopp, 2004).

Contudo este não é o único fator capaz de influenciar a concentração sanguínea dos xenobióticos post mortem. No caso de cadáveres não frescos, estes apresentam putrefação avançada. O metabolismo associado a estes estados, poderá originar a degradação de compostos lábeis, fazendo com que a sua presença nem sempre seja detetada nas matrizes mais comuns. Dentro dos xenobióticos cujas concentrações diminuem em ambiente post mortem destacam-se as benzodiazepinas (nitrazepam, flunitrazepam), glucoronidos da morfina, aspirina, heroína e cocaína. Também a produção endógena de compostos, tais como o etanol e cianeto, nos momentos que sucedem à morte está associada a flutuações de concentrações em consequência da atividade bacteriana existente nos corpos em decomposição. Devido às flutuações verificadas nas concentrações dos xenobióticos em ambiente post mortem e nas matrizes mais comuns, é preferível optar por matrizes que possuam tempos de retenção mais elevados como é o caso de amostras de cabelo (Drummer, 2004).

Caso Clínico 5: Um cadáver foi encontrado na floresta em estado avançado de decomposição, apresentando como material orgânico remanescente o cabelo, ossos e tecidos putrefatos. Não foi possível identificar o cadáver nestas condições.

Resultado: As análises realizadas a amostras de cabelo revelaram a presença simultânea de clorpromazina (3,2 ng/mg), fluoxetina (1,4 ng/mg), carbamazepina (12,6 ng/mg) e lorazepam (124 pg/mg). As concentrações encontradas correspondiam a um doente em tratamento psiquiátrico que tinha desaparecido de um hospital há 14 semanas. A identificação final foi obtida através de análise do ADN. A análise do cabelo revelou-se deste modo uma ótima ferramenta na identificação da classe dos xenobióticos (antipsicóticos) o que facilitou a investigação da identidade do indivíduo (Kintz, 2004).

A análise de xenobióticos nesta matriz para além de ser útil em casos de cadáveres apresentando elevada putrefação, proporciona também uma análise retrospectiva que permite averiguar a presença ou ausência dos xenobióticos nos momentos que antecederam a morte em situações cuja historial clínico do indivíduo é desconhecido e de difícil obtenção (Balikova, 2005). Quando se procede a este tipo de análise retrospectiva torna-se possível distinguir o tipo de exposição (única ou crónica) a que o

indivíduo foi sujeito. A título de exemplo, a distinção entre um consumo único ou frequente adquire especial importância quando se pretende interpretar os níveis de metadona ou outros opióides encontrados no sangue (Balikova, 2005). Um resultado no sangue periférico de 800 ng/ml de metadona não poderá ser interpretado sem recorrer a uma análise de cabelo. De facto, se o indivíduo for um consumidor crónico a concentração obtida poderá ser no máximo considerada ligeiramente tóxica. No entanto, caso esta não seja consumida de forma crónica, este valor poderá ser potencialmente tóxico. Apenas uma análise ao cabelo poderá distinguir entre uma exposição ocasional ou crónica (Kintz, 2004).

Caso Clínico 6: Um indivíduo de 39 anos foi encontrado morto em casa. Nas análises realizadas ao sangue foi detetado aldicarb (pesticida do grupo dos carbamatos) numa concentração de 4,81 mg/L, evidenciando uma intoxicação fatal. Dado os numerosos ferimentos apresentados pela vítima anteriores à sua morte o juiz requereu uma análise ao cabelo (Kintz, 2004).

Resultado: As análises ao cabelo revelaram uma concentração de aldicarb de 90 pg/mg e evidenciaram exposições repetidas. A mulher da vítima foi acusada de homicídio não tendo contestado o resultado (Kintz, 2004).

Para além dos xenobióticos acima citados também a oxcarbazepina (Kłys *et al.*, 2005a), álcool associado à clomipramina (Kłys *et al.*, 2005b), amitriptilina e seus metabolitos (Gaillard *et al.*, 2011), metanfetamina (Ago *et al.*, 2009 ; Beránková *et al.*, 2005 ; Nakahara *et al.*, 1997 ; Saito *et al.*, 2000), nordiazepam (Kintz, 2004), midazolam (Cirimele *et al.*, 2002), entre outros, foram detetados em análises de cabelo post mortem.

5.4. Determinação da exposição a xenobióticos durante a gestação

A identificação de recém-nascidos expostos a xenobióticos durante a gravidez pode ser efetuada pelos seguintes métodos: a) o reconhecimento por parte da mãe da administração de certas substâncias ao longo da gravidez, b) amostras de urina de origem materna ou c) análise do líquido amniótico, urina ou mecónio do recém-nascido.

Independentemente dos métodos usados são vários os problemas associados, entre os quais se destacam: (i) A informação proveniente da mãe não ser fidedigna; (ii) A obtenção de resultados falsos-negativos provenientes de amostras de urina de origem materna fruto do baixo tempo de permanência dos xenobióticos no organismo; (iii) Resultados positivos em amostras de urina de origem materna não evidenciarem uma exposição crónica, uma vez que estes apenas refletem a exposição no máximo nos três dias que antecederam a colheita; (iv) As amostras do recém-nascido poderem ocasionar resultados falsos negativos decorrentes de uma abstinência materna nos três dias anteriores à colheita (Villain *et al.*, 2004d)

Como alternativa às matrizes acima referidas, tanto as amostras de cabelo do recém-nascido como as da mãe permitem aumentar a janela de deteção possibilitando desta forma a recolha de informação relativamente ao(s) xenobiótico(s) utilizado(s) durante a gravidez e consequente avaliação das repercussões no neonato (Villain *et al.*, 2004d).

5.4.1. Opióides

Dentre os problemas de saúde observados em neonatos expostos a xenobióticos durante o período de gestação, a síndrome de abstinência adquire especial relevância. Esta síndrome revela-se no recém-nascido após o seu nascimento fruto da exposição materna maioritariamente a opióides ou a depressores do Sistema Nervoso Central (SNC), como barbitúricos e benzodiazepinas, e cuja sintomatologia envolve hiperexcitabilidade do SNC, disfunção gastrointestinal, dificuldade respiratória e instabilidade autonómica (Vinner *et al.*, 2003). Apesar de existir tratamento envolvendo morfina e outros fármacos, a sintomatologia atípica demonstrada pelos neonatos dificulta a identificação da síndrome de abstinência sendo por vezes difícil assegurar os devidos tratamentos de modo a evitar complicações a curto e longo prazo (Vinner *et al.*, 2003).

5.4.2. Álcool

Os efeitos prejudiciais do álcool durante a gravidez encontram-se bem documentados. O consumo de álcool durante a gestação poderá estar na origem da Síndrome Alcoólica Fetal caracterizada por dismorfia craniofacial, atraso no crescimento do recém-nascido,

défices cognitivos e neurológicos. A identificação do consumo de álcool através da quantidade de etanol ou do seu metabolito acetaldeído não fornece informações precisas quanto à exposição fetal devido à sua rápida eliminação (Chan *et al.*, 2004). Em alternativa, o uso de biomarcadores como os ésteres etílicos de ácidos gordos (FAEE), metabolitos não-oxidativos resultantes da esterificação do etanol com ácidos gordos endógenos, foram propostos para a identificação de consumo agudo e crónico de álcool (Chan *et al.*, 2004). Tendo como base esta descoberta, os FAEE foram identificados no mecónio (Chan *et al.*, 2004). No entanto, esta matriz apenas se encontra disponível nos três dias seguintes ao nascimento, pelo que o uso de amostras de cabelo do neonato, dada a sua maior janela de deteção aliada ao facto dos FAEE serem altamente estáveis nesta matriz, permite a identificação da exposição alcoólica até 3 meses após o nascimento (Chan *et al.*, 2004). Até à data, a determinação de FAEE no cabelo é a melhor opção quando se pretende avaliar o consumo crónico de álcool durante a gravidez (Joya *et al.*, 2012).

Caso Clínico 7: Foram analisadas amostras de cabelo colhidas a uma mulher que admitiu o consumo de álcool durante a gravidez e igualmente amostras do seu bebé (Klein *et al.*, 2002).

Resultado: As amostras de cabelo da mãe e do filho demonstraram uma concentração de FAEE de 2,6 pmol/mg e 0,4 pmol/mg, respetivamente, corroborando deste modo o relato feito pela mãe (Klein *et al.*, 2002).

5.4.3. Tabaco

Tal como o álcool, o consumo de tabaco durante a gravidez é vulgarmente negado pelas mães devido a sentimento de culpa e embaraço. Fetos que tenham sido expostos aos constituintes do tabaco podem apresentar baixo peso à nascença, aumento do risco de parto prematuro, aborto espontâneo, entre outros (Chan *et al.*, 2004). Com o intuito de identificar a exposição do feto ao tabaco são utilizados como marcadores a nicotina e o seu principal metabolito, a cotinina, ambos dotados de baixos tempos de semivida em matrizes convencionais como o plasma e a urina (Pichini *et al.*, 1997a). Deste modo o uso de amostras de cabelo torna-se proveitoso não só devido à possibilidade de

realização de uma análise retrospectiva mas também devido à elevada estabilidade e taxa de incorporação da nicotina e da cotinina neste tipo de matriz (Pichini *et al.*, 1997b).

Caso Clínico 8: Com o intuito de avaliar o nível de exposição gestacional de neonatos à nicotina e cotinina foram analisadas amostras de cabelo de 182 mulheres ao longo da gravidez tendo em conta o número de cigarros consumidos por estas principalmente nos últimos 3 meses de gestação (tabela 2) (Jacqz-Aigrain *et al.*, 2002).

Resultado:

Tabela 2. Concentrações de nicotina e cotinina presentes em amostras de cabelo (adaptado de Jacqz-Aigrain *et al.*, 2002).

Consumo de cigarros por dia	Nicotina (ng/mg de cabelo*)		Cotinina (ng/mg de cabelo*)	
	Mãe	Filho	Mãe	Filho
0 (9 casos)	13,6 ± 10,8	4,75 ± 6,69	0,64 ± 0,48	0,62 ± 0,35
1-5 (44 casos)	28,2 ± 28,8	5,81 ± 6,62	1,76 ± 1,76	0,83 ± 0,59
6-10 (56 casos)	32,4 ± 22,8	6,37 ± 7,33	2,27 ± 3,20	1,24 ± 1,32
11-15 (38 casos)	26,0 ± 16,2	4,68 ± 4,27	1,95 ± 1,64	1,32 ± 0,90
≥ 16 (35 casos)	40,6 ± 22,3	4,32 ± 4,74	2,79 ± 2,08	1,61 ± 1,20

*Média ± desvio padrão

Durante o terceiro trimestre de gravidez as mulheres apresentaram concentrações médias de nicotina e cotinina na ordem dos $30,7 \pm 23,2$ e $2,1 \pm 2,3$ ng/mg, respectivamente. Os neonatos à nascença apresentavam uma média de concentrações de $5,4 \pm 6,1$ para a nicotina e $1,2 \pm 1,1$ ng/mg de cotinina. As concentrações encontradas em amostras de cabelo de origem materna apresentavam concentrações superiores de nicotina e cotinina relativamente a amostras de cabelo de neonatos, não sendo no entanto possível estabelecer uma forte correlação entre os níveis de nicotina encontradas no neonato e na respetiva mãe. Por sua vez as concentrações de cotinina presentes na mãe demonstraram uma significativa correlação com os níveis de cotinina encontrados no neonato (Jacqz-Aigrain *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos tornam evidente a relação entre o número de cigarros consumidos por dia durante a gravidez e os níveis de cotinina encontrados no cabelo, tornando a cotinina um marcador de exposição fetal ao consumo do tabaco. A cotinina ao atravessar a placenta acumula-se em compartimentos fetais nas primeiras sete semanas de gestação podendo deste modo contribuir para uma toxicidade crónica, caracterizada por danos na placenta e tecidos fetais no início da gravidez (Jacqz-Aigrain *et al.*, 2002).

5.4.4. Cetamina

A cetamina, droga psicadélica derivada da fenciclidina, é um poderoso anestésico dissociativo de ação rápida, e tem como principais efeitos o elevado estado de sedação que proporciona, efeitos analgésicos e amnésicos. Devido aos seus efeitos céleres, dissociativos e alucinogénios, tornou-se uma popular droga de abuso, principalmente entre os mais jovens, seja em eventos sociais ou mesmo em crimes facilitados por drogas (Favretto *et al.*, 2013).

Caso Clínico 9: O caso incide sobre um neonato cuja mãe é suspeita de ter abusado de cetamina durante a gravidez. Dentro das informações relativas à mãe destacam-se: (i) deu à luz na 38ª semana de gestação; (ii) não se submeteu a nenhum teste pré-natal até à 29ª semana de gestação; (iii) fumava cinco cigarros por dia; (iv) admitiu uso de cetamina, tendo, no entanto, alegado a cessação do consumo da mesma por volta da 8ª semana de gestação (Su *et al.*, 2010).

Relativamente ao neonato vários foram os parâmetros analisados após o seu nascimento, nomeadamente: (i) hipotonia aparente; (ii) baixo peso ao nascimento; e (iii) disfunção cerebral moderada.

Apesar das amostras de urina serem as mais utilizadas quando se pretende analisar o uso de cetamina, esta apresenta um tempo de semivida de duas a três horas, dificultando a sua deteção. Foram analisadas amostras de cabelo do neonato com 2 centímetros de comprimento (Su *et al.*, 2010).

Resultado: Apesar da mãe ter afirmado que o consumo de cetamina tinha cessado por volta da 8ª semana de gestação, os resultados evidenciaram a presença da mesma e do seu metabolito, a norcetamina, nas concentrações de 141 pg/mg e 63 pg/mg, respectivamente. Tendo em conta os resultados obtidos é possível concluir que a mãe terá tido contacto com a cetamina pelo menos nos dois últimos meses de gravidez (Su *et al.*, 2010).

5.5. Toxicodependentes em programas de substituição

A análise do cabelo de toxicodependentes inseridos em programas de reabilitação tem como objetivo verificar o consumo de xenobióticos pelos mesmos para além dos autorizados pelo programa (Pragst e Balikova, 2006). A grande janela de deteção fornecida pelo cabelo em relação às matrizes mais comuns, fazem desta matriz uma das mais solicitadas pelos toxicologistas quando se pretende avaliar o consumo substâncias por parte dos indivíduos presentes em programas de reabilitação (Charles *et al.*, 2003).

5.5.1. Programas de reabilitação de consumidores de heroína

Na Alemanha, os indivíduos participantes em programas de reabilitação de heroína recebem doses diárias de cloridrato de heroína por via intravenosa sob controle da equipa médica. Um dos principais problemas associados a estes programas reside no consumo de heroína ilícita para além da heroína administrada como parte do programa. A distinção entre ambas pode ser realizada com o auxílio da acetilcodeína, impureza sintética da heroína ilícita. A pesquisa da acetilcodeína, presente em 0,25 a 10% da heroína ilícita funciona então como marcador do consumo ilícito de heroína, uma vez que a heroína administrada em programas de reabilitação não apresenta este composto. Um estudo realizado em 46 indivíduos demonstrou a presença de acetilcodeína em amostras de cabelo de 43,5% dos indivíduos no mês que antecedeu a administração de heroína como parte do programa de reabilitação. Doze meses após o programa de reabilitação a acetilcodeína foi detetada em 10,9% dos indivíduos (Musshoff *et al.*, 2005).

5.6. Consumo de drogas no local de trabalho

As análises do consumo de drogas requeridas pelas empresas aos seus trabalhadores têm como objetivo promover a segurança pública e corporativa das empresas e diminuir as perdas de produtividade por parte dos seus trabalhadores. Apesar de nos últimos 40 anos a análise em amostras de urina ser a metodologia mais comumente utilizada com o intuito de avaliar o consumo de drogas em locais de trabalho, a análise em amostras de cabelo tem adquirido algum destaque desde o início de 1980. No entanto, o seu emprego é efetuado, preferencialmente, em situações que impliquem a contratação de trabalhadores ou na realização de testes aleatórios (Pragst e Balikova, 2006).

Caso Clínico 10: Uma anestesista de 50 anos era considerada suspeita de abuso de narcóticos. De modo a confirmar essa suspeição foram realizadas várias análises a amostras de urina. Dado os resultados obtidos em análises a amostras de urina serem negativos a equipa médica requereu que fossem efetuadas análises a amostras de cabelo. Realizou-se a colheita de uma amostra de cabelo de três centímetros (Kintz *et al.*, 2005b).

Resultado: Os anestesistas trabalham frequentemente isolados em ambientes stressantes, com elevado número de horas de trabalho, aliado a um treino intenso e árduo inerente a uma carreira competitiva podem ser responsáveis por dificuldades no trabalho e em casa. Este conjunto de fatores está muitas vezes na origem do consumo de anestésicos por parte destes profissionais nos locais de trabalho. As amostras de cabelo da anestesista revelaram a presença de fentanilo (analgésico opióide) na concentração de 644 pg/mg, sendo a maior concentração de fentanilo reportada até à data. A anestesista foi colocada na lista de dispensas do pessoal médico, tendo cometido suicídio três meses depois através da injeção simultânea de meperidina (analgésico opióide) e atracúrio (bloqueador neuromuscular) (Kintz *et al.*, 2005b).

5.7. Outras aplicações

As aplicações mais úteis e relevantes das análises ao cabelo foram discutidas acima, mas a literatura refere a sua aplicação em algumas outras áreas. A análise do cabelo

pode ser importante, por exemplo, para avaliar a responsabilidade penal e a toxicodependência. É um fato bem conhecido que a dependência de drogas pode ser uma circunstância atenuante para uma pessoa que cometeu um crime. Em alguns casos é, inclusive, alegado que o crime foi cometido sob influência de drogas. Nesses casos, a análise do cabelo pode fornecer informações extremamente úteis sobre o historial de toxicodependência do réu, ou mesmo relacionadas com a ocorrência em si, se as amostras de cabelo forem devidamente recolhidas. No entanto, esta aplicação não foi ainda muito explorada pela comunidade científica.

Outra aplicação da análise do cabelo é a avaliação de aptidão para obter ou renovar a carta de condução. Vários estudos, principalmente por investigadores italianos (Stramesi *et al.*, 2008 ; Ricossa *et al.*, 2000)), têm sido publicados sobre este assunto, e isto é, talvez, resultante do estipulado na Lei italiana que impede a emissão de cartas condução não só a viciados em drogas, mas também a ex-viciados que possam ter uma recaída. Na Alemanha, a análise do cabelo faz parte do exame da capacidade de condução, sendo analisada uma amostra de cabelo de 6 cm (segmento proximal) para cobrir um período de 12 meses (Pragst e Balikova, 2006).

O cabelo também provou a sua utilidade para a monitorização da abstinência alcoólica em motoristas suspeitos de consumo (Liniger *et al.*, 2010 ; Wurst *et al.*, 2003).

VI. Conclusões e perspectivas futuras

A escolha das matrizes biológicas que são submetidas para análise em toxicologia forense representa um desafio importante. Qualquer matriz que tenha tido contacto com o xenobiótico funciona como uma potencial amostra para análise toxicológica forense. No entanto, este tipo de análise é efetuada, principalmente, em matrizes que dispõem de literatura suficiente, para que os resultados obtidos possam ser corretamente interpretados de acordo com um método previamente validado (Dinis *et al.*, 2010). A par da literatura disponível, a escolha das amostras depende, inevitavelmente, da natureza do caso associado. De um modo geral, o uso de sangue como matriz biológica representa o requisito mínimo numa análise toxicológica. Além deste, também a urina demonstrou ser bastante útil na realização de testes de rastreio que reflitam o consumo de determinados xenobióticos em dois ou mais dias precedentes à colheita da amostra (Drummer, 2000). Contudo, quando se pretende acompanhar a evolução de certos xenobióticos num período de tempo mais longo será vantajoso o uso de matrizes que registem esse consumo (Mieczkowski, 1996).

O acréscimo de dados proporcionados pela análise de xenobióticos na matriz cabelo, comparativamente aos obtidos nas matrizes tradicionalmente usadas, tem estado na base da sua crescente utilização no âmbito da toxicologia. Para além do facto de que a sua colheita é praticamente não-invasiva para o indivíduo em estudo, o cabelo permite que os xenobióticos sejam detetados por um tempo muito mais longo (meses ou até mesmo anos, dependendo do comprimento do cabelo) do que quando usadas as amostras habituais de sangue e urina. Além disso, o historial de abuso de drogas para cada indivíduo pode ser obtido através da análise segmentar. É ainda importante salientar que o risco de adulteração da amostra ou substituição é fortemente reduzida, visto que não há qualquer razão válida para o indivíduo manipular a amostra após a sua recolha. Este é um problema real, normalmente associado à urina, e esta questão tem sido abordada em vários trabalhos. Além disso, este fato permite a obtenção de uma segunda amostra para análise no caso de reclamações ou suspeitas de rutura na cadeia de custódia, uma vez que, em princípio, ele vai refletir uma linha de tempo similar.

Hoje em dia, os procedimentos de espectrometria de massa constituem o padrão de ouro para a análise de drogas no cabelo, uma vez que permitem a identificação inequívoca das drogas, o que é obrigatório em toxicologia forense. Esta instrumentação permitiu a detecção de drogas em concentrações que eram impensáveis há apenas alguns anos, e os cientistas estão cada vez mais familiarizados com a tecnologia, como o MS/MS (acoplado a LC ou GC) ou TOF-MS. A sensibilidade desses instrumentos analíticos tornou possível a detecção de drogas e sua quantificação no cabelo após uma única exposição, o que é relevante na identificação de situações de crimes facilitados por drogas. Além disso, quanto mais sensível for a tecnologia empregue, menor será a quantidade de amostra necessária para a análise, e isso irá permitir que mais testes a serem realizadas sobre a mesma amostra recolhida (incluindo testes de confirmação).

Além da sua potencial aplicação em análises de drogas no local de trabalho e na avaliação da aptidão para a condução, a análise do cabelo também é usada para a detecção de exposição gestacional à droga, em casos de responsabilidade penal de viciados em drogas, controlo do doping nos atletas, diagnóstico de intoxicação crónica e em toxicologia post mortem.

Embora o número de laboratórios que oferecem análises de cabelo continue a aumentar e as amostras de cabelo sejam, rotineiramente, colhidas durante as investigações criminais (em mortes relacionadas com drogas, agressão sexual facilitada por droga, proteção à criança) e para a monitorização do abuso de drogas (em programas de reabilitação de toxicodependentes, testes de drogas no local de trabalho), as metodologias existentes não se encontram estandardizadas, resultando numa variação considerável da qualidade dos serviços oferecidos.

Os desafios frequentemente colocados na análise de prova pericial em cabelo são as metodologias inadequadas resultantes de uma extração ineficiente de xenobióticos a partir de cabelo, ou de uma fraca validação com limites de detecção do método inaceitáveis, mas mais comumente a interpretação dos resultados analíticos.

Um ponto que pode ser melhorado, e este é, talvez, uma área de investigação promissora no futuro previsível para as análises do cabelo, é o uso de novas abordagens

para a descontaminação da amostra, minimizando desta forma o risco de encontrar um resultado positivo sem consumo ativo de drogas por parte do indivíduo testado.

A SoHT reconhece a importância da implementação de padrões de qualidade para garantir o futuro das análises de cabelo e a sua aceitação nos tribunais e publicou uma série de guias de orientação relativas à análise de drogas e agentes de dopagem no cabelo (www.soht.org). Além disso, a SoHT incentiva os laboratórios que realizam estas análises a participar nos seus testes anuais de controlo de qualidade, fornecendo aos laboratórios uma oportunidade para monitorizar o seu desempenho analítico.

A melhoria nas técnicas de extração e o desenvolvimento futuro de metodologias analíticas continuarão a promover o conhecimento, enquanto a introdução de diretrizes e sistemas de qualidade irá apoiar a aceitação de cabelo como uma poderosa ferramenta de investigação com aplicações a nível clínico e forense.

VII. Referências Bibliográficas

Ago, M., Ago, K. e Ogata, M. 2009. Determination of methamphetamine in sudden death of a traffic accident inpatient by blood and hair analyses. *Legal Medicine*, 11, Supplement 1, pp. S568-S569.

Allen, D. L. e Oliver, J. S. 2000. The use of supercritical fluid extraction for the determination of amphetamines in hair. *Forensic Science International*, 107, pp. 191-199.

Balikova, M. 2005. Hair analysis for drugs of abuse. Plausibility of interpretation. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 149, pp. 199-207.

Barbara Young, P. D. P. P. H. P. H. e John W Heath, P. D. P. 2000. *Histologia funcional: texto e atlas em cores*.

Barroso, M., *et al.* 2011. Hair: a complementary source of bioanalytical information in forensic toxicology. *Bioanalysis*, 3, pp. 67-79.

Baumgartner, A. M., *et al.* 1979. Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. *J Nucl Med*, 20, pp. 748-52.

Baysal, A. e Akman, S. 2010. Determination of lead in hair and its segmental analysis by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 65, pp. 340-344.

Beránková, K., *et al.* 2005. Methamphetamine in hair and interpretation of forensic findings in a fatal case. *Forensic Science International*, 153, pp. 93-97.

Bermejo, P., *et al.* 2004. Enzymatic digestion and ultrasonication: a powerful combination in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23, pp. 654-663.

Bevalot, F., *et al.* 2000. Analysis of corticosteroids in hair by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 740, pp. 227-36.

Boumba, V. A., Ziavrou, K. S. e Vougiouklakis, T. 2006. Hair as a Biological Indicator of Drug Use, Drug Abuse or Chronic Exposure to Environmental Toxicants. *International Journal of Toxicology*, 25, pp. 143-163.

Broecker, S., Herre, S. e Pragst, F. 2012. General unknown screening in hair by liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Forensic Science International*, 218, pp. 68-81.

Bulcão, R., *et al.* 2012. Designer drugs: aspectos analíticos e biológicos. *Química Nova*, 35, pp. 149-158.

Carneiro, J. e Junqueira, L. C. U. 2008. *Histologia básica: texto, atlas*, Guanabara-Koogan.

Chan, D., *et al.* 2004. Recent developments in meconium and hair testing methods for the confirmation of gestational exposures to alcohol and tobacco smoke. *Clinical Biochemistry*, 37, pp. 429-438.

Charles, B. K., *et al.* 2003. Opiate recidivism in a drug-treatment program: comparison of hair and urine data. *J Anal Toxicol*, 27, pp. 412-28.

Chèze, M., *et al.* 2005. Hair analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in toxicological investigation of drug-facilitated crimes: Report of 128 cases over the period June 2003-May 2004 in metropolitan Paris. *Forensic Science International*, 153, pp. 3-10.

Chèze, M., *et al.* 2010. A tendency for re-offending in drug-facilitated crime. *Forensic Science International*, 196, pp. 14-17.

Chèze, M., Villain, M. e Pépin, G. 2004. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC-MS/MS: Application to forensic cases of drug facilitated crimes. *Forensic Science International*, 145, pp. 123-130.

Chiaradia, M. C., Collins, C. H. e Jardim, I. C. S. F. 2008. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, 31, pp. 623-636.

Cirimele, V., *et al.* 2002. Determination of chronic abuse of the anaesthetic agents midazolam and propofol as demonstrated by hair analysis. *Int J Legal Med*, 116, pp. 54-7.

Cirimele, V., *et al.* 2000. Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ion-spray mass spectrometry. *Forensic Science International*, 107, pp. 381-388.

Cooper, G., Moeller, M. e Kronstrand, R. 2008. Current status of accreditation for drug testing in hair. *Forensic Science International*, 176, pp. 9-12.

Cooper, G. a. A. 2011. Hair testing is taking root. *Annals Of Clinical Biochemistry*, 48, pp. 516-530.

Cooper, G. a. A., Kronstrand, R. e Kintz, P. 2012. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Science International*, 218, pp. 20-24.

Cruces-Blanco, C. e García-Campaña, A. M. 2012. Capillary electrophoresis for the analysis of drugs of abuse in biological specimens of forensic interest. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 31, pp. 85-95.

De Grande, S. M. B. e Aquino Neto, F. R. 1990. A espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas EM-EM. *Química Nova*, 13, pp. 191-199.

De Lima, E. C. e Da Silva, C. L. 2007. Cabelo como Matriz Analítica Alternativa para a determinação de drogas de abuso. pp.

Dinis, O., R. J., *et al.* 2010. Collection of biological samples in forensic toxicology. *Toxicology Mechanisms & Methods*, 20, pp. 363-414.

Druid, H., *et al.* 2007. Evaluation of the role of abstinence in heroin overdose deaths using segmental hair analysis. *Forensic Science International*, 168, pp. 223-226.

Drummer, O. 2010. Forensic toxicology. *In: Luch, A. (ed.) Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Birkhäuser Basel.

Drummer, O. H. 2000. Overview. *Encyclopedia of Forensic Sciences* London: Academic Press.

Drummer, O. H. 2004. Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Science International*, 142, pp. 101-113.

Dumestre-Toulet, V., *et al.* 2000. β -Adrenergic compounds through hair analysis. *Problems of Forensic Sciences 2000*, Vol. 42, pp. 82-89

Elias Paulo, T. s/d. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas – GC-MS - Princípios e Aplicações. Unicamp.

Emídio, E. S., De Menezes Prata, V. e Dórea, H. S. 2010. Validation of an analytical method for analysis of cannabinoids in hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 670, pp. 63-71.

Favretto, D., *et al.* 2013. Determination of ketamine and norketamine in hair by micropulverized extraction and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Forensic Science International*, 226, pp. 88-93.

Ferrara, D. S., *et al.* 1998. Quality control in toxicological analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 713, pp. 227-243.

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

Frison, G., *et al.* 2003. Detection of thiopental and pentobarbital in head and pubic hair in a case of drug-facilitated sexual assault. *Forensic Science International*, 133, pp. 171-174.

Gaillard, Y., *et al.* 2011. Detection of amitriptyline, nortriptyline and bromazepam in liver, CSF and hair in the homicidal poisoning of a one-month-old girl autopsied 8 months after death. *Forensic Science International*, 207, pp. e16-e18.

Gibson, G., *et al.* 2005. A method for the determination of minoxidil in hair-regrowth formulations by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Il Farmaco*, 60, pp. 847-853.

Gleixner, A., Sauerwein, H. e Meyer, H. H. 1996. Detection of the anabolic beta 2-adrenoceptor agonist clenbuterol in human scalp hair by HPLC/EIA. *Clin Chem*, 42, pp. 1869-71.

Gottardo, R., *et al.* 2007. Hair analysis for illicit drugs by using capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1159, pp. 185-189.

Gottardo, R., *et al.* 2012. Monitoring compliance to therapy during addiction treatments by means of hair analysis for drugs and drug metabolites using capillary zone electrophoresis coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Forensic Science International*, 216, pp. 101-107.

Goulle, J. P., Cheze, M. e Pepin, G. 2003. Determination of endogenous levels of GHB in human hair. Are there possibilities for the identification of GHB administration through hair analysis in cases of drug-facilitated sexual assault? *J Anal Toxicol*, 27, pp. 574-80.

Han, E., *et al.* 2011. Simultaneous analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol in hair without different sample preparation and derivatization by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, pp. 1096-1103.

Henderson, G. L. 1993. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Science International*, 63, pp. 19-29.

Irving, R. C. e Dickson, S. J. 2007. The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC-MS-MS. *Forensic Science International*, 166, pp. 58-67.

Jacqz-Aigrain, E., *et al.* 2002. Maternal smoking during pregnancy and nicotine and cotinine concentrations in maternal and neonatal hair. *BJOG*, 109, pp. 909-11.

Joya, X., *et al.* 2012. Determination of maternal-fetal biomarkers of prenatal exposure to ethanol: a review. *J Pharm Biomed Anal*, 69, pp. 209-22.

Jurado, C. e Sachs, H. 2003. Proficiency test for the analysis of hair for drugs of abuse, organized by the Society of Hair Testing. *Forensic Science International*, 133, pp. 175-178.

Karch, S. B. 2006. *Drug Abuse Handbook*, CRC Press.

Kim, J., *et al.* 2011. Validation of a simultaneous analytical method for the detection of 27 benzodiazepines and metabolites and zolpidem in hair using LC-MS/MS and its application to human and rat hair. *Journal of Chromatography B*, 879, pp. 878-886.

Kintz, P. 1996. *Drug Testing In Hair*, CRC-Press.

Kintz, P. 1998. Hair testing and doping control in sport. *Toxicology Letters*, 102-103, pp. 109-113.

Kintz, P. 2004. Value of hair analysis in postmortem toxicology. *Forensic Science International*, 142, pp. 127-134.

Kintz, P. 2007. Bioanalytical procedures for detection of chemical agents in hair in the case of drug-facilitated crimes. *Anal Bioanal Chem*, 388, pp. 1467-74.

Kintz, P. 2010. *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*, Taylor & Francis.

Kintz, P. 2012. Segmental hair analysis can demonstrate external contamination in postmortem cases. *Forensic Science International*, 215, pp. 73-76.

Kintz, P., *et al.* 2003. Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault. *J Forensic Sci*, 48, pp. 195-200.

Kintz, P., *et al.* 1999. Testing for anabolic steroids in hair from two bodybuilders. *Forensic Science International*, 101, pp. 209-216.

Kintz, P., *et al.* 2000. Doping control for beta-adrenergic compounds through hair analysis. *J Forensic Sci*, 45, pp. 170-4.

Kintz, P., *et al.* 2010. Interpretation of hair findings in children after methadone poisoning. *Forensic Science International*, 196, pp. 51-54.

Kintz, P., *et al.* 2005a. Identification of alprazolam in hair in two cases of drug-facilitated incidents. *Forensic Science International*, 153, pp. 222-226.

Kintz, P., *et al.* 2004. GHB in postmortem toxicology: Discrimination between endogenous production from exposure using multiple specimens. *Forensic Science International*, 143, pp. 177-181.

Kintz, P., *et al.* 2005b. Evidence of addiction by anesthesiologists as documented by hair analysis. *Forensic Science International*, 153, pp. 81-84.

Klein, J., Chan, D. e Koren, G. 2002. Neonatal Hair Analysis as a Biomarker for in Utero Alcohol Exposure. *New England Journal of Medicine*, 347, pp. 2086-2086.

Kłys, M., Rojek, S. e Bolechała, F. 2005a. Determination of oxcarbazepine and its metabolites in postmortem blood and hair by means of liquid chromatography with mass detection (HPLC/APCI/MS). *Journal of Chromatography B*, 825, pp. 38-46.

Kłys, M., *et al.* 2005b. A fatal clomipramine intoxication case of a chronic alcoholic patient: Application of postmortem hair analysis method of clomipramine and ethyl glucuronide using LC/APCI/MS. *Legal Medicine*, 7, pp. 319-325.

Lebeau, M. A., Montgomery, M. A. e Brewer, J. D. 2011. The role of variations in growth rate and sample collection on interpreting results of segmental analyses of hair. *Forensic Science International*, 210, pp. 110-116.

Liniger, B., *et al.* 2010. Abstinence monitoring of suspected drinking drivers: ethyl glucuronide in hair versus CDT. *Traffic Inj Prev*, 11, pp. 123-6.

Lozano, J., *et al.* 2007. Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse. *Ther Drug Monit*, 29, pp. 711-34.

Manisali, I., Chen, D. D. Y. e Schneider, B. B. 2006. Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25, pp. 243-256.

Mieczkowski, T. 1996. The use of hair analysis for the detection of drugs: an overview. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 3, pp. 59-71.

Miyaguchi, H., *et al.* 2007. Development of a micropulverized extraction method for rapid toxicological analysis of methamphetamine in hair. *Journal of Chromatography A*, 1163, pp. 43-48.

Moffat, A. C., Osselton, D. M. e Widdop, B. 2004. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: in pharmaceuticals, body fluids, and postmortem material*, London, Pharmaceutical Press.

Moller, M., *et al.* 2010. Solid-phase microextraction for the detection of codeine, morphine and 6-monoacetylmorphine in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Science International*, 196, pp. 64-69.

Musshoff, F., *et al.* 2003. Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of cannabinoids in hair samples. *Forensic Science International*, 133, pp. 32-38.

Musshoff, F., *et al.* 2005. Opiate concentrations in hair from subjects in a controlled heroin-maintenance program and from opiate-associated fatalities. *J Anal Toxicol*, 29, pp. 345-52.

Musshoff, F. e Madea, B. 2007. New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes. *Forensic Science International*, 165, pp. 204-215.

Nakahara, Y. 1999. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 733, pp. 161-180.

Nakahara, Y., *et al.* 1997. Hair Analysis for Drug Abuse XIV. Identification of substances causing acute poisoning using hair root. I. Methamphetamine. *Forensic Science International*, 84, pp. 157-164.

O. Pombeiro, A. J. L. 1998. Técnicas e operações unitárias em química laboratorial. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Paterson, S., Cordero, R. e Stearns, E. 2009. Chronic drug use confirmed by hair analysis: Its role in understanding both the medical cause of death and the circumstances surrounding the death. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 16, pp. 143-147.

Pichini, S., *et al.* 1997a. The analysis of nicotine in infants' hair for measuring exposure to environmental tobacco smoke. *Forensic Science International*, 84, pp. 253-258.

Pichini, S., *et al.* 1997b. Hair analysis for nicotine and cotinine: evaluation of extraction procedures, hair treatments, and development of reference material. *Forensic Sci Int*, 84, pp. 243-52.

Potsch, L., Skopp, G. e Moeller, M. R. 1997. Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. *Forensic Science International*, 84, pp. 25-35.

Pragst, F. e Balikova, M. A. 2006. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta*, 370, pp. 17-49.

Pujol, M.-L., *et al.* 2007. Evaluation of the IDS One-Step ELISA kits for the detection of illicit drugs in hair. *Forensic Science International*, 170, pp. 189-192.

Randall, V. A. e Botchkareva, N. V. 2009. Chapter 1 - The Biology of Hair Growth. In: Gurpreet, S. A. (ed.) *Cosmetics Applications of Laser ; Light-Based Systems*. Boston: William Andrew Publishing.

Ricossa, M. C., Bernini, M. e De Ferrari, F. 2000. Hair analysis for driving licence in cocaine and heroin users.: An epidemiological study. *Forensic Science International*, 107, pp. 301-308.

Rossi, R., *et al.* 2009. Identification of GHB and morphine in hair in a case of drug-facilitated sexual assault. *Forensic Science International*, 186, pp. e9-e11.

Sachs, H. 1997. Quality control by the Society of Hair Testing. *Forensic Science International*, 84, pp. 145-150.

Saito, T., *et al.* 2000. Determination of chronic methamphetamine abuse by hair analysis. *Forensic Science International*, 112, pp. 65-71.

Salquère, G., *et al.* 2012. Multi-class pesticide analysis in human hair by gas chromatography tandem (triple quadrupole) mass spectrometry with solid phase microextraction and liquid injection. *Analytica Chimica Acta*, 710, pp. 65-74.

Santos Baptista, M. J. 2005. *Determinação de drogas terapêuticas e não terapêuticas e de alguns metabolitos no cabelo*. Mestre, Universidade de Aveiro.

Scott, K. S. 2009. The use of hair as a toxicological tool in DFC casework. *Science & justice : journal of the Forensic Science Society*, 49, pp. 250-253.

Skoog, D. A., Holler, F. J. e Nieman, T. A. 2002. *Princípios de Análise Instrumental*, Porto Alegre, Bookman.

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

Stout, P. R., *et al.* 2006. External contamination of hair with cocaine: evaluation of external cocaine contamination and development of performance-testing materials. *J Anal Toxicol*, 30, pp. 490-500.

Stramesi, C., *et al.* 2008. Segmental hair analysis in order to evaluate driving performance. *Forensic Science International*, 176, pp. 34-37.

Su, P.-H., Chang, Y.-Z. e Chen, J.-Y. 2010. Infant With In Utero Ketamine Exposure: Quantitative Measurement of Residual Dosage in Hair. *Pediatrics & Neonatology*, 51, pp. 279-284.

Thieme, D., *et al.* 2000. Analytical strategy for detecting doping agents in hair. *Forensic Sci Int*, 107, pp. 335-45.

Thorspecken, J., Skopp, G. e Potsch, L. 2004. In vitro contamination of hair by marijuana smoke. *Clin Chem*, 50, pp. 596-602.

Tsanaclis, L. M., Wicks, J. F. C. e Chasin, A. a. D. M. 2011. Análises de drogas em cabelos ou pêlos. *Revista Intertox de toxicologia, risco ambiental e sociedade*, 4, pp. 6-46.

Valente, A. L. P. e Augusto, F. 2000. Microextração por fase sólida. *Química Nova*, 23, pp. 523-530.

Van Eenoo, P. e Delbeke, F. T. 2006. Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control- New steroids and new insights. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 101, pp. 161-178.

Villain, M., *et al.* 2004a. Hair to document drug-facilitated crimes: four cases involving bromazepam. *J Anal Toxicol*, 28, pp. 516-9.

Villain, M., *et al.* 2004b. Testing for zopiclone in hair application to drug-facilitated crimes. *Forensic Sci Int*, 145, pp. 117-21.

Villain, M., *et al.* 2004c. Windows of detection of zolpidem in urine and hair: application to two drug facilitated sexual assaults. *Forensic Sci Int*, 143, pp. 157-61.

Villain, M., Cirimele, V. e Kintz, P. 2004d. Hair analysis in toxicology. *Clinical Chemistry And Laboratory Medicine: CCLM / FESCC*, 42, pp. 1265-1272.

Vinner, E., *et al.* 2003. Hair analysis of opiates in mothers and newborns for evaluating opiate exposure during pregnancy. *Forensic Science International*, 133, pp. 57-62.

Wennig, R. 2000. Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Science International*, 107, pp. 5-12.

Wilhelm, M. e Idel, H. 1996. Hair analysis in environmental medicine. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, 198, pp. 485-501.

Wurst, F. M., Skipper, G. E. e Weinmann, W. 2003. Ethyl glucuronide--the direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use. *Addiction*, 98 Suppl 2, pp. 51-61.

Xiang, P., *et al.* 2011. Segmental hair analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry after a single dose of benzodiazepines. *Forensic Science International*, 204, pp. 19-26.

Yegles, M., Marson, Y. e Wennig, R. 2000. Influence of bleaching on stability of benzodiazepines in hair. *Forensic Science International*, 107, pp. 87-92.

VIII. Anexos

Anexo 1. Informação constante nos formulários relativos à cadeia de custódia (adaptado de Cooper, 2011).

Kit estandardizado de colheita

Número de identificação da amostra

Nome e contacto da entidade responsável/empregador

Nome do dador e sua identificação (por ex. cartão único)

Informação do indivíduo que realizou a colheita (nome, assinatura e data)

Hora e data da colheita

Descrição da amostra do cabelo (comprimento, cor, estado em que se encontra)

Tratamentos cosméticos e medicação usada pelo dador

Duração e frequência relativas ao consumo de substâncias de abuso

Requerimento para análise

Nome e contacto do laboratório responsável pela análise

Informações relativas aos indivíduos que receberam e manipularam a amostra

Teste de drogas em locais de trabalho - requerimentos adicionais

Contacto do médico que segue o caso

Declaração do dador validando o processo de colheita e a sua permissão para analisar a sua amostra

Cópias do formulário podem ser requeridas pelo dador, indivíduo responsável pela colheita ou pela entidade responsável

Post mortem - requerimentos adicionais

Data do óbito e circunstâncias relacionadas com a morte

Estado do cabelo e avaliação do seu estado de decomposição

Crimes facilitados por drogas - requerimentos adicionais

Detalhes relativos ao tempo que decorreu entre o incidente e a data em que foi reportado

O tratamento do cabelo após o incidente afeta o cabelo como uso de matriz
