

Manoela Mitsue Pinheiro Uema

**Ésteres Etílico e Metílico de GHB:
Síntese, Estabilidade e Lactonização**



Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Setembro 2009

Manoela Mitsue Pinheiro Uema

**Ésteres Etílico e Metílico de GHB:
Síntese, Estabilidade e Lactonização**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade do Porto para
obtenção do título de Mestre em
Toxicologia Analítica Clínica e Forense

Trabalho realizado sob orientação do Professor Doutor Carlos Manuel Magalhães Afonso



Setembro 2009

De acordo com a legislação em vigor, não é permitida a reprodução de qualquer parte dessa dissertação.

“O temor do SENHOR é o princípio da sabedoria, e o conhecimento do Santo é prudência.”

Bíblia Sagrada, Provérbios 9:10, Versão de
João Ferreira de Almeida Atualizada

Dedicatória

Dedico esta dissertação às pessoas que
tornaram este sonho possível, meus pais,
Ioia e Kuniyo.

Agradecimentos

Ao meu senhor e salvador, JESUS CRISTO, por ter me dado o dom da vida, a graça e a força em toda a minha jornada.

Aos meus pais, Kuniyo e Ioaia, pelo amor e apoio incondicional.

Aos meus irmãos, André e Eduardo, pelo apoio e carinho apesar da distância.

Às minhas tias, tios, primos e primas, pelo carinho e, em especial, minha tia Ilmeide, pelas orações na madrugada.

Ao Professor Doutor Carlos Afonso pela orientação, confiança, por me proporcionar liberdade para aprender com meus erros e pelos ensinamentos generosamente transmitidos.

À Professora Doutora Maria de Lurdes Bastos pela compreensão, apoio prestado, incentivo, ensinamentos e disponibilidade demonstrada.

À Professora Doutora Madalena Pinto por me acolher no Serviço de Química Orgânica e pela alegria contagiante.

À Dr.^a Sara Cravo pelo imenso apoio, colaboração, pelos dias de férias trocados para me ajudar no laboratório, pela prontidão, pelas diversas sugestões proporcionadas e, principalmente, pela amizade.

À Gisela Adriano, futura farmacêutica, pela presteza na ajuda técnica, fornecendo todo material necessário para a execução do trabalho, pelas palavras de ânimo no meu desespero, pelo convívio, paciência e amizade.

Ao Joel Fonseca pelo apoio, pelas palavras amigas, pelo pão de queijo para amenizar a saudade de casa, por me ensinar o “português” e pela amizade.

Aos meus amigos pelo incentivo apesar da distância. E aqueles que adquiri na minha estada em Portugal: Marcelo, Cristiane, Carlos, Raquel, Elisângela, Marta Perro, Ana Mafalda, Carla e Sofia pela colaboração e amizade.

À Professora Doutora Ana Paula de Almeida pela correção da monografia, pelas sugestões que contribuíram imenso para a dissertação.

Ao Doutor José Fernandes e à Doutora Sara Cunha do Serviço de Bromatologia pela colaboração e disponibilidade demonstrada.

Ao Doutor Artur Silva da Universidade de Aveiro pela colaboração na análise dos ésteres por ressonância magnética.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Manoela Mitsue Pinheiro Uema

Resumo

O GHB e a GBL são substâncias psicoativas utilizadas em discotecas, bares, eventos “raves” ou “trance” por adolescentes e jovens adultos e também em casos de violência sexual. São frequentemente administradas em bebidas de elevado teor alcoólico, nomeadamente, bebidas brancas ou misturas destas como, por exemplo, os vulgarmente conhecidos “shots”. Estas bebidas apresentam um elevado teor em etanol e também, comparativamente com outras bebidas alcoólicas que não são obtidas por destilação, um elevado teor em metanol. A presença conjunta de etanol, de metanol e de GHB ou GBL numa bebida alcoólica possibilita a formação dos ésteres: *gama*-hidroxibutirato de etilo e *gama*-hidroxibutirato de metilo. Estes ésteres poderão ser igualmente activos no organismo, uma vez que após hidrólise enzimática poderão originar GHB e GBL.

Neste trabalho é apresentada a síntese por transesterificação da GBL e a caracterização estrutural destes dois ésteres pelos métodos espectroscópicos IV, ¹HRMN, ¹³CRMN e EM.

A estabilidade do GHB e do GBL em soluções etanólicas, metanólicas e ainda numa cachaça brasileira foi estudada por CG-EM. O método utilizado foi validado de acordo com as recomendações da ICH. Foi avaliada a degradação do GHB e da GBL em função do tempo e do pH. A formação do *gama*-hidroxibutirato de etilo e do *gama*-hidroxibutirato de metilo em soluções etanólicas e metanólicas é também discutida e analisada.

Foi verificada a formação de GBL a partir do *gama*-hidroxibutirato de etilo e do *gama*-hidroxibutirato de metilo no injetor do equipamento CG-EM. Este fato deverá ser tomado em conta quando da análise destas substâncias por CG-EM. É apresentada a influência da temperatura e de solventes de diferentes polaridades na reaccionização destes ésteres.

Abstract

GHB and GBL are psychoactive substances used by teenagers and young adults in nightclubs, raves and trance events. They are also reported to be used in drug facilitated sexual assault. These drugs are often administered in alcoholic drinks which have high ethanol and methanol concentrations, such as spirits beverages. These beverages have high ethanol concentration and, comparing to other drinks which are not made by distillation, a high methanol concentration as well. In this kind of media, GHB and GBL can be transformed in esters such as ethyl *gamma*-hydroxybutyrate and methyl *gamma*-hydroxybutyrate. These esters can be equally active in the organism because they can be transformed in GHB and GBL, after an enzymatic hydrolysis.

This work shows the esters synthesis by GBL transesterification and their structural characterization by spectroscopics methods IR, ¹HNMR, ¹³CNMR and MS.

The GBL and GHB stability in ethanolic, methanolic solutions and in a Brazilian *cachaça* was studied in GC-MS. The method was validated according to the ICH recommendation. The degradation of GBL and GHB over time and pH was evaluated. The ethyl *gamma*-hydroxybutyrate and methyl *gamma*-hydroxybutyrate formation is discussed and analyzed.

It was verified GBL formation from the esters ethyl *gamma*-hydroxybutyrate and methyl *gamma*-hydroxybutyrate in the GC-MS injector. This fact should be taken account when analyzing these substances in GC-MS. The influence of parameters, such as, temperature and different polarity solvents is demonstrated.

ÍNDICE

Agradecimentos	vi
Resumo	viii
Abstract	ix
Abreviaturas e Símbolos	x
Capítulo I – Introdução	1
1. Introdução	2
1.1. Ácido <i>gama</i> -hidroxibutírico	3
1.2. <i>Gama</i> -Butirolactona	5
1.3. Métodos Cromatográficos	6
1.3.1. Cromatografia Gasosa	7
1.3.2. Cromatografia Líquida	9
1.3.3. Derivatização	10
2. Objetivos	11
Capítulo II – Parte Experimental	12
3. Parte Experimental	13
3.1. Técnica Cromatográficas	13
3.1.1. Cromatografia em Camada Fina	13
3.1.2. Cromatografia em Coluna	13
3.1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	13
3.2. Técnicas Espectroscópicas	13
3.2.1. Infravermelho	13
3.2.2. Ressonância Magnética Nuclear	13
3.3. Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa	14
3.4. Reagentes e Solvente	14
3.5. Procedimentos Sintéticos	14
3.5.1. <i>Gama</i> -hidroxibutirato de Etilo	14
3.5.2. <i>Gama</i> -hidroxibutirato de Metilo	15
3.6. Ensaio da Estabilidade da GBL e do GHB	16
3.6.1. Estabilidade da GBL	17
3.6.2. Estabilidade do GHB	17
3.7. Estudo da Lactonização dos Ésteres	20
4. Resultados e Discussão	22

4.1.	Síntese do <i>Gama</i> -hidroxibutirato de Etilo e do <i>Gama</i> -hidroxibutirato de Metilo	22
4.2.	Caracterização e Elucidação Estrutural do <i>Gama</i> -hidroxibutirato de Etilo e do <i>Gama</i> -hidroxibutirato de Metilo	23
4.2.1.	Espectrofotometria no Infravermelho	23
4.2.2.	Ressonância Magnética Nuclear	24
4.2.3.	Espectrometria de Massa	26
4.3.	Estabilidade do GHB e da GBL em soluções e bebidas alcoólicas	28
4.4.	Comportamento dos ésteres etílico e metílico do GHB em CG-EM	55
	Capítulo II – Conclusão	68
5.	Conclusão	69
6.	Bibliografia	70

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figuras

Figura 1: Estrutura do GHB na forma livre e na forma de sal sódico	3
Figura 2: Estrutura da GBL	5
Figura 3: Interconversão do GHB em GBL	6
Figura 4: Transesterificação da GBL.....	6
Figura 5: Cromatógrafo de gases	7
Figura 6: Esquema de equipamento de CLAE	9
Figura 7: Reação de derivatização do GHB com BSTFA + 1% TMCS	10
Figura 8: Estrutura do gama-hidroxi-butirato de etilo	15
Figura 9: Estrutura do gama-hidroxi-butirato de metilo	16
Figura 10: Programa de temperatura do forno utilizado para análise da GBL e ésteres etílico e metílico do GHB	17
Figura 11: Cromatograma obtido da GBL em clorofórmio $t_R = 8,13$ minutos	18
Figura 12: Programa da temperatura do forno utilizado para análise do GHB	19
Figura 13: Cromatograma obtido do GHB em acetato de etilo $t_R = 10,22$ minutos	19
Figura 14: Cromatograma obtido do 2-hidroxicapróico em acetato de etilo $t_R = 10,65$ minutos	20
Figura 15: Cromatograma obtido do <i>gama</i> -hidroxi-butirato de etilo em acetato de etilo $t_R = 9,56$ minutos	21
Figura 16: Cromatograma obtido do <i>gama</i> -hidroxi-butirato de metilo em acetato de etilo $t_R = 8,88$ minutos	21
Figura 17: Reação de formação do <i>gama</i> -hidroxi-butirato de etilo	22
Figura 18: Reação de formação do <i>gama</i> -hidroxi-butirato de etilo	22
Figura 19: Purificação do <i>gama</i> -hidroxi-butirato de etilo ($t_R = 5,46$ minutos)	22
Figura 20: Purificação do <i>gama</i> -hidroxi-butirato de metilo ($t_R = 5,47$ minutos)	23
Figura 21: Espectro no infravermelho obtido do <i>gama</i> -hidroxi-butirato de etilo	23
Figura 22: Espectro no infravermelho obtido do <i>gama</i> -hidroxi-butirato de metilo .	25
Figura 23: Atribuição dos sinais no espectro $^1\text{HRMN}$ do <i>gama</i> -hidroxi-butirato de etilo.....	25
Figura 24: Atribuição dos sinais no espectro $^{13}\text{CRMN}$ do <i>gama</i> -hidroxi-butirato de etilo	25
Figura 25: Atribuição dos sinais no espectro $^1\text{HRMN}$ do <i>gama</i> -hidroxi-butirato de metilo	25

Figura 26: Atribuição dos sinais no espectro ¹³ CRMN do <i>gama</i> -hidroxibutirato de metilo	26
Figura 27: Espectro de massa (IE) do <i>gama</i> -hidroxibutirato de etilo	27
Figura 28: Espectro de Massas (IE) do <i>gama</i> -hidroxibutirato de metilo	27
Figura 29: Rearranjo de MacLafferty do <i>gama</i> -hidroxibutirato de etilo	28
Figura 30: Formação do íon com m/z = 87 a partir do <i>gama</i> -hidroxibutirato de metilo	28
Figura 31: Formação hipotética dos ésteres etílico e metílico do GHB em bebidas alcoólicas	29
Figura 32: Concentração de GHB em etanol ao longo do tempo	30
Figura 33: Concentração de GHB em etanol pH2 ao longo do tempo	31
Figura 34: Concentração de GHB em metanol ao longo do tempo	31
Figura 35: Concentração de GHB em metanol pH2 ao longo do tempo	32
Figura 36: Concentração de GHB em Cachaça	33
Figura 37: Cromatograma do GHB em etanol t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	33
Figura 38: Cromatograma do GHB em etanol t=72h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	33
Figura 39: Cromatograma do GHB em etanol a pH2 t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	34
Figura 40: Cromatograma do GHB em etanol a pH 2 t=120h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	34
Figura 41: Cromatograma do GHB em metanol t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	35
Figura 42: Cromatograma do GHB em metanol t=168h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	35
Figura 43: Cromatograma do GHB em metanol a pH 2 t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	36
Figura 44: Cromatograma do GHB em metanol a pH 2 t=96h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	36
Figura 45: Cromatograma do GHB em cachaça t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	37
Figura 46: Cromatograma do GHB em cachaça t=144h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	37
Figura 47: Gráfico da GBL em etanol	39
Figura 48: Gráfico da GBL em etanol a pH2	39
Figura 49: Gráfico da GBL em metanol	39

Figura 50: Grafico da GBL em metanol a pH2	40
Figura 51: Grafico da GBL em cachaça	40
Figura 52: Mecanismo de reação de transesterificação da GBL	41
Figura 53: Formação dos ésteres etílico e metílico do GHB	41
Figura 54: Cromatograma do GBL em etanol t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	42
Figura 55: Cromatograma do GBL em etanol t=120h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	42
Figura 56: Cromatograma do GBL em etanol t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	43
Figura 57: Cromatograma do GBL em etanol t=96h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	43
Figura 58: Cromatograma do GBL em metanol t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	44
Figura 59: Cromatograma do GBL em metanol t=72h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	44
Figura 60: Cromatograma do GBL em metanol a pH 2 t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	45
Figura 61: Cromatograma do GBL em metanol a pH 2 t=168h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	45
Figura 62: Cromatograma do GBL em cachaça t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	46
Figura 63: Cromatograma do GBL em cachaça t=168h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho	46
Figura 64: Gráfico da Linearidade obtida para GBL	49
Figura 65: Gráfico da Linearidade obtida para GHB	49
Figura 66: Gráfico da Linearidade obtida para 2-Hidroxicapróico	49
Figura 67: Curva de calibração do GHB pelo método do padrão interno	50
Figura 68: Transformação dos ésteres etílico e metílico do GHB nos seus precursores	55
Figura 69: Cromatograma do <i>gamma</i> -hidroxibutirato de etilo nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho (t_R GBL = 8,33 minutos)	56
Figura 70: Cromatograma do <i>gamma</i> -hidroxibutirato de metilo nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho (t_R GBL = 8,31 minutos)	56
Figura 71: Cromatograma do <i>gamma</i> -hidroxibutirato de etilo em clorofórmio (temperatura do injetor=250°C; t_R GBL = 8,39 minutos)	57

Figura 72: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de etilo em clorofórmio (temperatura do injetor=150°C; t _R GBL = 8,19 minutos; t _R Éster etílico GHB = 9,57 minutos)	58
Figura 73: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de etilo em clorofórmio (temperatura do injetor=80°C; t _R Éster etílico GHB = 9,60 minutos)	58
Figura 74: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de metilo em clorofórmio (temperatura do injetor=250°C; t _R GBL = 8,21 minutos)	59
Figura 75: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de metilo em clorofórmio (temperatura do injetor=150°C; t _R GBL = 8,29 minutos)	59
Figura 76: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de metilo em clorofórmio (temperatura do injetor=80°C; t _R GBL = 8,07 minutos; t _R Éster metílico GHB = 8,82 minutos)	60
Figura 77: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de etilo em em acetato de etilo (temperatura do injetor=250°C; t _R GBL = 8,23 minutos)	61
Figura 78: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de etilo em em acetato de etilo (temperatura do injetor de 150°C; t _R GBL = 8,16 minutos; t _R Éster etílico de GHB = 9,70 minutos)	61
Figura 79: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de etilo em acetato de etilo (temperatura do injetor a 80°C; t _R Éster etílico de GHB= 9,56 minutos)	62
Figura 80: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de etilo em propan-2-ol (temperatura do injetor a 250°C; t _R GBL= 8,37 minutos)	62
Figura 81: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de etilo em propan-2-ol (temperatura do injetor a 150°C; t _R GBL= 8,31 min; t _R Éster etílico de GHB = 9,70 minutos)	63
Figura 82: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de etilo em propan-2-ol (temperatura do injetor a 80°C; t _R Éster Etílico de GHB = 9,27 minutos)	63
Figura 83: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de metilo em acetato de etilo (temperatura do injetor de 250°C; t _R GBL = 8,31 minutos)	64
Figura 84: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de metilo em acetato de etilo (temperatura do injetor de 150°C; t _R GBL = 8,20 minutos; t _R Éster Metílico de GHB = 8,96 minutos)	64
Figura 85: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de metilo em acetato de etilo (temperatura do injetor de 80°C; t _R Éster Metílico de GHB = 8,88 minutos)	65
Figura 86: Cromatograma do <i>gama</i> -hidroxibutirato de metilo em propan-2-ol (temperatura do injetor de 250°C; t _R GBL = 8,50 minutos)	65

Figura 87: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de metilo em propan-2-ol (temperatura do injetor de 150°C; t_R GBL = 8,40 minutos; t_R Éster Metílico de GHB = 8,96 minutos) 66

Figura 88: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de metilo em propan-2-ol (temperatura do injetor de 80°C; t_R Éster Metílico de GHB = 8,68 minutos) 66

Tabelas

Tabela 1: Reagentes e solventes..... 14

Tabela 2: Soluções padrão de GBL e GHB 16

Tabela 3: Zona de linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação da GBL, GHB e ácido 2-hidroxicapróico 48

Tabela 4: Zona de linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação da GHB + 2-hidroxicapróico (PI) 50

Tabela 5: Limite de detecção da GBL e GHB nas matrizes em estudo 50

Tabela 6: Limite de quantificação da GBL e GHB nas matrizes em estudo 51

Tabela 7: Repetibilidade da GBL 51

Tabela 8: Repetibilidade do GHB 51

Tabela 9: Repetibilidade do 2-hidroxicapróico 51

Tabela 10: Repetibilidade do GHB + 2-hidroxicapróico 52

Tabela 11: Precisão Intermédia da GBL 52

Tabela 12: Precisão Intermédia do GHB 52

Tabela 13: Exatidão obtida para o GHB em etanol 53

Tabela 14: Exatidão obtida para o GHB em etanol pH = 2 53

Tabela 15: Exatidão obtida para o GHB em metanol 53

Tabela 16: Exatidão obtida para o GHB em metanol pH = 2 53

Tabela 17: Exatidão obtida para o GHB em cachaça 53

Tabela 18: Exatidão obtida para a GBL em etanol 54

Tabela 19: Exatidão obtida para a GBL em etanol pH = 2 54

Tabela 20: Exatidão obtida para a GBL em metanol 54

Tabela 21: Exatidão obtida para a GBL em metanol pH = 2 54

Tabela 22: Exatidão obtida para a GBL em cachaça 54

Abreviaturas

1,4 BD – 1,4-butanodiol

BSTFA – N-O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida

CG – Cromatografia Gasosa

CL – Cromatografia Líquida

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EM – Espectroscopia de Massa

FDA – Food and Drug Administration

GABA – ácido γ -aminobutírico

GBL – *Gama*-butirolactona

GHB – Ácido *Gama*-hidroxibutírico

IV - Infravermelho

MSTFA – Metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida

NIDA – Nacional de Abuso de Drogas dos Estados Unidos

OMS – Organização Mundial de Saúde

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TLC – Cromatografia em Camada Fina

TMS - Tetrametilsilano

UV – Ultra-violeta

Capítulo I

Introdução

1. Introdução

As drogas psicoativas são substâncias que ao serem tomadas podem mudar a consciência, o humor e o processo de pensamento. Seu uso e dependência causam um encargo significativo para o indivíduo e para a sociedade em todo mundo. Segundo o relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2002, 8,9% dos encargos de doenças provêm do uso de substâncias psicoativas [1].

O Instituto Nacional de Abuso de Drogas dos Estados Unidos (NIDA) define “Club Drugs” como um grupo heterogêneo de compostos psicoativos que tendem a ser abusados por adolescentes e jovens adultos em discotecas, bares, eventos “raves” ou “trance”. O GHB é uma das drogas pertencente a esse grupo [2].

O Ácido *gama*-hidroxibutírico (GHB) é um depressor do sistema nervoso central. É um composto endógeno, um produto medicinal e uma droga recreativa. Foi aprovado pelo FDA em 2002 para o tratamento da narcolepsia, atualmente, tem sido usado também em vários países da Europa para o tratamento da síndrome de abstinência de álcool. Seu uso não medicinal tem sido reportado na década de 80 pelos fisiculturistas e na década de 90 foi observado seu uso como droga recreativa em discotecas na Europa, Estados Unidos e Austrália [3-4]. Devido à restrição internacional da produção e do uso do GHB, ocorreu uma mudança no consumo de GHB para seus precursores como a *gama*-butirolactona (GBL) e 1,4-butanodiol (1,4-BD) [5].

Durante os últimos 10 anos houve um aumento no uso de drogas e álcool para imobilizar vítimas nos casos de violação sexual [6]. O GHB dissolve facilmente em muitas matrizes líquidas e na dosagem apropriada pode induzir o sono, causar amnésia, diminuir a inibição e acarretar uma leve euforia. Devido a essas características, tem sido utilizado em casos de violência sexual. No cenário forense, essa substância é freqüentemente encontrada em bebidas, principalmente em bebidas alcoólicas [7].

Informações toxicológicas disponíveis de estudos forenses do Reino Unido, França, Estados Unidos e Austrália sugerem que pequenas proporções de casos de violência sexual reportadas envolvem o uso encoberto de GHB. Apesar disso, a verdadeira incidência do uso da droga nesse tipo de crime pode ser maior que o identificado devido a vários fatores como o não referir ou a referência tardia pela vítima,

a falta de coleta de amostras para análise forense pela polícia e/ou a pelo processo coleta da amostra [6].

Em meio aquoso, o GHB e a GBL sofrem interconversão. GBL é convertida em GHB pela hidrólise enquanto o GHB sofre uma esterificação intramolecular para se converter em GBL. Em meio alcoólico, a GBL pode sofrer interconversão nos ésteres de GHB, metílico ou etílico dependendo do meio alcoólico, pela reação de transesterificação. Por isso, existe a possibilidade da GBL sofrer interconversão a GHB em produtos de base aquosa e da GBL sofrer interconversão a ésteres de GHB em produtos alcoólicos entre o tempo de produção, consumo e/ou apreensão. Por isso, deve-se levar em consideração essas interconversões ao desenvolver um método de análise de material suspeito em conter GHB, levando em conta que o GHB é uma substância controlada e a GBL não, exceto na Itália, Latvia e Suécia [3, 8].

Devido ao exposto, é importante o estudo da estabilidade do GHB e GBL em meio alcoólico e a lactonização dos ésteres no equipamento.

1.1. Ácido *gama*-hidroxibutírico

O ácido *gama*-hidroxibutírico (GHB) ou ácido 4-hidroxibutanóico (Figura 1), também é conhecido como *gama*-hidroxibutirato e oxibato. É uma substância orgânica de cadeia curta, que possui 4 carbonos e dois grupos funcionais: álcool e ácido carboxílico. É uma substância incolor, inodora e de sabor salgado. Na forma livre é líquida. Na forma de sal sódico é um sólido branco. Sua fórmula molecular é $C_4H_8O_3$ e possui uma massa molecular de 104,1. O GHB, tanto na forma livre, quanto na forma de sal, é muito solúvel em água e insolúvel nos solventes orgânicos [9-10]. O pKa do GHB é de 4,72.

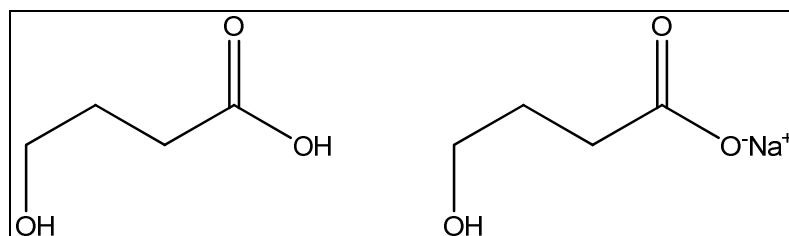


Figura 1: Estrutura do GHB na forma livre e na forma de sal sódico.

É uma substância natural, que pode ser encontrada em vários tecidos de mamíferos, em especial no cérebro, atingindo as mais altas concentrações no hipotálamo, hipocampo, substância nigra e no gânglio basal. Atua como um

neurotransmissor e/ou um neuromodulador endógeno [11-12]. Está bioquímica e estruturalmente relacionado com o ácido γ -aminobutírico (GABA), a γ -butirolactona (GBL) e o 1,4-butanodiol (1,4 BD).

Para a medicina e a biologia, a história do GHB começa na década de 1960, na qual o laboratório de Laborit sintetizou o GHB com o objetivo de obter uma substância que mimetizasse o GABA e que atravessasse a barreira hematoencefálica facilmente, podendo assim ser utilizado no tratamento das convulsões [11-12].

Na Europa e no Japão, o GHB foi utilizado como um análogo do GABA pretendendo aproveitar o seu efeito anestésico, dada a sua capacidade de induzir o sono e o coma reversível, mas sua utilização foi interrompida devido a sua pouca ação analgésica e aos seus efeitos adversos. Atualmente, está sendo utilizado em diversos países da Europa, no tratamento da dependência do álcool [4, 12-13]. Nos Estados Unidos, devido a pesquisas que indicavam que estimulava o hormônio do crescimento em modelos animais, foi usado como suplemento alimentar para o aumento da massa muscular [13]. Atualmente, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou sua comercialização para o tratamento da cataplexia em pacientes com narcolepsia sob o nome comercial Xyrem® [14-15].

Por causa dos seus efeitos euforigênicos e relaxantes, o GHB tem atraído jovens que o utilizam como droga de abuso e o seu consumo tem sido geralmente associado ao álcool, cannabis e outras drogas como a 3,4-metilenodioximetanfetamina (Ecstasy) [16]. Além disso, por causa da sua capacidade de induzir amnésia e aumentar a libido o seu uso tem sido relatado em casos de abuso sexual [14, 17].

A via de administração do GHB e de seus precursores mais descrita para o uso ilícito e farmacológico é a via oral. Mas, pode ser administrado por via intravenosa também. O GHB está disponível sob forma líquida, em pó ou incluído em cápsulas em concentrações variadas [16, 18]. No entanto, a forma farmacêutica do GHB comercializado sob o nome de Xyrem® [19].

O GHB é rapidamente absorvido quando administrado por via oral em humanos, e mostra uma grande variação na biodisponibilidade [20]. Sofre o efeito de primeira passagem. Pode ser metabolizado completamente no fígado e apresenta uma biodisponibilidade oral em ratos de 59 – 65%. Tem sido observado em humanos que há um aumento na taxa de absorção quando o GHB é administrado com estômago vazio, resultando numa redução do tempo para alcançar a concentração plasmática máxima

[21]. O pico plasmático em humanos ocorre ao fim de 15 a 45 minutos após a administração [22].

A via metabólica predominante do GHB é a oxidação a semialdeído succínico pela enzima citosólica NADP⁺ dependente chamada GHB desidrogenase. Outra enzima capaz de reduzir o GHB a semialdeído succínico é a GHB trans-hidrogenase, que é localizada na fração microsomal. O segundo passo da metabolização do GHB é a oxidação do semialdeído succínico a ácido succínico por uma enzima NAD⁺ dependente que é a semialdeído succínico desidrogenase. O ácido succínico é transformado em substrato para o Ciclo de Krebs, que por fim é metabolizado em CO₂ e H₂O [21].

Já foram descritos diversos métodos de análise do GHB. Os métodos de rastreio do GHB podem ser colorimétrico [23], enzimático [24] e eletroforese [25]. E os métodos mais utilizados para doseamento do GHB são cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Contudo, devido à elevada polaridade e instabilidade térmica do GHB e seus precursores (1,4-BD e GABA), não é possível a sua análise direta por GC. Para esta ser possível é necessário recorrer à derivatização prévia transformando-os em derivados voláteis. Habitualmente obtêm-se derivados sililados por reação com reagentes de sililação adequados como, por exemplo, o metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) e o N-O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) [26].

1.2. γ -Butirolactona

A γ -Butirolactona (GBL) (Figura 2) é um líquido oleoso, incolor e com cheiro característico. Sua fórmula molecular é C₄H₆O₂ e possui uma massa molecular de 86,09, uma densidade de 1,12g/mL a 25°C e um ponto de ebulição de 204 - 205°C. É solúvel na água e solúvel no metanol, no etanol, na acetona, no éter e no benzeno [9, 27].

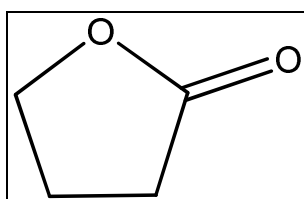


Figura 2: Estrutura da GBL

É o éster cíclico do GHB. Em meio aquoso, um equilíbrio pH-dependente é estabelecido entre o ânion hidroxicarboxilato de cadeia aberta e a lactona. Em meio básico o GHB predomina enquanto em meio ácido a forma de lactona é favorecida (Figura 3) [28].

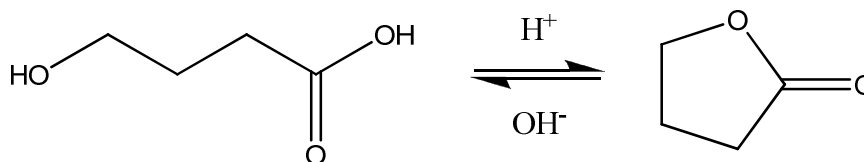


Figura 3: Interconversão do GHB em GBL.

A GBL pela ação das enzimas γ -lactonase se transforma em GHB nos tecidos periféricos. Logo, demonstra os mesmos efeitos do GHB *in vivo* [11].

A GBL em meio alcoólico e pH ácido pode sofrer transesterificação e formar os ésters etílico ou metílico do GHB dependendo do meio ser etanol ou metanol, respectivamente (Figura 4) [29].

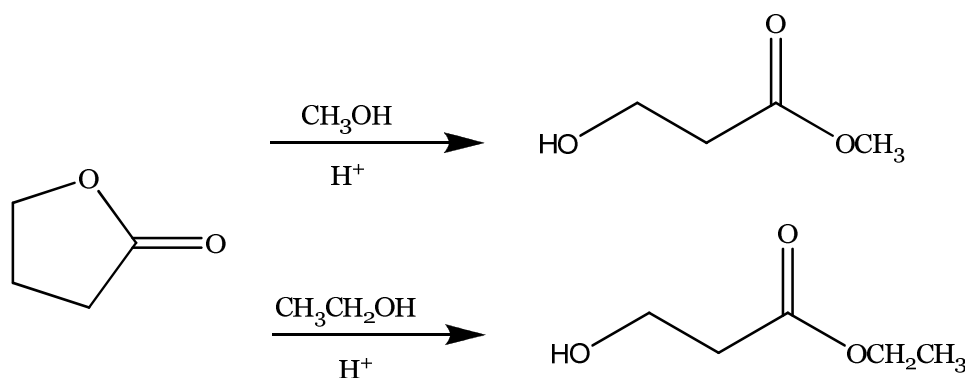


Figura 4: Transesterificação da GBL.

A GBL pode ser analisada directamente por GC, uma vez que possui polaridade, volatilidade e comportamento cromatográfico adequados. Outros métodos de análise da GBL são por CLAE/UV [26], colorimétrico [23], entre outros.

1.3. Métodos Cromatográficos

Cromatografia é um processo de separação que é realizado pela distribuição dos componentes da mistura em duas fases, uma estacionária e outra, móvel. É uma técnica muito versátil, pois pode separar substâncias voláteis ou volatilizáveis por cromatografia gasosa, substâncias não voláteis e materiais de alto peso molecular por

cromatografia líquida. Técnicas cromatográficas mais clássicas, como a cromatografia em camada fina (TLC) podem ser muito úteis [30].

As posições dos picos no eixo do tempo (tempo de retenção, t_R) podem identificar os componentes da amostra e as áreas sob os picos dão uma medida quantitativa de cada componente da amostra [31].

As técnicas de cromatografia gasosa e líquida vêm-se destacando e ganhando popularidade desde meados do século passado devido à capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras farmacêuticas, biológicas e em alimentos mesmo quando os analitos se encontram-se em quantidades muito reduzidas [32].

1.3.1. Cromatografia Gasosa

Na cromatografia gasosa, o princípio operacional básico envolve a vaporização da amostra no injetor, a separação dos componentes da mistura em uma coluna cromatográfica específica e a detecção de cada componente por um detector. A eluição é feita por fluxo de um gás inerte, normalmente o hélio, que atua como fase móvel. A coluna contém a fase estacionária. A separação dos componentes é determinada pela distribuição de cada componente entre a fase móvel e a fase estacionária. As unidades básicas do sistema de cromatografia gasosa são fonte de gás de arraste, injetor, coluna cromatográfica, forno, detector e registrador como indicado na figura 5 [31, 33-34].

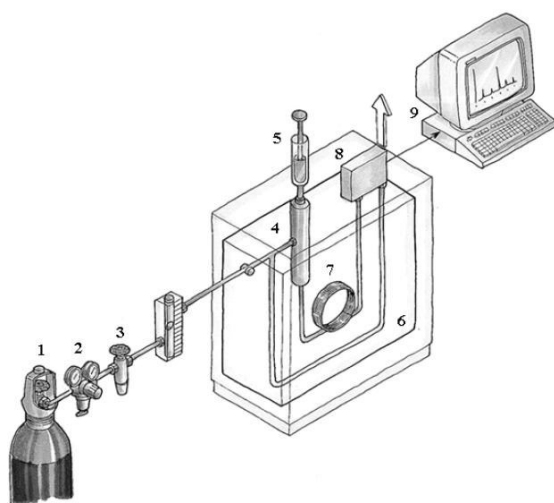


Figura 5: Cromatógrafo de gases: (1) Cilindro de gás de arraste, (2) Regulador de pressão, (3) Válvula de controle de fluxo, (4,5) Injetor, (6) Forno, (7) Coluna, (8) Detector, (9) Registrador de dados. [34]

Uma vez que as substâncias são analisadas na forma de vapor, o injetor, a coluna e o detector são obrigatoriamente partes aquecidas do equipamento.

O detector deve apresentar as seguintes características: uma sensibilidade adequada, boa estabilidade e reprodutibilidade, uma resposta linear, fiável e de fácil uso. Há vários tipos de detectores disponíveis: detector de ionização em chama, detector por condutividade térmica, detector por captura de elétrons, entre outros [33].

O detector de ionização em chama é o mais usado para análise de substâncias orgânicas. Produz íons em uma chama pela combustão de hidrogênio/ar e o efluente da coluna. O número de íons é proporcional ao número de átomos de carbono reduzidos na chama. É um dispositivo sensível a massa e não a concentração [31].

O detector de Condutividade Térmica é baseado nas variações da condutividade térmica de uma corrente gasosa que carrega as moléculas do analito. É um dispositivo simples e possui uma larga faixa dinâmica linear [31].

O detector de captura de elétrons opera da seguinte maneira: o efluente da coluna passa sobre um emissor β , um elétron do emissor provoca ionização do gás de arraste (geralmente nitrogênio) e a produção de uma rajada de elétrons [31].

Uma tecnologia que veio revolucionar ainda mais as técnicas cromatográficas, foi a possibilidade de utilizar o espectrômetro de massas como detector. A primeira dessas técnicas foi a CG – EM.

Para além deste processo ter contribuído para um aumento enorme da sensibilidade na detecção, ele proporciona ainda uma contribuição para o esclarecimento estrutural dos analitos separados na coluna cromatográfica dos quais, após a detecção, é possível registrar os respectivos espectros de massa.

A interface no CG – EM é um dispositivo que transporta o efluente do cromatógrafo para o espectrômetro de massa. Isso deve ser feito de uma maneira que o analito não condense na interface nem se decomponha antes de entrar na fonte iônica do espectrômetro de massa [33]. Esta dificuldade fez com que só anos mais tarde o mesmo princípio pudesse ser aplicado a cromatografia líquida: CL – EM.

A técnica hifenada CG-EM é uma ferramenta versátil e largamente utilizada na identificação dos elementos presentes em amostras e na determinação de suas concentrações. O espectrômetro de massa separa os íons em movimento com base nas suas razões massa-carga, m/z . O detector de aprisionamento de íons (ion trap), um dos mais simples, gera os íons a partir de amostras eluídas através de impacto de elétrons ou ionização química, e estes são armazenados em um campo de radiofrequência. Os íons presos são então ejetados da área de estocagem para um multiplicador de elétrons. A ejeção é controlada de modo a possibilitar a varredura com base na razão massa/carga [31].

O CG/EM está disponível na maioria dos laboratórios forenses e é um método eficiente na detecção de GHB e GBL [26].

1.3.2. Cromatografia Líquida

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) surgiu a partir da instrumentalização e teoria da cromatografia gasosa. É uma das técnicas analíticas de separação mais utilizada, pois apresenta uma boa sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas, adequação a separações de substâncias não-voláteis ou termicamente frágeis e ampla aplicabilidade [31, 35].

A instrumentação pode ser mais ou menos sofisticada e existem equipamentos totalmente computadorizados. Os componentes fundamentais são uma bomba capaz de produzir um fluxo constante e reprodutível, um medidor de pressão, injetor, coluna, detector e um registrador como ilustrado na Figura 6 [35].

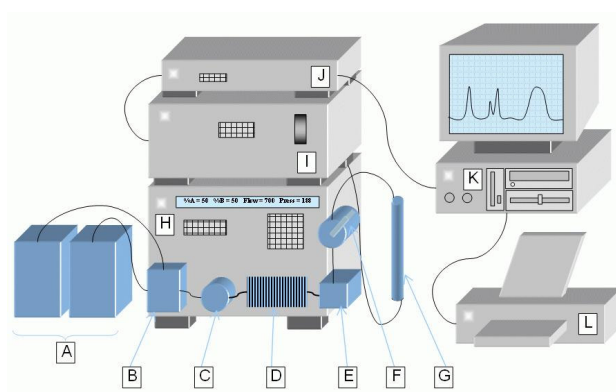


Figura 6: Esquema de equipamento de CLAE. A – Reservatório de Eluente, B – Misturador, C – Válvula de Purga, D – Circuito de Compensação de Pressão, E – Câmara de Mistura, F – Válvula de Injeção, G – Coluna de Separação, H – Unidade de CLAE, I – Detector, J – Interface com o Computador, K – Computador e L – Impressora. Fonte: Modificado de [36].

A separação de uma mistura em CLAE acontece pela interação do soluto-fase móvel, soluto-fase estacionária e a fase móvel. A classificação dada de acordo com essas interações é: cromatografia em fase reversa, fase móvel mais polar que fase estacionária; cromatografia em fase normal, fase estacionária mais polar que fase móvel; por pareamento de íons ou troca iônica e por exclusão [35].

Os detectores mais comuns em CLAE são: ultravioleta (UV), infravermelho (IV), fluorescência, eletroquímicos, índice de refração, entre outros [31].

A CLAE é também comum em laboratórios toxicológicos. É um método muitas vezes usado para separação e confirmação de GHB e GBL [26].

1.3.3. Derivatização

A derivatização é utilizada previamente à análise em CG e é realizada para melhorar a volatilidade e estabilidade térmica de compostos, particularmente de compostos que contêm grupos funcionais polares e para mudar as propriedades de separação de compostos, melhorando a resolução cromatográfica e detecção [37].

Nas reações de derivatização ocorre uma substituição do hidrogênio de grupos polares como NH, OH e SH por grupos alquila, acila ou silila. Essas substituições aumentam significativamente a volatilização da substância [38].

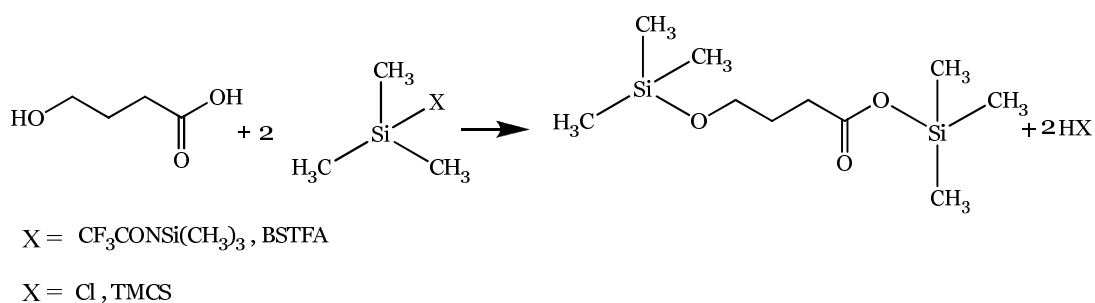


Figura 7: Reação de derivatização do GHB com BSTFA + 1% TMCS.

2. Objetivos

O GHB e a GBL são frequentemente administrados em bebidas alcoólicas. A maior parte das vezes trata-se de bebidas brancas, ou seja, bebidas destiladas, com elevados teores em etanol e em metanol.

Esta circunstância levou-nos a estudar, por CG-EM, a formação dos ésteres etílico e metílico obtidos da eventual reacção do GHB e da GBL com os álcoois das bebidas, o etanol e o metanol.

Para poder dar sequência ao objectivo atrás delineado, pretendemos também desenvolver e otimizar os processos de síntese do *gama*-hidroxibutirato de etilo e do *gama*-hidroxibutirato de metilo, bem como caracterizar de forma cabal estas duas substâncias.

Durante a execução do presente trabalho verificamos também que os ésteres etílico e metílico obtidos apresentavam um comportamento cromatográfico pouco reprodutível e indiciador da sua transformação em GBL no equipamento analítico de CG-EM utilizado. O estudo deste comportamento constituiu assim o terceiro objetivo a que nos propusemos no trabalho aqui apresentado.

Capítulo II

Parte Experimental

3. Parte Experimental

3.1. Técnica Cromatográficas

3.1.1. Cromatografia em Camada Fina

Para análise em cromatografia em camada fina, foram utilizadas placas de gel de sílica 60G (ALUGRAM®) de 0,20 mm de espessura com indicador de fluorescência a 254 nm. Foram eluídas em clorofórmio. Após, a eluição, as placas foram observadas sob lâmpada de ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) e foram também reveladas em iodo.

3.1.2. Cromatografia em Coluna

Foram utilizados cartuchos de cromatografia flash de sílica (GraceResolv®) 70 g/150 mL.

3.1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para as separações em CLAE, foram utilizadas colunas em fase normal Hypersil H3, 250 x 4,6 mm, 5 μ m, Hicrom® como fase estacionária e clorofórmio como fase móvel. Detector UV/Vis Jasco – 245 – 875 nm, tempo de corrida: 10 minutos e volume de injeção de 20 μ L, fluxo de 1 mL/minuto.

3.2. Técnicas Espectroscópicas

3.2.1. Infravermelho

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos por meio de incorporação da amostra em discos de KBr, em espectrômetro ATI Mattson Genesis FTIR™, utilizou-se o software WINFIRST 3.00.

3.2.2. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram adquiridos, à temperatura ambiente, num espectrômetro Bruker Avance 300. Utilizou-se como solvente acetona deuterada (CD_3COCD_3). Os deslocamentos químicos

estão expressos em δ (ppm) relativamente ao tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna ($\delta = 0$), e as constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

3.3. Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa

Os espectros de massa foram obtidos por injeção direta (GBL e ésteres metílico e etílico) ou após derivatização (GHB e 2-Hidroxicapróico) em equipamento CG-EM, cromatografo gasoso ThermoQuest CE Instruments Trace GC 2000 Series e espectrômetro de massa ThermoQuest Finnigan GCQ Plus.

3.4. Reagentes e Solventes

Reagente	Grau de Pureza	Marca
Acetato de Etilo	Pró – Análise	Carlo Erba
Hidrogenocarbonato de Sódio (NaHCO ₃)	Pró – Análise	Panreac
Clorofórmio	Pró – Análise	Carlo Erba
Etanol	Pró – Análise	Carlo Erba
GBL ¹	Pró – Análise	Sigma Aldrich
GHB	----	Síntese ²
Metanol	Pró – Análise	Panreac
Sulfato de Sódio Anidro	Pró – Análise	Pronalab

¹ GBL foi destilada.

² [39]

Tabela 1: Reagentes e solventes.

3.5. Procedimentos Sintéticos

3.5.1. *Gama*-hidroxibutirato de Etilo

Adicionaram-se a um balão de 250 ml de fundo redondo 9 mL (0,12 mol) de GBL, 53 mL (0,69 mol) de etanol e ácido sulfúrico concentrado até pH 1. Com ajuda de um agitador magnético, agitou-se o meio reacional durante 45 min, à temperatura ambiente e depois aqueceu-se a refluxo durante 1 h. Deixou-se arrefecer e acrescentou-se hidrogenocarbonato de sódio até pH 7. Filtrou-se e evaporou-se o solvente em evaporador rotativo. O resíduo foi então

centrifugado (3000 rpm, 10 min) e purificado por cromatografia em coluna empacotada (cartucho) de gel de sílica, usando como eluente a série: clorofórmio (250 mL), clorofórmio metanol 1:1 (250 mL) e metanol (250 mL).

O produto resultante foi repurificado por HPLC em fase normal (coluna Hypersil H3, clorofórmio), tendo-se recolhido a fração que eluiu entre 5 e 5,8 min. Foi evaporado o solvente e obtiveram-se 3,66 g de um resíduo viscoso que revelou corresponder ao *gama*-hidroxibutirato de etilo e que foi caracterizado por IV, ¹HRMN, ¹³CRMN e EM.

Gama-hidroxibutirato de etilo: rendimento : 36%. Líquido viscoso. IV (KBr): 3419, 2977, 2935, 2877, 1728, 1641, 1529, 1467, 1443, 1372, 1343, 1313, 1246, 1160, 1059, 1032, 943, 912, 570, 455, 433 cm⁻¹. ¹H-RMN (300,13 MHz; CD₃COCD₃): δ = 3,63 ppm (s, 1H, OH), 3,57 (t, 2H, J = 6,30 Hz, H_α), 1,79 (qt, 2H, J = 6,88 Hz, H_β), 2,38 (t, 2H, J = 7,44 Hz, H_γ), 4,09 (q, 2H, J = 7,12 Hz, OCH₂CH₃), 1,22 (t, 3H, J = 7,14 Hz OCH₂CH₃). ¹³C-RMN (75,47 MHz; CD₃COCD₃): δ = 173,7 ppm (CO), 31,2 (C_α), 28,8 (C_β), 61,4 (C_γ), 60,4 (OCH₂CH₃), 14,5 (OCH₂CH₃). EM: 39 (100), 87 (66), 133 (38) [M+1]⁺.

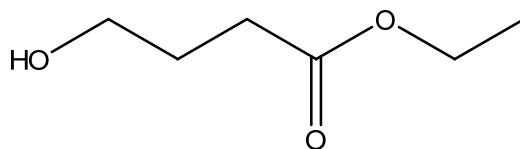


Figura 8: Estrutura do *gama*-hidroxibutirato de etilo

3.5.2. *Gama*-hidroxibutirato de Metilo

Adicionaram-se a um balão de 250 ml de fundo redondo 15 mL (0,1897 mol) de GBL, 85 mL (2,099 mol) de metanol e ácido sulfúrico concentrado até pH 1. Com ajuda de um agitador magnético, agitou-se o meio reacional durante 45 min, à temperatura ambiente e depois aqueceu-se a refluxo durante 1 H. Deixou-se arrefecer e acrescentou-se hidrogenocarbonato de sódio até pH 7. Filtrou-se e evaporou-se o solvente em evaporador rotativo. O resíduo foi então centrifugado (3000 rpm, 10 min) e purificado por cromatografia em coluna empacotada (cartucho) de gel de sílica, usando como eluente a série: clorofórmio (250 mL), clorofórmio metanol 1:1 (250 mL) e metanol (250 mL).

O produto resultante foi repurificado por HPLC em fase normal (coluna Hypersil H3, clorofórmio), tendo-se recolhido a fração que eluiu entre 5 e 5,8 min. Foi evaporado o solvente e obtiveram-se 9,7 g de um resíduo viscoso que revelou corresponder ao *gama*-hidroxibutirato de metilo e que foi caracterizado por IV, ¹HRMN, ¹³CRMN e EM.

Gama-hidroxibutirato de metilo: rendimento: 57%. Líquido viscoso. IV(KBr): 3418, 2948, 2875, 1728, 1654, 1433, 1360, 1315, 1246, 1196, 1159, 1055, 918, 874, 657, 566, 427 cm⁻¹. ¹H-RMN (300,13 MHz; CD₃COCD₃): δ = 3,71 ppm (s, 1H, OH), 2,44 (t, 2H, J = 7,44 Hz, H_α), 1,79 (qt, 2H, J = 6,86 Hz, H_β), 3,57 (t, 2H, J = 6,28 Hz, H_γ), 3,62 (s, 3H, OCH₃). ¹³C-RMN (75,47 MHz; CD₃COCD₃): δ = 174,7 ppm (CO), 30,9 (C_α), 28,8 (C_β), 61,4 (C_γ), 51,7 (OCH₃). EM: 39 (100), 87 (36), 119 (9) [M+1]⁺, .

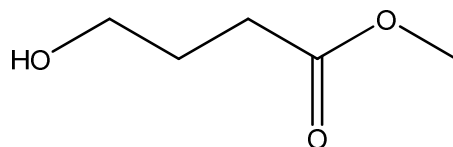


Figura 9: Estrutura do *gama*-hidroxibutirato de metilo

3.6. Ensaio da Estabilidade da GBL e do GHB

Foi estudada a estabilidade da GBL e do GHB em soluções aquosas de etanol e metanol, em concentrações semelhantes às utilizadas como droga de abuso a diferentes pH. Para isso foram preparadas as soluções padrão de acordo com a tabela abaixo.

GBL (10 mg/mL)	Solução etanólica a 40 % (v/v)	Solução etanólica a 40 % (v/v) a pH 2	Solução metanólica a 0,09 % (v/v)	Solução metanólica a 0,09 % (v/v) a pH 2	Cachaça
GHB (10 mg/mL)	Solução etanólica a 40 % (v/v)	Solução etanólica a 40 % (v/v) a pH 2	Solução metanólica a 0,09 % (v/v)	Solução metanólica a 0,09 % (v/v) a pH 2	Cachaça

Tabela 2: Soluções padrão de GBL e GHB.

3.6.1. Estabilidade da GBL

Cada uma das soluções padrão contendo GBL foi extraída com 2 x 50µl de clorofórmio. As fases clorofórmicas foram secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e colocadas num balão graduado de 2,0 mL. O volume foi completado com clorofórmio. Este procedimento originou soluções de GBL na concentração de 1 mg/mL, as quais foram utilizadas nas análises por CG-EM.

3.6.2. Estabilidade do GHB

Cada uma das soluções padrão contendo GHB foi levada à secura com ajuda de corrente de nitrogênio (azoto). Os resíduos foram retomados com metanol até obter soluções de GHB na concentração de 10 mg/mL. A partir destas prepararam-se soluções de GHB na concentração de 0,2 mg/mL. Estas foram adicionadas de solução de 2-hidroxicapróico (0,3 mg/mL), o qual foi utilizado como padrão interno, e foram sujeitas a derivatização com BSTFA. As soluções resultantes da reação de derivatização foram utilizadas nas análises por CG-EM.

Análise por CG-EM

Foi injectado 1 µl de cada uma das soluções e cada análise foi realizada em duplicado.

As condições analíticas para o estudo da GBL foi baseado em Oliveira [39]: injeção em modo *splitless*, temperatura do injetor de 250°C, temperatura inicial do forno de 45°C durante 5 minutos com aumento de 20°C por minuto até atingir a temperatura final de 280°C (Figura 10).

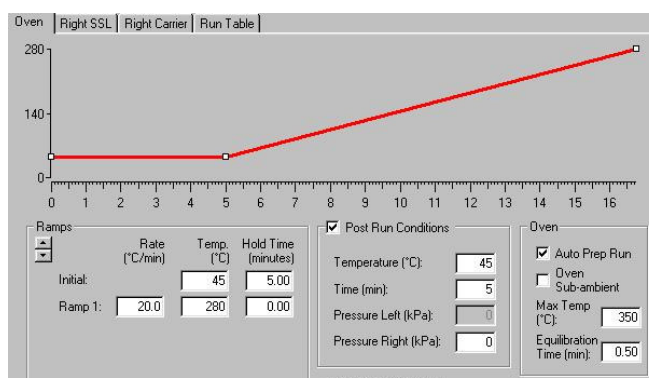


Figura 10: Programa de temperatura do forno utilizado para análise da GBL e ésteres etílico e metílico do GHB.

O espectrômetro de massa foi do tipo ion trap com ionização por impacto eletrônico a 70 eV. A temperatura da linha de transferência foi de 280°C e da fonte iônica foi de 200°C.

Foram feitas análises no modo *full scan*, no qual foi monitorado o intervalo de 15 a 320 m/z. E no modo de seleção de íons mais abundantes SIM (Selected Ion Monitoring), cujos fragmentos escolhidos foram: m/z = 28, 41, 43, 87, 119 e 133.

Nas condições do laboratório, o tempo de retenção encontrado para a GBL foi de 8,13 minutos como observado no cromatograma abaixo (Figura 11).

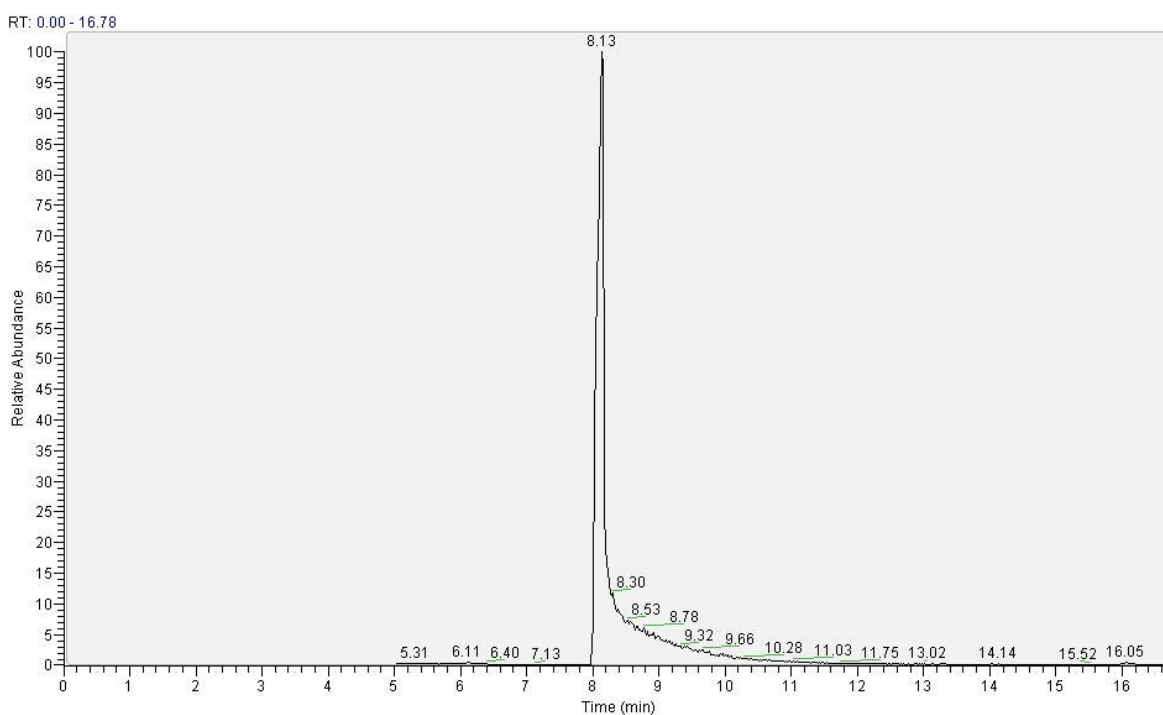


Figura 11: Cromatograma obtido da GBL em clorofórmio $t_R = 8,13$ minutos.

As condições analíticas para o estudo do GHB foi baseado em Oliveira [39]: injeção em modo *splitless*, temperatura do injetor de 250°C, temperatura inicial do forno de 45°C por 3 minutos com aumento de 15°C por minuto até atingir a temperatura final de 280°C (Figura 12).

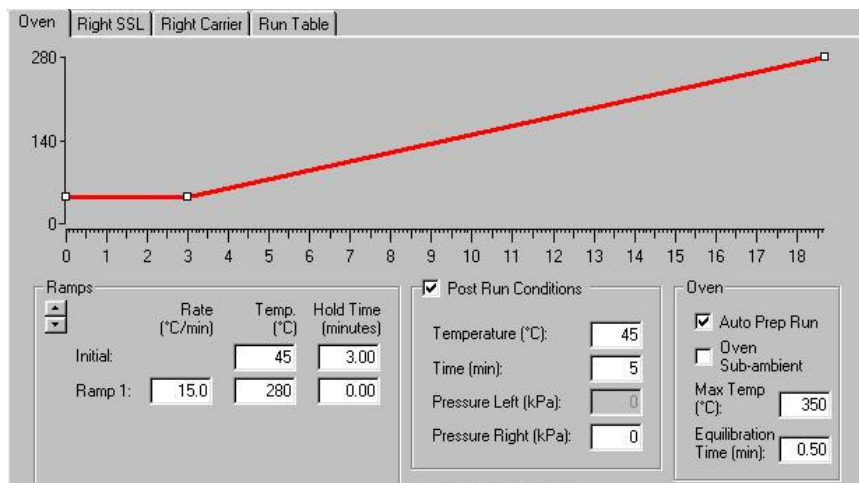


Figura 12: Programa da temperatura do forno utilizado para análise do GHB.

O espectrômetro de massa foi do tipo ion trap com ionização por impacto eletrônico a 70 eV. A temperatura da linha de transferência foi de 280°C e da fonte iônica foi de 200°C.

Foram feitas análises no modo *full scan*, no qual foi monitorado o intervalo de 10 a 320 m/z. E no modo de seleção de íons mais abundantes SIM (Selected Ion Monitoring), cujos fragmentos escolhidos foram: m/z = 42, 116, 147, 159, 204, 232, 233, 261 e 304.

Nas condições do laboratório, o tempo de retenção encontrado para o GHB foi de 10,2 minutos e do 2-hidroxicapróico foi de 10,7 como observado nas figuras 13 e 14.

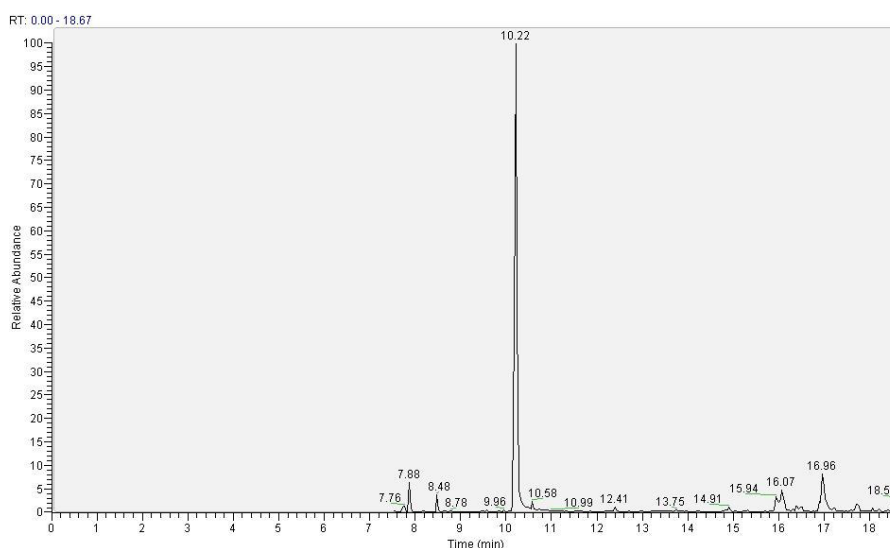


Figura 13: Cromatograma obtido do GHB em acetato de etilo $t_R = 10,22$ minutos.

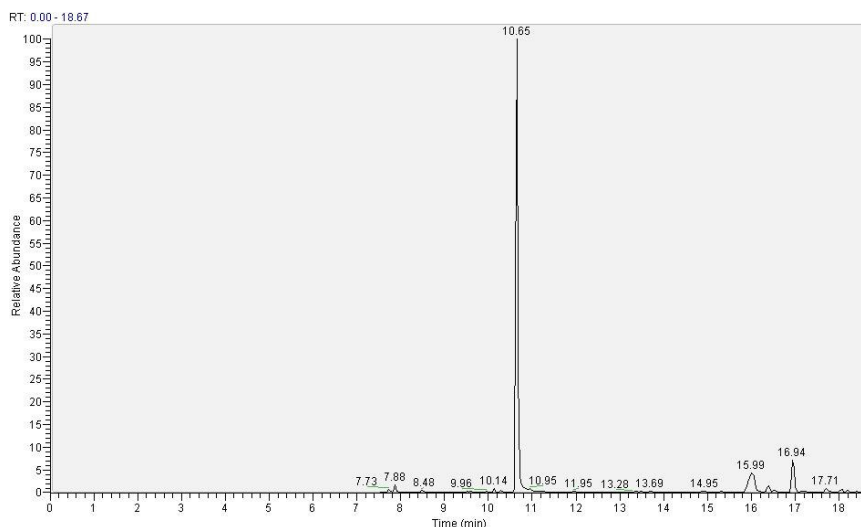


Figura 14: Cromatograma obtido do 2-hidroxicapróico em acetato de etilo $t_R = 10,65$ minutos.

3.7. Estudo da Lactonização dos Ésteres

Para o estudo da lactonização dos ésteres etílico e metílico do GHB foram preparadas soluções destas duas substâncias a concentração de 5mg/mL em cada um dos solventes seguintes: clorofórmio, acetato de etilo e isopropanol.

Análise por CG-EM

Foi injectado 1 μ l de cada uma das soluções e cada análise foi realizada em triplicado.

As amostras foram injectadas em modo *splitless*. Para estudar a influência da temperatura do injectador na lactonização dos ésteres, foram efectuadas análise nas temperaturas seguintes: 80°C, 150°C e 250°C. A temperatura inicial do forno foi de 45°C durante 5 minutos com aumento de 20°C por minuto até atingir a temperatura final de 280°C (Figura 10).

O espectrômetro de massa foi do tipo ion trap com ionização por impacto eletrônico a 70 eV. A temperatura da linha de transferência foi de 280°C e da fonte iônica foi de 200°C.

Foram feitas análises no modo *full scan*, no qual foi monitorado o intervalo de 10 a 320 m/z, e no modo de seleção de íons mais representativos (SIM: Selected Ion Monitoring), em que os fragmentos escolhidos foram: m/z = 28, 41, 43, 87, 119 e 133.

Nas condições do laboratório, o tempo de retenção encontrado para o éster etílico de GHB foi de 9,6 minutos e para o éster metílico de GHB foi de 8,9 minutos com o injetor a 80°C como observado nos cromatogramas abaixo (Figuras 15 e 16).

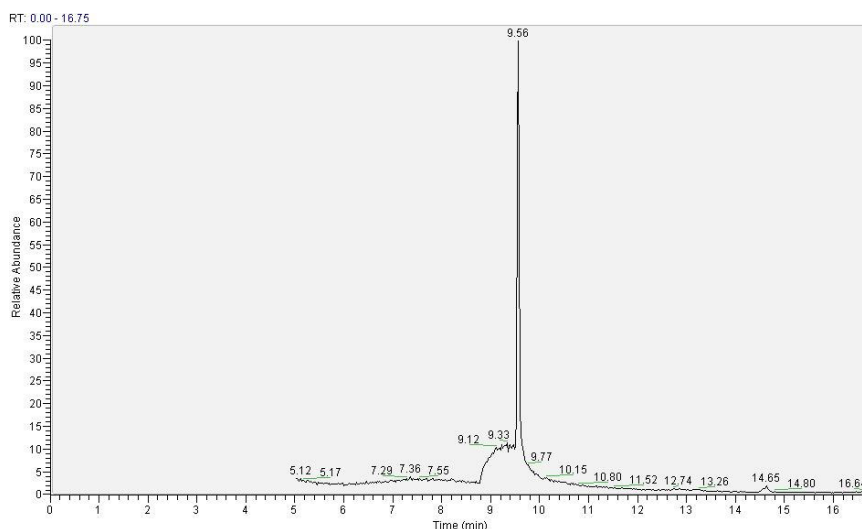


Figura 15: Cromatograma obtido do *gamma*-hidroxibutirato de etilo em acetato de etilo $t_R = 9,56$ minutos.

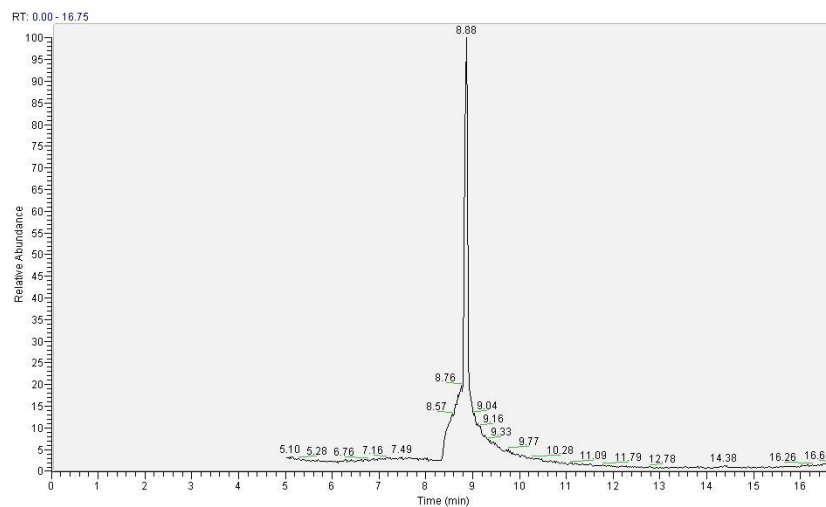


Figura 16: Cromatograma obtido do *gamma*-hidroxibutirato de metilo em acetato de etilo $t_R = 8,88$ minutos.

4. Resultados e Discussão

4.1. Síntese do *gamma*-hidroxibutirato de etilo e do *gamma*-hidroxibutirato de metilo

A síntese foi baseada em Brown e Keblys [40]. Ocorreu a partir da transesterificação da GBL em meio alcoólico e a pH ácido. O mecanismo da reação de alcoólise é a protonação do oxigênio carbonilo da GBL seguido do ataque nucleofílico pelo álcool [8]. Logo, o álcool agiu como um agente nucleofílico e o ácido como um catalisador da reação (Figura 12).

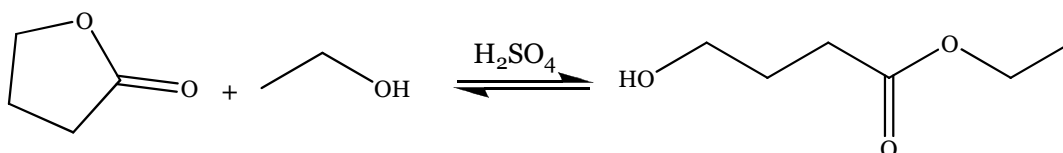


Figura 17: Reação de formação do *gamma*-hidroxibutirato de etilo.

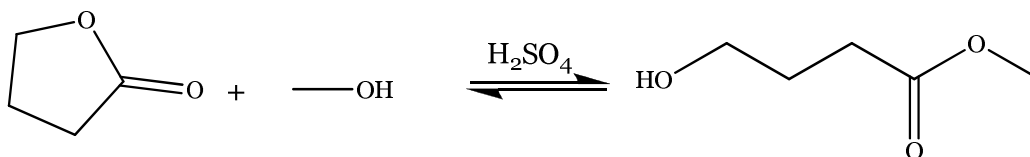


Figura 18: Reação de formação do *gamma*-hidroxibutirato de etilo.

Na purificação por CLAE, foram recolhidos frações na faixa do tempo de retenção em cinza. Como pode ser observado nas figuras 19 e 20.

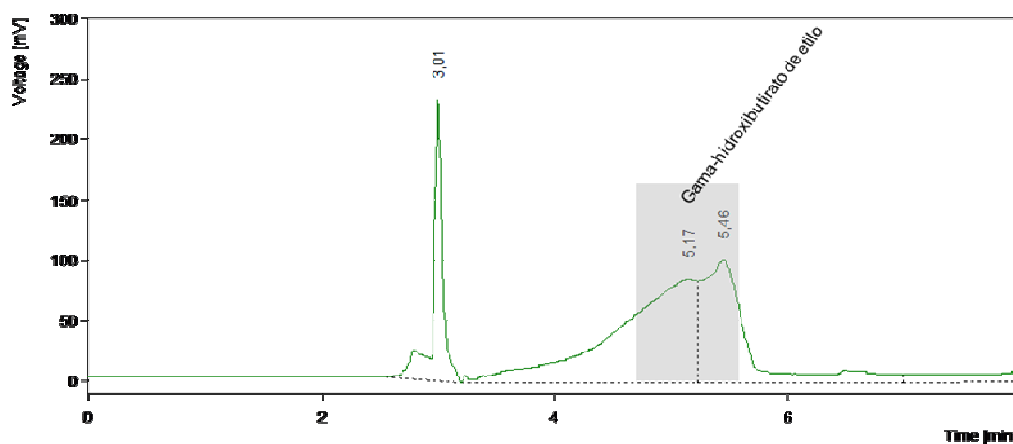


Figura 19: Purificação do *gamma*-hidroxibutirato de etilo ($t_R = 5,46$ minutos). Impureza do solvente ($t_R = 3,01$ minutos).

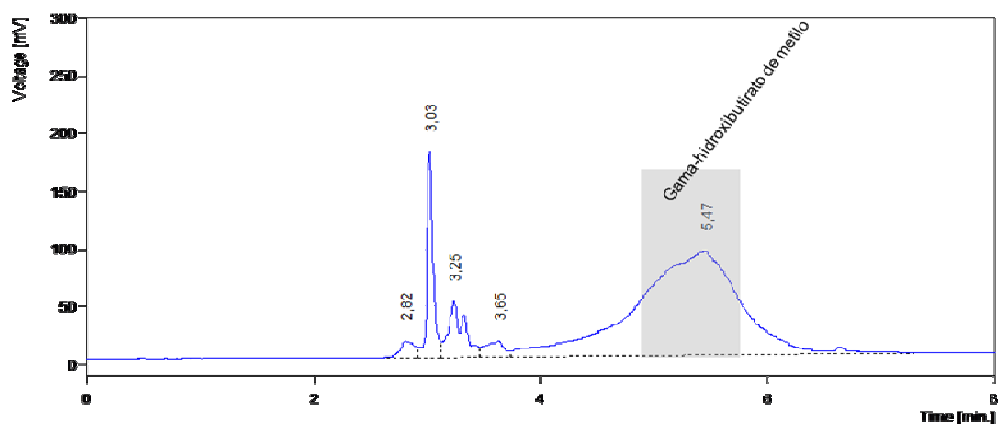


Figura 20: Purificação do *gama*-hidroxibutirato de metilo ($t_R = 5,47$ minutos). Impureza do solvente ($t_R = 3,03$ minutos).

4.2. Caracterização e Elucidação Estrutural do *Gama*-hidroxibutirato de Etilo e do *Gama*-hidroxibutirato de Metilo

4.2.1. Espectrofotometria no Infravermelho

As figuras 21 e 22 apresentam os espectros no IV (KBr) do éster etílico do GHB e do éster metílico do GHB, respectivamente.

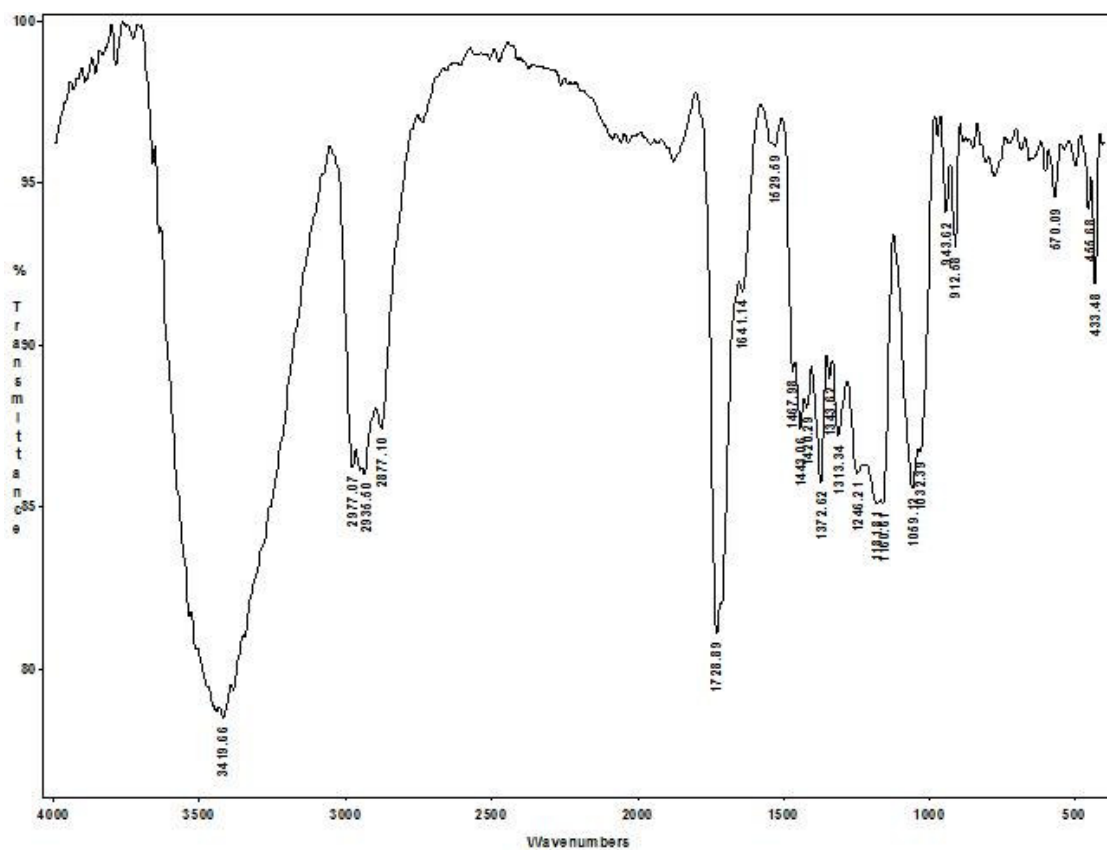


Figura 21: Espectro no infravermelho obtido do *gama*-hidroxibutirato de etilo.

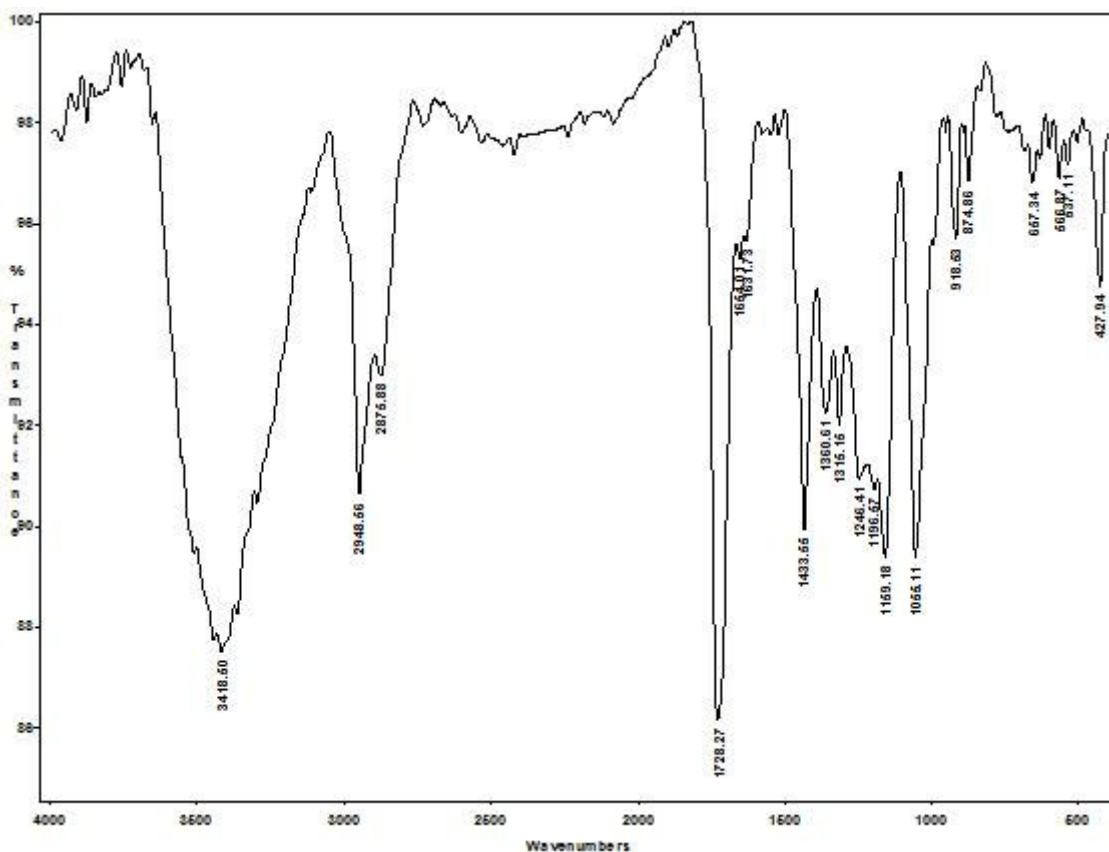


Figura 22: Espectro no infravermelho obtido do *gamma*-hidroxibutirato de metilo.

Nos espectros de ambas as substâncias é de assinalar a absorção forte em 1728 cm^{-1} , originada pela vibração de alongamento-encurtamento da ligação dupla do grupo C=O éster. A ligação CO – O é responsável pelo aparecimento da banda a cerca de 1160 cm^{-1} . A ligação O – H origina a banda larga e intensa em 3418 cm^{-1} . A presença da função álcool é confirmada pela absorção a cerca de 1050 cm^{-1} , resultante da vibração da ligação C – OH. As restantes absorções significativas resultam das vibrações das ligações da cadeia carbonada: C – H ($2950\text{-}2970\text{ cm}^{-1}$) e C – C ($700\text{ - }1300\text{ cm}^{-1}$).

4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear

Ambos os ésteres foram analisados por $^1\text{HRMN}$ e $^{13}\text{CRMN}$.

A figura 23 mostra a atribuição dos sinais observados no espectro $^1\text{HRMN}$ do *gamma*-hidroxibutirato de etilo.

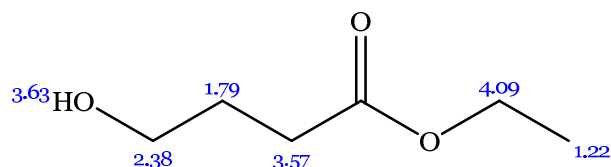


Figura 23: Atribuição dos sinais no espectro $^1\text{HRMN}$ do *gamma*-hidroxibutirato de etilo.

O espectro de $^1\text{HRMN}$ do *gamma*-hidroxibutirato de etilo a 300 MHz em CD_3COCD_3 apresenta um singlete a 3,63 ppm indicando a presença de um grupo hidroxilo, um tripleto a 3,57 ppm com $J = 6,30$ Hz dos hidrogênios no carbono- α , um quinteto a 1,79 ppm com $J = 6,88$ Hz dos hidrogênios no carbono- β , um tripleto a 2,38 ppm com $J = 7,44$ Hz dos hidrogênios no carbono- γ , um quarteto a 4,09 ppm com $J = 7,12$ Hz devido aos hidrogênios do grupo metileno (OCH_2CH_3) e um tripleto a 1,22 ppm com $J = 7,14$ Hz devido aos hidrogênios do grupo metilo (OCH_2CH_3).

A figura 24 mostra a atribuição dos sinais observados no espectro $^{13}\text{CRMN}$ do *gamma*-hidroxibutirato de etilo.

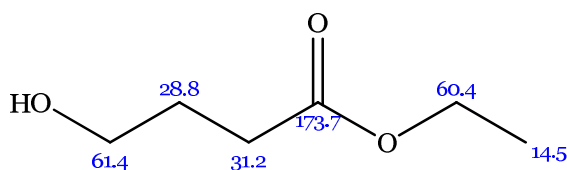


Figura 24: Atribuição dos sinais no espectro $^{13}\text{CRMN}$ do *gamma*-hidroxibutirato de etilo.

O espectro de $^{13}\text{CRMN}$ do *gamma*-hidroxibutirato de etilo a 75 MHz em CD_3COCD_3 apresentou sinais em $\delta = 173,7$ ppm referentes ao carbono carbonílico, $\delta = 31,2$ ppm do carbono- α , $\delta = 28,8$ ppm carbono- β , $\delta = 61,4$ ppm carbono- γ , $\delta = 60,4$ ppm do carbono metilénico (OCH_2CH_3) e $\delta = 14,5$ ppm do carbono metílico (OCH_2CH_3).

A figura 25 mostra a atribuição dos sinais observados no espectro $^1\text{HRMN}$ do *gamma*-hidroxibutirato de metilo.

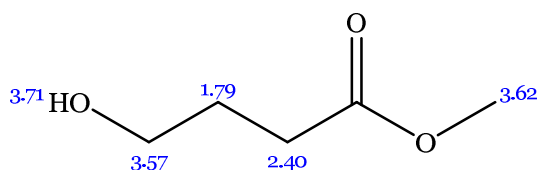


Figura 25: Atribuição dos sinais no espectro $^1\text{HRMN}$ do *gamma*-hidroxibutirato de metilo.

O espectro de $^1\text{HMRN}$ do *gama*-hidroxibutirato de metilo a 300 MHz em CD_3COCD_3 apresenta um singlete a 3,71 ppm indicando a presença de um grupo hidroxilo, um tripleto a 2,40 ppm com $J = 7,44$ Hz dos hidrogênios no carbono- α , um quinteto a 1,79 ppm com $J = 6,86$ Hz dos hidrogênios no carbono- β , um tripleto a 3,57 ppm com $J = 6,28$ Hz dos hidrogênios no carbono- γ e um singlete a 3,62 ppm devido aos hidrogênios do grupo metilo (OCH_3).

A figura 26 mostra a atribuição dos sinais observados no espectro $^{13}\text{CRMN}$ do *gama*-hidroxibutirato de metilo.

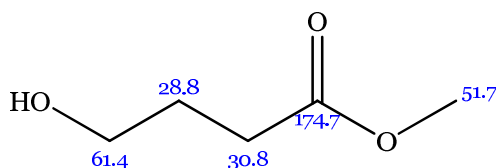


Figura 26: Atribuição dos sinais no espectro $^{13}\text{CRMN}$ do *gama*-hidroxibutirato de metilo.

O espectro de $^{13}\text{CRMN}$ do *gama*-hidroxibutirato de metilo a 75 MHz em CD_3COCD_3 apresentou sinais em $\delta = 174,7$ ppm referentes ao carbono carbonílico, $\delta = 30,8$ ppm do carbono- α , $\delta = 28,8$ ppm carbono- β , $\delta = 61,4$ ppm carbono- γ e $\delta = 51,7$ ppm do carbono metílico (OCH_3).

4.2.3. Espectrometria de Massa

As figuras 27 e 28 apresentam os espectros de massa do *gama*-hidroxibutirato de etilo e do *gama*-hidroxibutirato de metilo, respectivamente, obtidos pelo detector de massas do equipamento de CG-EM utilizado neste trabalho.

Deve-se assinalar o fato do íon molecular estar ausente em ambas as substâncias. Este fato ocorre com frequência com ésteres e álcoois saturados, os quais têm tendência a sofrer protonação originando o íon $M+1$ mais intenso e visível que o íon molecular. Este fato faz com que, muitas vezes, seja o pico $M+1$ que permite diagnosticar o valor da massa molecular do éster ou álcool saturado em análise. No caso presente é relevante o fato do valor de m/z do íon molecular protonado do éster etílico ser de intensidade muito significativa.

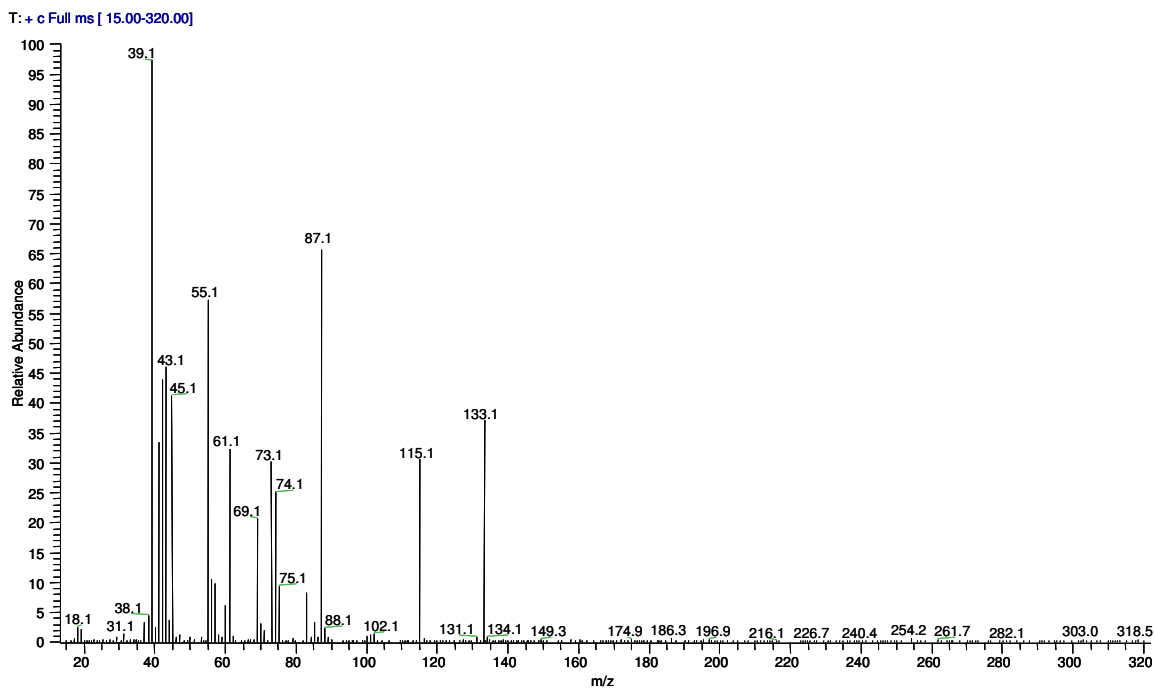


Figura 27: Espectro de massa (IE) do *gama*-hidroxibutirato de etilo.

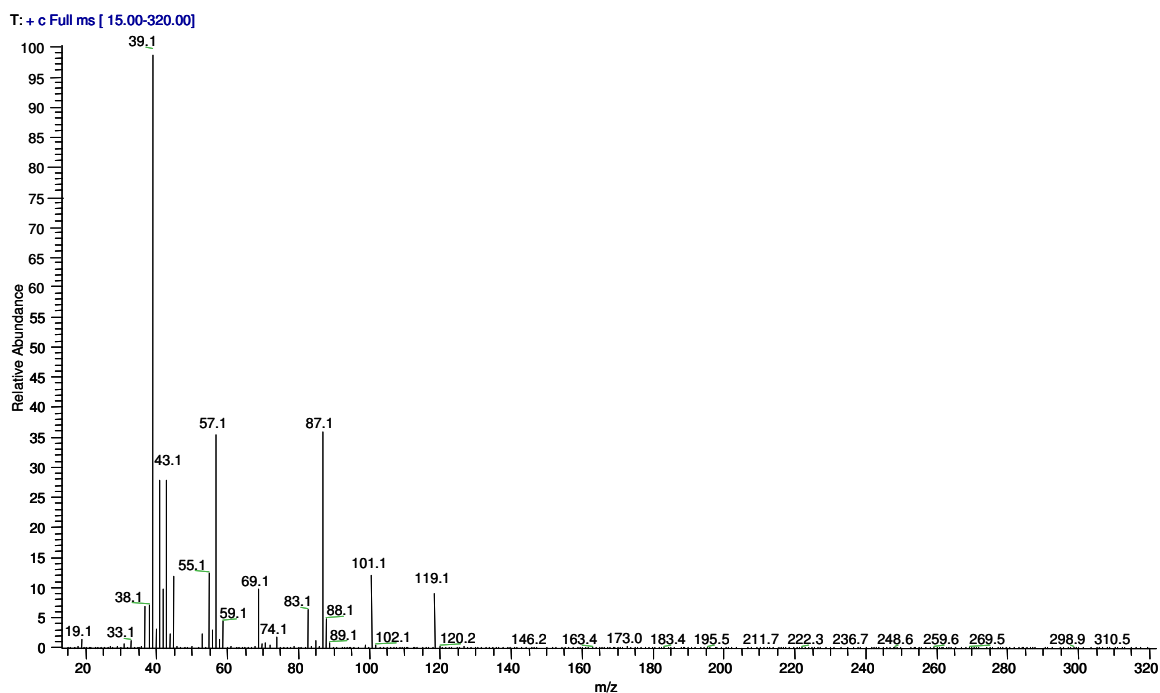


Figura 28: Espectro de Massas (IE) do *gama*-hidroxibutirato de metilo.

Os picos com $m/z = 115$ e $m/z = 101$ resultam da perda de água a partir do íon molecular protonado dos ésteres etílico e metílico, respectivamente.

No espectro de massa do éster etílico, o pico com valor de $m/z = 87$ pode justificar-se por descarboxilação (- COO) ou por perda de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, resultante da quebra *alfa* ao carbonilo; o pico com valor de $m/z = 88$ pode originar-se de duas formas distintas: por perda de - COOH (descarboxilações e perdas de COOH são frequentes em ésteres saturados) ou por rearranjo de McLafferty (Figura 29).

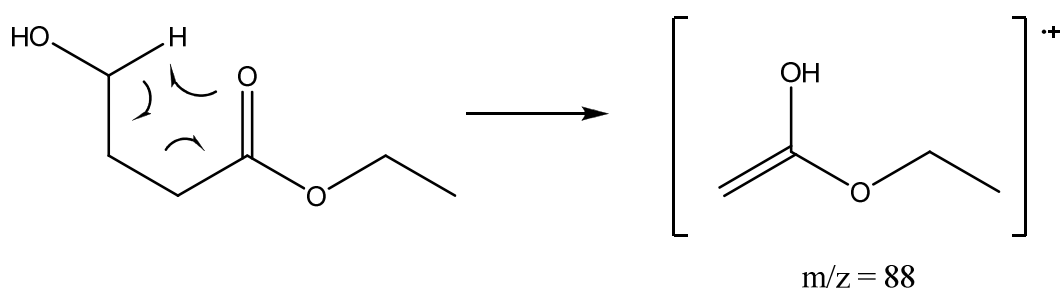


Figura 29: Rearranjo de MacLafferty do gama-hidroxibutirato de etilo.

No espectro de massa do éster metílico, o pico com valor de $m/z = 87$ pode justificar-se pela perda de CH_3O (Figura 30).

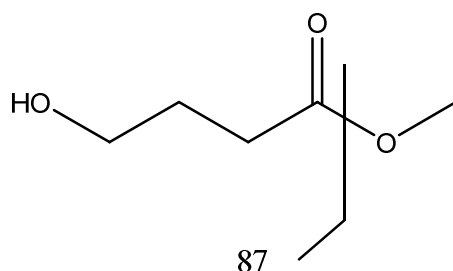
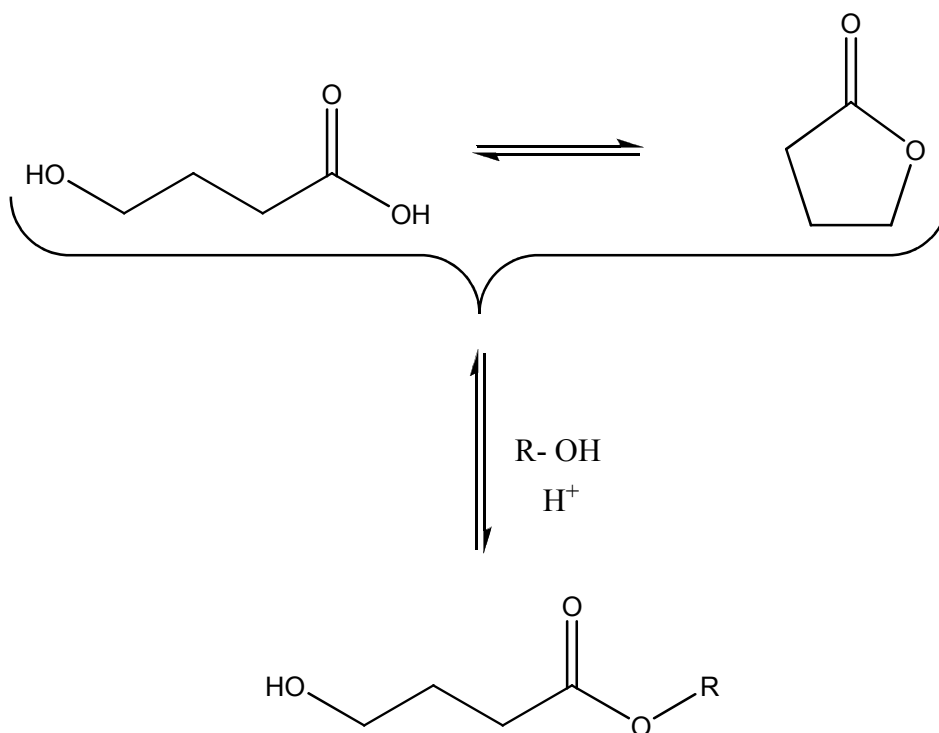


Figura 30: Formação do íon com $m/z = 87$ a partir do gama-hidroxibutirato de metilo.

4.3. Estabilidade do GHB e da GBL em soluções e bebidas alcoólicas

O GHB e a GBL são frequentemente administrados em bebidas alcoólicas. Uma vez que, quimicamente, se trata de um ácido carboxílico e de uma lactona (éster cíclico), é de admitir que em presença do etanol e do metanol (álcoois naturais das bebidas alcoólicas), possam ocorrer reacções de esterificação conducentes à formação de *gama*-hidroxibutirato de etilo e de *gama*-hidroxibutirato de metilo (Figura 31)



R = CH₂CH₃: *gama*-hidroxibutirato de etilo
 R = CH₃: *gama*-hidroxibutirato de metilo

Figura 31: Formação hipotética dos ésteres etílico e metílico do GHB em bebidas alcoólicas

A transformação de GHB nos ésteres etílico e metílico corresponde a uma esterificação directa, enquanto que a transformação da GBL nos mesmos ésteres corresponde a uma transesterificação.

No sentido de observar a possibilidade acima aventada e, caso ela ocorra, avaliar também a extensão da formação de ésteres do etanol e do metanol a partir do GHB e da GBL, prepararam-se soluções etanólicas e metanólicas de GHB e GBL e adicionaram-se aquelas substâncias a uma bebida alcoólica, uma cachaça brasileira. A cachaça, uma aguardente apresentava um teor em etanol de 40% e o teor em metanol, tratando-se de uma bebida branca, rondará os 0,09%.

Uma vez que o tempo e o pH são parâmetros que poderão condicionar fortemente as reacções de esterificação acima referidas, prepararam-se soluções etanólicas e metanólicas de GHB e GBL sem alterar o pH e prepararam-se soluções etanólicas e metanólicas de GHB e GBL de pH 2. A escolha de pH ácido favorece a formação dos ésteres, uma vez que a reacção de esterificação é ácido catalisada. Em relação ao tempo, as soluções preparadas foram estudadas entre

o e até um máximo de 200 H. Nas primeiras 12 horas de contacto recolheram-se alíquotas de 1 em 1 hora. Depois das 12 horas, foram recolhidas alíquotas de 24 em 24H. Cada uma das alíquotas foi analisada por CG-EM, nas condições já referidas na parte experimental.

Prepararam-se também soluções em branco que permitiram verificar a ausência de efeitos de interferências da matriz. Assim, pôde confirmar-se que, nas condições cromatográficas adotadas, não se observa qualquer pico de qualquer substância interferente com os mesmos tempos de retenção dos GHB, GBL, éster etílico do GHB e éster metílico do GHB. Este facto ocorre para as soluções padrão preparadas e também para a cachaça.

A formação dos ésteres foi monitorizada avaliando 2 aspectos diferentes: o desaparecimento das soluções do GHB e da GBL adicionados e a formação dos ésteres etílico e metílico do GHB.

As figuras 32 a 36 mostram o desaparecimento do GHB ao longo do tempo.

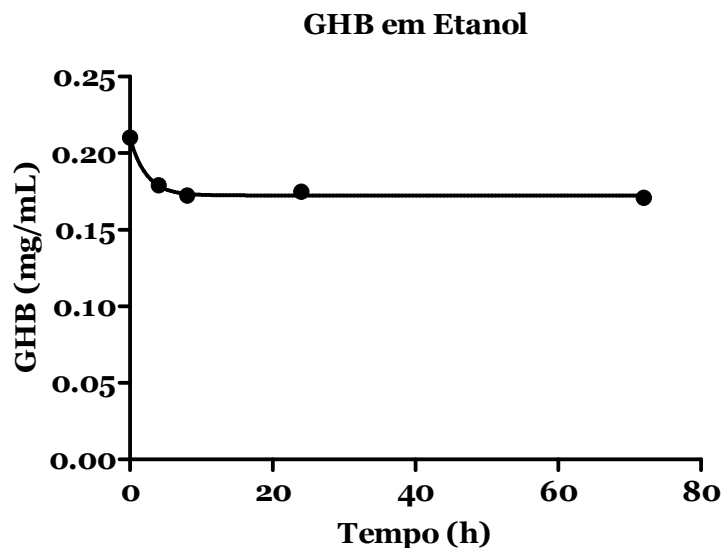


Figura 32: Concentração de GHB em etanol ao longo do tempo.

GHB em Etanol pH2

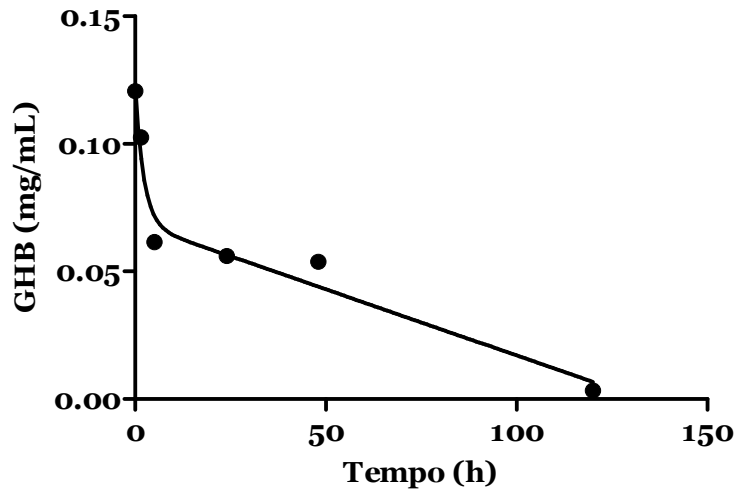


Figura 33: Concentração de GHB em etanol pH2 ao longo do tempo.

GHB em Metanol

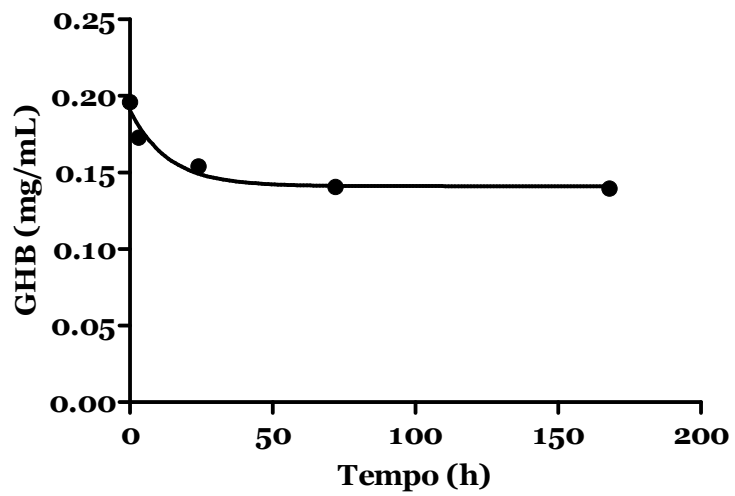


Figura 34: Concentração de GHB em metanol ao longo do tempo.

GHB em Metanol pH2

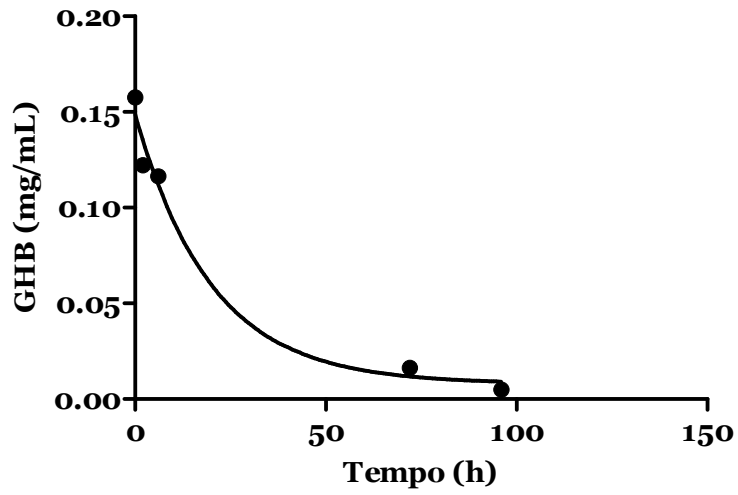


Figura 35: Concentração de GHB em metanol pH2 ao longo do tempo.

GHB em Cachaça

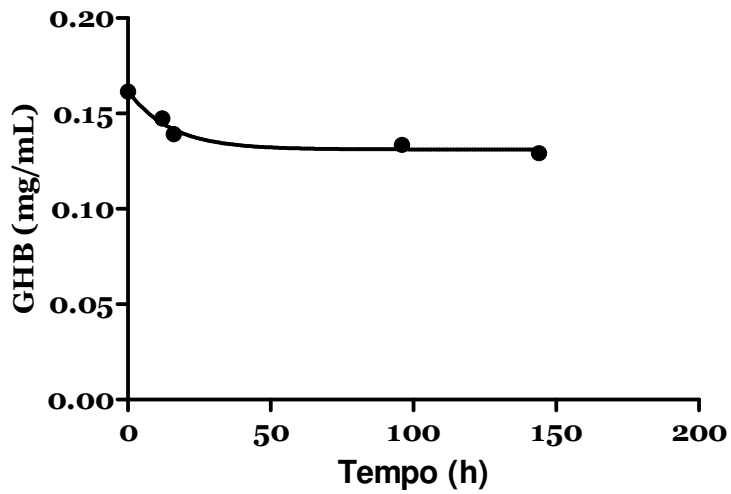


Figura 36: Concentração de GHB em Cachaça.

As figuras 37 e 38 mostram os cromatogramas da solução etanólica do GHB no tempo zero e às 72 horas.

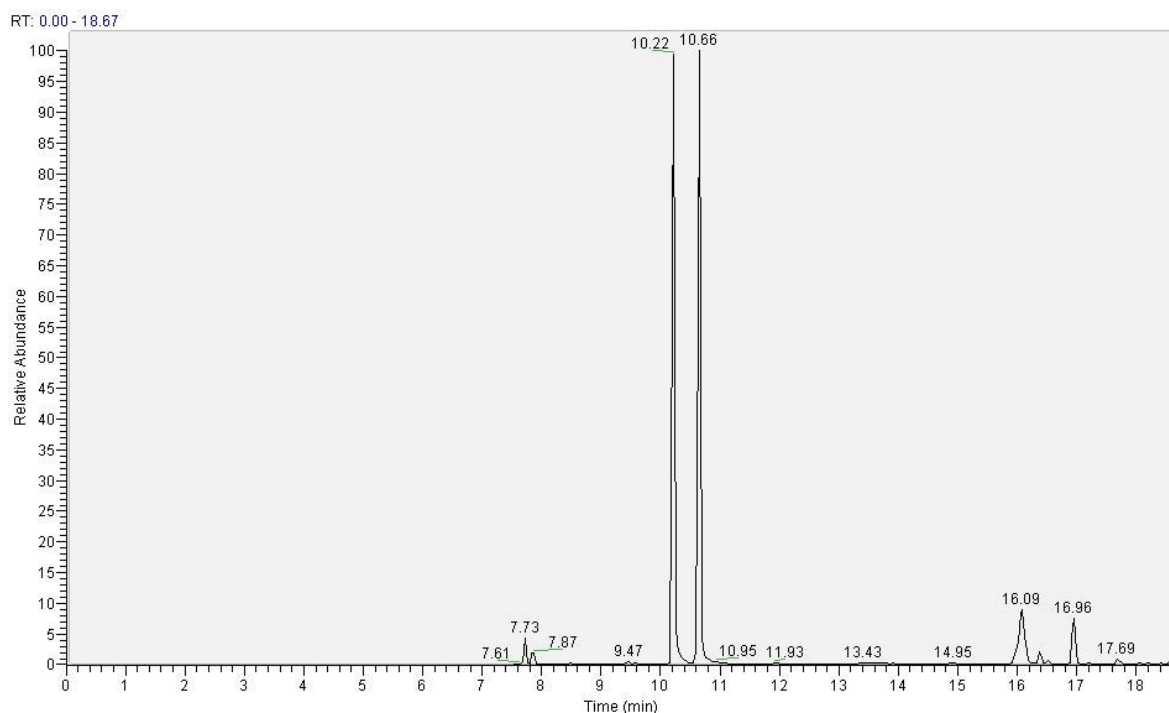


Figura 37: Cromatograma do GHB em etanol t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

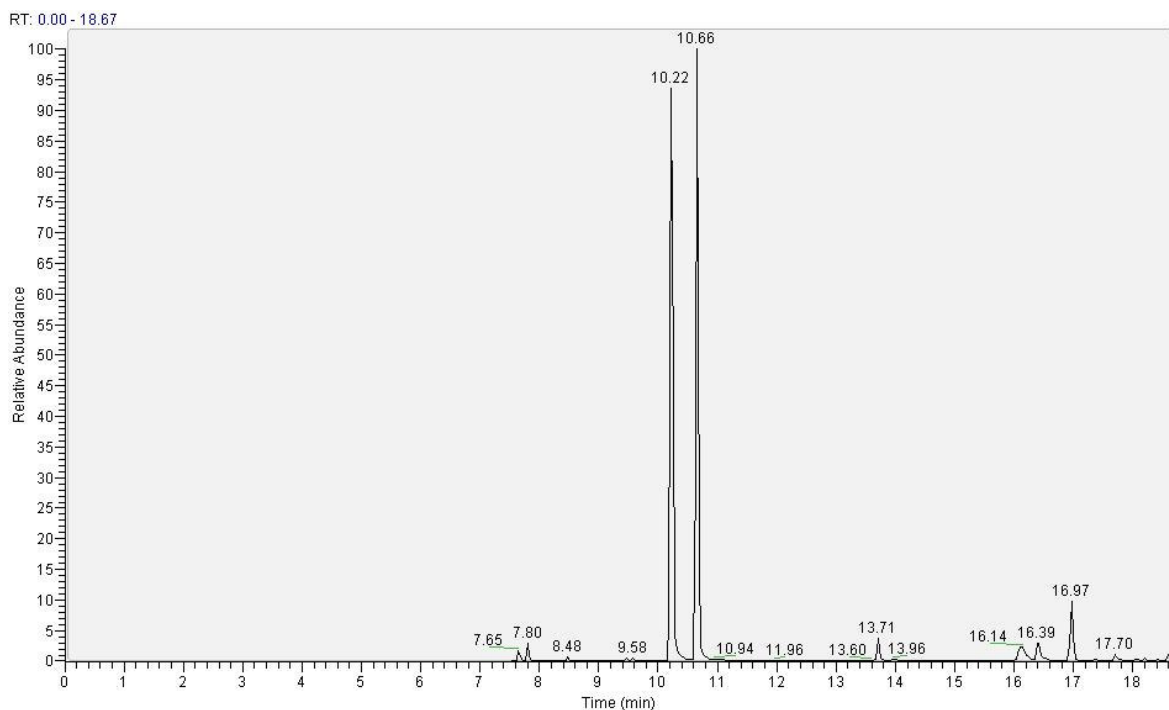


Figura 38: Cromatograma do GHB em etanol t=72h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

As figuras 39 e 40 mostram os cromatogramas da solução etanólica do GHB a pH 2 no tempo zero e às 120 horas.

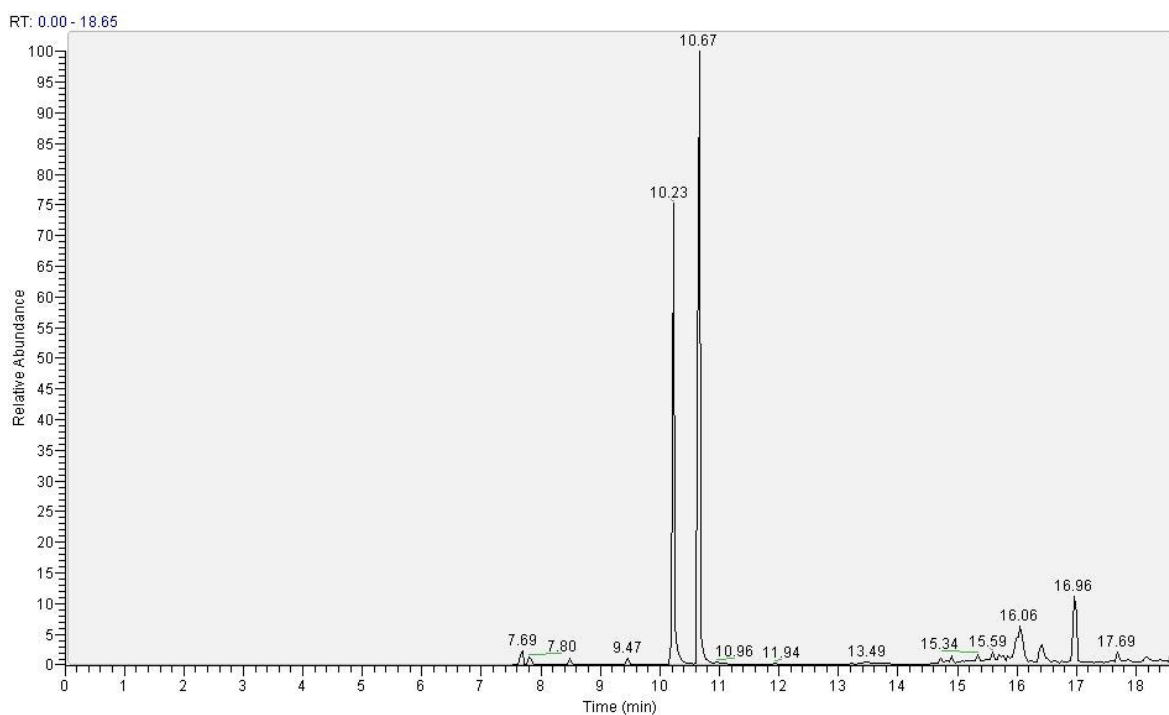


Figura 39: Cromatograma do GHB em etanol a pH2 t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

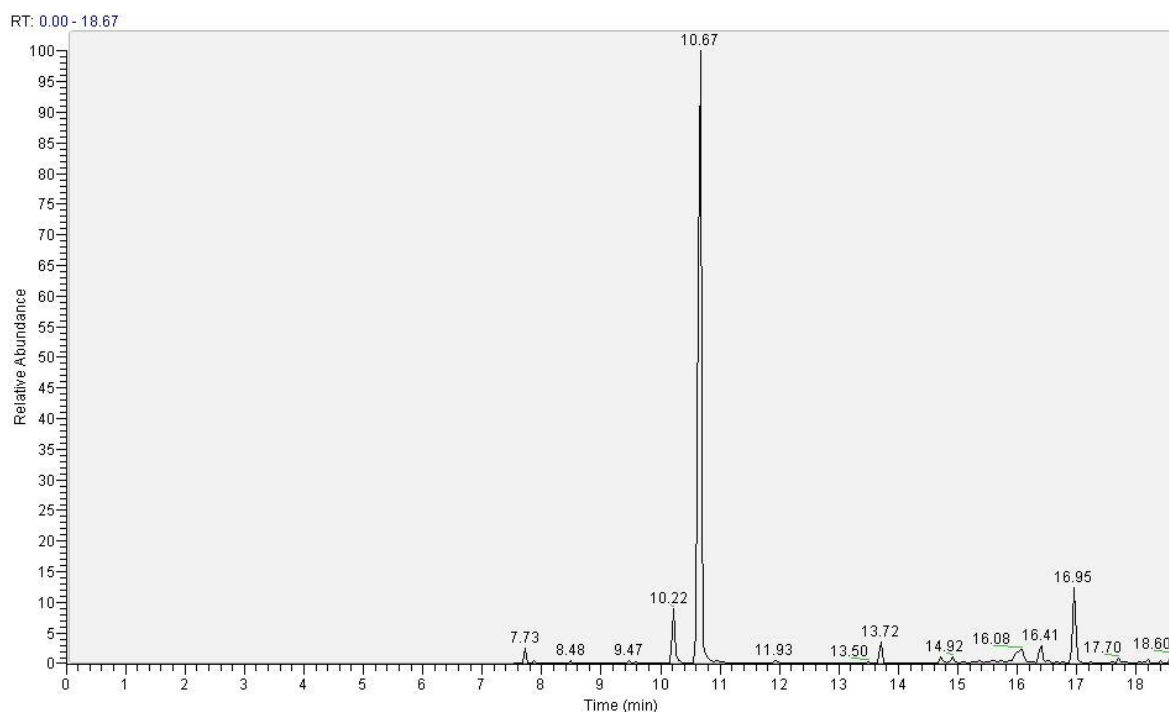


Figura 40: Cromatograma do GHB em etanol a pH 2 t=120h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

As figuras 41 e 42 mostram os cromatogramas da solução metanólica do GHB no tempo zero e às 168 horas.

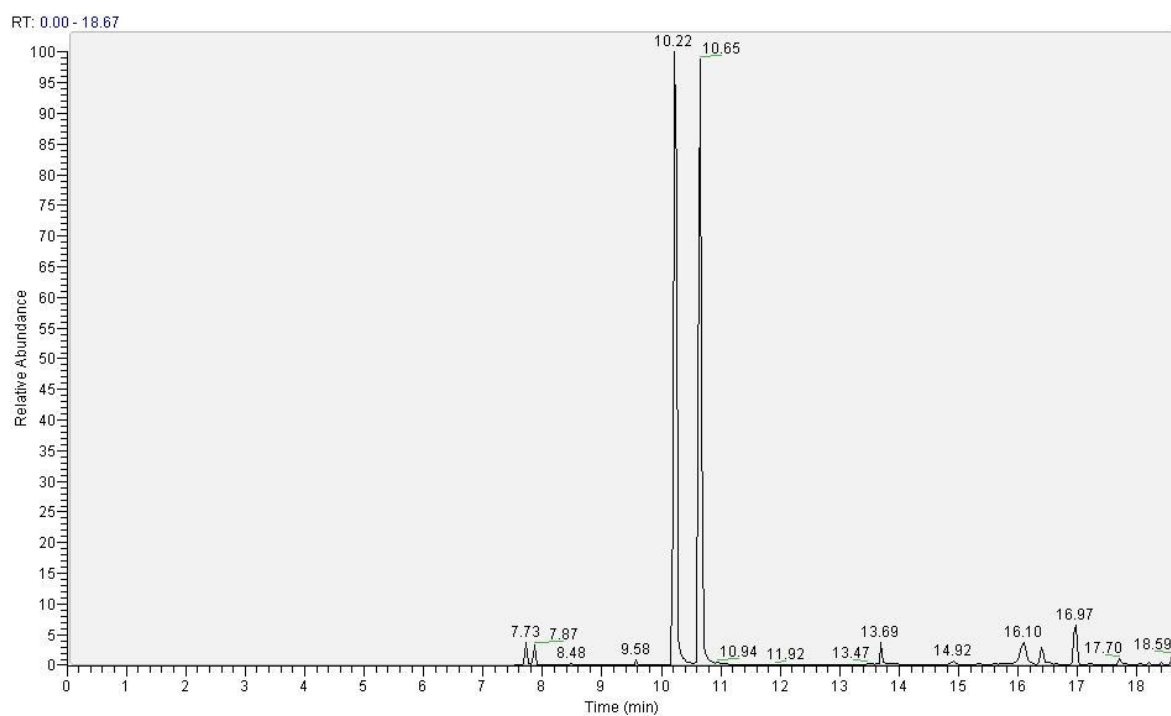


Figura 41: Cromatograma do GHB em metanol t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

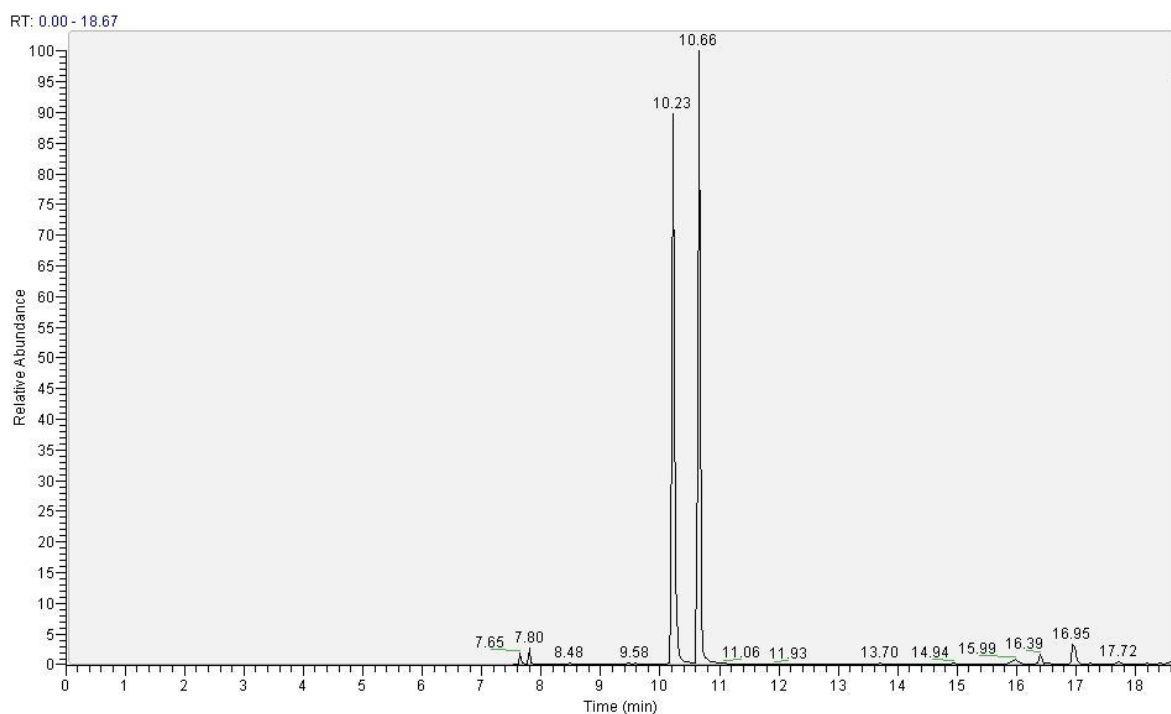


Figura 42: Cromatograma do GHB em metanol t=168h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

As figuras 43 e 44 mostram os cromatogramas da solução metanólica a pH 2 do GHB no tempo zero e às 96 horas.

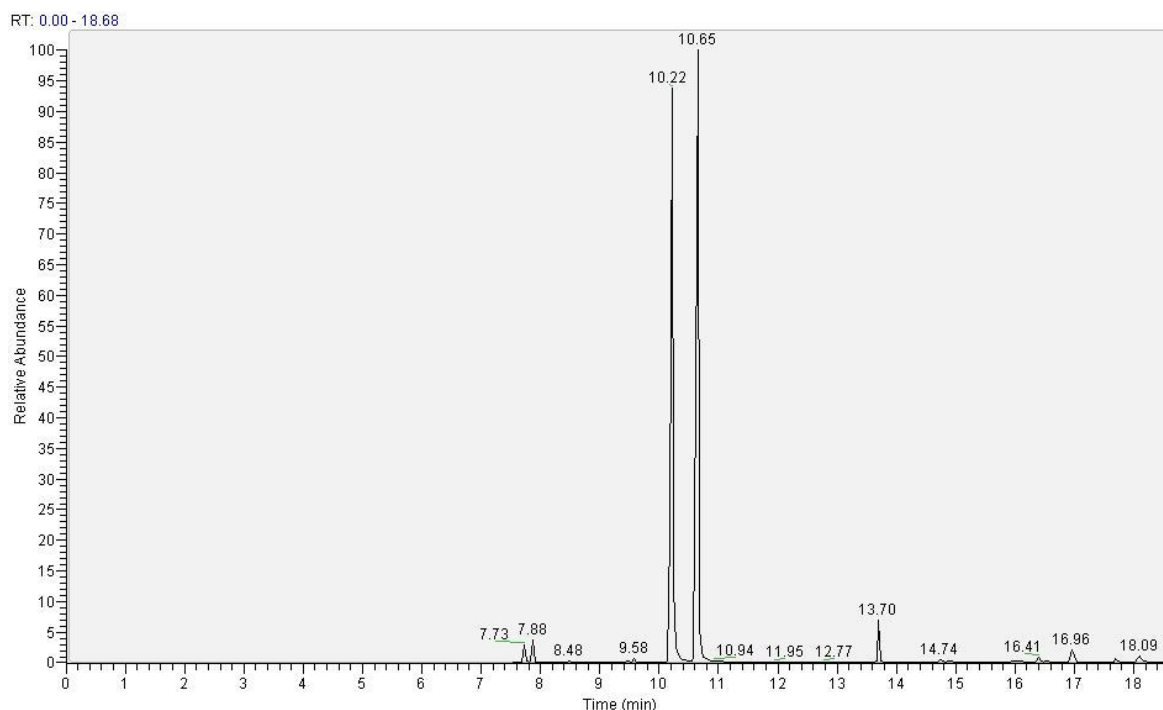


Figura 43: Cromatograma do GHB em metanol a pH 2 t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

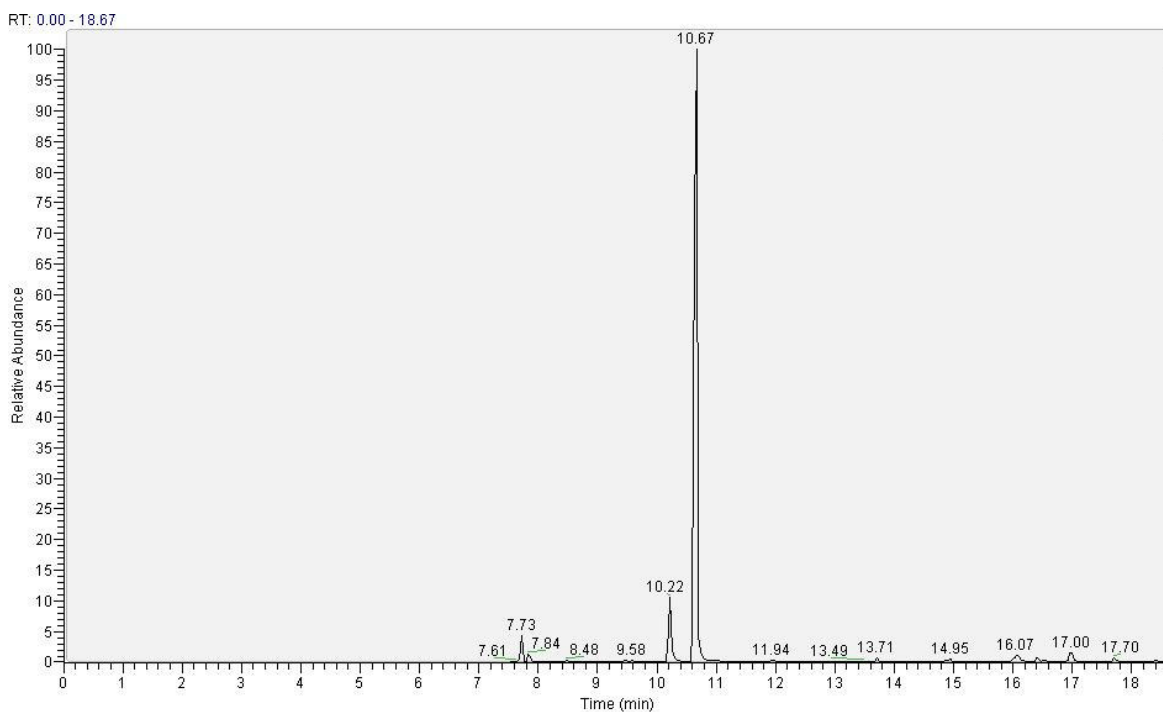


Figura 44: Cromatograma do GHB em metanol a pH 2 t=96h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

As figuras 45 e 46 mostram os cromatogramas do GHB em cachaça no tempo zero e às 144 horas.

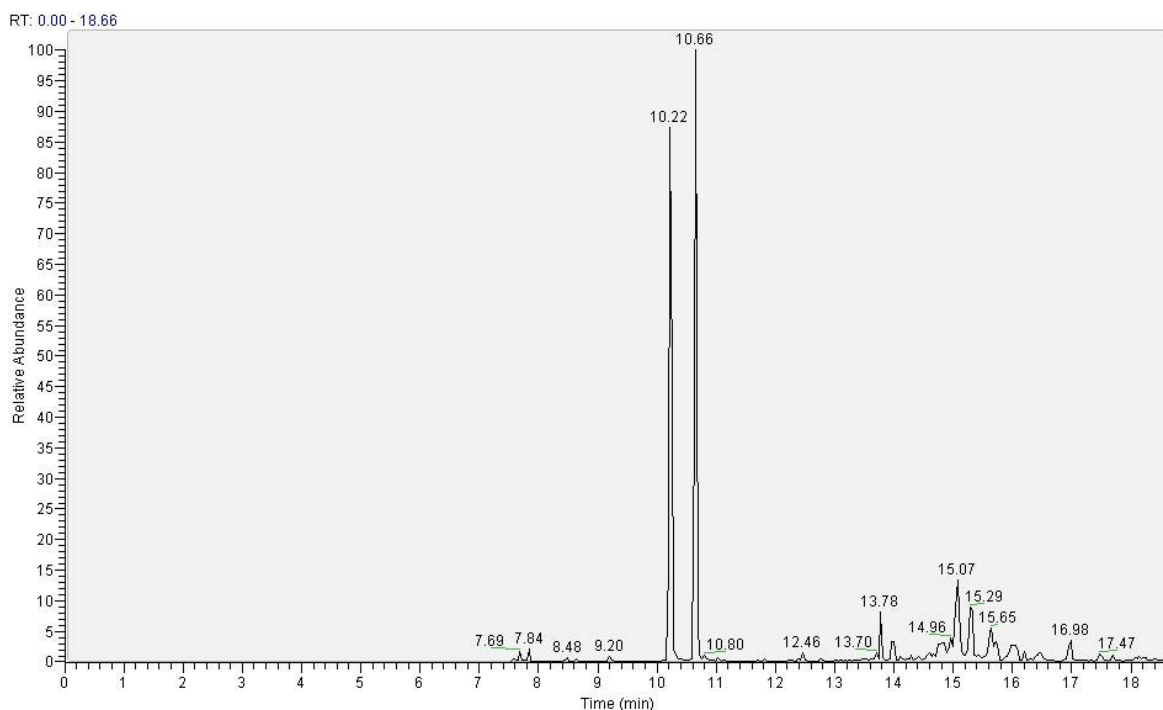


Figura 45: Cromatograma do GHB em cachaça t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

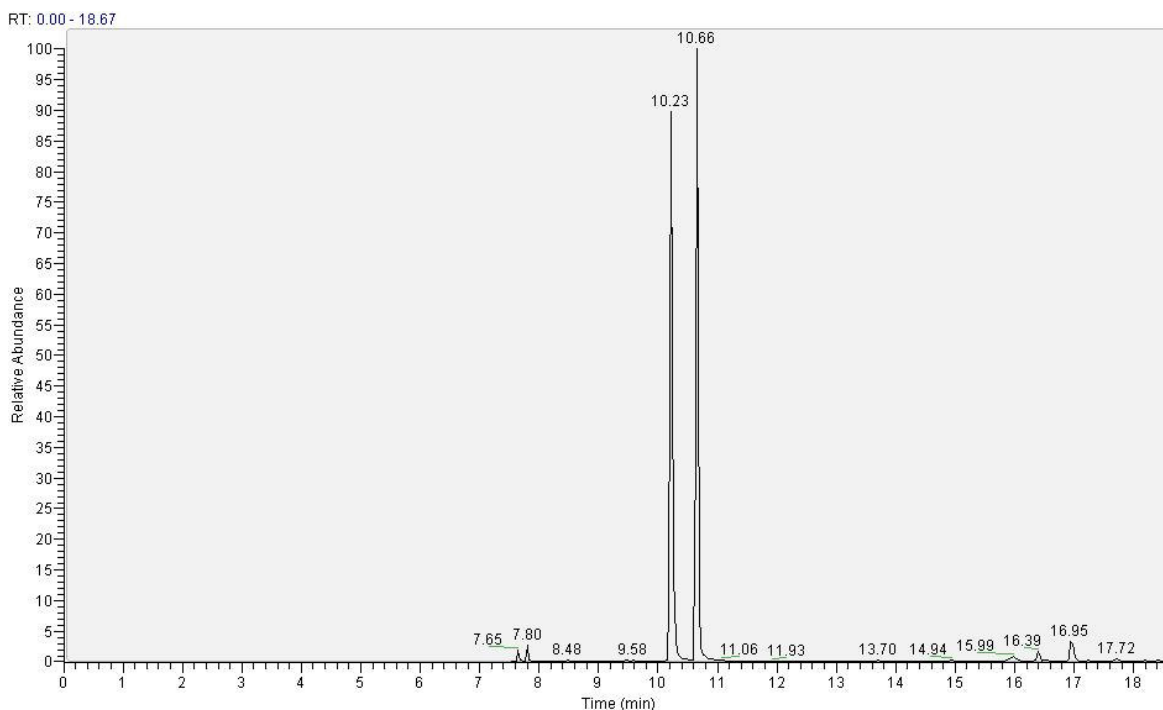


Figura 46: Cromatograma do GHB em cachaça t=144h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

A análise dos gráficos e cromatogramas apresentados (Figuras 32 a 46) permite concluir que há desaparecimento de GHB, mas não se detecta a formação de outras substâncias ao longo do tempo. Para a interpretação deste facto contribui a circunstância que o método que permite a análise de GHB por CG-EM exige que a hidroxiácido seja derivatizado. Assim, algumas das substâncias eventualmente formadas poderão ter sido destruídas durante o procedimento de derivatização. Entre elas, poderão estar os ésteres etílico e metílico do GHB.

Outro aspecto relevante é a importância do pH para o desaparecimento do GHB. É possível verificar que nas soluções de pH 2, quer etanólicas, quer metanólicas, o desaparecimento de GHB ao longo do tempo é muito mais considerável do que nas soluções em que não se baixou o pH. Este facto pode explicar-se admitindo que está associada ao desaparecimento de GHB uma reacção ácido dependente ou ácido catalisada, como acontece com as esterificações.

É também possível verificar que, nas soluções de pH 2, a velocidade de desaparecimento do GHB é maior na solução metanólica do que na solução etanólica. Este facto poderá significar que as reacções que provocam o consumo de GHB são mais rápidas com o metanol do que com o etanol.

Finalmente, é de assinalar que a pH2 o desaparecimento de GHB é total ao fim de cerca de 100 horas em solução metanólica e ao fim de cerca de 120 horas em solução etanólica.

As figuras 47 a 51 mostram o desaparecimento da GBL ao longo do tempo.

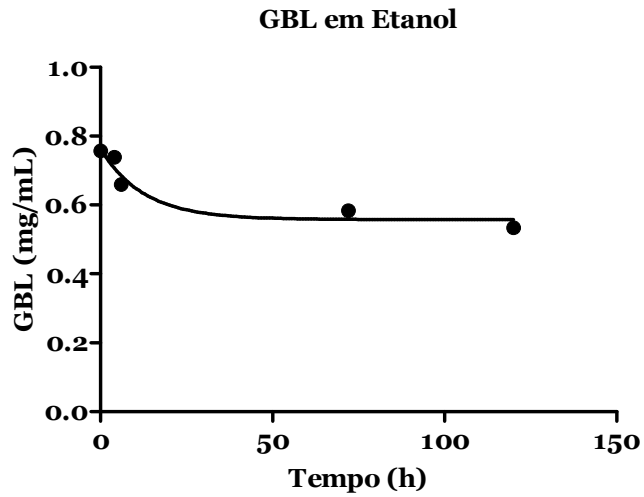


Figura 47: Gráfico da GBL em etanol.

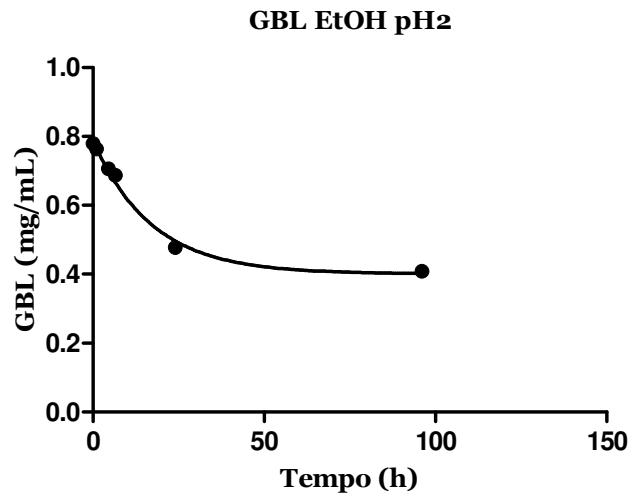


Figura 48: Gráfico da GBL em etanol a pH2.

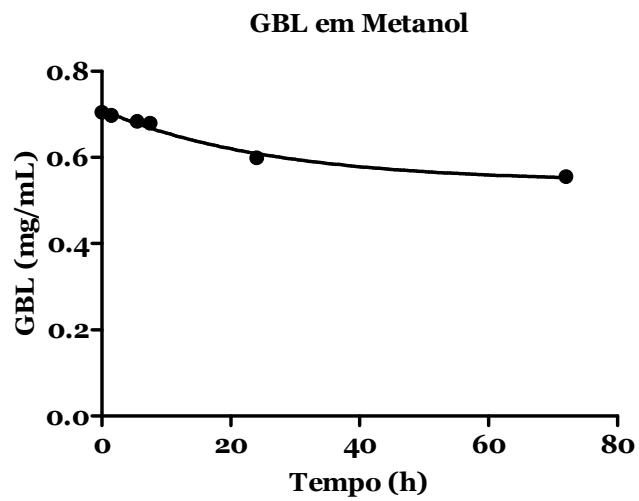


Figura 49: Gráfico da GBL em metanol.

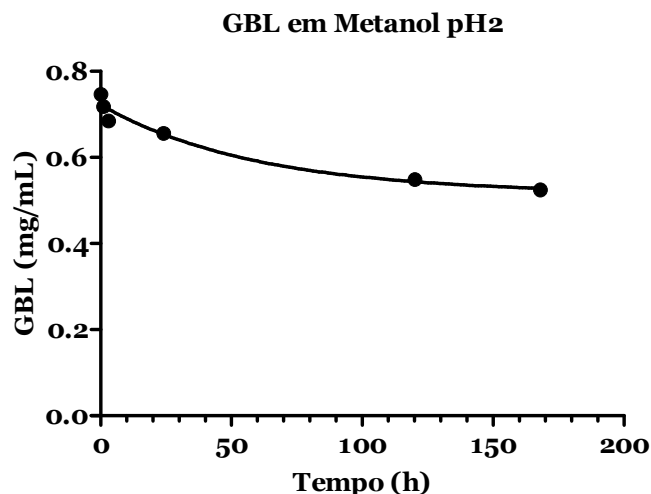


Figura 50: Gráfico da GBL em metanol a pH2.

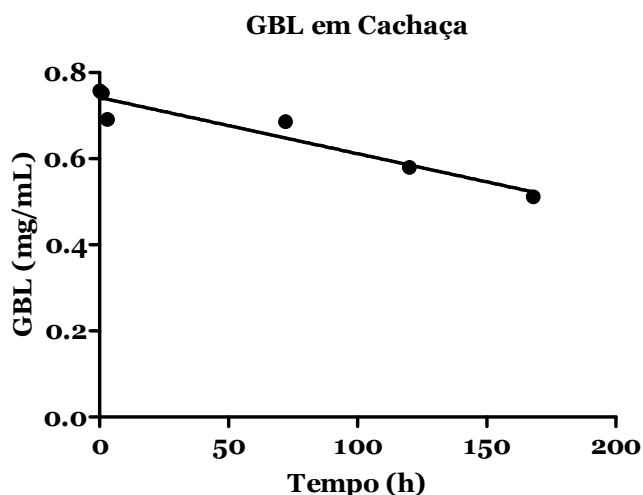
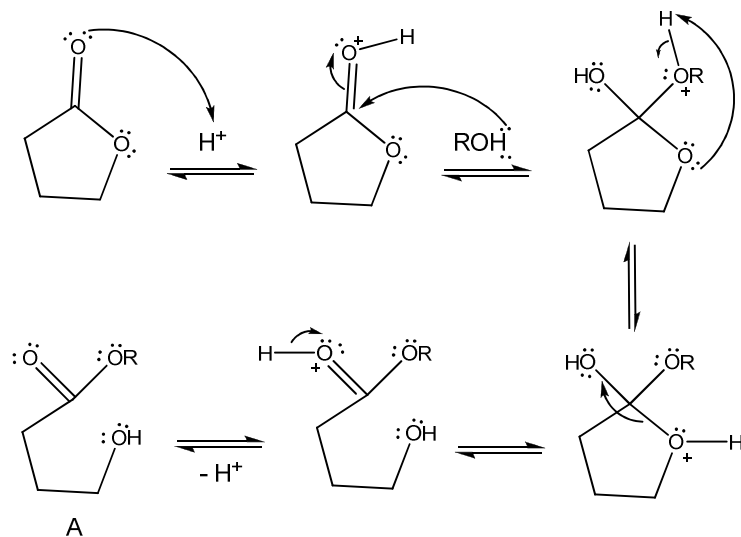


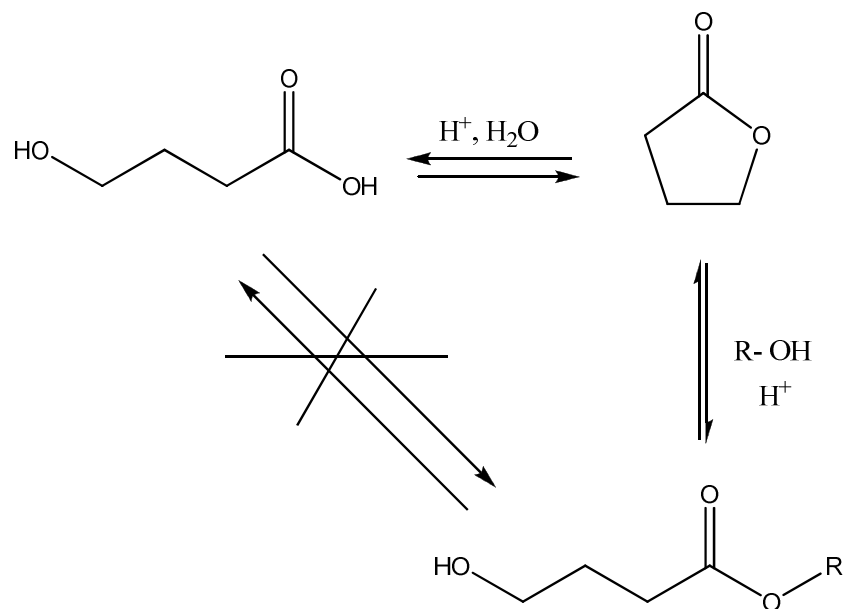
Figura 51: Gráfico da GBL em cachaça.

A transformação da GBL nos ésteres etílico e metílico corresponde a uma transesterificação, cujo mecanismo está representado na figura 52. No caso presente há a transformação de um éster cíclico num éster linear. De acordo com *Hennessy, Moane e McDermott* [8] a obtenção dos ésteres etílico e metílico do GHB tem necessariamente de ocorrer a partir da GBL. Ou seja, o GHB não esterifica diretamente, ocorrendo antes a transformação de GHB em GBL, a qual então transesterifica com o etanol e o metanol para originar os ésteres etílico e metílico, respectivamente (Figura 53).



R = CH₃CH₂ : A = *Gama*-hidroxibutirato de etilo
 R = CH₃: A = *Gama*-hidroxibutirato de metilo

Figura 52: Mecanismo de reação de transesterificação da GBL.



R = CH₂CH₃: *gama*-hidroxibutirato de etilo
 R = CH₃: *gama*-hidroxibutirato de metilo

Figura 53: Formação dos ésteres etílico e metílico do GHB. Adaptado de [8].

As figuras 54 e 55 mostram os cromatogramas da solução etanólica da GBL no tempo zero e às 100 horas.

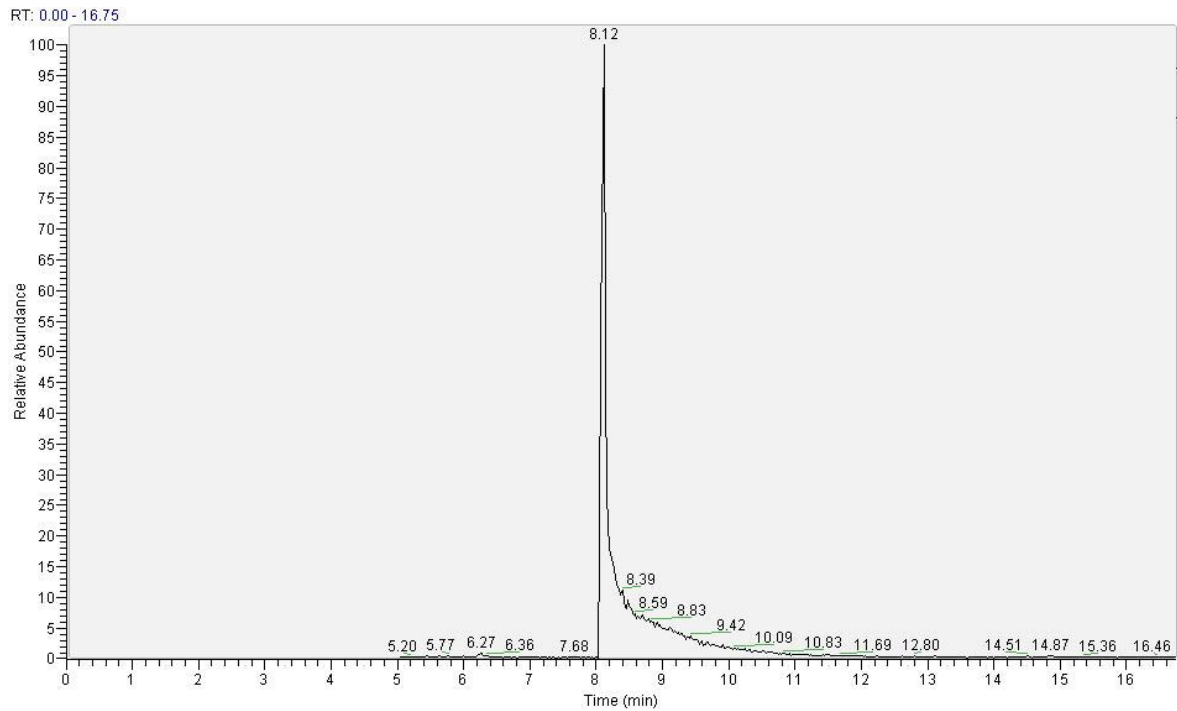


Figura 54: Cromatograma do GBL em etanol t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

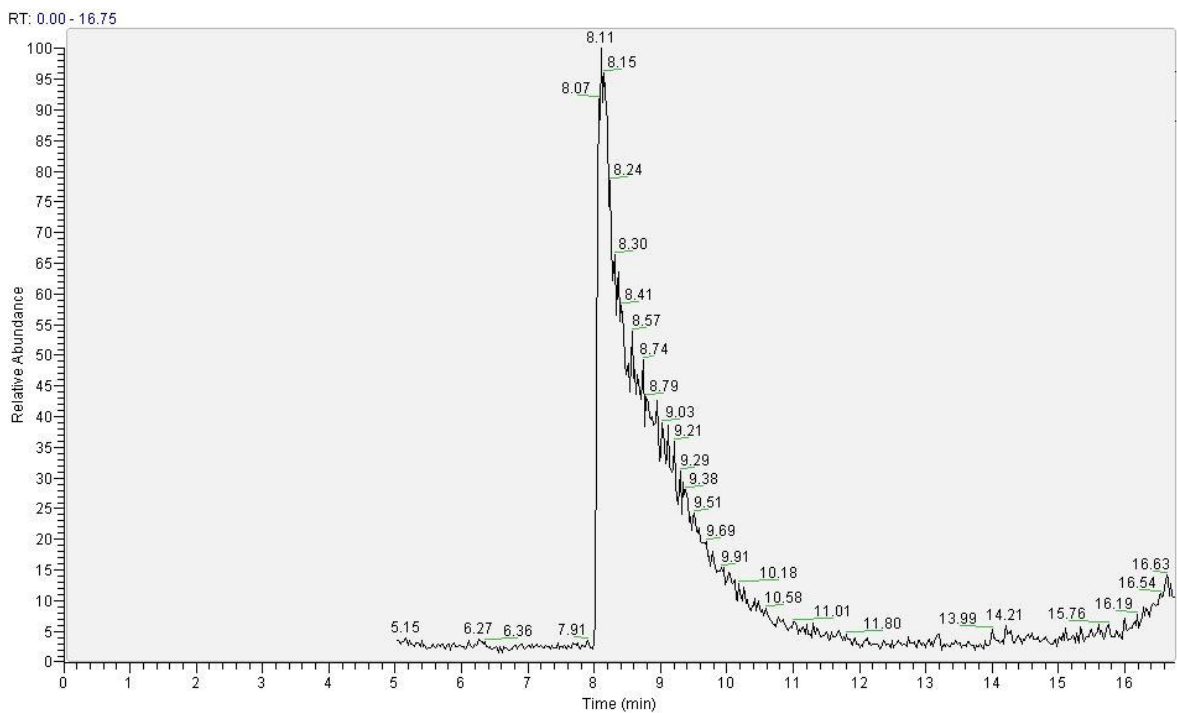


Figura 55: Cromatograma do GBL em etanol t=120h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

As figuras 56 e 57 mostram os cromatogramas da solução etanólica a pH 2 da GBL no tempo zero e às 96 horas.

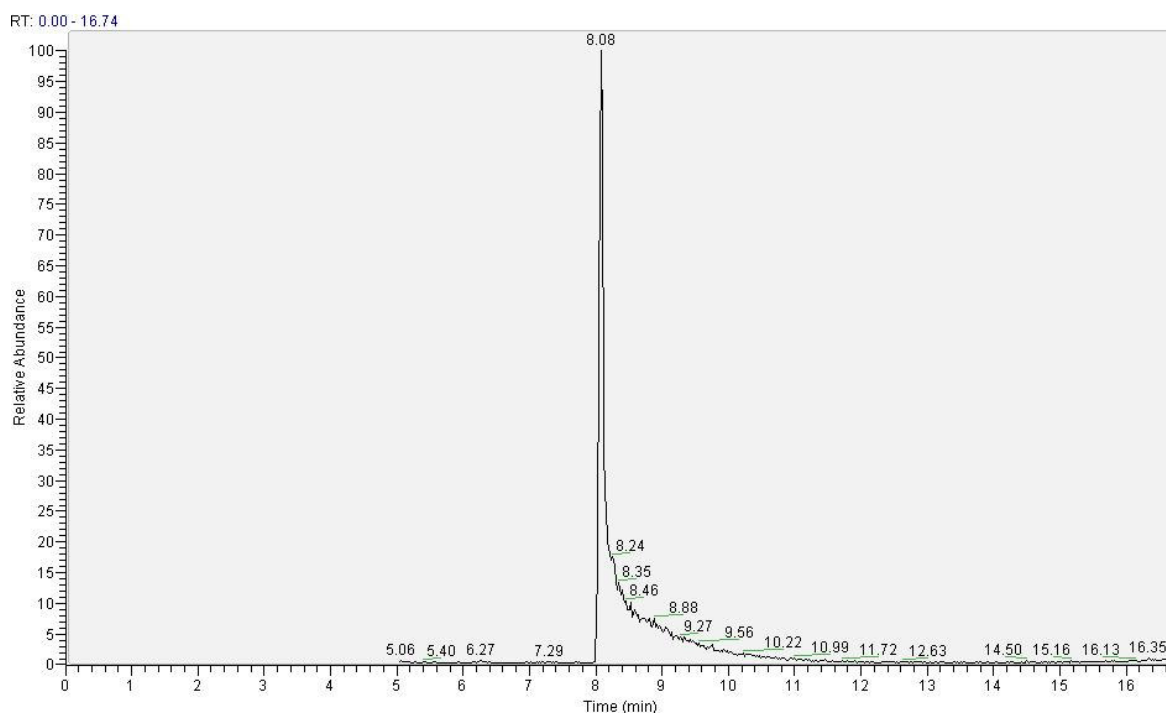


Figura 56: Cromatograma do GBL em etanol t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

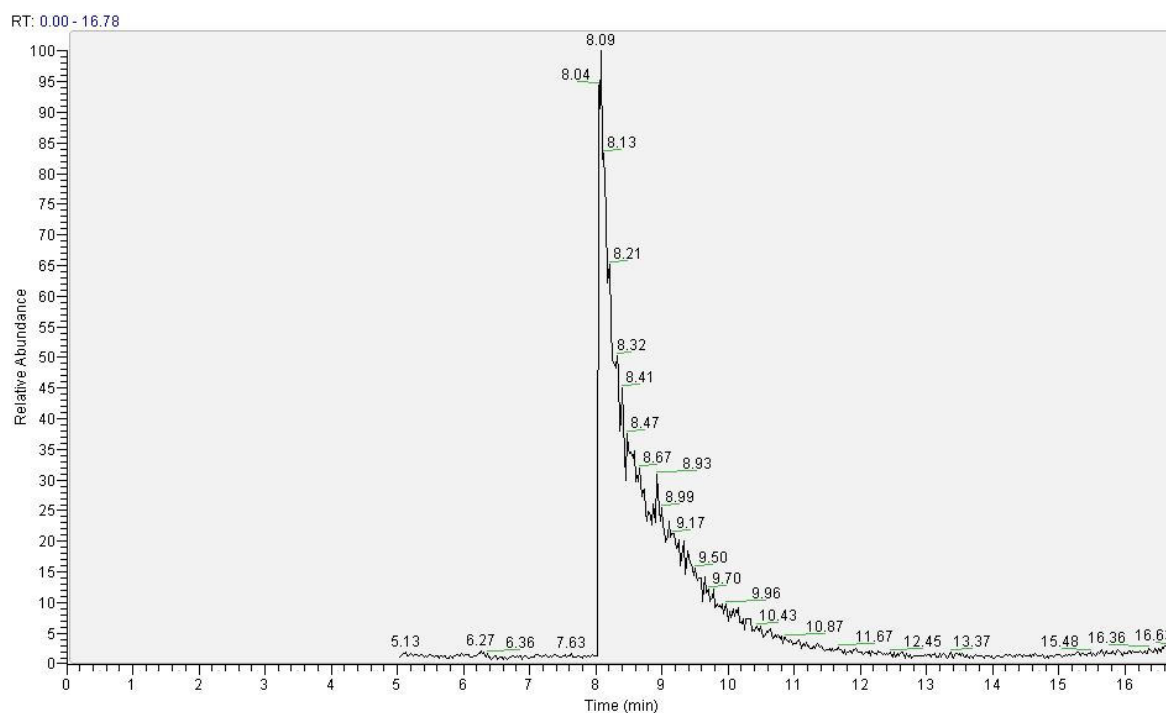


Figura 57: Cromatograma do GBL em etanol t=96h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

As figuras 58 e 59 mostram os cromatogramas da solução metanólica da GBL no tempo zero e às 72 horas.

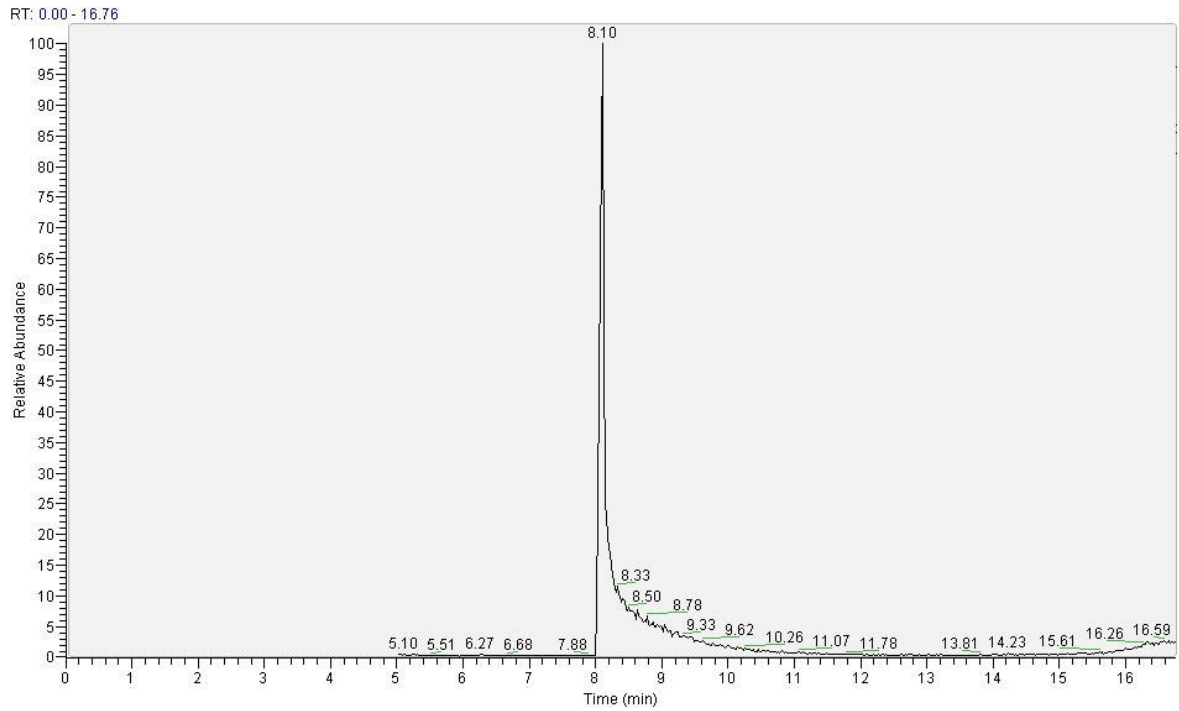


Figura 58: Cromatograma do GBL em metanol t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

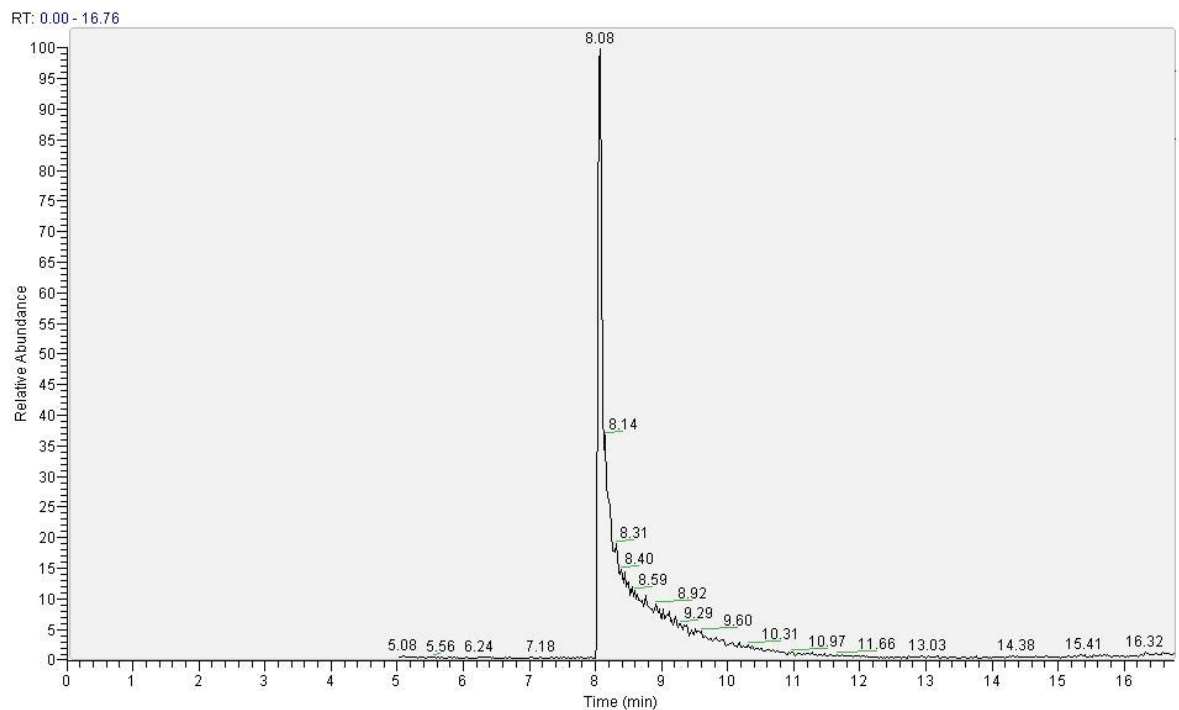


Figura 59: Cromatograma do GBL em metanol t=72h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

As figuras 60 e 61 mostram os cromatogramas da solução metanólica a pH 2 da GBL no tempo zero e às 168 horas.

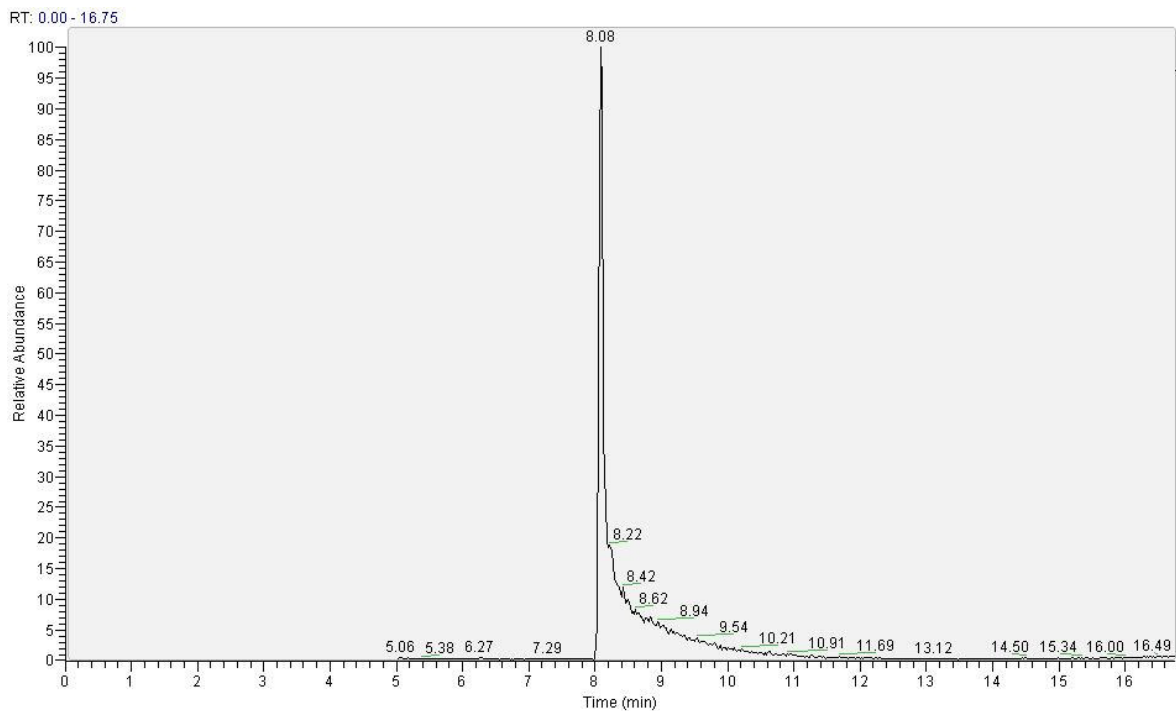


Figura 60: Cromatograma do GBL em metanol a pH 2 $t=0$ nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

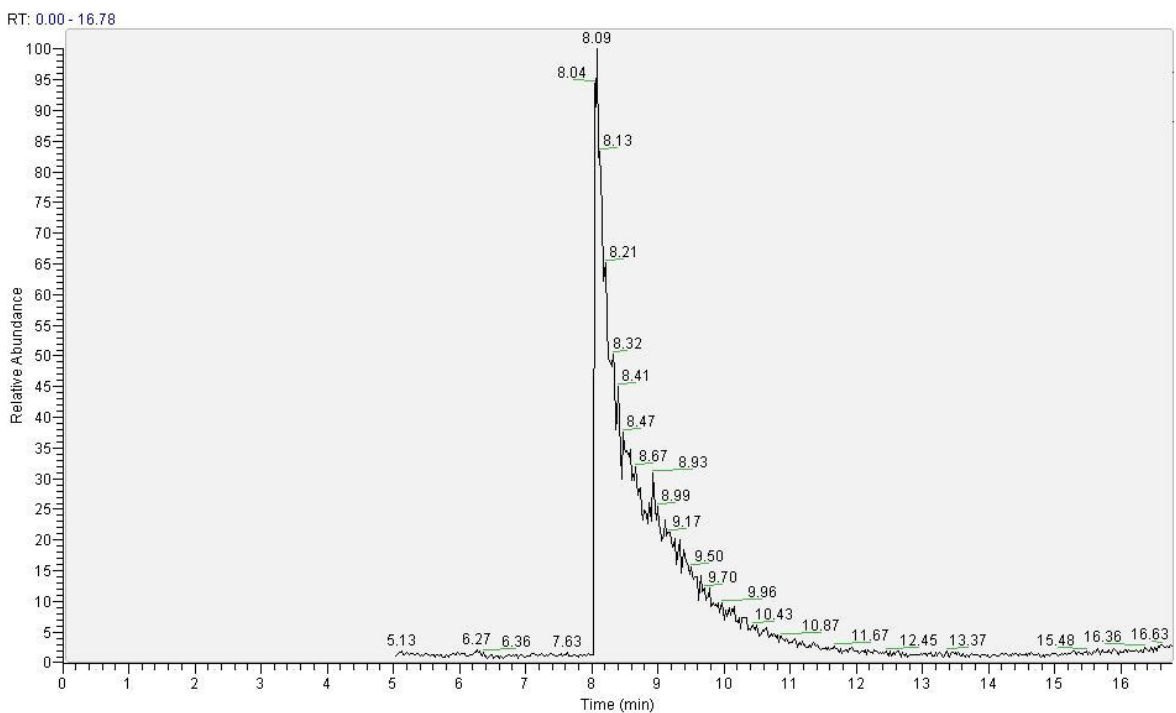


Figura 61: Cromatograma do GBL em metanol a pH 2 $t=168h$ nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

As figuras 62 e 63 mostram os cromatogramas da solução de GBL em cachaça no tempo zero e às 168 horas.

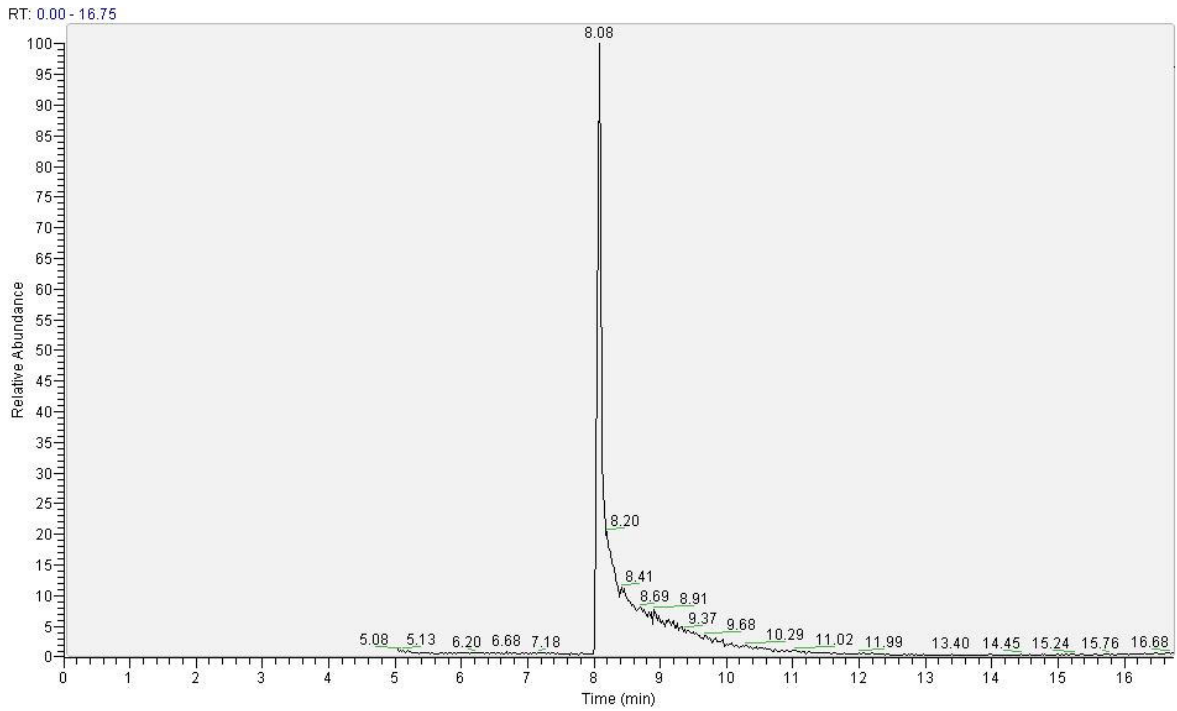


Figura 62: Cromatograma do GBL em cachaça t=0 nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

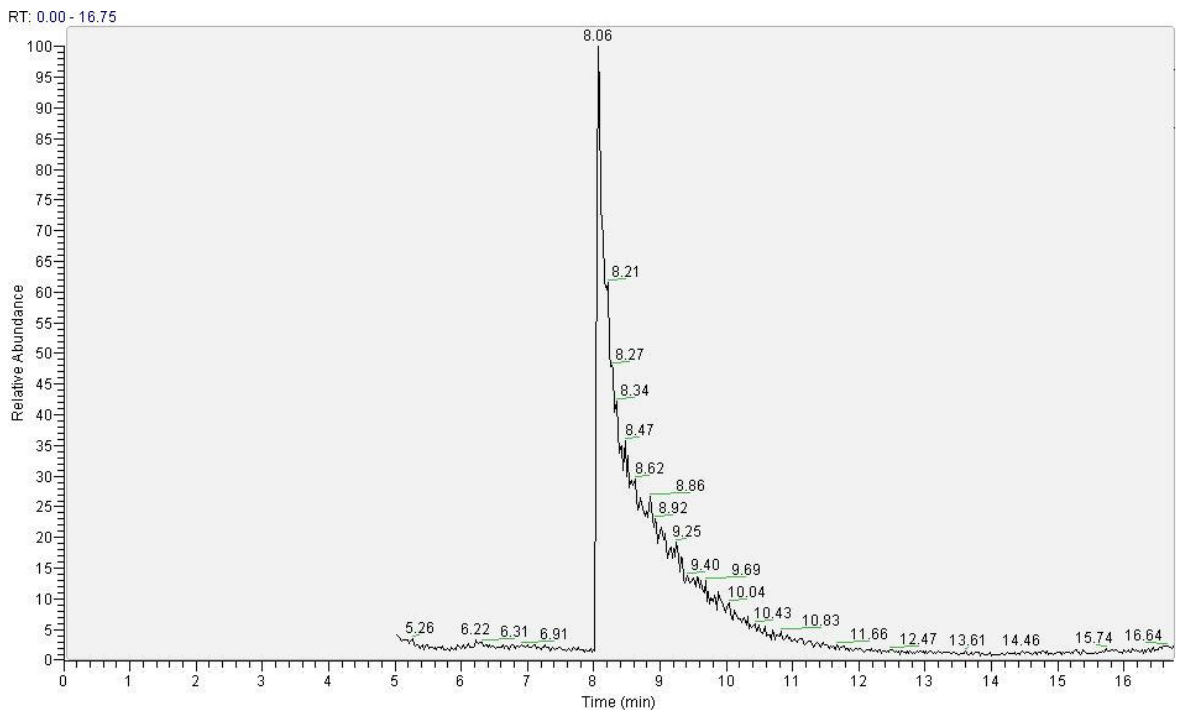


Figura 63: Cromatograma do GBL em cachaça t=168h nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho.

A análise dos gráficos (Figuras 47 a 51) e cromatogramas apresentados e (Figuras 54 a 63) permite concluir que há desaparecimento da GBL, mas não se detecta a formação de outras substâncias ao longo do tempo, tal como acontece com o GHB.

Contudo, neste caso, não existe qualquer reacção de derivatização que possa colocar em risco a integridade das substâncias formadas, nomeadamente os ésteres etílico e metílico do GHB, os quais eram objectivo das experiências aqui desenvolvidas. Este facto veio chamar a nossa atenção, no sentido de tentar explicar o sucedido. De fato, *Hennessy, Moane e McDermott* [8] descreveram a formação destes ésteres em condições similares às dos ensaios por nós efetuados. Por outro lado, pudemos verificar que, mesmo as soluções padrão contendo os ésteres puros, apresentavam um comportamento cromatográfico pouco comum, originando dificilmente cromatogramas reprodutíveis e apresentando limites de detecção muito elevados. O estudo deste problema será objecto do capítulo seguinte desta tese.

Tal como aconteceu com as soluções em estudo contendo GHB, a importância do pH para o desaparecimento da GBL é evidente. É possível verificar que nas soluções de pH 2, quer etanólicas, quer metanólicas, o desaparecimento de GBL ao longo do tempo é mais considerável do que nas soluções em que não se baixou o pH. Este facto pode explicar-se admitindo que está associada ao desaparecimento de GBL uma reacção ácido dependente ou ácido catalisada, como acontece com as transesterificações.

Um aspecto relevante é que, ao contrário do que sucedeu com as soluções de GHB, o desaparecimento de GBL nas soluções etanólicas é menor do que nas soluções metanólicas. Este facto poderá ser explicado se tivermos em conta a desproporção em termos de concentração dos 2 álcoois. Assim, enquanto que nas soluções etanólicas, o álcool está em concentrações da ordem de 40%, facilitando a reacção, nas soluções metanólicas, o álcool está em concentrações francamente menores, da ordem de 0,09%, o que não facilita a transesterificação. Esta diferença decorre da realidade das bebidas alcoólicas que, em qualquer circunstância, apresentam teores em etanol sempre muito mais elevados do que em metanol. Neste trabalho o objecto da avaliação da formação dos ésteres etílico e metílico do GHB incidia numa bebida branca, as quais apresentam os teores em etanol e também em metanol mais elevados do que as outras.

Também, ao contrário do que sucedeu com as soluções de GHB, neste caso o desaparecimento de GBL não é total, mesmo ao fim de cerca de 150 horas.

Em relação ao comportamento do GHB e da GBL na cachaça, verifica-se um comportamento semelhante ao que sucedeu nas soluções padrão destas substâncias em etanol e metanol. Há desaparecimento de ambas as substâncias ao longo do tempo. Este desaparecimento é mais marcado na cachaça do que nas soluções metanólicas, o que se poderá justificar pela maior quantidade de etanol presente, a qual facilita a reacção de esterificação.

Tal como nos casos anteriores, também não foi possível por em evidência a formação de outras substâncias. Os ésteres a terem-se formado, não se formaram em quantidade suficiente para poderem ser detectados, ou, uma outra possível razão que será explorada a seguir, é a ocorrência de relactonização dos ésteres no equipamento de análise.

Para o estudo da estabilidade foi observados os parâmetros da International Conference on Harmonization (ICH). A especificidade, a linearidade, o limite de detecção, o limite de quantificação, a precisão e a exatidão foram analisados [41].

Especificidade

Não foi observado nenhum interferente das matrizes como pode ser observado nos cromatogramas abaixo.

Linearidade

Cinco concentrações do GHB, GBL, 2-Hidroxicaproico e GHB + 2-Hidroxicaproico foram avaliados em um dia. A partir da curva obtida determinou-se a equação da reta e o R² pelo método dos mínimos quadrados através do programa MicrosoftTM Excel 2003.

Substância	Linearidade (mg/mL)	Equação da Reta	Coefficiente de Correlação (R ²)
GBL	0,5 – 2,75	$y = 3,0 * 10^7 x + 5,0 * 10^6$	0,9939
GHB	0,0055 – 0,3	$y = 2,0 * 10^8 x + 2,0 * 10^6$	0,992
Ácido 2-hidroxicapróico	0,1 – 2	$y = 1,0 * 10^8 x - 85027$	0,9981

Tabela 3: Zona de linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação da GBL, GHB e ácido 2-hidroxicapróico.

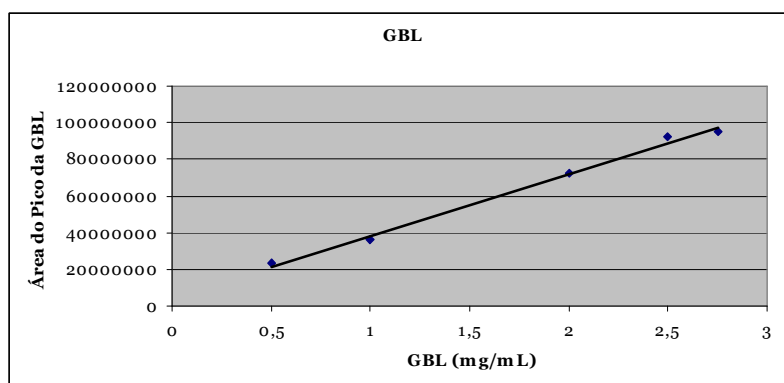


Figura 64: Gráfico da Linearidade obtida para GBL.

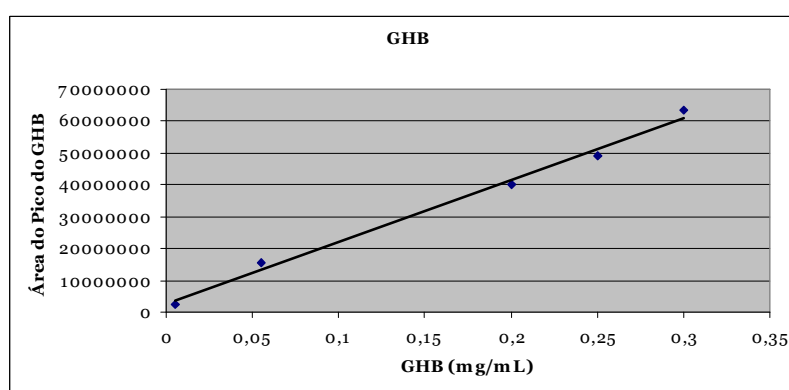


Figura 65: Gráfico da Linearidade obtida para GHB.

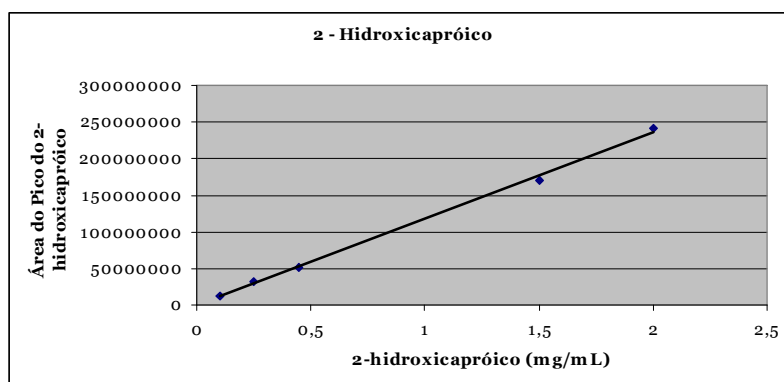


Figura 66: Gráfico da Linearidade obtida para 2-Hidroxicapróico

O doseamento do GHB foi realizado pelo método do padrão interno. Enquanto, o doseamento da GBL foi realizado pelo método do padrão externo.

Substância	Linearidade (mg/mL)	Equação da Reta	Coefficiente de Correlação (R ²)
GHB + 2- hidroxicapróico	0,0055 – 0,3	$y = 5,623x + 0,0798$	0,9968

Tabela 4: Zona de linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação do GHB + 2-hidroxicapróico (PI).

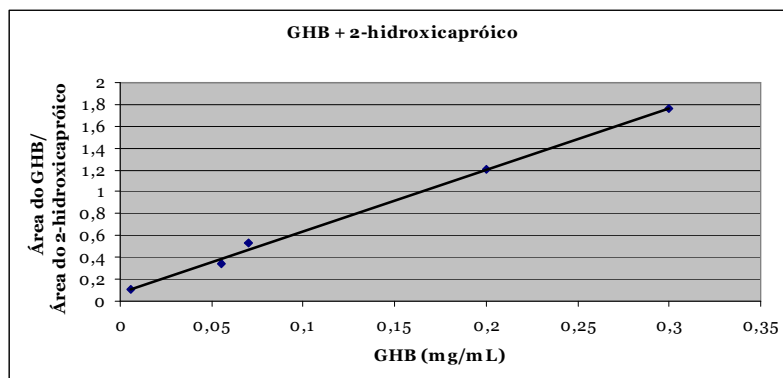


Figura 67: Curva de calibração do GHB pelo método do padrão interno.

Limite de Detecção

O limite de detecção foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$LD = 3,3 \cdot \sigma / S$, onde: σ é o desvio padrão do branco e S é o declive da curva calibração [41]. Os valores dos limites de detecção estão na tabela a seguir:

	Etanol	Etanol pH=2	Metanol	Metanol pH=2	Cachaça
GBL	$4,54 \cdot 10^{-4}$	$4,68 \cdot 10^{-4}$	$4,7 \cdot 10^{-4}$	$4,84 \cdot 10^{-4}$	$4,74 \cdot 10^{-4}$
GHB	$1,25 \cdot 10^{-5}$	$1,99 \cdot 10^{-5}$	$1,22 \cdot 10^{-4}$	$2,32 \cdot 10^{-4}$	$6,72 \cdot 10^{-4}$

Tabela 5: Limite de detecção da GBL e GHB nas matrizes em estudo.

Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$LD = 10 \cdot \sigma / S$, onde: σ é o desvio padrão do branco e S é o declive da curva calibração [41]. Os valores dos limites de quantificação estão na tabela a seguir

	Etanol	Etanol pH=2	Metanol	Metanol pH=2	Cachaça
GBL	$1,38 * 10^{-3}$	$1,41 * 10^{-3}$	$1,42 * 10^{-3}$	$1,46 * 10^{-3}$	$1,44 * 10^{-3}$
GHB	$3,79 * 10^{-5}$	$6,03 * 10^{-5}$	$3,7 * 10^{-4}$	$7,03 * 10^{-4}$	$2,04 * 10^{-3}$

Tabela 6: Limite de quantificação da GBL e GHB nas matrizes em estudo.

Precisão

Repetibilidade

O parâmetro da repetibilidade foi avaliado na construção das curvas calibração. Os valores podem ser observados nas tabelas a seguir:

GBL (mg/mL)	Precisão (%)
0,5	5,07
1,0	2,44
2,0	3,01
2,5	3,36
2,75	3,82

Tabela 7: Repetibilidade da GBL.

GHB (mg/mL)	Precisão (%)
0,0055	8,323
0,055	9,35
0,2	4,073
0,25	2,136
0,3	1,209

Tabela 8: Repetibilidade do GHB.

2-hidroxicapróico (mg/mL)	Precisão (%)
0,5	5,07
1,0	2,44
2,0	3,01
2,5	3,36
2,75	3,82

Tabela 9: Repetibilidade do 2-hidroxicapróico

GHB + 2-hidroxicapróico (mg/mL)	Precisão (%)
0,0055	8,01
0,055	6,40
0,07	2,64
0,2	2,54
0,3	7,80

Tabela 10: Repetibilidade do GHB + 2-hidroxicapróico.

Precisão Intermédia

O parâmetro da precisão intermédia foi avaliado em três concentrações dos analitos em dias diferentes não consecutivos. Podem ser observados nas seguintes tabelas:

GBL (mg/mL)	Precisão (%)
0,5	8,73
1	4,10
2	3,01

Tabela 11: Precisão Intermédia da GBL.

GHB (mg/mL)	Precisão (%)
0,0055	7,20
0,2	3,11
0,3	2,38

Tabela 12: Precisão Intermédia do GHB.

Exatidão

O parâmetro da exatidão do GHB foi demonstrado por meio do percentual de recuperação do método descrito pela fórmula abaixo:

$$\% \text{Recuperação} = \left[\frac{\text{Área do analito} / \text{Área do PI}_{\text{obtido}}}{\text{Área do analito} / \text{Área do PI}_{\text{teórico}}} \right] * 100$$

Foram analisados 3 concentrações três vezes em cada uma das matrizes do estudo. Os valores podem ser observados nas seguintes tabelas dentro do intervalo aceito pelo ICH, 80 – 120% [41].

GHB (mg/mL)	Exatidão (%)
0,0055	106,83
0,2	93,15
0,3	82,87

Tabela 13: Exatidão obtida para o GHB em etanol.

GHB (mg/mL)	Exatidão (%)
0,0055	117,43
0,2	80,78
0,3	82,88

Tabela 14: Exatidão obtida para o GHB em etanol pH = 2.

GHB (mg/mL)	Exatidão (%)
0,0055	107,81
0,2	93,11
0,3	83,69

Tabela 15: Exatidão obtida para o GHB em metanol.

GHB (mg/mL)	Exatidão (%)
0,0055	119,21
0,2	80,01
0,3	81,36

Tabela 16: Exatidão obtida para o GHB em metanol pH = 2.

GHB (mg/mL)	Exatidão (%)
0,0055	114,84
0,2	81,93
0,3	85,15

Tabela 17: Exatidão obtida para o GHB em cachaça.

A GBL foi extraída das matrizes. Sua recuperação foi de 77,26%. O parâmetro da recuperação da extração foi determinado a partir da fórmula:

$$\% \text{ Recuperação: } [(\text{Área do analito})_{\text{extraído}} / (\text{Área do analito})_{\text{padrão}}] * 100$$

O parâmetro da exatidão da GBL foi realizado da mesma maneira do GHB. Os valores podem ser observados nas seguintes tabelas, dentro do intervalo aceito pelo ICH, 80 – 120% [41]:

GBL (mg/mL)	Exatidão (%)
0,5	88,92
1	99,97
2	100,42

Tabela 18: Exatidão obtida para a GBL em etanol.

GBL (mg/mL)	Exatidão (%)
0,5	90,78
1	102,36
2	98,20

Tabela 19: Exatidão obtida para a GBL em etanol pH = 2.

GBL (mg/mL)	Exatidão (%)
0,5	90,12
1	94,30
2	98,38

Tabela 20: Exatidão obtida para a GBL em metanol.

GBL (mg/mL)	Exatidão (%)
0,5	95,02
1	98,8
2	102,82

Tabela 21: Exatidão obtida para a GBL em metanol pH = 2.

GBL (mg/mL)	Exatidão (%)
0,5	89,76
1	99,99
2	102,22

Tabela 22: Exatidão obtida para a GBL em cachaça.

4.4. Comportamento dos ésteres etílico e metílico do GHB em CG-EM

No estudo da estabilidade do GHB e da GBL em soluções metanólicas e etanólicas e também no estudo por CG-EM dos ésteres sintetizados, pudemos observar, conforme foi referido nos capítulos anteriores, que os ésteres etílico e metílico do GHB apresentavam um comportamento cromatográfico pouco comum, originando dificilmente cromatogramas reproduzíveis e apresentando limites de detecção muito elevados. Uma hipótese que levantamos para explicar este comportamento foi que poderia ocorrer degradação dos ésteres no próprio equipamento de análise por CG-EM.

De fato, é de considerar a possibilidade de haver transformação dos ésteres nos seus precursores (Figura 68).

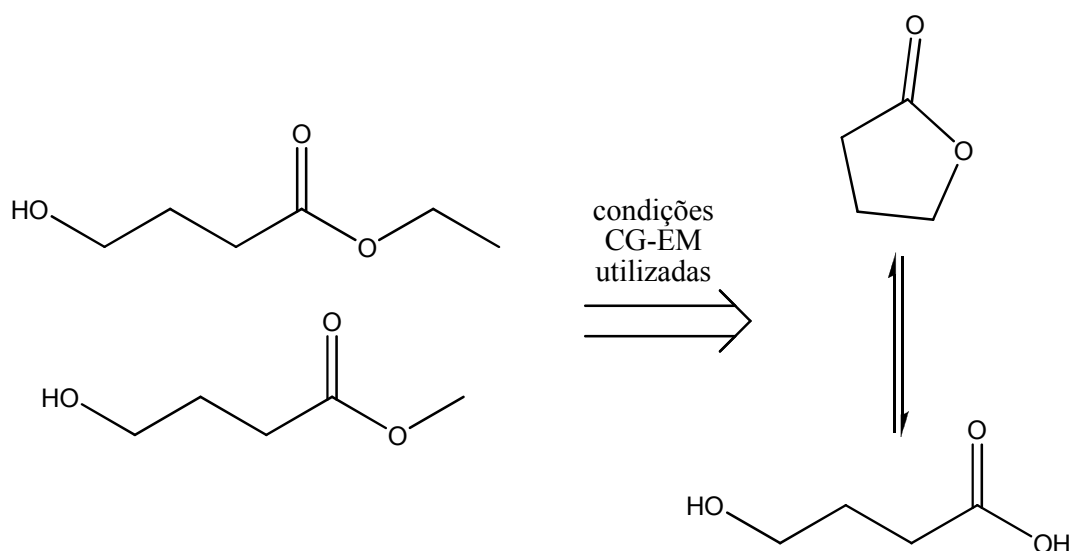


Figura 68: Transformação dos ésteres etílico e metílico do GHB nos seus precursores.

A corroborar esta hipótese, surge o fato por nós observado em que soluções puras de éster etílico e de éster metílico do GHB, injetadas isoladamente, originarem um pico intenso com o mesmo t_R e características cromatográficas da GBL (Figuras 69, 70, 71, 74 e 75).

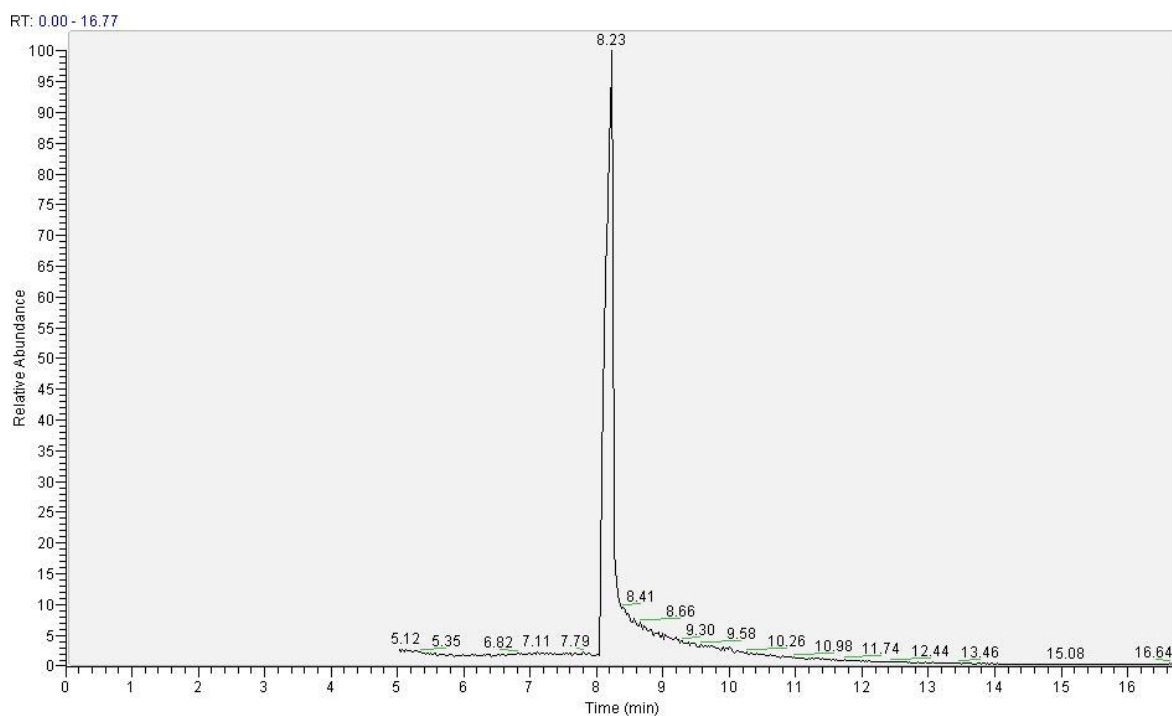


Figura 69: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de etilo nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho (t_R GBL = 8,33 minutos).

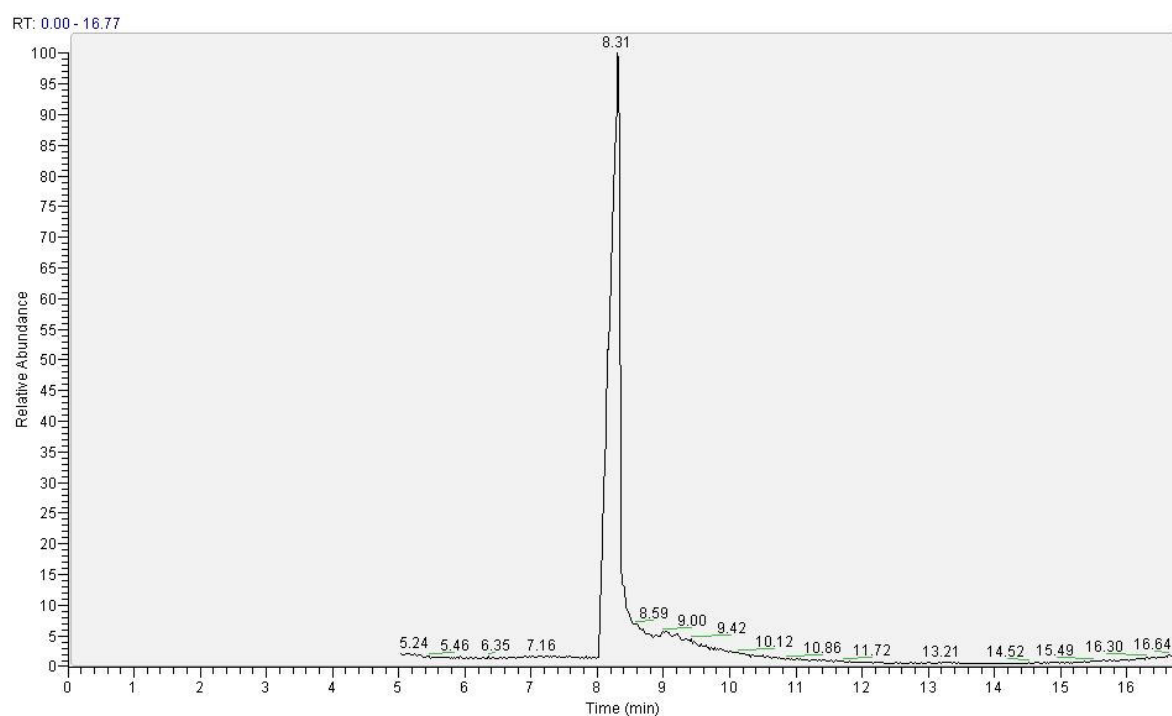


Figura 70: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de metilo nas condições CG-EM utilizadas neste trabalho (t_R GBL = 8,31 minutos).

Como o GHB nestas condições, sem derivatização, não seria visível, e também porque se trata de uma molécula bastante instável, optamos por explorar e conhecer

melhor a possibilidade de transformação dos ésteres etílico e metílico do GHB em GBL nas condições de CG-EM utilizadas neste trabalho.

Embora possa ocorrer noutros locais e por influência de vários fatores, a transformação dos ésteres etílico e metílico do GHB em GBL poderá ocorrer por efeito da temperatura do injetor e variar com o solvente utilizado na preparação das soluções. Nesse sentido foram verificados estes dois parâmetros.

Assim, foram mantidas todas as condições cromatográficas habitualmente utilizadas, com exceção da temperatura do injetor. As Figuras 71, 72 e 73 mostram os cromatogramas obtidos por injeção de uma solução de *gama*-hidroxibutirato de etilo em clorofórmio, usando como temperatura do injetor 250°C, 150°C e 80°C, respectivamente.

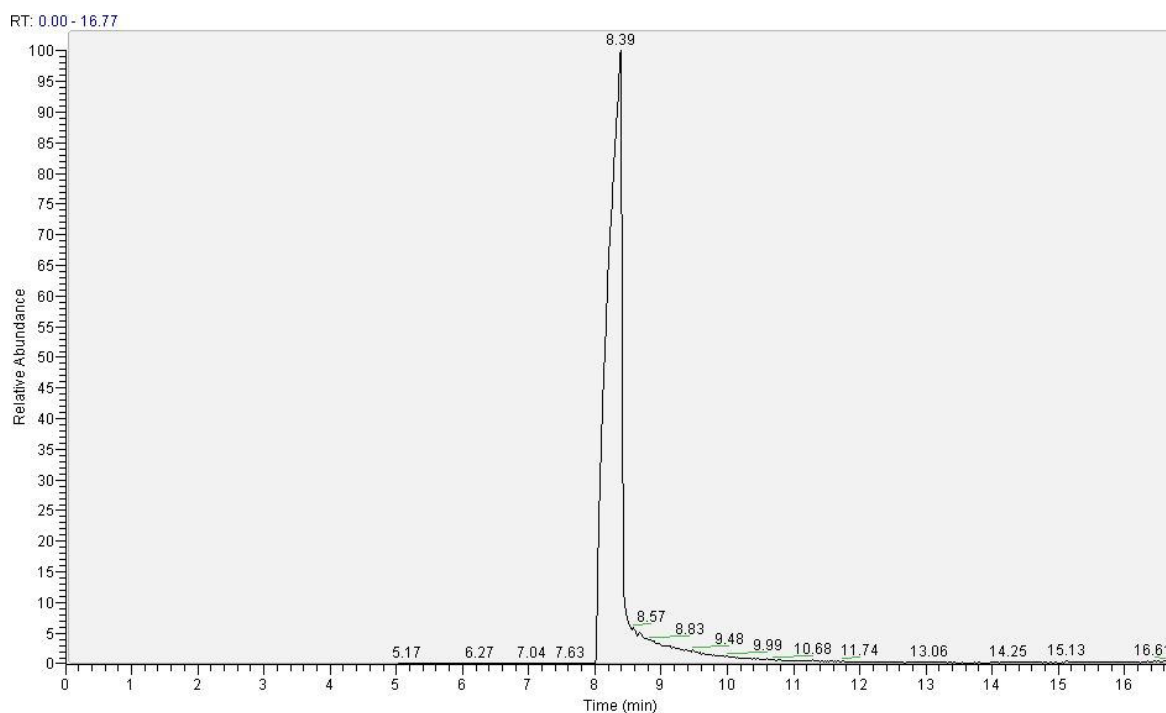


Figura 71: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de etilo em clorofórmio (temperatura do injetor=250°C; t_R GBL = 8,39 minutos).

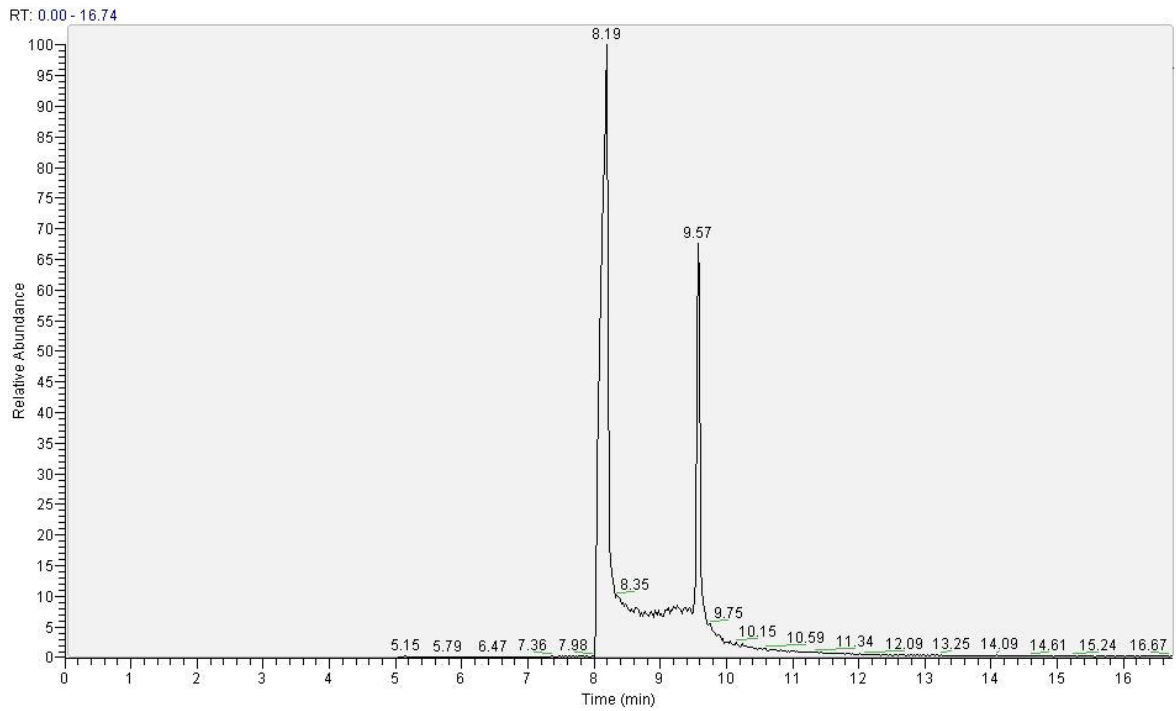


Figura 72: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de etilo em clorofórmio (temperatura do injetor=150°C; t_R GBL = 8,19 minutos; t_R Éster etílico GHB = 9,57 minutos).

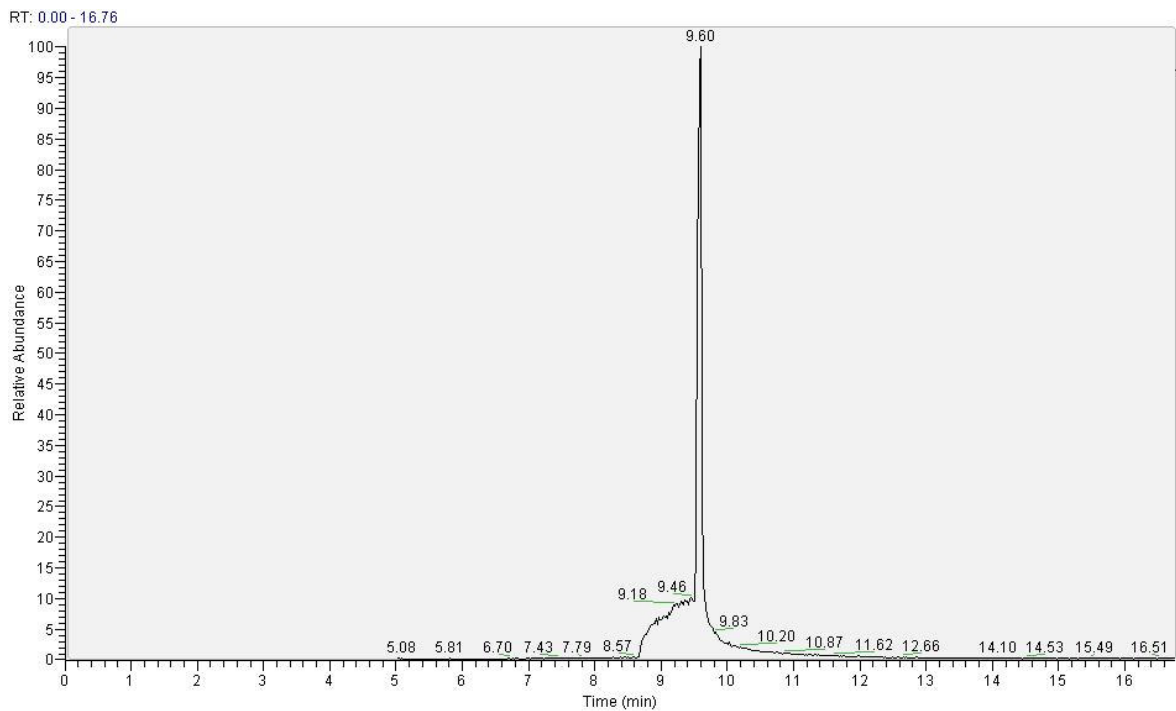


Figura 73: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de etilo em clorofórmio (temperatura do injetor=80°C; t_R Éster etílico GHB = 9,60 minutos).

As Figuras 74, 75 e 76 mostram os cromatogramas obtidos por injeção de uma solução de *gama*-hidroxibutirato de metilo em clorofórmio às temperaturas de 250°C, 150°C e 80°C, respectivamente.

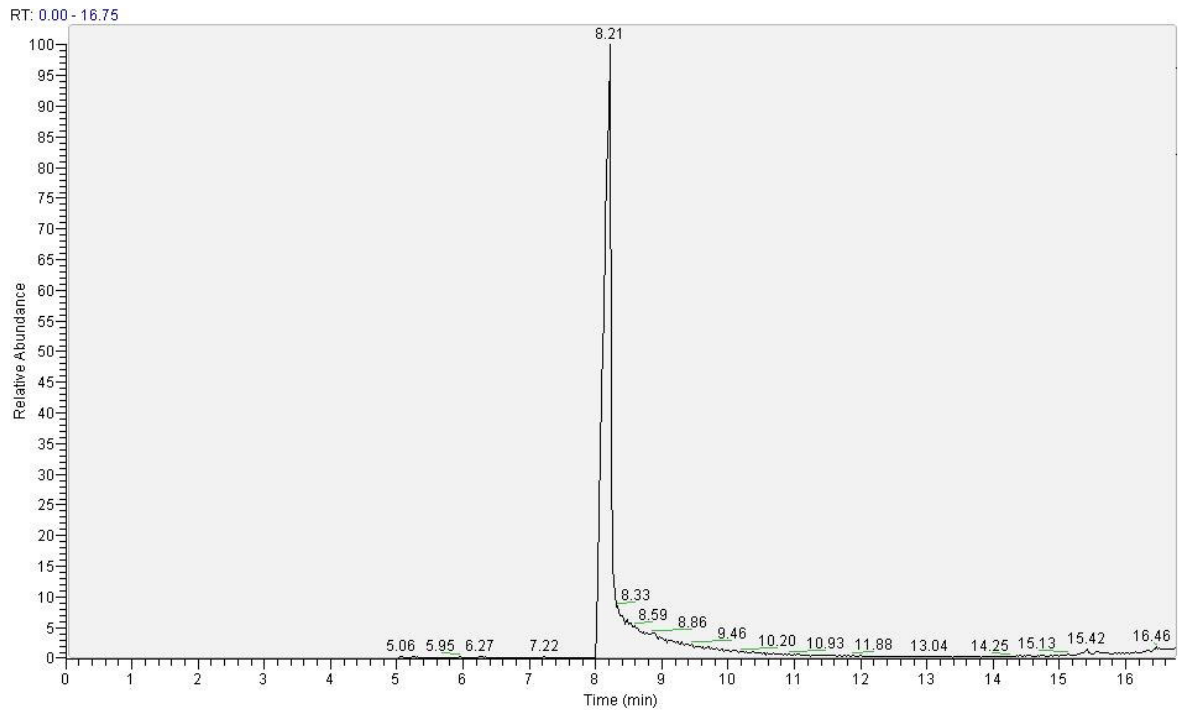


Figura 74: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de metilo em clorofórmio (temperatura do injetor=250°C; t_R GBL = 8,21 minutos).

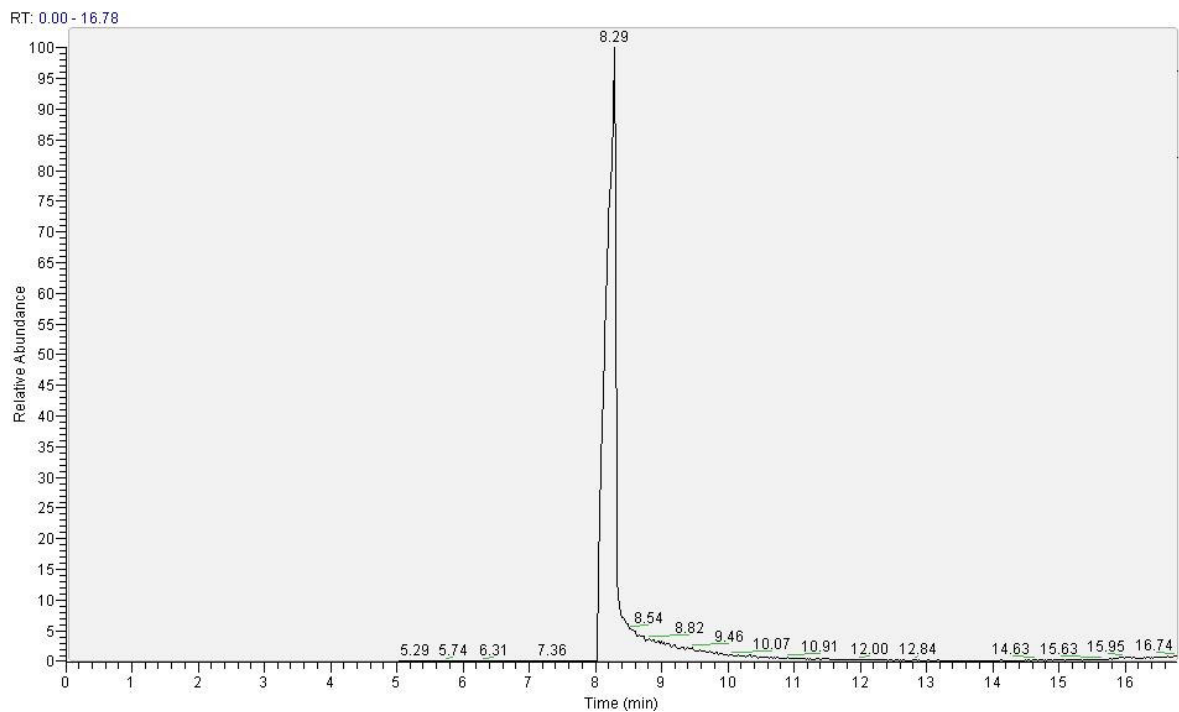


Figura 75: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de metilo em clorofórmio (temperatura do injetor=150°C; t_R GBL = 8,29 minutos).

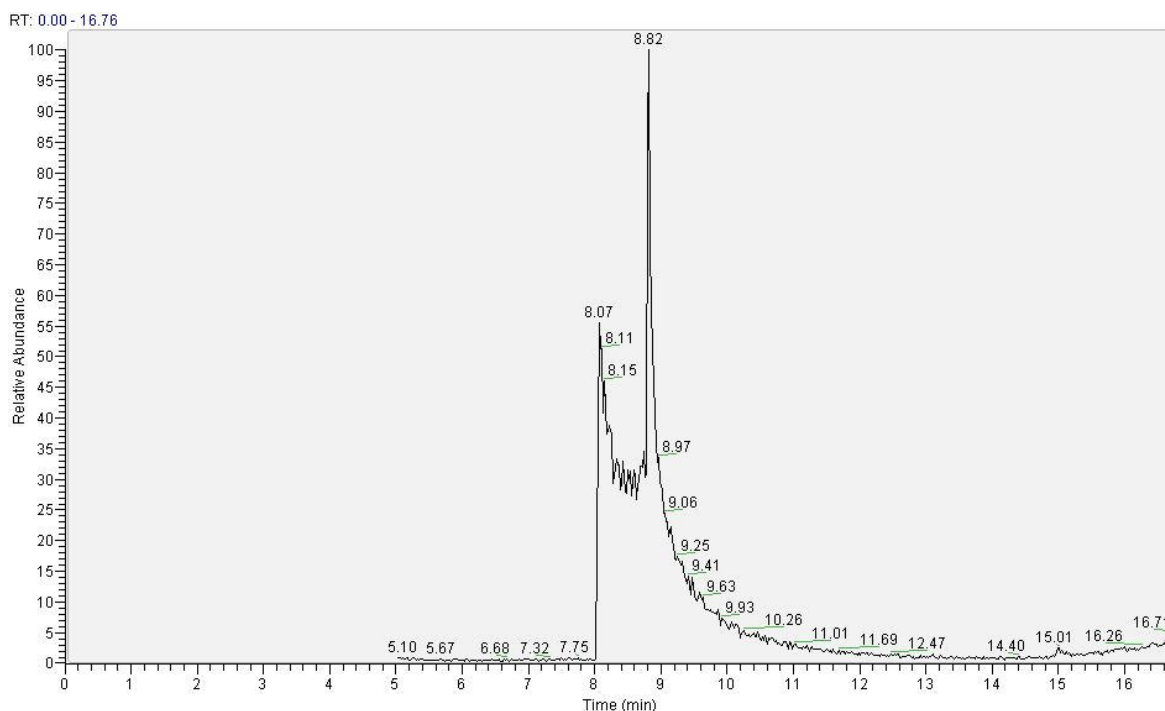


Figura 76: Cromatograma do *gamma*-hidroxibutirato de metilo em clorofórmio (temperatura do injetor=80°C; t_R GBL = 8,07 minutos; t_R Éster metílico GHB = 8,82 minutos).

A análise destes cromatogramas confirma a hipótese inicialmente colocada da transformação dos ésteres etílico e metílico do GHB em GBL no equipamento e nas condições cromatográficas utilizadas, bem como evidencia que essa transformação ocorre por influência da temperatura do injetor. Assim, a temperaturas elevadas, praticamente todo o éster, quer o éster etílico, quer o éster metílico do GHB, é transformado em GBL. Quando a temperatura diminui para 80°C o éster metílico já não sofre reaccionização e o éster metílico é parcialmente lactonizado.

Procuramos também observar a influência dos solventes neste comportamento de lactonização dos ésteres etílico e metílico do GHB no injetor cromatográfico. Para isso, prepararam-se soluções de ambos os ésteres em clorofórmio, acetato de etilo e propan-2-ol que foram injetadas com o injetor às temperaturas de 250°C, 150°C e 80°C. A seleção destes solventes prende-se com o fato de cobrirem uma gama de polaridades alargada, desde o clorofórmio apolar, ao propan-2-ol polar.

As Figuras 77 a 88 mostram os cromatogramas obtidos de acordo com o definido no parágrafo anterior.

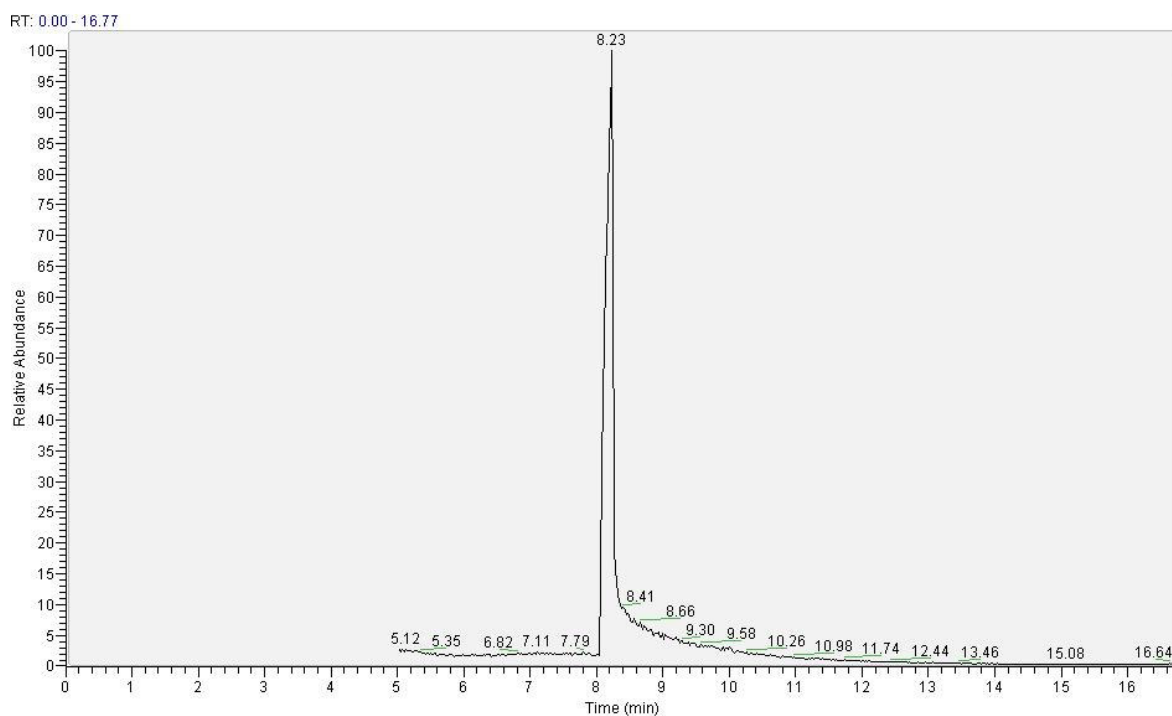


Figura 77: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de etilo em em acetato de etilo (temperatura do injetor=250°C; t_R GBL = 8,23 minutos).

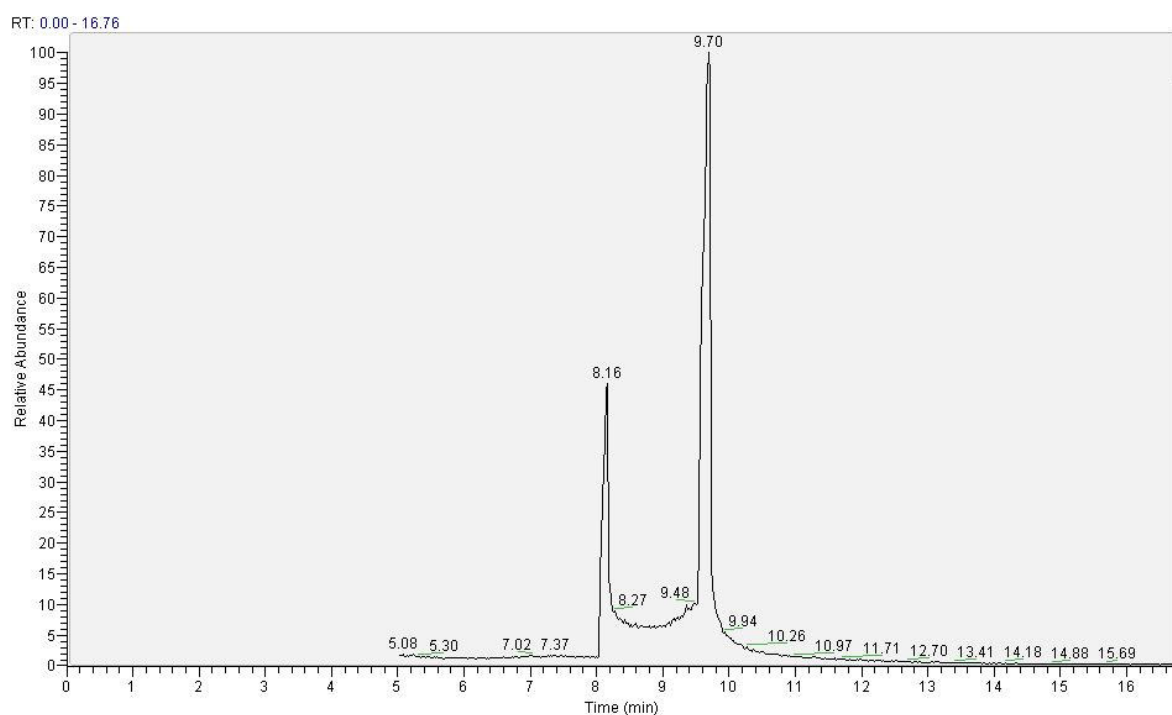


Figura 78: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de etilo em em acetato de etilo (temperatura do injetor de 150°C; t_R GBL = 8,16 minutos; t_R Éster etílico de GHB = 9,70 minutos).

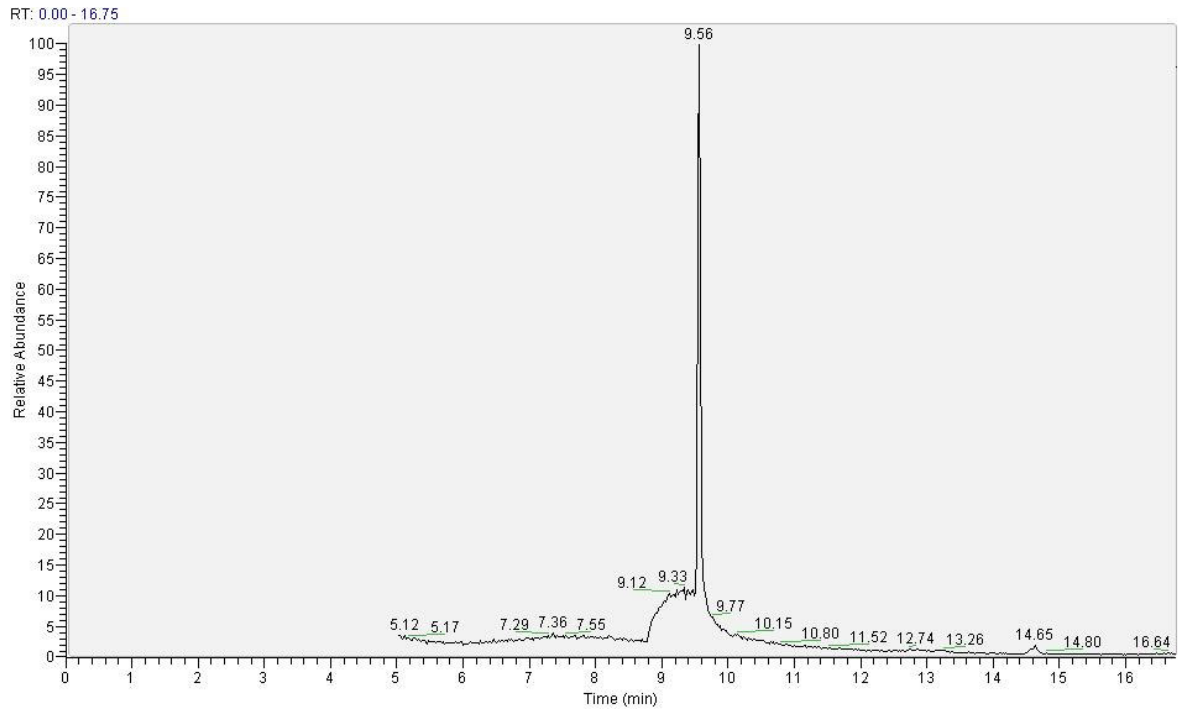


Figura 79: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de etilo em acetato de etilo (temperatura do injetor a 80°C; t_R Éster etílico de GHB= 9,56 minutos).

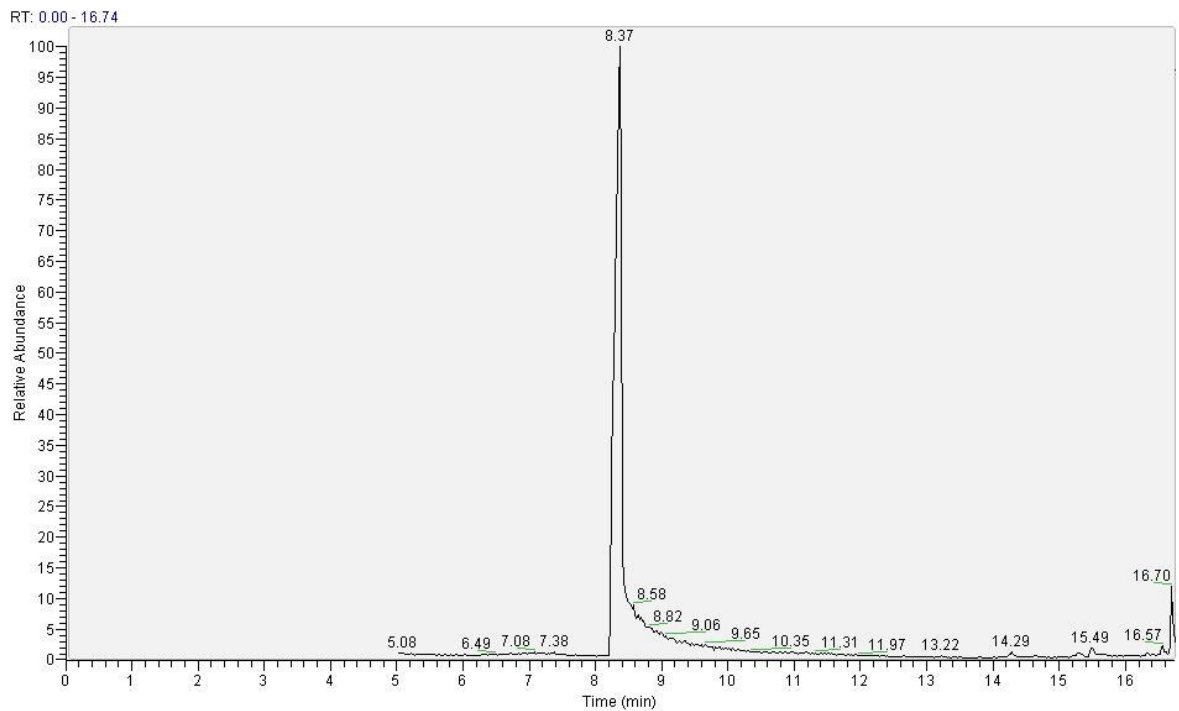


Figura 80: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de etilo em propan-2-ol (temperatura do injetor a 250°C; t_R GBL= 8,37 minutos).

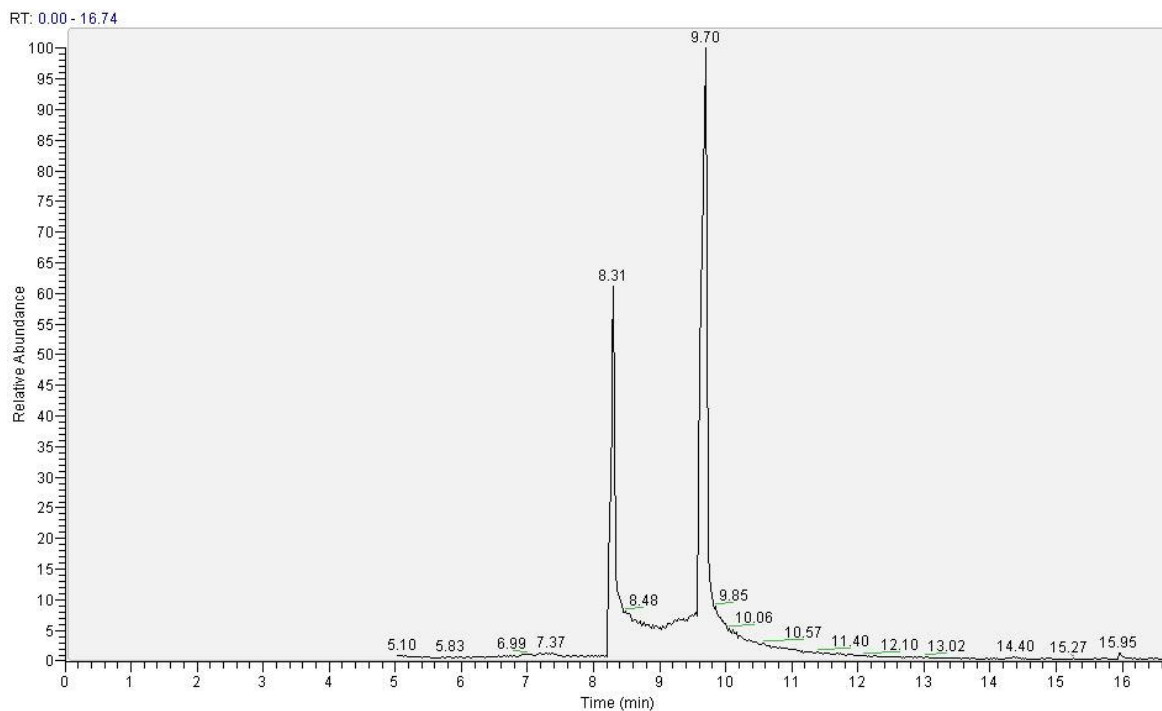


Figura 81: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de etilo em propan-2-ol (temperatura do injetor a 150°C; t_R GBL= 8,31 min; t_R Éster etílico de GHB = 9,70 min).

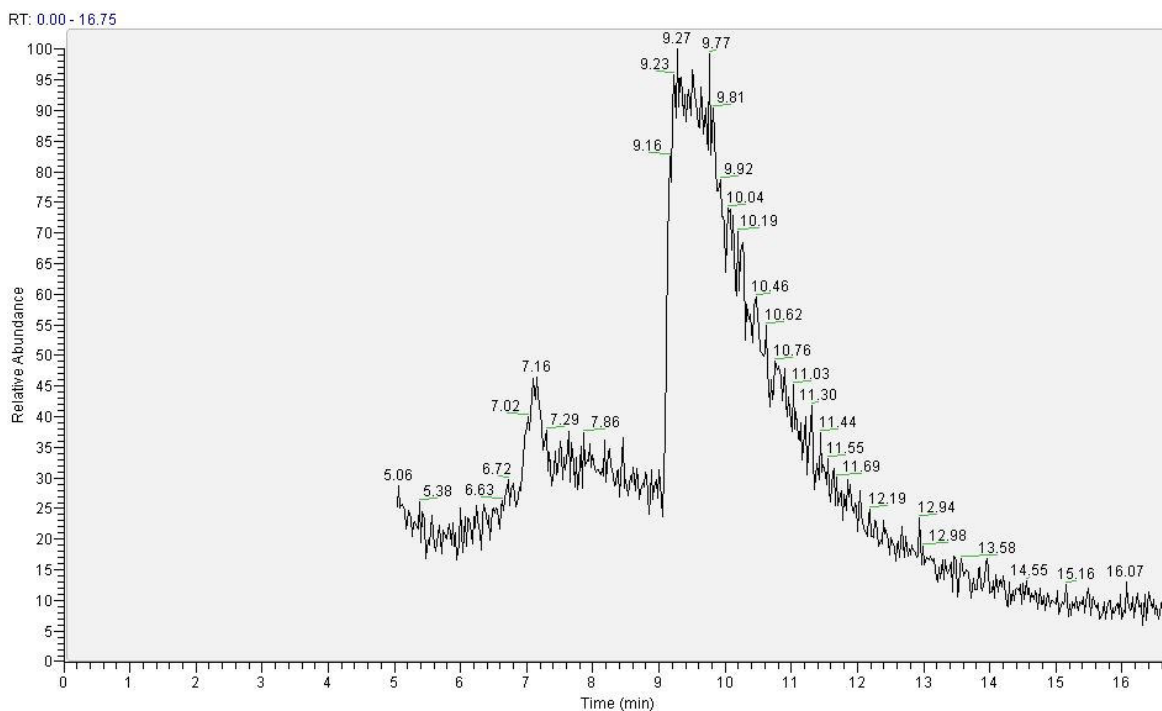


Figura 82: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de etilo em propan-2-ol (temperatura do injetor a 80°C; t_R Éster Etílico de GHB = 9,27 minutos).

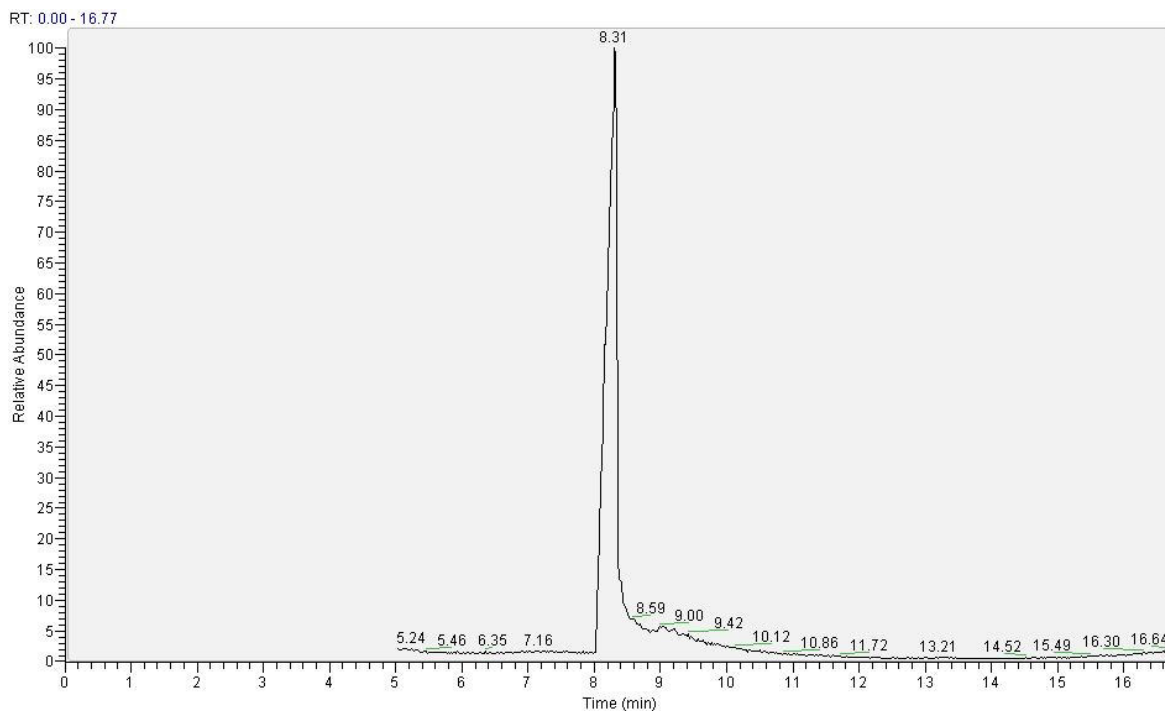


Figura 83: Cromatograma do *gamma*-hidroxibutirato de metilo em acetato de etilo (temperatura do injetor de 250°C; t_R GBL = 8,31 minutos).

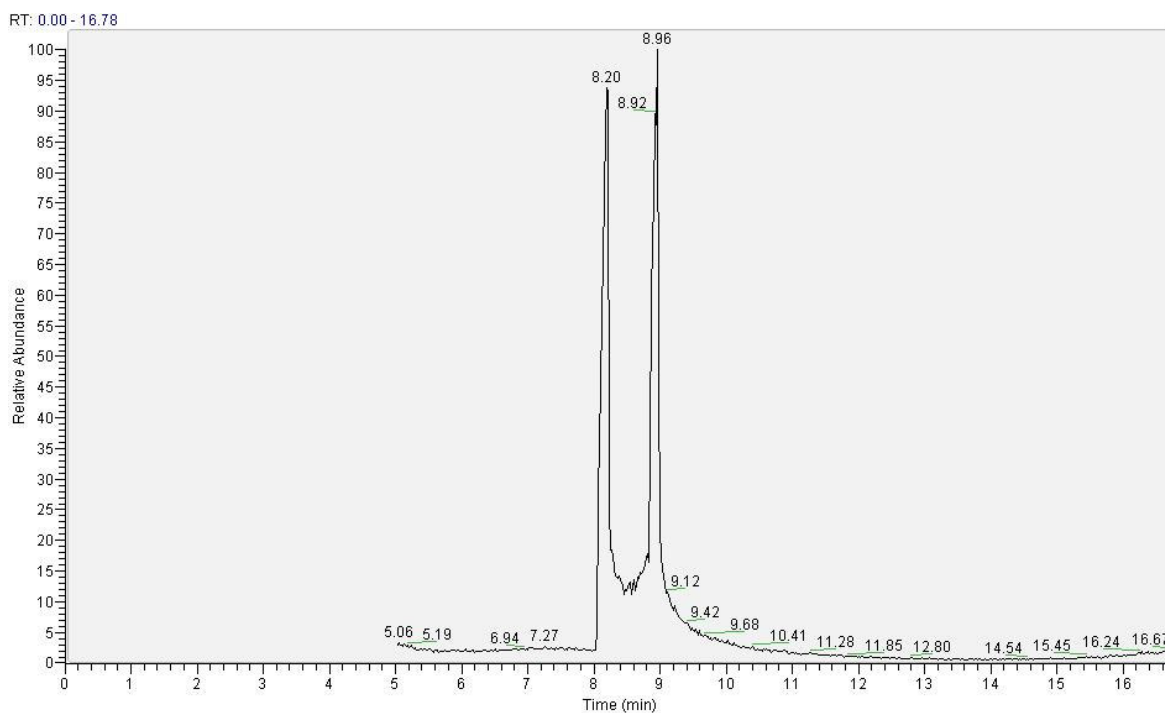


Figura 84: Cromatograma do *gamma*-hidroxibutirato de metilo em acetato de etilo (temperatura do injetor de 150°C; t_R GBL = 8,20 minutos; t_R Éster Metílico de GHB = 8,96 minutos).

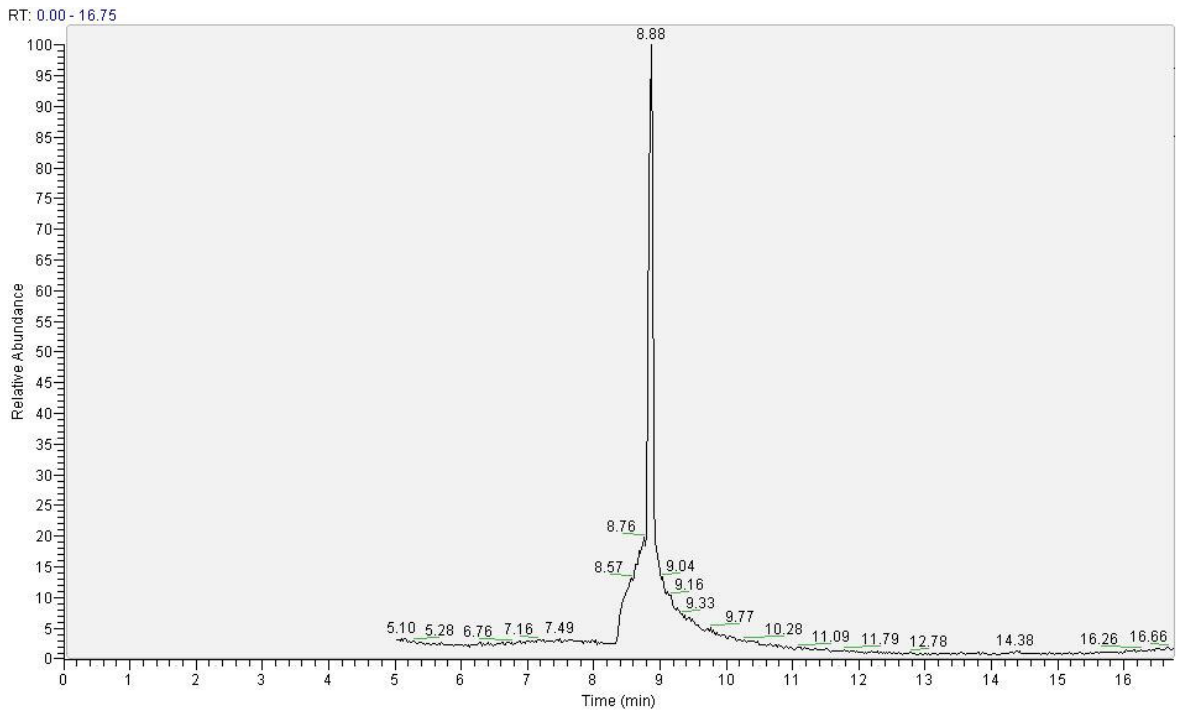


Figura 85: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de metilo em acetato de etilo (temperatura do injetor de 80°C; t_R Éster Metílico de GHB = 8,88 minutos).

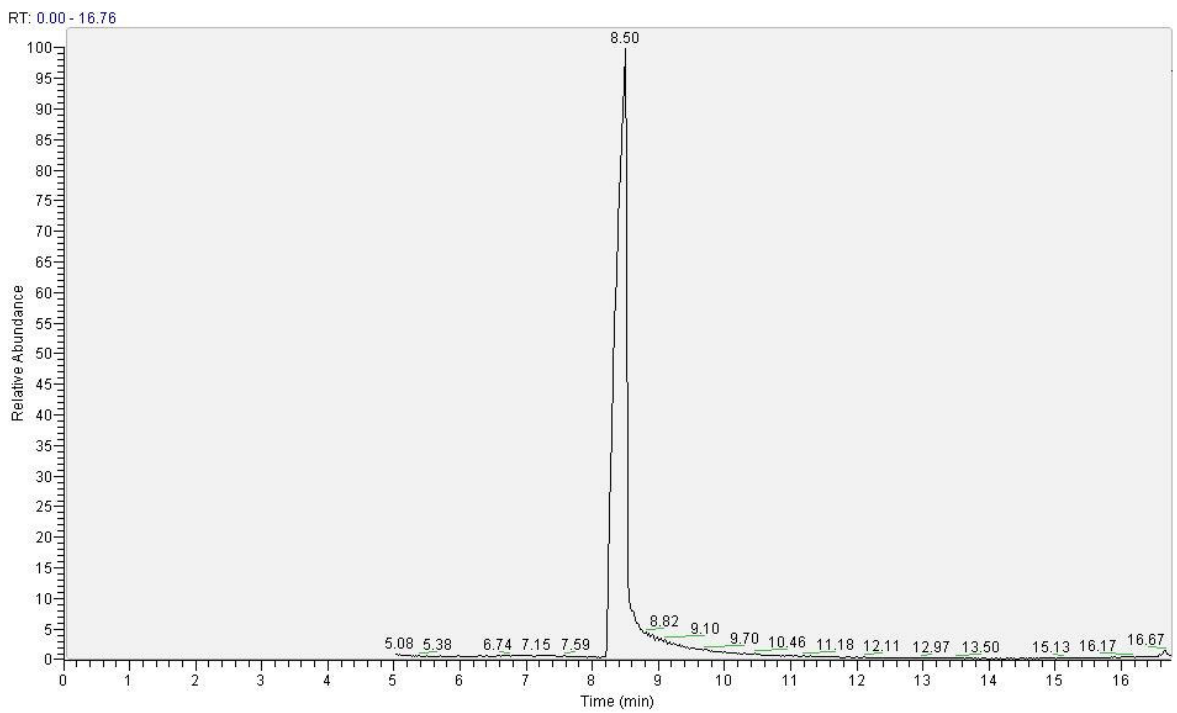


Figura 86: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de metilo em propan-2-ol (temperatura do injetor de 250°C; t_R GBL = 8,50 minutos).

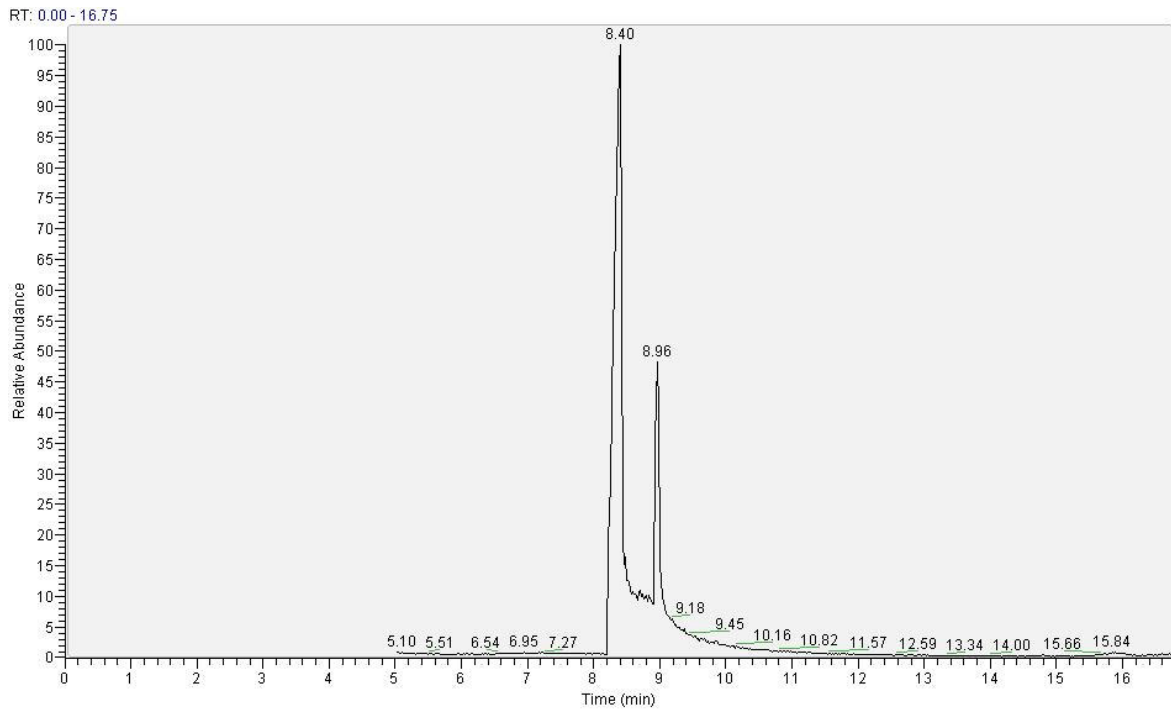


Figura 87: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de metilo em propan-2-ol (temperatura do injetor de 150°C; t_R GBL = 8,40 minutos; t_R Éster Metílico de GHB = 8,96 minutos).

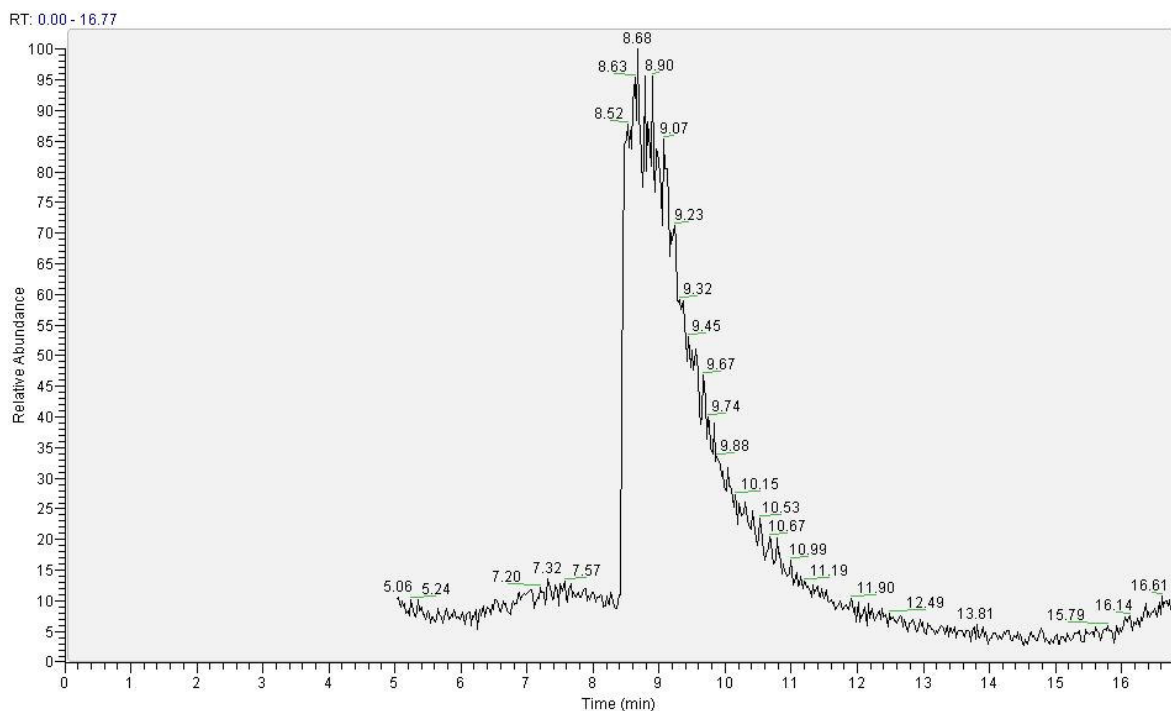


Figura 88: Cromatograma do *gama*-hidroxibutirato de metilo em propan-2-ol (temperatura do injetor de 80°C; t_R Éster Metílico de GHB = 8,68 minutos).

A análise destes cromatogramas parece indicar diferentes comportamentos de lactonização dependendo dos solventes utilizados. Assim, em clorofórmio, solvente mais apolar, e a 150°C, observa-se uma maior extensão da lactonização dos dois ésteres quando comparada com a que ocorre com os outros dois solventes mais polares. O éster

metílico é praticamente transformado totalmente em GBL a 150°C e o éster etílico é lactonizado em clorofórmio em muito maior extensão do que nos outros solventes.

Uma possível explicação para esta preferência da lactonização ocorrer em clorofórmio poderá ser a presença habitual de ácido clorídrico como impureza do clorofórmio que, juntamente com o calor poderá eventualmente catalisar a reação de lactonização [42].

O comportamento dos ésteres em propan-2-ol (Figuras 80 a 82 e 86 a 88) mostra que às temperaturas de 250°C e de 150° C ocorre lactonização, sendo esta praticamente completa à temperatura mais alta e parcial a 150°C. A 80° C, o comportamento cromatográfico de ambos os ésteres e da GBL é muito deficiente, não sendo possível definir picos cromatográficos gaussianos. Este fato pode ser explicado tendo em consideração que a temperatura de injeção (80°C) é menor do que o ponto de ebulição do propan-2-ol (82,5°C) ficando a volatilização da amostra muito dificultada.

O acetato de etilo revelou possuir as características mais adequadas para a análise dos ésteres nas condições de CG-EM utilizadas neste trabalho. Os picos cromatográficos são gaussianos, bem definidos e facilmente mensuráveis.

Capítulo III

Conclusão

5. Conclusão

O GHB e a lactona com ele relacionada, a GBL, são substâncias frequentemente administradas em bebidas de elevado teor etanólico e metanólico. Por reacção com estes álcoois podem formar-se os ésteres: *gama*-hidroxibutirato de etilo e do *gama*-hidroxibutirato de metilo.

Neste trabalho foi possível desenvolver e otimizar os processos de síntese do *gama*-hidroxibutirato de etilo e do *gama*-hidroxibutirato de metilo. Ambas as substâncias foram purificadas e caracterizadas estruturalmente pelos métodos espectroscópicos adequados e habituais.

Foi igualmente estudada a estabilidade do GHB e da GBL em soluções etanólicas e metanólicas tendo em vista observar o desaparecimento daquelas substâncias e da formação dos ésteres etílico e metílico do GHB. Foi possível verificar que há degradação do GHB e da GBL ao longo do tempo e que esta degradação é fortemente condicionada pelo pH. Assim, em soluções etanólicas e metanólicas observa-se que a pH = 2 a degradação do GHB e da GBL é substancialmente mais rápida e mais extensa do que quando o pH não é alterado. A degradação do GHB e da GBL foi igualmente estudada numa bebida branca, uma cachaça brasileira, sendo possível verificar o mesmo comportamento atrás descrito.

Neste trabalho foi também verificada, confirmada e estudada a possibilidade de lactonização dos ésteres etílico e metílico do GHB no injector do sistema CG-EM. Este processo de lactonização depende da temperatura do injector e dos solventes utilizados para dissolução das amostras. Assim, a lactonização é mais extensa com clorofórmio do que com acetato de etilo ou propan-2-ol.

6. Bibliografia

1. WHO. Neurosciences of Psychoactive Substance Use and Dependence. Geneva: World Health Organization (WHO); 2004.
2. NIDA. NIDA InfoFacts: Club Drugs (GHB, Ketamine, and Rohypnol). National Institute of Drug Abuse; 2008 [updated 08/2008; cited 2009 30/07/2009]; Available from: <http://www.drugabuse.gov/infofacts/Clubdrugs.html>.
3. Hillebrand J, Olszewski D, Sedefov R. GHB and its Precursor GBL: an Emerging Trend Case Study. In: EMCDDA, editor. EMCDDA Thematic Papers. Lisbon: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction; 2008. p. 1 - 32.
4. Maccioni P, Pes D, Fantini N, Carai MA, Gessa GL, Colombo G. Gamma-Hydroxybutyric acid (GHB) suppresses alcohol's motivational properties in alcohol-preferring rats. *Alcohol*. 2008 Mar;42(2):107-13.
5. Carter LP, Pardi D, Gorsline J, Griffiths RR. Illicit gamma-hydroxybutyrate (GHB) and pharmaceutical sodium oxybate (Xyrem®): Differences in characteristics and misuse. *Drug and Alcohol Dependence*. 2009;104(1-2):1-10.
6. EMCDDA. Sexual Assaults Facilitated by Drugs and Alcohol. In: EMCDDA, editor. Lisbon: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction; 2008. p. 1 -19.
7. Bennett MJ, Steiner RR. Detection of Gamma-Hydroxybutyric Acid in Various Drink Matrices via AccuTOF-DART*. *Journal of forensic sciences*. 2009;54(2):370-5.
8. Hennessy SA, Moane SM, McDermott SD. The reactivity of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) in alcoholic solutions. *Journal of Forensic Sciences*. 2004;49(6):1220-9.
9. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. New Jersey: Merck & Co., Inc.; 2006. Available from: <https://themerckindex.cambridgesoft.com/TheMerckIndex/index.asp>.
10. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. London: Pharmaceutical Press; 2007 [cited 2007. Available from: www.medicinescomplete.com].
11. Garcia FB, Pedraza C, Navarro JF. [Update on gamma-hydroxybutyric acid]. *Rev Neurol*. 2006 Jul 1-15;43(1):39-48.
12. Maitre M, Humbert JP, Kemmel V, Aunis D, Andriamampandry C. [A mechanism for gamma-hydroxybutyrate (GHB) as a drug and a substance of abuse]. *Med Sci (Paris)*. 2005 Mar;21(3):284-9.
13. Li J, Stokes SA, Woeckener A. A tale of novel intoxication: a review of the effects of gamma-hydroxybutyric acid with recommendations for management. *Ann Emerg Med*. 1998 Jun;31(6):729-36.

14. Abanades S, Farre M, Segura M, Pichini S, Barral D, Pacifici R, et al. Gamma-hydroxybutyrate (GHB) in humans: pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006 Aug;1074:559-76.
15. Nicholson KL, Balster RL. GHB: a new and novel drug of abuse. *Drug Alcohol Depend*. 2001 Jun 1;63(1):1-22.
16. Kam PC, Yoong FF. Gamma-hydroxybutyric acid: an emerging recreational drug. *Anaesthesia*. 1998 Dec;53(12):1195-8.
17. Crunelli V, Emri Z, Leresche N. Unravelling the brain targets of gamma-hydroxybutyric acid. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Feb;6(1):44-52.
18. Rodgers J, Ashton CH, Gilvarry E, Young AH. Liquid ecstasy: a new kid on the dance floor. *Br J Psychiatry*. 2004 Feb;184:104-6.
19. Relatório Público Europeu de Avaliação (EPAR) Xyrem. Londres: Agência Europeia do Medicamento; 2007 [updated 02/2007; cited 2008 02/04/2008]; Available from: www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/xyrem/324056pt1.pdf.
20. Abanades S, Farre M, Barral D, Torrens M, Closas N, Langohr K, et al. Relative abuse liability of gamma-hydroxybutyric acid, flunitrazepam, and ethanol in club drug users. *Journal of clinical psychopharmacology*. 2007 Dec;27(6):625-38.
21. Couper FJ, Marinetti, L J. Gamma-Hydroxybutyrate (GHB) - Effects on Human Performance and Behaviour. *Forensic Sci Rev*. 2002;14:101 - 21.
22. Mason PE, Kerns WP, 2nd. Gamma hydroxybutyric acid (GHB) intoxication. *Acad Emerg Med*. 2002 Jul;9(7):730-9.
23. Alston WC, 2nd, Ng K. Rapid colorimetric screening test for gamma-hydroxybutyric acid (liquid X) in human urine. *Forensic science international*. 2002 Apr 18;126(2):114-7.
24. Bravo DT, Harris DO, Parsons SM. Reliable, sensitive, rapid and quantitative enzyme-based assay for gamma-hydroxybutyric acid (GHB). *Journal of forensic sciences*. 2004 Mar;49(2):379-87.
25. Bortolotti F, De Paoli G, Gottardo R, Trattene M, Tagliaro F. Determination of gamma-hydroxybutyric acid in biological fluids by using capillary electrophoresis with indirect detection. *Journal of chromatography*. 2004 Feb 5;800(1-2):239-44.
26. Mercer JW, Oldfield LS, Hoffman KN, Shakleya DM, Bell SC. Comparative analysis of gamma-hydroxybutyrate and gamma-hydroxyvalerate using GC/MS and HPLC. *J Forensic Sci*. 2007 Mar;52(2):383-8.
27. Sigma Aldrich. 2008 [cited 2008 20/03/2008]; Available from: www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/H7629.
28. Soderlund E. The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals and The Dutch Expert Committee on Occupational Standards,

135. Gamma-Butyrolactone (GBL). Stockholm: National Institute of Working Life; 2004.
29. Hennessy SA, Moane SM, McDermott SD. The reactivity of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) in alcoholic solutions. *Journal of forensic sciences*. 2004 Nov;49(6):1220-9.
30. Scott RPW. *Principle and Practice of Chromatography*. Sussex: Library4science; [cited 2008 24/03/2008]; Available from: <http://www.library4science.com/>.
31. Skoog DA, Holler, F J, Nieman, T A. *Princípios de Análise Instrumental*. 5 ed. Porto Alegre: Bookman; 2002.
32. Ribani M, Bortolli, C B G, Collins, C H, Jardim, I C S F, Melo, L F C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*. 2004;27(5):771 - 80.
33. Kitson FG, Larsen BS, McEwn CN. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: a Practical Guide*. San Diego: Academic Press; 1996.
34. Nascimento ESP. *Ésteres em Aguardente de Cana: Seu Perfil*. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2007.
35. Cass QB, Degani ALG. *Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégias e Validação*. São Carlos: UFSCAR; 2001.
36. Wikipedia. *Typischer Aufbau einer HPLC-Apparatur*2009 [cited 2009 25/09/2009]: Available from: <http://sh.wikipedia.org/wiki/Datoteka:HPLC.gif>.
37. Willard HH, Merritt, L L, Dean, J A, Settle, F A. *Instrumental Methods of Analysis*. 7 ed. Belmont: Wadsworth; 1988.
38. Knapp DR. *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. 1 ed. New York: Wiley; 1979.
39. Oliveira SML. *Análise de GHB e Substâncias Precursoras em Bebidas Alcoólicas*. Porto: Universidade do Porto; 2009.
40. Brown HC, Keblys KA. Rates and Equilibria in the Reaction of Gamma-Butyrolactone with Alcohols. A Convenient Synthesis of 4-Hydroxybutyrates. *The Journal of Organic Chemistry*. 1966;31(2):485-7.
41. ICH. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva1996.
42. Armarego WLE, Chai CLL. *Purification of laboratory chemicals* 5ed. Cornwall: Butterworth-Heinemann; 2003.