

Análise de GHB e Substâncias Precursoras em Bebidas Alcoólicas

Sofia de Magalhães Lima e Oliveira

Porto, 2009

U. PORTO



**FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

Análise de GHB e Substâncias Precursoras em Bebidas Alcoólicas

Sofia de Magalhães Lima e Oliveira

Dissertação de candidatura apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto para
a obtenção de grau de Mestre em Toxicologia Analítica, Clínica e Forense

Orientador: Professor Doutor Carlos Manuel Magalhães Afonso

Porto, 2009



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Ao Sandro,
Aos meus pais,
Aos meus tios Clara e Waldemar

Agradecimentos

Gostaria de apresentar os meus agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para a concretização deste trabalho.

Assim, começo por agradecer ao Professor Doutor Carlos Afonso ter aceite a orientação deste trabalho e por me ter dado a oportunidade de o poder realizar. Agradeço a forma entusiasta e cuidadosa com que sempre orientou este trabalho, bem como a disponibilidade que sempre demonstrou. E porque a ciência é feita com pessoas agradeço os conhecimentos que me transmitiu quer em termos de trabalho, quer em termos pessoais, que jamais esquecerei. Agradeço-lhe profundamente toda a ajuda que me prestou nos momentos menos bons.

Agradeço à Professora Doutora Madalena Pinto, Directora do Serviço de Química Orgânica, por me ter permitido realizar este trabalho neste serviço e por me ter disponibilizado o material e equipamento necessários.

Agradeço à Professora Doutora Maria de Lourdes Bastos, Directora do Serviço de Toxicologia e coordenadora do Mestrado em Toxicologia Analítica, Clínica e Forense, a disponibilidade de coordenar tal Mestrado e assim permitir a criação de um Mestrado numa área tão interessante como a Toxicologia e que versasse temas realmente importantes nesse domínio. Agradeço a preocupação e o cuidado que sempre demonstrou relativamente ao desenvolvimento do Mestrado.

Agradeço à Dr^a. Sara a ajuda que me prestou durante todo o desenvolvimento deste trabalho, a disponibilidade que sempre demonstrou e os conhecimentos que me transmitiu.

Agradeço ao Professor Doutor Artur Silva, responsável do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, por me ter disponibilizado os meios necessários à execução deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Hilário Tavares, responsável do espectrofotómetro de ressonância magnética, a disponibilidade para me ajudar a obter os espectros que necessitei.

Agradeço a todos os docentes, investigadores e auxiliares do Serviço de Química Orgânica, a simpatia com que sempre me receberam.

Agradeço à Fundação AstraZeneca pelo apoio financeiro.

Agradeço ao Professor Doutor António Albino Teixeira, Professor Catedrático do Instituto Farmacologia e Terapêutica da Faculdade de Medicina, e meu orientador de tese de Doutoramento, e à Doutora Teresa, minha co-orientadora, terem-me permitido a frequência concomitante do Mestrado.

Agradeço aos meus amigos o apoio que me deram.

Agradeço à minha família o apoio e o amor que me dão. Agradeço especialmente aos meus tios Manuel e António e aos meus primos Armando e Daniel a visão que me dão da vida e à minha prima Raquel pelo conforto e pela boa disposição que me deu durante este período.

Finalmente agradeço aos meus pais, aos meus tios Clara e Waldemar e ao Sandro a paciência que tiveram relativamente às minhas ausências, agradeço pelo grande incentivo e ajuda que me deram e dão e pelo infindável amor que me transmitem.

Obrigada a todos!

Resumo

O ácido γ -hidroxibutírico (GHB) é um depressor do sistema nervoso central e é muitas vezes utilizado como droga de abuso, nomeadamente em discotecas e festas privadas. As razões subjacentes ao consumo abusivo do GHB são o facto de provocar euforia e de facilitar a violação sexual. Frequentemente é adicionado a bebidas alcoólicas, o que, por um lado, potencia os seus efeitos, devido à interacção com o etanol, e, por outro, disfarça o sabor a salgado do GHB, impedindo que as vítimas de violação sexual o detectem. Os casos de coma e morte associados a consumo de GHB envolvem normalmente a utilização de outras substâncias depressoras do SNC, como o etanol.

O GHB está bioquímica e estruturalmente relacionado com outras substâncias: γ -butirolactona (GBL), 1,4-butanodiol (1,4-BD), ácido γ -aminobutírico (GABA). Estas substâncias constituem os precursores do GHB. Todas elas originam rapidamente GHB no organismo. Recentemente e muito devido a restrições legais o GHB tem vindo a ser substituído pelo 1,4-BD e pela GBL como drogas de abuso. Apesar disso, as implicações legais do consumo de GHB ou dos seus precursores são diferentes.

Uma vez que o GHB e os seus precursores são rapidamente metabolizados, perante uma potencial vítima de intoxicação se a pesquisa nas matrizes biológicas (sangue e urina) não for efectuada em tempo útil, dificilmente se conseguirão detectar. O GHB e os seus precursores são frequentemente ingeridos por adição a bebidas alcoólicas. Assim, o seu doseamento nessas bebidas é de extrema importância, pois poderá contribuir para o conhecimento da natureza do agente intoxicante bem como da dose a que a potencial vítima esteve sujeita. Por estes motivos, é necessário desenvolver métodos de análise que permitam a identificação e o doseamento de uma forma simples e rápida não só do GHB, mas também das substâncias precursoras em bebidas alcoólicas.

O objectivo deste trabalho foi identificar e dosear o GHB e substâncias precursoras em bebidas alcoólicas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). O doseamento do GHB, 1,4-BD e do GABA foi efectuado pelo método do padrão interno. O doseamento da GBL foi efectuado pelo método do padrão externo. O GHB, o 1,4-BD e GABA foram analisados após derivatização. A GBL foi extraída com acetato de etilo e analisada directamente. O método desenvolvido foi validado de acordo com as normas da "International Conference on Harmonization" (ICH) e mostrou ser simples, preciso e sensível.

Abstract

Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) is a central nervous system depressant. GHB is a drug of abuse and is used in clubs and house parties. GHB causes euphoria and disinhibition and potentiates de sexuality, being used as drug facilitated sexual assault (DFSA). Usually GHB is added to alcoholic drinks which potentiate GHB depressant effects and hide the GHB salty taste, which makes the GHB detection by the victims of sexual assault a hard task. GHB can cause coma and death, namely if it is consumed with other CNS depressants, such as ethanol. GHB is related to other substances such as: γ -butyrolactone (GBL), 1,4-butanediol (1,4-BD), γ -aminobutyric acid (GABA). These substances are GHB precursors. In the organism, GHB precursors are rapidly converted to GHB. More recently, and for legal reasons GHB was substituted by 1,4-BD and GBL. Besides this, legal implications of consuming GHB or its precursors are different.

Once GHB and precursors are rapidly metabolized, in face of a potential intoxicated victim the analyses to the biological matrices (blood and urine) needs to be done promptly, otherwise they will not be detected. GHB and related substances consuming is related to the ethanol consuming and usually they are added to alcoholic drinks. So, if we have the chance of analysing those drinks it will be very important, once it could allow us to know the nature of intoxicant agent and the dose consumed. For this reason it is necessary to develop analytical methodologies to identify and quantificate easily and rapidly GHB and its precursors in alcoholic drinks.

The aim of this work was to identify and quantificate GHB and precursors in alcoholic drinks by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). GHB, 14-BD and GABA were quantificated by internal standard method. GBL was quantificated by external standard method. GHB, 14-BD and GABA were analysed after derivatization. GBL was analysed directly after extraction with ethyl acetate. The method was validated according to International Conference on Harmonization (ICH) and showed to be simple, sensitive and precise.

Índice

RESUMO	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
ABREVIATURAS	X
1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS	1
1.1. GHB - Aspectos Gerais	1
1.2. GHB – Aspectos Químicos, Físico-químicos e Biológicos	2
1.3. GHB – Substância Endógena	7
1.4. GHB – Fármaco	11
1.5. GHB – Droga de Abuso	11
1.6. GHB – Farmacocinética	12
1.7. GHB – Acidose	14
1.8. GHB – Toxicidade	15
1.9. GHB – Dados Estatísticos	17
1.10. GHB – Restrições Legais	18
1.11. GHB – Aspectos Analíticos	18

1.12. Objectivos	20
2. EXPERIMENTAL	21
2.1. Reagentes e Solventes	21
2.2. Equipamento	21
2.3. Síntese e Identificação do Sal Sódico do GHB	22
2.4. Soluções Padrão, Soluções Problema e Branco	22
2.5. Derivatização	24
2.6. Extração Líquido/Líquido (L/L)	24
2.7. Análise GC-MS	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1. Síntese e Caracterização do Sal Sódico do GHB	27
3.2. Desenvolvimento do Método para Análise do GHB, 1,4-BD, GABA e GBL	31
3.3. Validação do Método	45
3.4. Doseamento de GHB, 1,4-BD, GABA e GBL numa Bebida Alcoólica	56
4. CONCLUSÕES	60
BIBLIOGRAFIA	61

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura química do GHB	2
Figura 2: Interconversão da GBL, GHB livre e GHB na forma de sal	3
Figura 3: Comportamento do GHB em soluções alcoólicas	4
Figura 4: Estrutura química dos precursores do GHB	4
Figura 5: Metabolização do 1,4-BD a GHB	4
Figura 6: Metabolização do GABA a GHB	5
Figura 7: Biossíntese do GHB	7
Figura 8: Efeito do GHB sobre a libertação de GABA e glutamato	9
Figura 9: Metabolização do GHB	13
Figura 10: Metabolismo da GBL e do 1,4-BD a GHB	14
Figura 11: Reacção de derivatização do GHB e das substâncias relacionadas com o GHB.	20
Figura 12: Esquema geral de procedimentos para análise dos GHB, 1,4-BD, GABA e GBL na bebida.	23
Figura 13: Programa de temperaturas da coluna utilizado na análise dos derivados sililados do GHB, 1,4-BD, GABA e ácido 2-hidroxicapróico.	25
Figura 14: Programa de temperaturas da coluna utilizado na análise da GBL	25
Figura 15: Reacção de síntese do sal sódico do GHB a partir da GBL	27
Figura 16: Equilíbrio do GHB na forma livre com a GBL e com o GHB na forma iónica	28
Figura 17: Espectro IV do sal sódico do GHB.	28
Figura 18: Vibrações de alongamento-encurtamento do anião carboxilato do sal sódico do GHB	29
Figura 19: Espectro ¹ H RMN do sal sódico do GHB	29
Figura 20: Espectro ¹³ C RMN do sal sódico do GHB	30
Figura 21: Estrutura química do derivado sililado do GHB	30
Figura 22: Cromatograma e espectro de massa obtido em modo total do derivado sililado do produto de síntese da GBL com NaOH	31
Figura 23: Principais quebras em espectrometria de massa do derivado sililado do GHB	31
Figura 24: Mecanismo de sililação com BSTFA+1%TMCS	32
Figura 25: Estrutura química dos derivados di e trissililados do GABA	33
Figura 26: Cromatograma do derivado sililado do GHB	33
Figura 27: Cromatograma do derivado sililado do 1,4-BD	34

Figura 28: Cromatograma dos derivados sililados do GABA.	34
Figura 29: Cromatograma do derivado sililado do ácido 2-hidroxicapróico	35
Figura 30: Cromatograma da GBL	35
Figura 31: Cromatograma dos derivados sililados do GHB, 1,4-BD e ácido 2-hidroxicapróico obtido a partir da bebida adicionada de GHB e 1,4-BD.	36
Figura 32: Cromatograma dos derivados sililados do GABA e ácido 2-hidroxicapróico obtido a partir da bebida adicionada de GABA.	36
Figura 33: Cromatograma obtido a partir da bebida adicionada de GBL.	37
Figura 34: Espectro de massa obtido em modo TIC do derivado sililado do GHB.	37
Figura 35: Principais fragmentos do derivado sililado do GHB	38
Figura 36: Espectro de massa obtido em modo TIC do derivado sililado do 1,4-BD	39
Figura 37: Principais fragmentos do derivado sililado do 1,4-BD	39
Figura 38: Espectro de massa obtido em modo TIC do derivado dissililado do GABA.	40
Figura 39: Principais fragmentos do derivado dissililado do GABA	40
Figura 40: Espectro de massa obtido em modo TIC do derivado trissililado do GABA	41
Figura 41: Principais fragmentos do derivado trissililado do GABA	41
Figura 42: Espectro de massa obtido em modo total do derivado sililado do padrão interno.	42
Figura 43: Principais fragmentos do derivado sililado do ácido 2-hidroxicapróico	42
Figura 44: Espectro de massa da GBL obtido em modo total	43
Figura 45: Principais quebras da GBL	43
Figura 46: Espectro de massa obtido em modo SIM do derivado sililado do GHB.	44
Figura 47: Espectro de massa obtido em modo SIM do derivado sililado 1,4-BD.	44
Figura 48: Espectros de massa obtidos em modo SIM dos derivados sililados do GABA. (A) Espectro de massa obtido em modo SIM do derivado dissililado do GABA; (B) espectro de massa obtido em modo SIM do derivado trissililado do GABA.	44
Figura 49: Espectro de massa obtido em modo SIM do derivado sililado do ácido 2-hidroxicapróico.	45
Figura 50: Espectro de massa obtido em modo SIM da GBL	45
Figura 51: Cromatograma da matriz derivatizada isenta das substâncias de interesse e adicionada de padrão interno	46
Figura 52: Cromatograma da matriz isenta das substâncias de interesse	46
Figura 53: Linearidade obtida para o GHB, 1,4-BD, GABA e ácido 2-hidroxicapróico.	47
Figura 54: Curvas de calibração obtidas pelo método do padrão interno para o GHB, 1,4-BD e GABA.	48
Figura 55: Curva de calibração obtida pelo método do padrão externo para a GBL	49
Figura 56: Cromatograma dos derivados sililados do GHB, 1,4-BD e ácido 2-hidroxicapróico obtido a partir da bebida adicionada de GHB e 1,4-BD.	56
Figura 57: Cromatograma dos derivados sililados do GABA e ácido 2-hidroxicapróico obtido a partir da bebida adicionada de GABA.	57
Figura 58: Cromatograma obtido a partir da bebida adicionada de GBL.	57

Figura 59: Cromatograma e espectro de massa obtido em modo TIC a partir da solução desconhecida.

59

Figura 60: Cromatograma e espectro de massa obtido em modo TIC a partir da solução desconhecida adicionada de GHB.

59

Índice de Tabelas

Tabela 1: Características físico-químicas do GHB	5
Tabela 2: Características físico-químicas da GBL	6
Tabela 3: Características físico-químicas do 1,4-BD	6
Tabela 4: Características físico-químicas do GABA	6
Tabela 5: Efeitos do GHB de acordo com a dose administrada	15
Tabela 6: Concentrações utilizadas para o estudo da linearidade	22
Tabela 7: Concentrações preparadas para o doseamento das substâncias pelo método do padrão interno.	23
Tabela 8: Tempos de retenção das substâncias em análise	35
Tabela 9: Zona linear, equação da curva e coeficiente de correlação do GHB, 1,4-BD, GABA e ácido 2-hidroxicapróico.	48
Tabela 10: Equação da curva de calibração e factor de correlação para o GHB, 1,4-BD e GABA	49
Tabela 11: Limite de detecção e quantificação do GHB, 1,4-BD, GABA e GBL.	49
Tabela 12: Repetibilidade para diferentes concentrações de GHB, obtida para o estudo da linearidade.	50
Tabela 13: Repetibilidade para diferentes concentrações de 1,4-BD, obtida para o estudo da linearidade.	50
Tabela 14: Repetibilidade para diferentes concentrações de GABA, obtida para o estudo da linearidade.	51
Tabela 15: Repetibilidade para diferentes concentrações de ácido 2-hidroxicapróico, obtida para o estudo da linearidade.	51
Tabela 16: Repetibilidade para diferentes concentrações de GHB, obtida pelo método do padrão interno.	51
Tabela 17: Repetibilidade para diferentes concentrações de 1,4-BD, obtida pelo método do padrão interno.	52
Tabela 18: Repetibilidade para diferentes concentrações de GABA, obtida pelo método do padrão interno.	52
Tabela 19: Repetibilidade para diferentes concentrações de GBL, obtida pelo método do padrão externo.	52

Tabela 20: Precisão intermédia para diferentes concentrações de GHB, obtida pelo método do padrão interno.	53
Tabela 21: Precisão intermédia para diferentes concentrações de 1,4-BD, obtida pelo método do padrão interno.	53
Tabela 22: Precisão intermédia para diferentes concentrações de GABA, obtida pelo método do padrão interno.	53
Tabela 23: Precisão intermédia para diferentes concentrações de GBL, obtida pelo método do padrão externo.	54
Tabela 24: Exactidão para diferentes concentrações de GHB, obtida pelo método do padrão interno.	54
Tabela 25: Exactidão para diferentes concentrações de 1,4-BD, obtida pelo método do padrão interno.	55
Tabela 26: Exactidão para diferentes concentrações de GABA, obtida pelo método do padrão interno.	55
Tabela 27: Exactidão para diferentes concentrações de GBL, obtida pelo método do padrão externo.	55
Tabela 28: Concentração de GHB, 1,4-BD, GABA e GBL na aguardente	58

Abreviaturas

1,4-BD – 1,4-butanodiol

BHE – Barreira hemato-encefálica

BSTFA – Bis-(trimetilsilil)-fluoracetamida

DART – Análise Directa em Tempo Real

FID – Detector de Ionização em Chama

GABA – Ácido γ -aminobutírico

GBL – γ -Butirolactona

GC – Cromatografia Gasosa

GC-MS - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa

GHB – Ácido γ -hidroxibutírico

5-HIAA – 5-Hidroxiindol

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IV – Infravermelho

ICH – Conferência Internacional de Harmonização

LC – Cromatografia Líquida

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MS – Espectrometria de Massa

MSTFA – *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida

PI – Padrão Interno

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SSA – Semialdeído Succínico

SIM - Monitorização com Iões Seleccionados

SN2 – Substituição Nucleofílica Bimolecular

SNC – Sistema Nervoso Central

SPE – Extração em Fase Sólida

SPME – Microextração em Fase Sólida

T-HCA – *Trans*-hidrixicrotonato

TIC – Cromatograma de Iões Total

TMCS - Trimetilclorosilano

1. Introdução e Objectivos

O consumo de drogas de abuso é uma preocupação crescente no Mundo Ocidental. O ácido γ -hidroxibutírico (GHB) e outras substâncias que se encontram quimicamente relacionadas com o GHB, tais como a γ -butirolactona (GBL) e o 1,4-butanodiol (1,4-BD) não são excepções. O GHB é controlado pela legislação, mas os seus precursores não são, o que faz com que o GHB seja muitas vezes substituído pela GBL ou pelo 1,4-BD (Nicholson 2001). O ácido γ -aminobutírico (GABA) é também um precursor do GHB embora não esteja descrita utilização abusiva desta substância.

Devido aos efeitos que provocam, como euforia e sensação de bem-estar, o GHB e os seus precursores são consumidos sobretudo em discotecas, bares e festas privadas. A prevalência de consumo do GHB e dos seus precursores entre jovens não é muito significativa. Contudo, devido à estreita janela de segurança podem provocar facilmente coma e morte, pelo que os custos de saúde associados ao consumo de GHB, GBL ou 1,4-BD podem ser relativamente elevados. O GHB tem também sido muito associado a violações sexuais (DFSA: drug-facilitated sexual assault) (Couper 2002).

A utilização abusiva do GHB está muito associada ao consumo de bebidas alcoólicas, o que por um lado dificulta a detecção pelas vítimas de abuso sexual e por outro potencia a sua toxicidade. Assim, reveste-se de particular importância a pesquisa e doseamento quer do GHB quer das substâncias precursoras em bebidas alcoólicas.

1.1. GHB - Aspectos Gerais

O GHB é uma substância endógena, mas é também um fármaco e uma droga de abuso.

Nos anos 60 foi provada a existência do GHB como substância endógena, sabendo-se hoje que existe no cérebro e noutros tecidos dos mamíferos (Nicholson 2001). O GHB foi sintetizado no início dos anos 60 por Laborit e, inicialmente, foi usado como fármaco anestésico. Nos anos 70 verificou-se que poderia ser útil no tratamento das alterações do sono, nomeadamente da narcolepsia (Couper 2002). Actualmente o GHB é ainda utilizado na terapêutica aproveitando

as suas propriedades como fármaco depressor (Couper 2002).

A crença de que o GHB poderia estimular a libertação de hormona do crescimento tornou o seu uso muito popular durante os anos 90 entre os praticantes de musculação, tendo sido incluído em vários suplementos alimentares (Couper 2002). A partir do final dos anos 90, o GHB granjeou muita popularidade como droga recreativa, para originar euforia e desinibição (Couper 2002).

1.2. GHB – Aspectos Químicos, Físico-químicos e Biológicos

O termo GHB corresponde ao ácido γ -hidroxibutírico ou 4-hidroxibutanóico (Figura 1)(Couper 2002). Na literatura surge muitas vezes designado por 4-hidroxibutirato e algumas vezes também por oxibato de sódio, revelando o seu uso na forma de sal sódico.

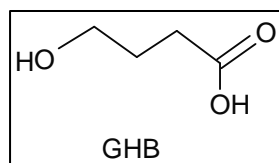


Figura 1: Estrutura química do GHB

O GHB é um ácido carboxílico de cadeia curta e hidroxilado na posição *gamma* (Nicholson 2001; Couper 2002). O GHB é muitas vezes utilizado como sal sódico. O sal sódico do GHB é uma substância sólida, pouco solúvel em lípidos e solventes orgânicos, mas facilmente solúvel em água. É inodoro e tem um sabor salgado. O sal sódico do GHB pode ser encontrado na forma de pó, comprimidos ou cápsulas. Tem um pka de 4,72. Em solução, o GHB encontra-se em equilíbrio com a GBL. (Couper 2002). A GBL resulta da intra-esterificação que ocorre entre o grupo carboxilo e o grupo hidroxilo de uma molécula de GHB. No organismo a GBL origina fácil e rapidamente GHB através de um processo enzimático controlado pela lactonase sérica (Couper 2002).

In vitro esta transformação é espontânea e depende do pH da solução. Em solução aquosa o

GHB pode ser formado quer por hidrólise ácido-catalisada da GBL, quer por protonação do GHB na forma de carboxilato (**Figura 2**).

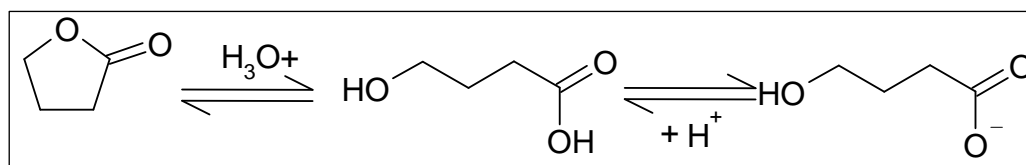


Figura 2: Interconversão da GBL, GHB livre e GHB na forma de sal

Ambas as reacções são reversíveis, podendo o GHB na forma livre originar a GBL, por esterificação, ou o ião carboxilato por dissociação do ácido. Ambas as reacções são dependentes do pH. A reacção de hidrólise/esterificação diminui quando o pH passa de fortemente ácido para moderadamente ácido (pH=4-7), sendo mínima entre pH4 e pH7 e voltando a aumentar para valores de pH maiores de 7. A reacção de protonação depende da concentração de todas as espécies envolvidas: concentração de GHB na forma de carboxilato, concentração de GHB na forma livre e concentração hidrogeniônica (que define o pH). Assim, quando o pH é igual ao pka (4,71) existe uma quantidade equimolecular de GHB livre e GHB na forma de carboxilato. Quando o pH é menor do que 2,71, predomina o GHB na forma livre e quando o pH é maior que 6,71, predomina o GHB na forma de carboxilato. Para valores de pH compreendidos entre 2,71 e 6,71, a concentração de GHB na forma de carboxilato vai aumentando progressivamente com o aumento do pH (DeFrancesco 2006).

O recurso a bebidas alcoólicas para disfarçar o sabor do GHB pode alterar a estabilidade do ácido. Assim, verifica-se que, em presença de soluções alcoólicas, podem coexistir e competir entre si duas reacções: a esterificação espontânea de GHB em GBL e a transesterificação da lactona (**Figura 3**). Dependendo do tipo de álcool, da concentração do álcool e do pH, pode estar favorecida uma ou outra reacção (Hennessy 2004).

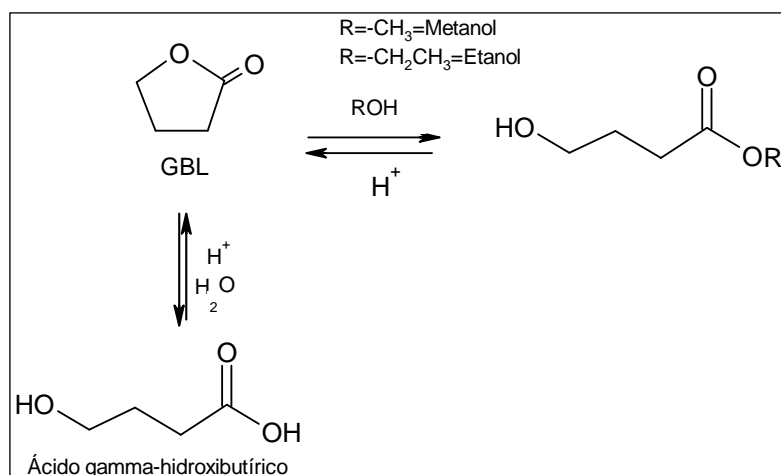


Figura 3: Comportamento do GHB em soluções alcoólicas

Como já referido o GHB encontra-se relacionado com a GBL mas também com outras substâncias: o 1,4-BD e o GABA, que constituem os principais precursores do GHB (Figura 4) (Couper 2002).

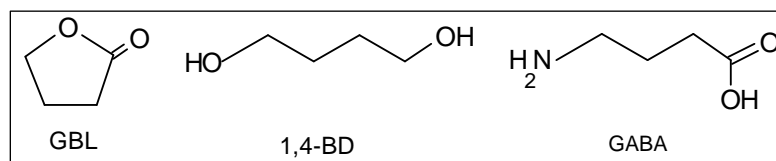


Figura 4: Estrutura química dos precursores do GHB

O 1,4-BD origina o GHB por oxidação de um grupo hidroxilo a ácido carboxílico, via aldeído (4-hidroxitubiraldeído). No organismo este processo oxidativo é controlado pela álcool desidrogenase e pela aldeído desidrogenase (Figura 5) (Couper 2002).

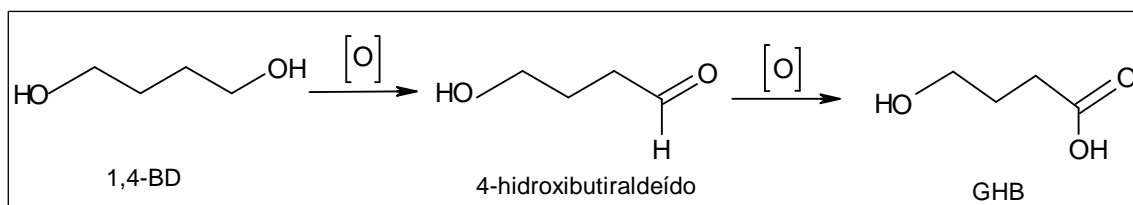


Figura 5: Metabolização do 1,4-BD a GHB

O GABA origina GHB por uma desaminação oxidativa, que transforma a amina em aldeído, seguida de uma redução do aldeído a álcool. No organismo, esta transformação do grupo amino em grupo hidroxilo ocorre via semialdeído succínico (SSA) e é catalisada pela GABA aminotransferase e pela semialdeído succínico redutase (Figura 6)(Couper 2002).

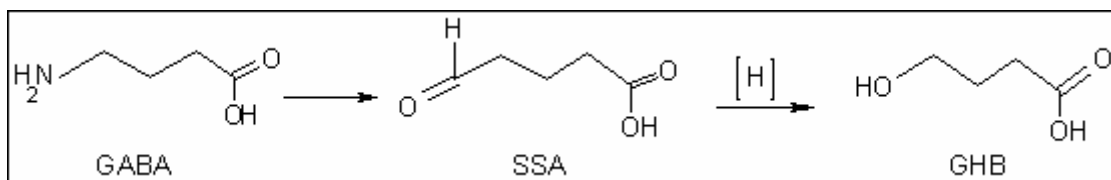


Figura 6: Metabolização do GABA a GHB

As Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3 e Tabela 4 apresentam algumas características do GHB (sal sódico), GBL, 1,4-BD e GABA, respectivamente.

	GHB (Couper 2002)
Estado Físico	Sólido
Características Organolépticas	Branco, salgado e inodoro
Peso Molecular	126,09
Ponto de Fusão (C°)	145-146
pKa	4,72
Solubilidade	Facilmente solúvel na água. Pouco solúvel nos solventes orgânicos e nos lípidos.
Estabilidade	Em solução encontra-se em equilíbrio com a lactona

Tabela 1: Características físico-químicas do GHB

	GBL
Estado Físico	Líquido oleoso
Características Organolépticas	Sabor leve a caramelo, incolor
Peso Molecular	86,09
Densidade (d ⁰ ₁₅)	1,13
Ponto de Fusão (C°)	- 43,53
Ponto de Ebulição (760) (C°)	204

Solubilidade	Solúvel na água, no metanol, no etanol, na acetona, no éter e no benzeno. Pouco solúvel nos hidrocarbonetos alifáticos e ali-cíclicos
Estabilidade	Higroscópico.

Tabela 2: Características físico-químicas da GBL

	1,4-BD
Estado físico	Líquido viscoso
Características Organolépticas	Praticamente inodoro, incolor
Peso Molecular	90,12
Densidade (d_0^{15})	1,017
Ponto de Fusão (C°)	20
Ponto de Ebulição (C°)	228
Solubilidade	Solúvel na água, no DMSO, na acetona e no etanol a 95 % Ligeiramente solúvel no éter etílico e pouco solúvel no benzeno e no éter de petróleo
Estabilidade	Higroscópico. Sensível ao calor e à luz. As soluções aquosas, em DMSO, em etanol a 95% ou em acetona são estáveis durante 24 horas em condições laboratoriais normais.

Tabela 3: Características físico-químicas do 1,4-BD

	GABA
Estado Físico	Sólido
Características Organolépticas	Branco
Peso Molecular	103,12
pKa	10,43
Ponto de Fusão (C°)	195
Solubilidade	Facilmente solúvel na água Insolúvel ou pouco solúvel nos solventes orgânicos.
Estabilidade	Estável nas condições laboratoriais normais

Tabela 4: Características físico-químicas do GABA

1.3. GHB – Substância Endógena

O GHB pode funcionar como neurotransmissor ou neuromodulador. O GHB encontra-se distribuído heterogeneamente pelo sistema nervoso central (SNC). As concentrações de GHB mais elevadas encontram-se no hipocampo, nos gânglios basais, no hipotálamo e na substância negra (Nicholson 2001).

No SNC o GABA constitui a principal fonte de GHB. O GABA sofre desaminação oxidativa pela GABA transaminase e origina o semialdeído succínico. O semialdeído succínico é convertido a GHB por acção da semialdeído succínico redutase. Além do GABA podem existir outras fontes. O 1,4-butanodiol e a GBL podem também constituir uma fonte endógena de GHB. A ideia de que o GABA não é o único precursor do GHB é reforçada pelo facto dos níveis de GHB periféricos serem elevados apesar dos níveis de GABA serem baixos (Figura 7).

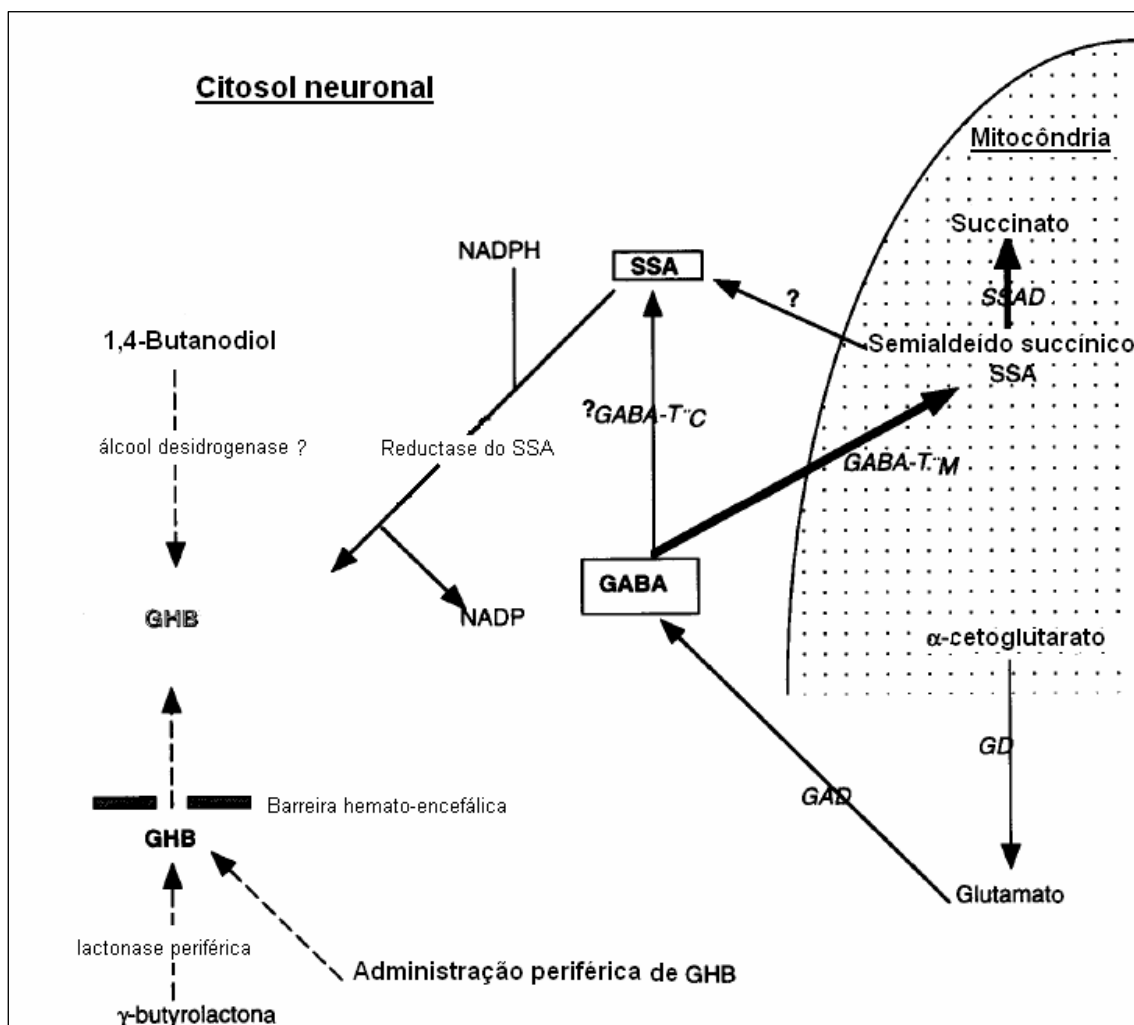


Figura 7: Biossíntese do GHB

Em situações *post-mortem* as aminas biogénicas, tais como a putrescina podem constituir fontes de GHB, contribuindo para um aumento dos níveis de GHB (Moriya 2004).

Pensa-se que o GHB é um neurotransmissor ou neuromodulador. O GHB actua em receptores específicos – receptores do GHB – pré e pós-sinápticos. O GHB também actua em receptores GABA_B, nomeadamente quando é administrado (Figura 8). Além disso interfere com outros neurotransmissores, tais como: dopamina, serotonina e acetilcolina (Nicholson 2001).

O GHB apresenta um efeito bifásico sobre o sistema dopaminérgico. A administração de GHB a diferentes espécies animais provoca inicialmente uma diminuição da libertação da dopamina dos neurónios dopaminérgicos. No caso de concentrações de GHB elevadas este efeito pode não ser visualizado. Os autoreceptores da dopamina são inibidos indirectamente, o que provoca uma estimulação da actividade da hidroxilase da tirosina, havendo assim um aumento da produção de dopamina. Pensa-se que a diminuição da libertação da dopamina é medeada por receptores do GHB. De seguida ocorre um aumento da libertação da dopamina e que é dependente do tempo (a dopamina aumenta com o tempo) e da dose (doses baixas inibem a libertação, doses altas estimulam). O aumento da dopamina pensa-se estar relacionado com os receptores GABA_B (34thECDD 2006).

Segundo Drasbek concentrações de GHB inferiores a 1mM aumentam a libertação de dopamina porque inibem interneurónios GABAérgicos e portanto desinibem as células dopaminérgicas. Isto pode ser responsável pelo potencial de abuso do GHB. Por sua vez, concentrações de GHB superiores a 1mM inibem os neurónios dopaminérgicos directamente e diminuem a libertação de dopamina. Este efeito é medeado pelos receptores GABA_B pós-sinápticos acoplados a canais de K⁺ (Drasbek 2006).

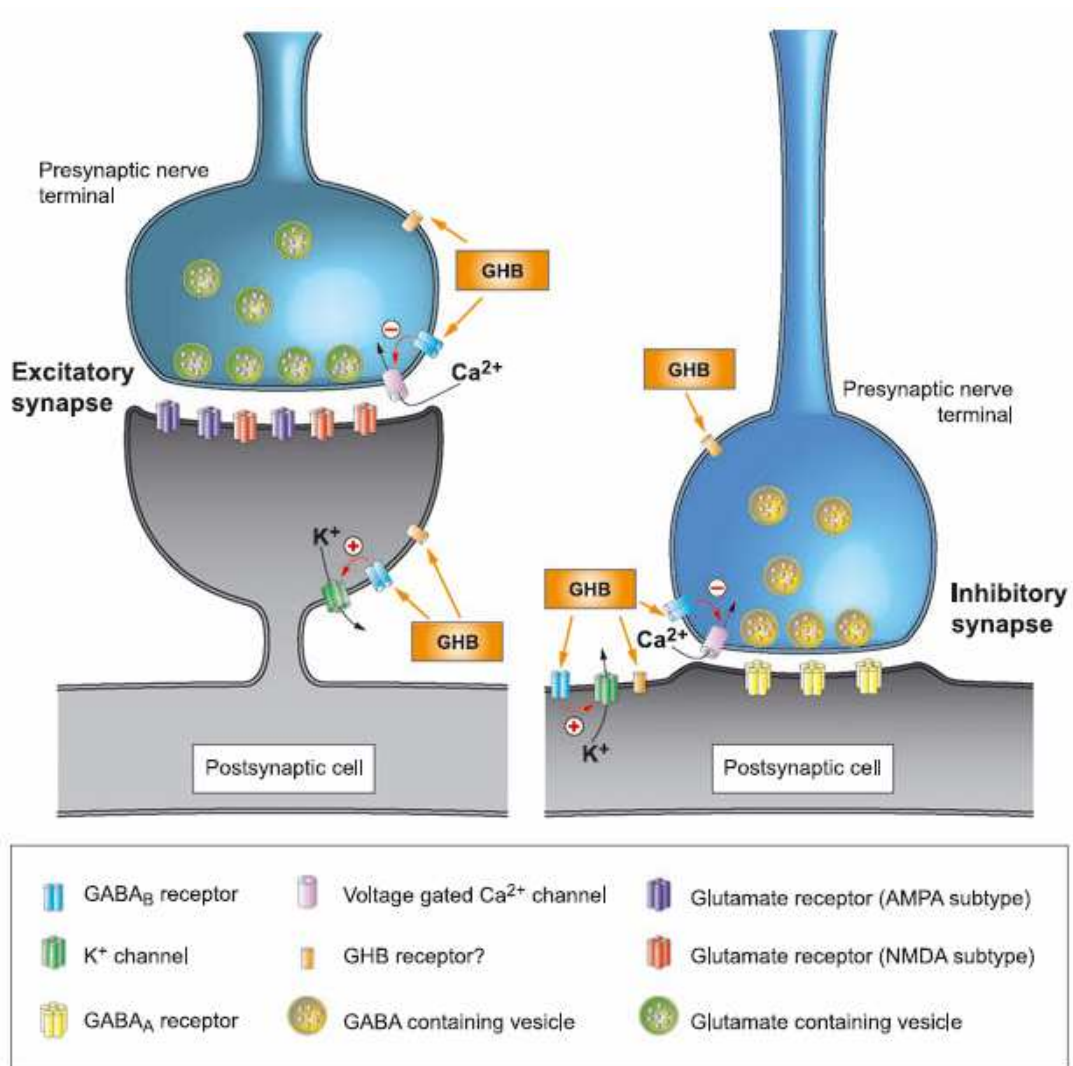


Figura 8: Efeito do GHB sobre a liberação de GABA e glutamato

O GHB interfere com os sistemas da serotonina aumentando a sua renovação, mas sem alterar as concentrações desse neurotransmissor. Este mecanismo ainda não está muito claro, mas pensa-se que é devido a um aumento do transporte do triptofano para o cérebro e à sua recaptação pelas células serotoninérgicas, o que resulta num aumento da concentração deste aminoácido (Nicholson 2001). Efectuou-se um estudo em ratos em que se administrava uma dose de GHB correspondente a 4,0 mmol/kg e verificou-se que isso induzia uma acumulação de triptofano e ácido 5-hidroxiindole acético (5-HIAA) no córtex frontal, estriado e no hipocampo, sem provocar grandes alterações no conteúdo em serotonina. No mesmo estudo verificou-se também que no espaço extracelular o GHB induzia uma ligeira diminuição da liberação daquele neurotransmissor. Além disso a acumulação de triptofano e do 5-HIAA é mimetizada pelos agonistas dos receptores do GHB e bloqueada pelos antagonistas. O GHB induz a acumulação de [3H]-triptofano no espaço extracelular. Quando se administra GHB o

conteúdo em aminoácidos neutros, incluindo o triptofano, aumenta. Como o sistema serotoninérgico está envolvido na regulação do sono, humor e ansiedade, a sua estimulação por doses elevadas de GHB pode estar envolvida em alguns dos efeitos neurofarmacológicos do GHB (Gobaille 2002).

Inicialmente verificou-se que a GBL aumentava os níveis de acetilcolina no cérebro de rato. Mais tarde, porém verificou-se que o GHB diminui os níveis de acetilcolina no corpo estriado e no tronco cerebral. Recentemente verificou-se que o GHB diminui os níveis extracelulares de acetilcolina no hipocampo via receptores GABA_B, pensa-se que a acção do GHB sobre a acetilcolina é a responsável pela amnésia e pela alteração cognitiva provocada pelo GHB (Drasbek 2006)

O GHB interacciona com os neuroesteróides que são substâncias com efeitos ansiolíticos, anticonvulsivantes e hipnóticos. A injeção de GHB em ratos (> 300mg/kg i.p.) aumenta a alo-pregnanolona e a alo-tetraidrodesoxicorticosterona no córtex cerebral. Estes neuroesteróides são neuromoduladores positivos dos receptores GABA_A. Também se verifica que há um aumento dos seus precursores: progesterona e a pregnenolona. Pensa-se que o aumento destes esteróides neuroactivos provém de uma estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. O GHB desinibe os neurónios do hipotálamo, o que leva à libertação do factor de libertação da corticotropina (Drasbek 2006).

A administração de GHB a humanos (2,5g, I.V.) aumenta a concentração plasmática da prolactina e da hormona do crescimento (34thECDD 2006).

Alguns dos efeitos neuroquímicos e comportamentais do GHB, incluindo alterações no disparo de neurónios dopaminérgicos e catalepsia, podem ser atenuados ou eliminados com a administração de antagonistas dos opióides, tais como naloxona e naltrexona. Isto ocorre apesar do GHB não ter afinidade para os receptores opióides e da naloxona não ter afinidade para os receptores do GHB. O GHB tem-se mostrado capaz de estimular um aumento na libertação de vários opióides endógenos. Foi proposto que a inibição dos neurónios dopaminérgicos ocorria através da modulação da actividade interneurónica opióide. Contudo, existem outros estudos que contrariam isto porque o antagonismo da naloxona relativamente aos efeitos do GHB e as alterações dopaminérgicas não são inteiramente consistentes (Nicholson 2001).

O GHB também pode ser encontrado em elevadas concentrações em alguns tecidos periféricos. Pensa-se que o GHB pode ser importante na diminuição do consumo de substratos energéticos e na protecção dos tecidos em situações de necessidade metabólica excessivas,

isto porque as concentrações séricas de GHB aumentam em circunstâncias de stresse (Okun 2001).

1.4. GHB – Fármaco

Nos anos 60 o GHB foi sintetizado pela primeira vez com o intuito de poder ser utilizado como anti-convulsivante na epilepsia, contudo verificou-se que não tinha esse efeito. Mais tarde o GHB foi utilizado como hipnótico e anestésico (Couper 2002). Actualmente, nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa é utilizado para tratar a cataplexia associada à narcolepsia com nome comercial “Xyrem” (Okun 2001; Drasbek 2006; Carter 2009). Na Europa é utilizado no tratamento da síndrome de abstinência ao álcool, com o nome comercial “Alcover” e como adjuvante da anestesia e hipnótico com o nome comercial “Somsanit” (Couper 2002; Carter 2009).

1.5. GHB – Droga de Abuso

O GHB como droga de abuso toma outras designações: “Alcover”, “Anectamine”, “Degreaser + Lye”, “Easy Lay”, “Everclear”, “G,G-caps”, “Gamma-OH”, “Grievous Bodily Harm”, “Georgia”, “Home Boy”, “Great Hormones at Bedtime”, “Liquid Ecstasy”, “Liquid X”, “Natural Sleep 500”, “Oxysleep”, “Salt Water”, “Scoop”, “Soap”, “Smart Drug”, “Somatox-PM”, “Somsanit” e “Vita G” (Couper 2002).

No início dos anos 90 o GHB começou a ser vendido em ginásios, em lojas de produtos de saúde e em sítios da Internet como suplemento alimentar e com o intuito de aumentar a massa muscular, substituindo assim os esteróides anabolizantes (Couper 2002; Carter 2009). Pensa-se que o aumento da massa muscular está relacionado com o aumento da libertação da hormona de crescimento (Drasbek 2006).

O GHB é utilizado sobretudo como droga recreativa, devido à euforia que provoca, mas também para potenciar a função sexual, nomeadamente como droga facilitadora da violação sexual (Carter 2009). O GHB para doses baixas provoca diminuição da inibição e para doses mais elevadas provoca alteração cognitiva, depressão do SNC podendo levar a coma e morte. As características do GHB que o tornam preocupante como droga facilitadora da violação sexual são: provocar desinibição, sedação, amnésia e coma e ainda pelo facto de ser

difícilmente detectado em bebidas com sabores fortes (Meyers 2005).

Quando o GHB é utilizado como droga de abuso a dose mais frequente é 35mg/kg, mas isto depende da experiência dos indivíduos com a substância, da tolerância e da intenção da utilização (Villain 2003). O seu consumo está muito ligado ao do álcool, *ecstasy*, marijuana, cocaína e citalopram (Shaw 2002). A associação de GHB e outras substâncias é mais frequente em casa relativamente a quando é consumido em discotecas (Sumnall 2008). A administração conjunta de outros depressores do sistema nervoso central pode potenciar a toxicidade do GHB, podendo culminar em morte (34thECDD 2006). Assim, o álcool, opióides e benzodiazepinas podem potenciar os efeitos do GHB. As anfetaminas e a cocaína podem mascará-los, nomeadamente a bradicardia.

As substâncias precursoras do GHB provocam os mesmos efeitos que o próprio GHB: euforia, diminuição da inibição e sedação (Couper 2002).

1.6. GHB – Farmacocinética

No Homem a principal via de administração do GHB é a oral. A absorção depende da dose: a absorção diminui com o aumento da dose (Palatini 1993; Couper 2002). O pico plasmático é alcançado ao fim de 20-45 minutos. Isto explica que os efeitos clínicos e adversos se façam sentir em pouco tempo, 10-30 minutos (Couper 2002).

O GHB atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) e a placenta. Apresenta um modelo de distribuição bicompartimental. Não se liga a proteínas, nem se acumula em tecidos, mesmo após administrações repetidas. Atinge-se um equilíbrio entre a concentração cerebral e a concentração noutros tecidos ao fim de 30 minutos (Couper 2002).

O GHB apresenta um extenso metabolismo hepático. A via metabólica principal envolve a oxidação a semialdeído succínico pela GHB desidrogenase. O GHB também pode originar semialdeído succínico via GHB trans-hidrogenase. O semialdeído succínico é oxidado a ácido succínico pela semialdeído succínico desidrogenase. O ácido succínico entra no ciclo de Krebs e origina CO₂, e H₂O. O semialdeído succínico também pode ser metabolizado a GABA pela GABA transaminase (Figura 9).

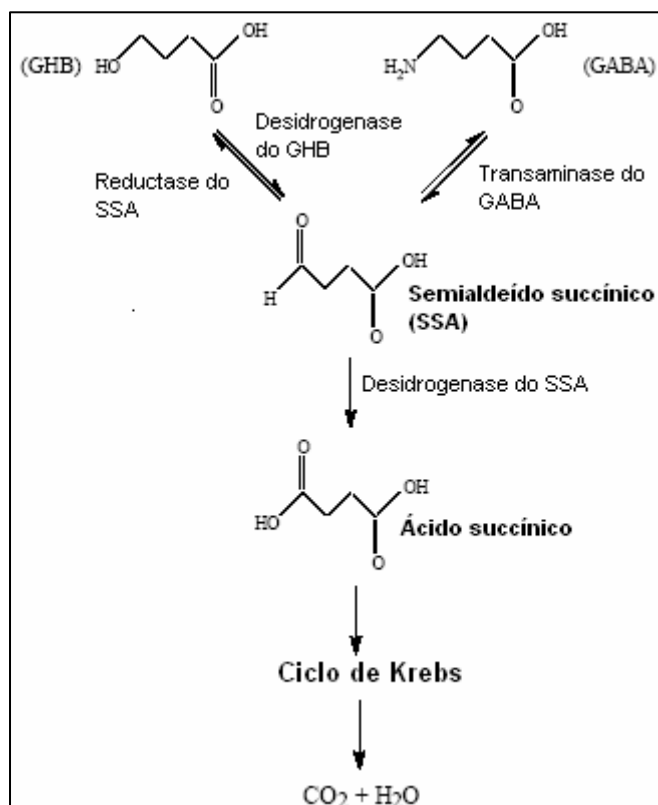


Figura 9: Metabolização do GHB

Uma via alternativa para a metabolização do GHB é através da β -oxidação. Esta via implica a presença de trans-hidroxicrotonato (T-HCA) no cérebro. O T-HCA possui algumas das propriedades funcionais do GHB, nomeadamente ligação a receptores do GHB com propriedades agonistas. Além disso, *in vitro*, o T-HCA é um substrato da GHB desidrogenase e pode ser transformado em aminocronato após a transformação pela GABA transaminase (Maitre 1997).

A principal via de eliminação do GHB é a urinária (Brenneisen 2004). Para doses baixas tem cinética de eliminação de ordem 1 e para doses elevadas tem cinética de eliminação de ordem 0 (Hornfeldt 2002). O GHB não tem um verdadeiro tempo de semi-vida ($T_{1/2}$) (Couper 2002). O $T_{1/2}$ varia entre 30-60 minutos e aumenta de forma não linear com a dose (Ellian 2001).

A GBL é absorvida mais rapidamente que o GHB, o que não é de estranhar, uma vez que é mais lipofílica que o GHB e portanto atravessa mais facilmente as membranas. A GBL é distribuída pelo músculo e depois redistribui-se no sangue. No organismo, e como referido, a GBL converte-se em GHB pela acção da lactonase sérica ou hepática (Figura 10)(Couper 2002). O 1,4-BD tem absorção e distribuição semelhantes às do GHB. O 1,4 – BD é convertido mais lentamente que a lactona a GHB num processo que envolve dois passos de oxidação: oxidação do 1,4-BD a β -hidroxibutiraleído, pela álcool desidrogenase e oxidação do aldeído a

GHB, pela aldeído desidrogenase (Figura 10). A conversão ocorre sobretudo no fígado, mas também pode ocorrer no cérebro e rins (Couper 2002).

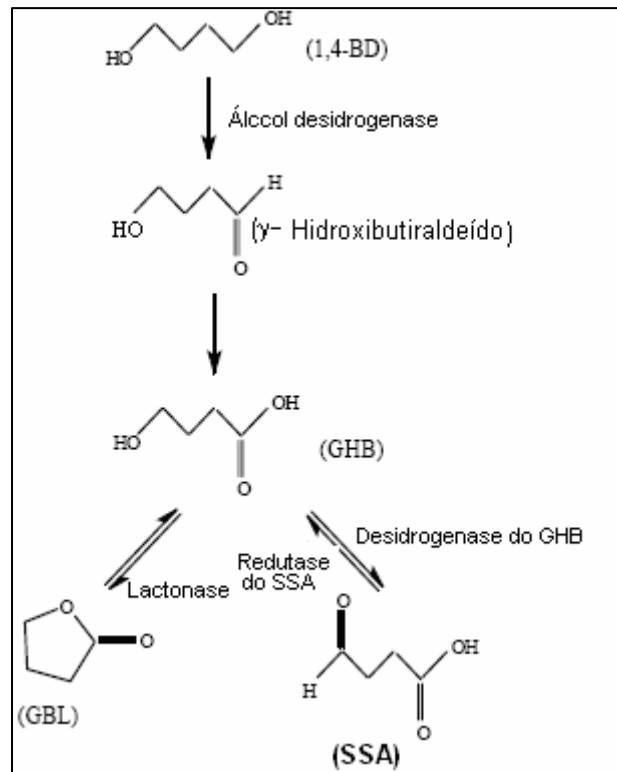


Figura 10: Metabolismo da GBL e do 1,4-BD a GHB

1.7. GHB – Acidose

A acidose do GHB é uma doença genética rara e que se caracteriza por uma deficiência da desidrogenase do semialdeído succínico, o que provoca uma acumulação de GHB e de semialdeído succínico. Os indivíduos com esta doença apresentam concentrações de GHB elevadas na urina, sangue e líquido cefaloraquidiano, uma vez que o excesso de semialdeído succínico é reduzido a GHB pela redutase do semialdeído succínico. Em pessoas com esta patologia têm sido encontradas concentrações de GHB de 260 mg/L na urina, 105 mg/L no soro e 62 mg/L no líquido cefalo-raquidiano. Enquanto que em indivíduos sem esta patologia se têm encontrado as seguintes concentrações de GHB: 1mg/L no soro; 1,07mg/L na urina de homens e 0,23 mg/L na urina de mulheres; relativamente ao líquido cefalo-raquidiano tem-se

encontrado diferentes concentrações consoante a idade: 0,26 – 0,27mg/L em crianças muito novas, 0,11 – 0,13 mg/L em crianças mais velhas e 0,02 - 0,03 mg/L em adultos.

Devido ao aumento das concentrações do GHB esta doença pode provocar problemas a nível óculo-motor, atraso psicomotor, psicose, ataxia, hipercinésia e convulsões. Normalmente é caracterizada por atraso mental, motor e na fala e ainda por hipotonia (Couper 2002; Pearl 2009).

1.8. GHB – Toxicidade

O mecanismo de acção do GHB parece envolver o receptor GABA_B e/ou um receptor específico do GHB (Okun 2001; Dahlen 2002; Wu 2004)

Há uma grande variabilidade inter e intraindividual. Os estudos de toxicidade em animais e humanos indicam que a toxicidade do GHB depende da dose (Couper 2002; Dahlen 2002). A **Tabela 5** resume os efeitos do GHB, consoante a dose administrada.

Dose (mg/kg)	Efeito (Bernasconi 1999; Couper 2002; Villain 2003)
10	Relaxante com diminuição do tónus muscular e da inibição, amnésia
20-30	Forte sensação de relaxamento, sonolência, euforia. Interfere com a circulação sanguínea, com a coordenação motora e com o equilíbrio.
50-60	Interferência pronunciada com o controlo motor e com o discurso, perda de consciência e anestesia. Diminuição da frequência cardíaca e depressão respiratória
>60	Estado semelhante a coma

Tabela 5: Efeitos do GHB de acordo com a dose administrada

Quando o GHB é utilizado como droga de abuso não se tem a certeza da dose e é consumido muitas vezes com outras substâncias. A toxicidade do GHB é potenciada pelo álcool, opióides, barbituratos ou benzodiazepinas, agravando os efeitos respiratórios e exacerbando os efeitos a nível do sistema nervoso central, pelo que a maioria dos casos de morte envolve a mistura com essas substâncias (Bernasconi 1999; Nicholson 2001; Okun 2001; Dahlen 2002). Além disso a mistura de GHB com outras substâncias pode dificultar a interpretação dos resultados. As reacções adversas descritas de intoxicação por GHB incluem: náuseas, vómitos, transpiração profunda, incontinência, distúrbios visuais, ataxia severa, movimentos musculares clónicos

aleatórios, bradicardia, hipotensão, delírio, hipotermia, depressão respiratória severa, acidose respiratória, apneia, diminuição do nível de consciência (Nicholson 2001; Okun 2001; Couper 2002).

Na maioria dos casos de intoxicação aguda por GHB a recuperação é espontânea, frequentemente abrupta e normalmente não está associada a sequelas (Nicholson 2001). A maioria das situações de sobredosagem respondem ao tratamento de suporte e os indivíduos recuperam a consciência em 1-5 horas, embora também estejam identificadas várias mortes devido a sobredosagem. Normalmente é necessário vigiar a função respiratória, fazer entubação endotraqueal, ventilação e prevenção da aspiração do vômito (Nicholson 2001; Couper 2002). O acordar do estado de comatose pode ser repentino e o indivíduo pode ter um comportamento agressivo. Os seus movimentos devem estar limitados para permitir que continue com as vias aéreas desobstruídas e impedir o risco de pneumonia por aspiração ou de auto-desentubação. A desentubação deve ser efectuada só após se ter verificado que a respiração voltou ao normal e deve ser cuidadosa uma vez que se está perante um indivíduo potencialmente violento. É de ter em conta que o indivíduo pode não oxigenar bem sem a ventilação, embora movimente normalmente as extremidades e comunique com a equipa (Okun 2001).

A utilização de anticonvulsivos no tratamento também coloca algumas questões, nomeadamente quanto à depressão respiratória e aos efeitos no SNC. Teoricamente as benzodiazepinas podem agravar a depressão respiratória e o valproato necessita de mais estudos em humanos para poder ser utilizado no tratamento das convulsões associadas ao GHB. O diazepam, por sua vez, tem sido utilizado em humanos para tratar a síndrome de abstinência causada pelo GHB e pela GBL (Okun 2001).

Outra opção terapêutica é o tratamento com fisostigmina. Historicamente o GHB era utilizado na Europa como anestésico. Contudo, a sua utilização foi descontinuada porque era necessário um grande período de tempo para recuperar a consciência. Henderson e Holmes demonstraram que a administração intravenosa de 2 mg de fisostigmina permitia um acordar rápido e seguro dos doentes anestesiados com GHB, em 2-10 minutos. O mecanismo de reversão envolve o sistema colinérgico com efeitos directos ou indirectos na dopamina e GABA. Contudo, a fisostigmina pode causar uma crise colinérgica, pelo que a sua administração deve ser cautelosa. A fisostigmina pode provocar náuseas, vômito, salivação e bradicardia. Pode ser então necessário administrar atropina, uma vez que o GHB também causa bradicardia. Assim, os efeitos secundários da fisostigmina constituem mais um risco do que um benefício, no tratamento da sobredosagem do GHB (Okun 2001).

A exposição crónica ao GHB pode levar à dependência física, nomeadamente em pessoas com patologia psiquiátrica ou história de consumo de drogas (Bernasconi 1999). Os sintomas da síndrome de abstinência são: insónia, ansiedade, confusão, agitação, tremor, diaforese, hostilidade, desorientação, delírio, paranóia com alucinações visuais, tácteis e auditivas (em alguns casos pode-se desenvolver um estado semelhante a esquizofrenia), dificuldades motoras extraoculares, cãimbras musculares, taquicardia e hipertensão. Normalmente estes sintomas resolvem-se sem sequelas passados alguns dias ou semanas. O tratamento da síndrome de abstinência pode ser efectuado com fenobarbital, benzodiazepinas e haloperidol (Couper 2002). Contudo, quando o GHB é utilizado no tratamento crónico da narcolepsia em humanos não se verifica desenvolvimento de tolerância relativamente ao aumento de tempo de sono e à diminuição dos episódios de catalepsia (Couper 2002). Isto não é de estranhar uma vez que se sabe desde há muito que uma substância pode não desenvolver tolerância para todos os efeitos (Couper 2002).

1.9. GHB – Dados Estatísticos

O GHB é muitas vezes ingerido com álcool por adultos jovens e adolescentes. A faixa etária que apresenta um maior consumo de GHB está compreendida entre os 18 e os 30 anos.

Após os anos 90 a notificação de intoxicação por GHB ocorreu principalmente nos EUA e na Europa, nomeadamente no Reino Unido, Bélgica, Dinamarca, Espanha, Noruega, Suécia e Holanda. Nos EUA estão notificadas cerca de 60 mortes associadas ao consumo de GHB desde de 1990, na Europa estão noticiadas 8, desde de 1995. O 1,4 butanodiol e a GBL também podem provocar morte, contudo como no organismo são convertidos a GHB, normalmente o que se detecta nos fluidos biológicos é GHB (34thECDD 2006).

De acordo com um estudo efectuado em Barcelona entre 2003 e 2004, 70% dos casos de intoxicação por GHB, que necessitaram de admissão hospitalar, estavam associados ao consumo de outras substâncias, o etanol representou 50% desses casos. Ainda segundo este estudo verificou-se que a maioria das admissões ao serviço de urgência ocorreu ao início da manhã, o que não será de estranhar dadas as razões que fundamentam o seu consumo abusivo (Galicia 2008).

De acordo com um outro estudo efectuado na Suécia verificou-se que em 2004, 94% dos indivíduos admitidos no serviço de urgência com sintomas de intoxicação por drogas de abuso, estavam intoxicados com GHB (Knudsen 2008).

1.10. GHB – Restrições Legais

Em 2000, nos EUA, o GHB passou a ser uma substância controlada pelos organismos oficiais, sendo classificada como substância pertencente à lista I, o que significa substância de elevado risco de abuso e de uso terapêutico não autorizado. Em 2002, o GHB passou a integrar a lista III, e pode ser utilizado como fármaco (Shima 2005).

Recentemente foi classificado no Reino Unido como uma substância pertencente à classe C, o que significa que é proibida a posse de GHB e que isto pode levar a 2 anos de cadeia e a sua venda pode levar a 5 anos de cadeia; quer uma situação quer outra podem ser substituídas por pagamento de uma multa (Gonzalez 2005).

A GBL pode ser utilizada como bloco de síntese para produzir pesticidas, fármacos e outros produtos, e é um produto intermediário na síntese de vitaminas e fármacos. O 1,4-BD pode também ser utilizado como precursor em muitos processos químicos. Assim, o acesso quer à GBL, quer ao GHB está facilitado (Couper 2002).

1.11. GHB – Aspectos Analíticos

Está descrita a análise do GHB e das substâncias precursoras em diferentes matrizes biológicas (Lebau 2001; Moriya 2004; Marinetti 2005) e não biológicas (Elliott 2005). Têm sido descritos métodos que podem envolver ou não extracção (McCusker 1999; Frison 2000; Sabucedo 2004). Para análise do GHB e substâncias precursoras pode-se recorrer à extracção líquido-líquido (McCusker 1999; Duer 2001; Ellian 2001; Bosman 2003; Elliott 2004), extracção em fase sólida (SPE) (Frison 2000; Wood 2004; Richard 2005) e micro-extracção em fase sólida (SPME) (Frison 2000; Meyers 2005).

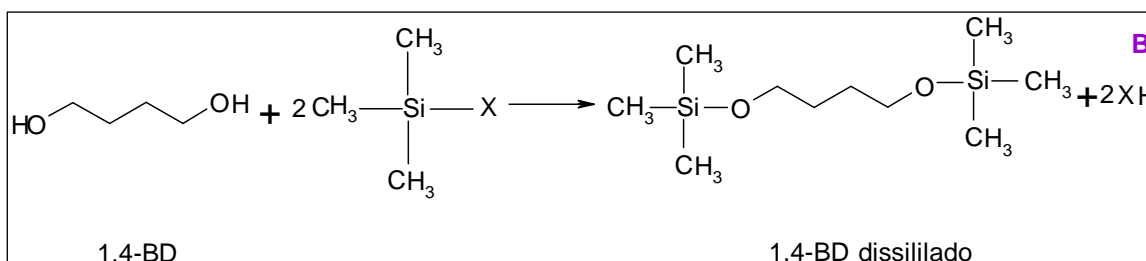
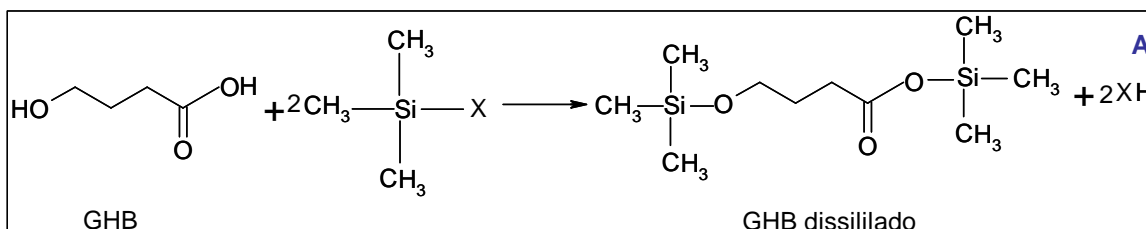
Após a extracção pode-se fazer uma análise presuntiva, através de métodos de rastreio ou pode-se fazer a identificação e doseamento inequívocos das substâncias.

Os métodos de rastreio descritos para a análise do GHB e das substâncias precursoras são: colorimétricos (Alston 2002), enzimáticos (Bravo 2004), electroforéticos (Baldacci 2003; Bishop 2004; Gottardo 2004) e espectrometria de massa (análise directa em tempo real-DART)(Bennett 2009). Os métodos de identificação inequívoca e de doseamento incluem: métodos cromatográficos e ressonância magnética nuclear (Del Signore 2005).

Os métodos cromatográficos utilizados na análise do GHB incluem:

- Cromatografia gasosa com detector de fotoionização em chama (GC-FID)(Lebau 2000; Moriya 2004)
- Cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massa: GC-MS (Lebau 2001; Villain 2003; Brenneisen 2004) e GC-MS/MS (Gouille 2003; Kintz 2003)
- Cromatografia líquida com detecção por ultravioleta (HPLC-UV) (de Vriendt 2001)
- Cromatografia líquida acoplada a detector de espectrometria de massa (LC-MS)(Fung 2004; Wood 2004)

O GHB é uma molécula pequena, polar e termicamente instável e portanto para poder ser analisado por GC-MS tem que ser convertido a GBL (mais apolar), ou tem que ser derivatizado, por exemplo com derivados de trimetilsilílicos, tornando-se menos polar.



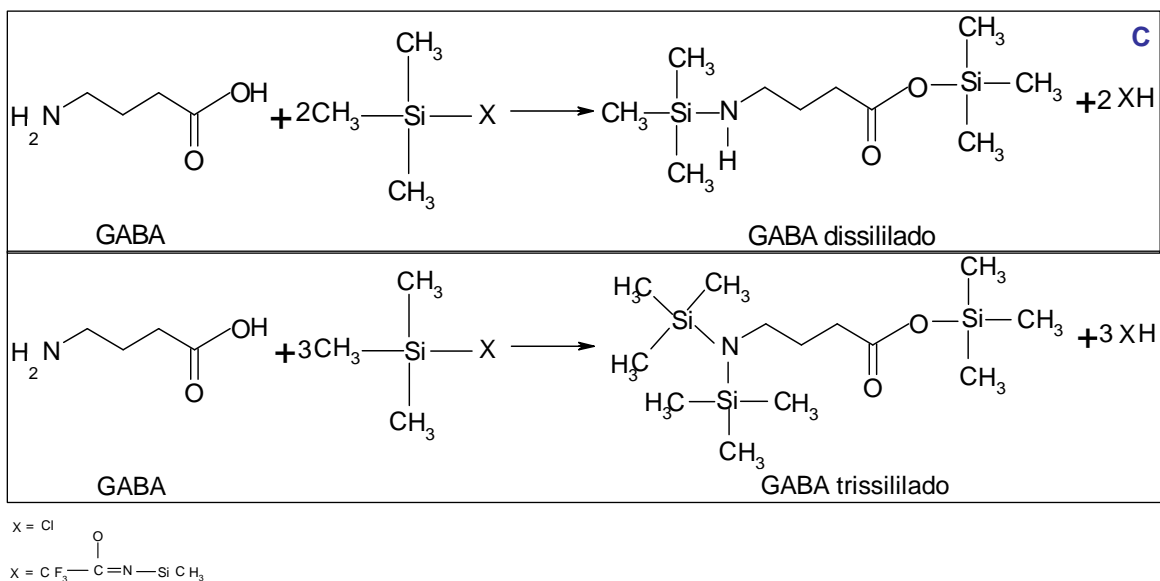


Figura 11: Reacção de derivatização do GHB e das substâncias relacionadas com o GHB.

(A) derivatização do GHB; (B) derivatização do 1,4-BD; (C) derivatização do GABA

1.12. Objectivos

Os casos de intoxicação por GHB encontram-se sub-diagnosticados e isto pode dever-se quer ao rápido metabolismo, quer às condições laboratoriais/experimentais. Por outro lado sabe-se que o consumo de GHB e dos seus precursores está muito associado ao consumo de bebidas alcoólicas. Assim, a determinação quer do GHB, quer dos seus precursores em bebidas alcoólicas poderá contribuir eficazmente para o diagnóstico causal da intoxicação.

É pois necessário o desenvolvimento de métodos que permitam identificar e dosear o GHB e as substâncias precursoras em bebidas alcoólicas. Assim, o principal objectivo deste trabalho foi desenvolver um método simples e preciso que permitisse identificar e dosear GHB e substâncias precursoras por GC-MS em bebidas alcoólicas.

2. Experimental

2.1. Reagentes e Solventes

A GBL, o 1,4-BD, o GABA, o ácido 2-hidroxicapróico, a bistrifluoracetamida + 1% trimetilclorosilano (BSTFA+1%TMCS) e o metanol foram provenientes da Sigma-Aldrich. O hidróxido de sódio foi obtido na Panreac. O acetato de etilo foi comprado à Carlo Erba Reactifs. Todos os reagentes e solventes tinham grau de pureza pró-análise. A GBL foi destilada antes de ser utilizada. A bebida utilizada foi uma aguardente de cana-de-açúcar de grau alcoólico 40° comprada num supermercado nacional.

2.2. Equipamento

A análise por GC-MS foi efectuada num sistema GC-MS da Finnigan. O cromatógrafo utilizado foi o Trace GC da Série 2000, ThermoQuest CE Instruments e o espectrómetro de massa acoplado foi o GCQPlus Finnigan ThermoQuest. A coluna capilar utilizada foi uma DB-5. Esta coluna é de polaridade intermédia. O gás vector foi o hélio com um débito de 1,5ml/min.

Os espectros no infra-vermelho (IV) foram obtidos num espectrofotómetro ATIMattson Genesis da série FTIR (programa WinFirst v.2.10) na forma de discos de KBr.

Os espectros de ressonância magnética (^1H e $^{13}\text{CRMN}$) foram obtidos em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$ à temperatura ambiente. O espectrofotómetro utilizado foi o Bruker Avance 300 (13MHz para o $^1\text{HRMN}$ e 75,47MHz para o $^{13}\text{CRMN}$).

2.3. Síntese e Identificação do Sal Sódico do GHB

Num balão de duas tubuladuras, munido de tubo de carga e refrigerante, colocaram-se 0,2 moles de NaOH (aq.). Adicionaram-se lentamente e com agitação suave 0,2 moles de GBL, tendo o cuidado de manter o pH próximo de 7,6. Deixou-se reagir durante cerca de 30 minutos e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Evaporou-se o solvente em evaporador rotativo a 60°C e com a ajuda de pressão reduzida (-20mBar). Secou-se o resíduo obtido em estufa a 100°C e recristalizou-se do etanol. Obtiveram-se cristais brancos que foram caracterizados através do ponto de fusão, IV, ¹HRMN, ¹³CRMN, e espectrometria de massa.

2.4. Soluções Padrão, Soluções Problema e Branco

Prepararam-se soluções padrão de GHB, GABA e ácido 2-hidroxicapróico (utilizado como padrão interno) em metanol, de 1,4-BD e de GBL em acetato de etilo. O ácido 2-hidroxicapróico foi utilizado como padrão interno para o doseamento do GHB, do 1,4-BD e do GABA.

Estas soluções foram utilizadas para as análises qualitativa e quantitativa subsequentes.

Para estudar a linearidade para cada uma das substâncias traçaram-se curvas de calibração (área do pico *versus* concentração). As concentrações das soluções utilizadas para traçar as curvas de calibração encontram-se na **Tabela 6**.

Substância	Concentração (mg/ml)
GHB	0,0035; 0,005; 0,007; 0,0175; 0,035
1,4-BD	0,005; 0,02; 0,025; 0,04; 0,05
GABA	0,2; 0,5; 0,75; 1; 2
Ácido 2-hidroxicapróico	0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1
GBL	0,375; 0,75; 1,25; 1,5; 3

Tabela 6: Concentrações utilizadas para o estudo da linearidade

Como referido, o doseamento do GHB, 1,4-BD e GABA na bebida foi feito pelo método do padrão interno. Para fazer o doseamento destas substâncias traçaram-se curvas de calibração (razão área do pico da substância em estudo/área do ácido 2-hidroxicapróico *versus* concentração da substância em estudo). As concentrações das soluções utilizadas para traçar as curvas de calibração encontram-se na **Tabela 7**. A GBL foi doseada pelo método do padrão externo.

Substância	Concentração (mg/ml)
GHB	0,0065; 0,013; 0,065
1,4-BD	0,01; 0,04; 0,08
GABA	0,825; 3,3; 3,9
Ácido 2-hidroxicapróico	0,2

Tabela 7: Concentrações preparadas para o doseamento das substâncias pelo método do padrão interno.

A aguardente foi adicionada das substâncias em estudo de modo a que as concentrações obtidas estivessem de acordo com as habitualmente utilizadas como drogas de abuso (Figura 12). Embora o GABA não seja utilizado como droga de abuso, trata-se de uma substância quimicamente relacionada e o método desenvolvido permite igualmente a sua análise.

O GHB, o 1,4-BD e o GABA foram analisados directamente em solução na bebida, enquanto que a GBL foi extraída da bebida com acetato de etilo antes de ser analisada.

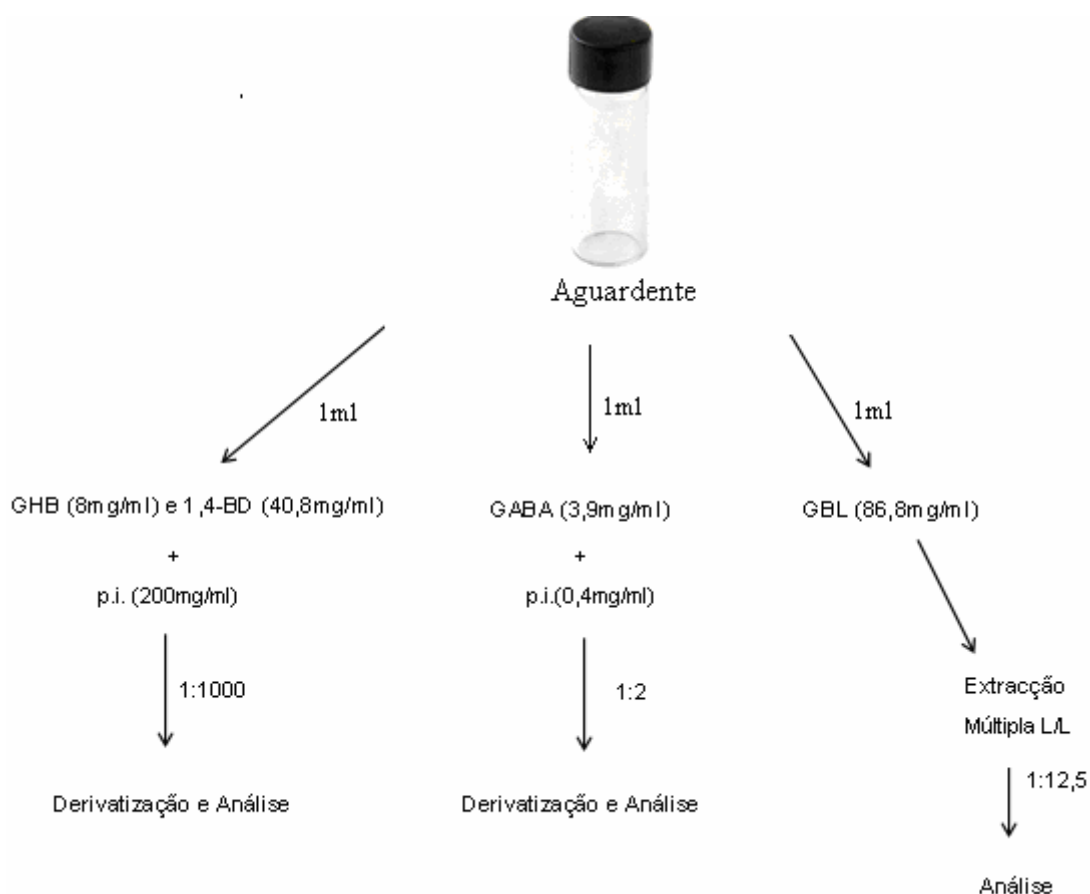


Figura 12: Esquema geral de procedimentos para análise dos GHB, 1,4-BD, GABA e GBL na bebida.

pi = padrão interno (ácido 2 – hidroxicapróico)

Prepararam-se brancos com cada um dos solventes utilizados (metanol e acetato de etilo), com o reagente de derivatização e com a bebida.

2.5. Derivatização

Retiraram-se 100µl de cada uma das soluções preparadas (soluções padrão, bebida adicionada das substâncias em estudo e brancos) e evaporaram-se em corrente de azoto à temperatura ambiente. Fez-se a reconstituição do volume inicial com acetato de etilo e adicionaram-se 100µl de BSTFA+1%TMCS (reagente de derivatização). Agitou-se em *vortex* e deixou-se reagir a 75°C durante 30 minutos.

2.6. Extracção Líquido/Líquido (L/L)

À bebida adicionada de GBL adicionou-se acetato de etilo num tubo de centrífuga. Agitou-se e centrifugou-se a 2000rpm durante 5minutos e à temperatura ambiente (Heraeus Sepatech). Retirou-se a fase orgânica. Adicionou-se igual volume de acetato de etilo e repetiu-se o procedimento de extracção. Juntaram-se as fases orgânicas, adicionou-se acetato de etilo até perfazer 4ml.

2.7. Análise GC-MS

Analisaram-se em triplicado 1µl de cada uma das soluções contendo os analitos em estudo. O GHB, o 1,4-BD, o GABA e o ácido 2-hidroxicapróico foram analisados após derivatização. A GBL foi analisada directamente.

Para a análise dos derivados siliilados do GHB, do 1,4-BD, do GABA e do ácido 2-hidroxicapróico o cromatógrafo operou nas seguintes condições: a injeção foi em modo "splitless", a temperatura do injector foi de 250°C, a temperatura inicial do forno foi de 45°C durante 3 minutos, aumentando 15°C/min até à temperatura final de 200°C (Figura 13).

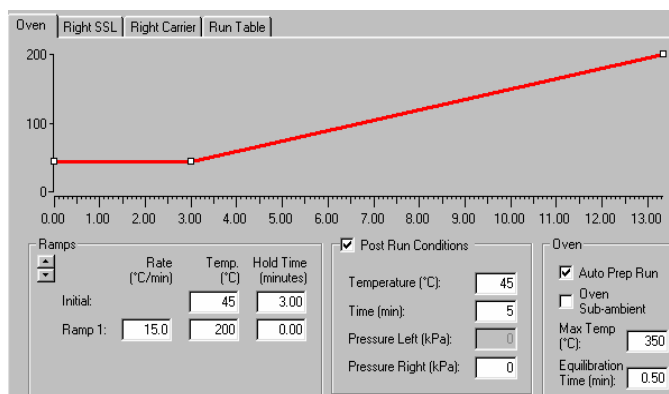


Figura 13: Programa de temperaturas da coluna utilizado na análise dos derivados sililados do GHB, 1,4-BD, GABA e ácido 2-hidroxicapróico.

Para a análise da GBL o cromatógrafo operou nas seguintes condições: a injeção foi em modo “splitless”, a temperatura do injetor foi de 250°C, a temperatura inicial do forno foi de 45°C durante 5 minutos; aumentando 20°C/min até à temperatura final de 200°C (Figura 14).

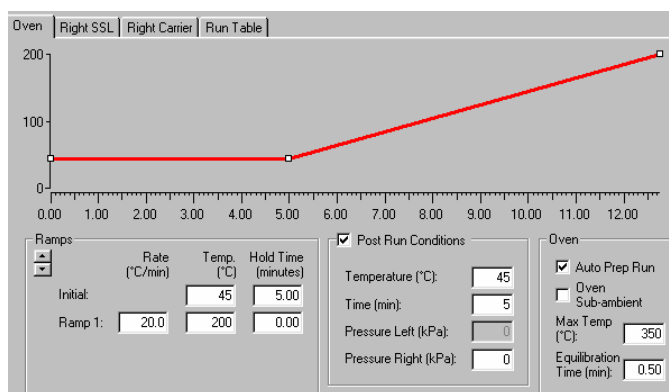


Figura 14: Programa de temperaturas da coluna utilizado na análise da GBL

No espectrómetro de massa a temperatura da linha de transferência foi de 280°C e a da fonte iónica de 200°C. A ionização foi por impacto electrónico a 70 eV e o analisador utilizado foi do tipo “ion trap”.

Para a análise qualitativa dos derivados sililados do GHB, 1,4-BD, GABA e ácido 2-hidroxicapróico utilizou-se o detector em modo *TIC* (Cromatograma de Iões Total) com o intervalo de massas $m/z = 15-320$. Para a análise quantitativa utilizou-se o modo *SIM* (Monitorização com Iões Seleccionados) e os fragmentos escolhidos foram: $m/z = 116, 147,$

159, 204, 232, 233, 261 e 304.

Para a análise qualitativa da GBL utilizou-se o detector em modo *TIC* com o intervalo de massas $m/z = 15-320$. Para a análise quantitativa da GBL utilizou-se o modo *SIM* e os fragmentos escolhidos foram: $m/z = 28, 41$ e 87 .

O metanol e o acetato de etilo, solventes utilizados neste estudo, o reagente de derivatização e a bebida antes de ser adicionada dos analitos foram igualmente analisados nas mesmas condições cromatográficas e espectrométricas.

3. Resultados e Discussão

3.1. Síntese e Caracterização do Sal Sódico do GHB

Da reacção da GBL com o NaOH resultou a formação do sal sódico de GHB (Figura 15), na forma de cristais brancos que cristalizam do etanol. O rendimento da reacção foi de 58,8%. A reacção é equimolecular convindo não adicionar NaOH em excesso uma vez que a formação do sal sódico e a inversão da reacção estão fortemente dependentes do pH.

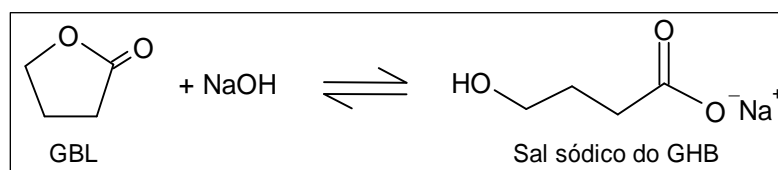


Figura 15: Reacção de síntese do sal sódico do GHB a partir da GBL

O sal sódico do GHB, a GBL e o GHB na forma livre podem encontrar-se em equilíbrio, constituindo o pH um factor crítico nestes equilíbrios (Figura 16). No caso presente houve o cuidado de manter o pH de 7,6 durante o processamento da reacção, evitando-se a lactonização e garantindo a formação de GHB na forma de sal sódico. Por outro lado, também se verificou que o aquecimento pode reverter a reacção e originar de novo a GBL, pelo que a reacção foi conduzida sem aquecimento adicional ao da exotermia da reacção.

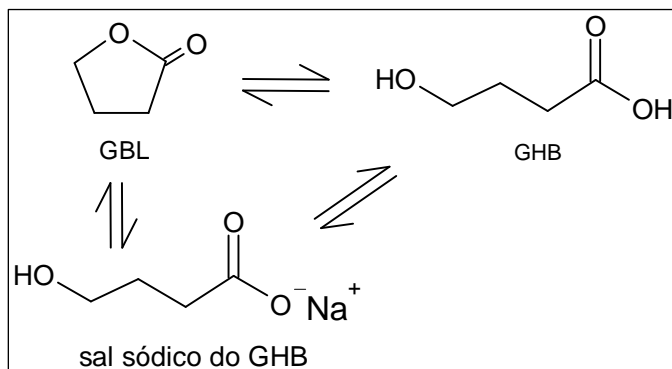


Figura 16: Equilíbrio do GHB na forma livre com a GBL e com o GHB na forma iônica

O produto bruto foi recristalizado do etanol originando cristais brancos com um intervalo de fusão de 148°C-150°C, compatível com o descrito na literatura para o sal sódico do GHB (145°-146°C) (Index Merck, ed.13).

O espectro no IV (Figura 17) apresenta as bandas características do espectro do sal sódico do GHB. A banda larga a 3344,29cm⁻¹ é originada pelo grupo hidroxilo do álcool. A banda a 2957cm⁻¹ corresponde às vibrações das ligações C-H da cadeia alifática; as bandas a 1557,82cm⁻¹ e 1421,92cm⁻¹ correspondem respectivamente às vibrações assimétrica e simétrica do anião carboxilato (Figura 18)(DeFrancesco 2006).

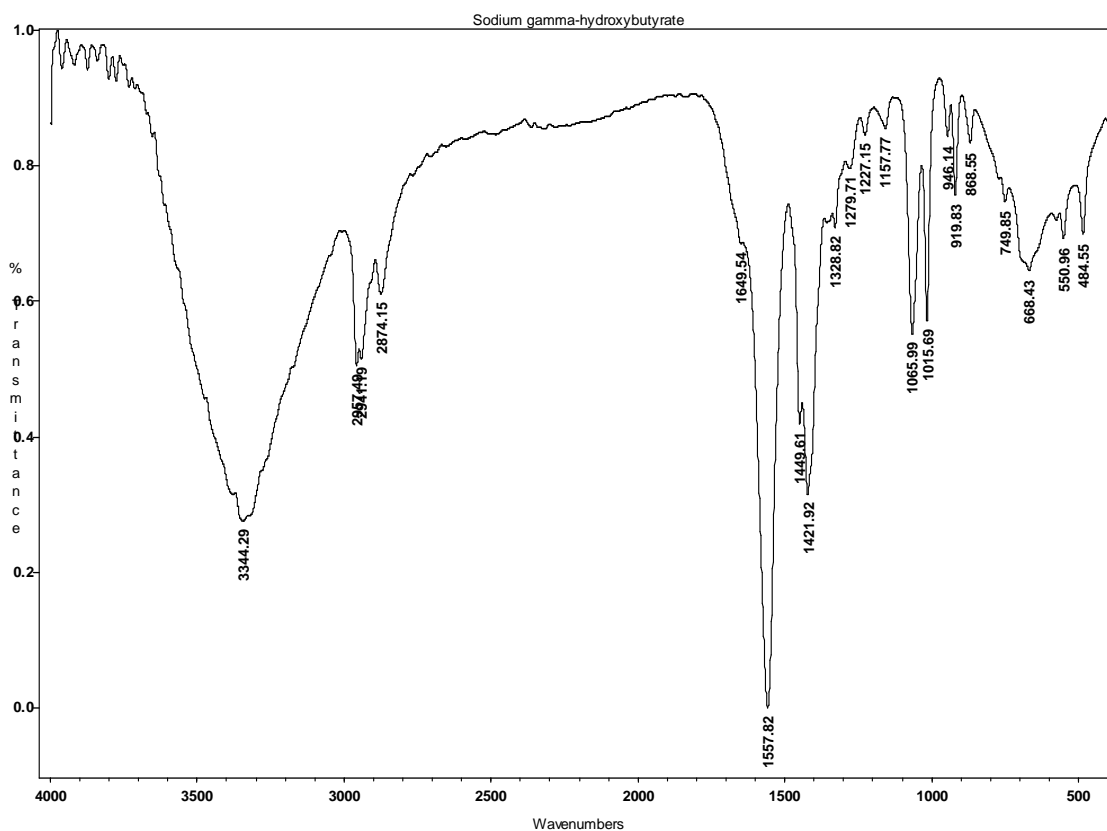


Figura 17: Espectro IV do sal sódico do GHB.

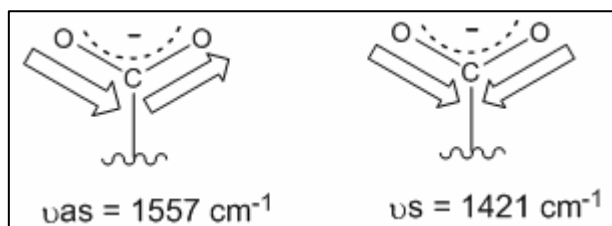


Figura 18: Vibrações de alongamento-encurtamento do anião carboxilato do sal sódico do GHB

Os espectros $^1\text{HRMN}$ (Figura 19) e $^{13}\text{CRMN}$ (Figura 20) apresentam os sinais característicos do sal sódico do GHB. O espectro $^1\text{HNMR}$ apresenta o sinal a 4,96 ppm originado pelo hidrogénio do hidroxilo da função álcool do GHB; o tripleto a 3,59ppm é originado pelos H_γ , o tripleto a 2,25ppm é originado pelos H_α , o quintupeto a 1,82ppm é originado pelos dois H_β . Quanto ao espectro $^{13}\text{CRMN}$ apresenta um sinal a 182,63ppm que é originado pelo carbono carbonílico (C-1). O sinal a 63,24ppm originado pelo C-4, o sinal a 35,90ppm é originado pelo C-2 e o sinal a 30,40ppm originado pelo C-3.

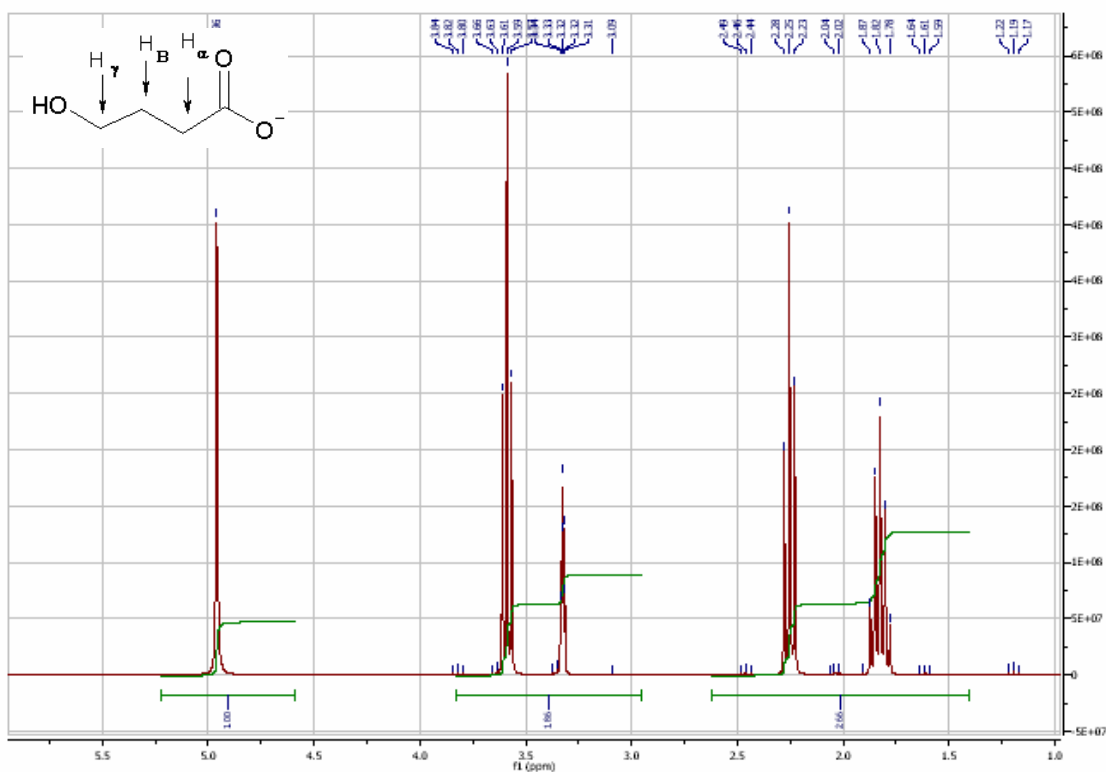


Figura 19: Espectro $^1\text{HRMN}$ do sal sódico do GHB

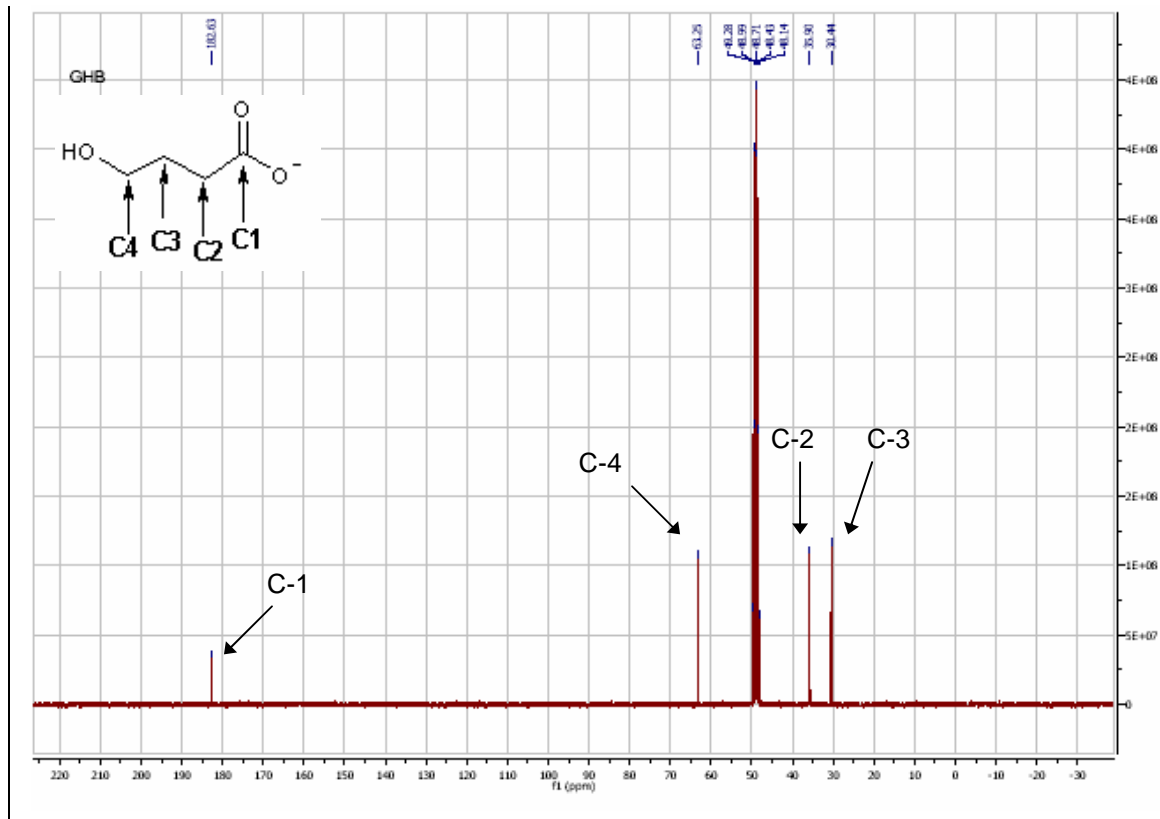


Figura 20: Espectro ^{13}C RMN do sal sódico do GHB

O espectro de massa (Figura 22) do produto de síntese derivatizado (Figura 21) corresponde ao sal sódico do GHB dissililado. As principais quebras verificadas estão representadas na Figura 23. O íon molecular ($m/z=248$) não é visível e surge o pico $m/z=233$ como último pico do espectro e que é originado por perda de um grupo metilo a partir do íon molecular. O pico base tem o valor de $m/z=147$ $[(\text{CH}_3)_2\text{Si}=\text{O}^+\text{Si}(\text{CH}_3)_3]$. Este fragmento corresponde a um rearranjo dos grupos trimetilsililo e que é frequente ocorrer em compostos dimetilssililados (Esselman 1969).

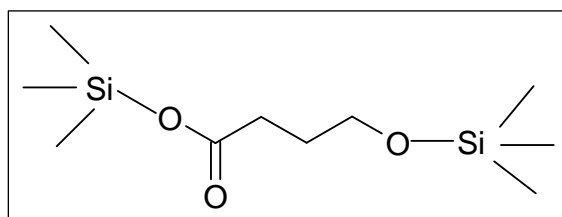


Figura 21: Estrutura química do derivado siliado do GHB

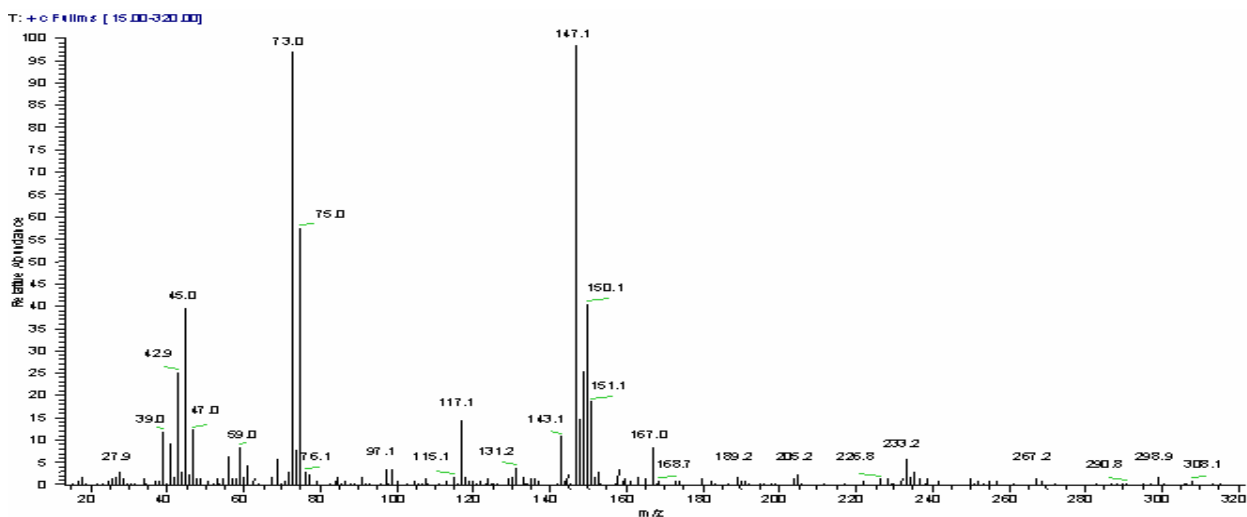


Figura 22: Cromatograma e espectro de massa obtido em modo total do derivado siliado do produto de síntese da GBL com NaOH

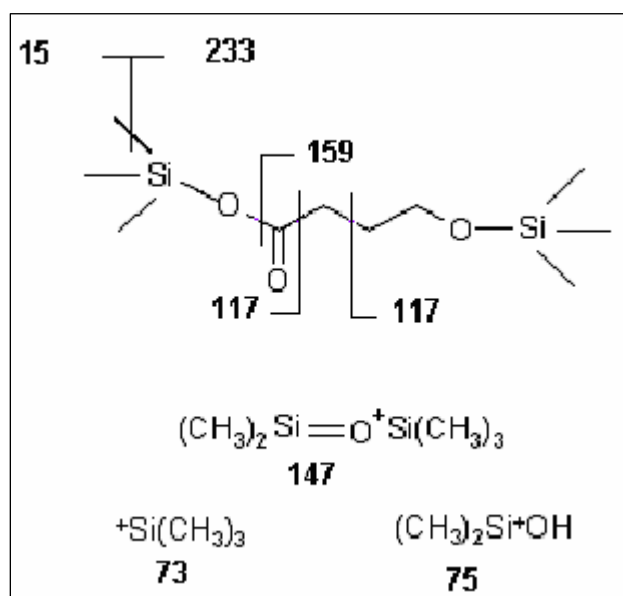


Figura 23: Principais quebras em espectrometria de massa do derivado siliado do GHB

3.2. Desenvolvimento do Método para Análise do GHB, 1,4-BD, GABA e GBL

Foi necessário otimizar o método no sentido de escolher os solventes mais adequados para

cada uma das substâncias, as melhores condições de derivatização e de análise por GC-MS. O GHB, o GABA e o ácido 2-hidroxicapróico foram solubilizados em metanol. Este solvente além de permitir solubilizar as substâncias referidas permitiu obter cromatogramas com menos interferências. O 1,4-butandiol e a GBL foram solubilizados em acetato de etilo. Este solvente solubiliza bem o 1,4-BD e a GBL, foi o solvente em que decorreu a derivatização das substâncias em estudo e originou cromatogramas sem interferências.

A análise por cromatografia gasosa do GHB, do 1,4-BD e do GABA implica a sua prévia derivatização. A obtenção de derivados sililados elimina a presença dos grupos OH e NH₂ presentes nestas substâncias e que são responsáveis pelo seu mau comportamento cromatográfico. A reacção de derivatização utilizada foi a sililação com BSTFA+1%TMCS. A reacção ocorre por um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (SN₂), em que há substituição dos hidrogénios activos por grupos TMS (trimetilsililo) (Figura 24). As melhores condições de derivatização foram obtidas usando a temperatura de 75°C durante 30 minutos. Para tempos e temperaturas de derivatização inferiores não se conseguiram obter reacções de derivatização completas e para temperaturas e tempos de derivatização superiores ocorreu a degradação das substâncias, evidenciada pelo surgimento de uma coloração castanha no meio reaccional. A reacção de derivatização do GABA não foi completa e portanto na sua análise utilizou-se o somatório das áreas dos picos dos derivados di e trissililados (Figura 25).

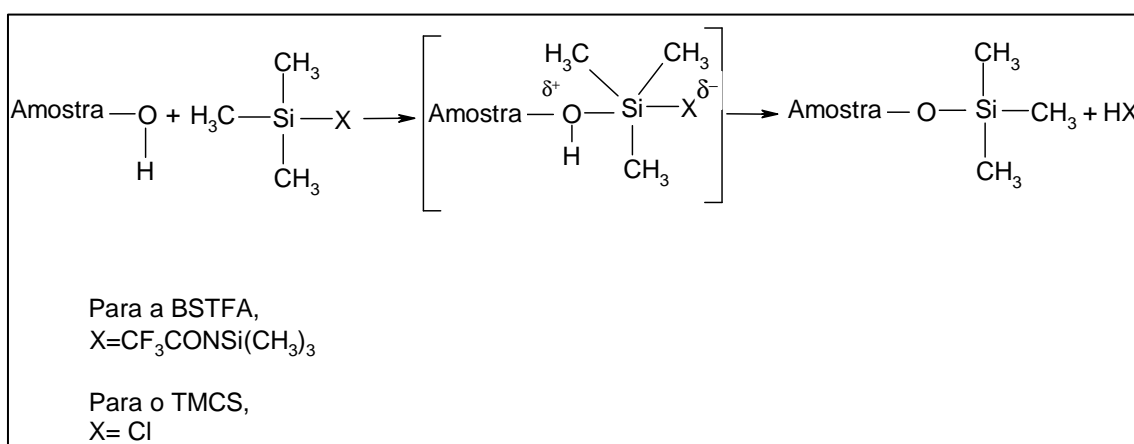


Figura 24: Mecanismo de sililação com BSTFA+1%TMCS

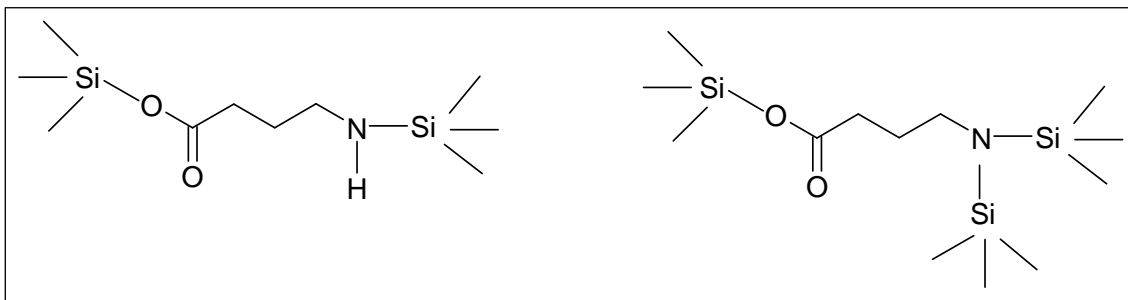


Figura 25: Estrutura química dos derivados di e trissililados do GABA

Quanto à GBL, não possui condições de ser derivatizada e verificou-se que se degradava durante a reacção de derivatização. Assim, foi analisada numa alíquota de bebida em separado, após extracção com acetato de etilo. O GHB, o 1,4-BD e o GABA foram analisados directamente sem recorrer à extracção destas substâncias a partir da bebida contaminada. Verificou-se que durante a reacção de derivatização o GHB não se converte em GBL.

Foram estudadas várias condições cromatográficas que permitissem a separação, identificação e doseamento do GHB na forma de sal sódico, do 1,4-BD, do GABA e da GBL por GC-MS. As melhores condições foram as referidas em 2.7.

Relativamente à análise qualitativa obtiveram-se cromatogramas e espectros de massa em modo *TIC* ($m/z=15-320$).

A **Figura 26** (GHB), **Figura 27** (1,4-BD), **Figura 28** (GABA), **Figura 29** (ácido 2-hidroxicapróico) e **Figura 30** (GBL) mostram os cromatogramas obtidos para cada um dos analitos em estudo e a **Tabela 8** apresenta os respectivos tempos de retenção nas condições cromatográficas referidas em 2.7. A **Figura 31** (GHB, 1,4-BD e PI) e a **Figura 32** (GABA e PI) mostram os cromatogramas obtidos a partir da bebida adicionada destes analitos e do padrão interno utilizado nos respectivos doseamentos.

A **Figura 33** (GBL) mostra o cromatograma obtido a partir da bebida adicionada deste analito e após extracção com acetato de etilo.

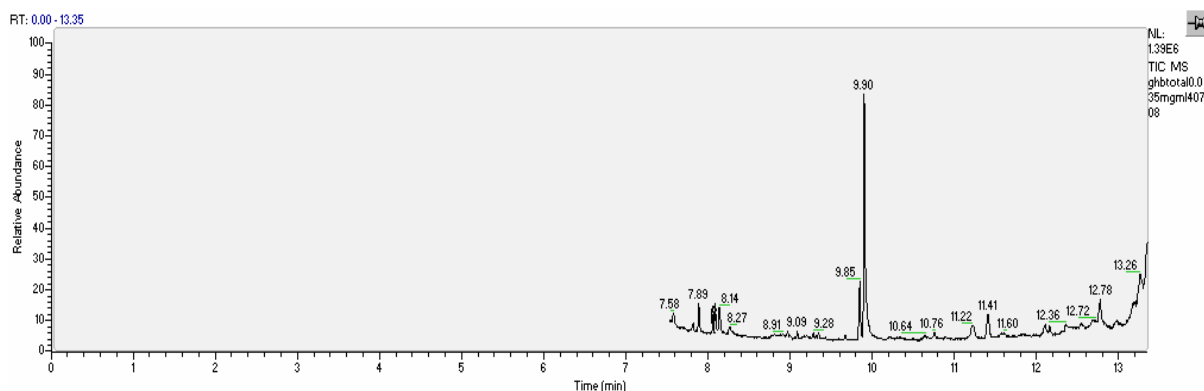


Figura 26: Cromatograma do derivado sililado do GHB

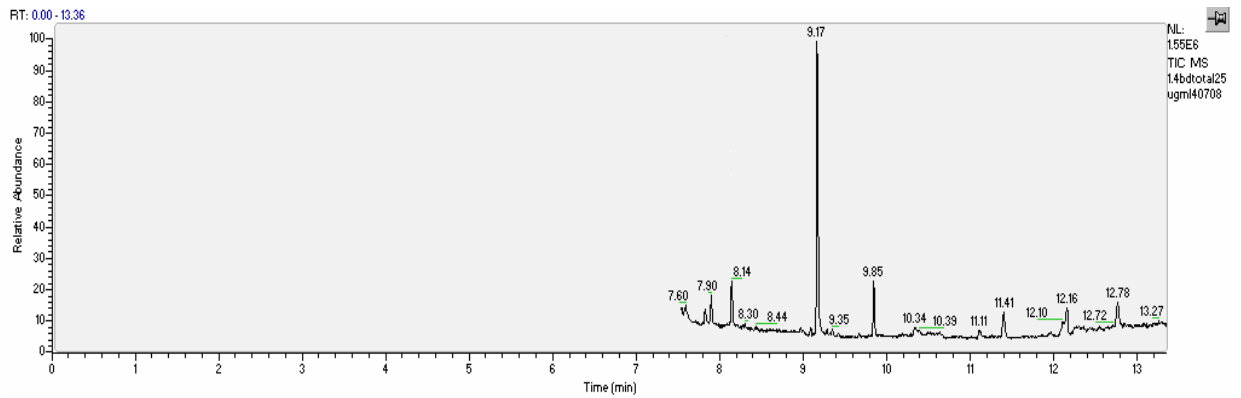


Figura 27: Cromatograma do derivado siliado do 1,4-BD

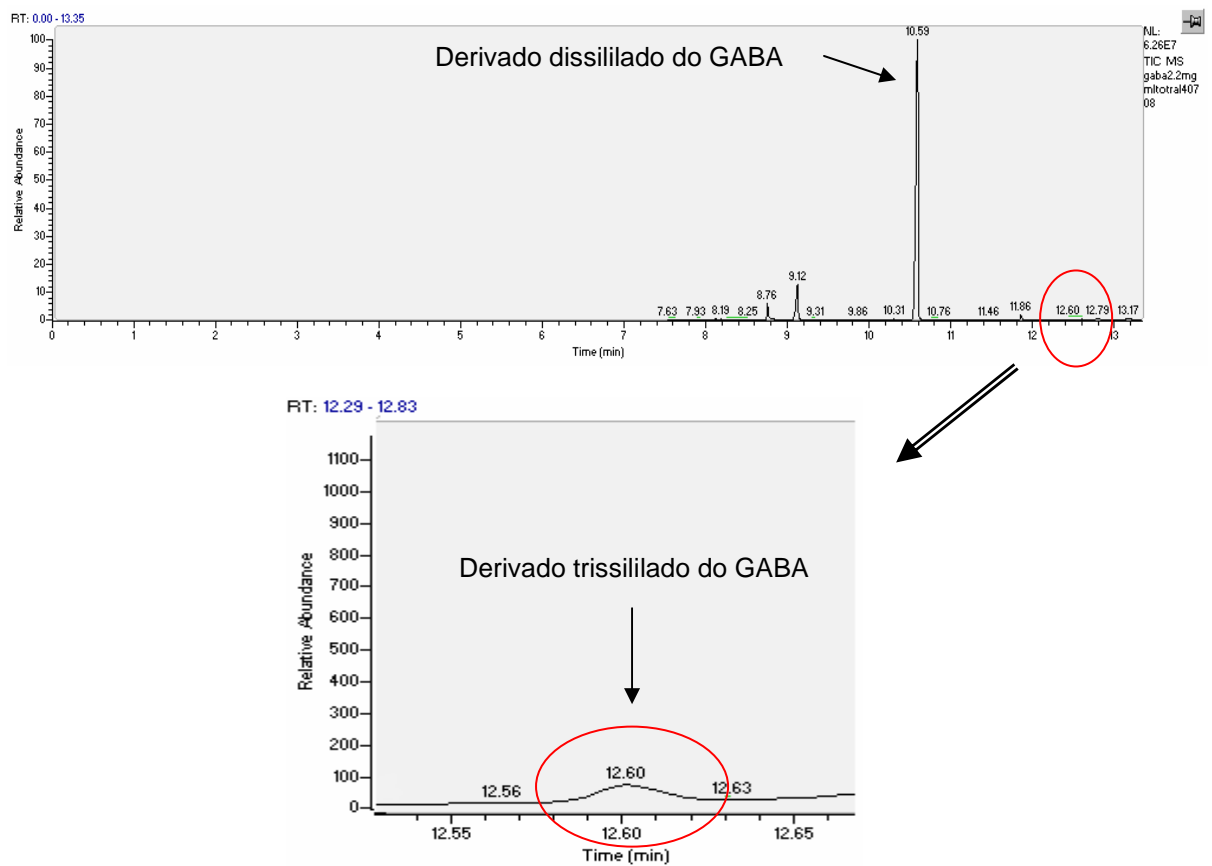


Figura 28: Cromatograma dos derivados siliados do GABA.

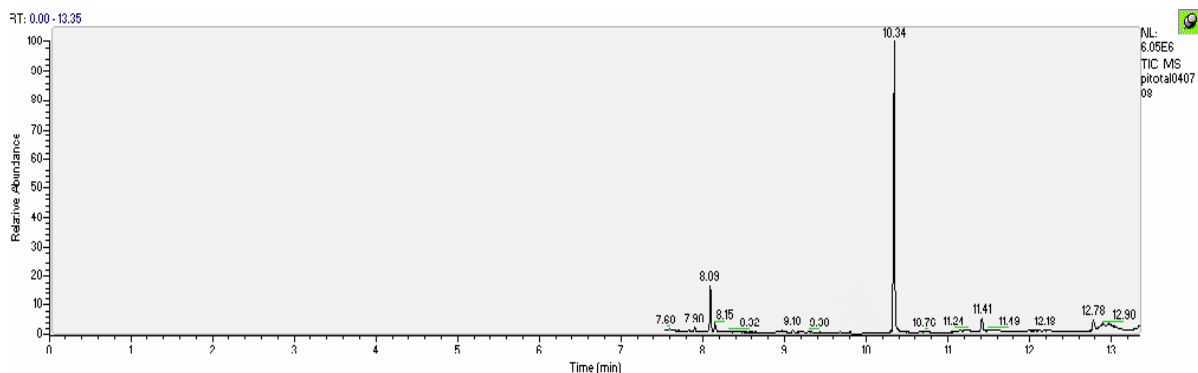


Figura 29: Cromatograma do derivado siliado do ácido 2-hidroxicapróico

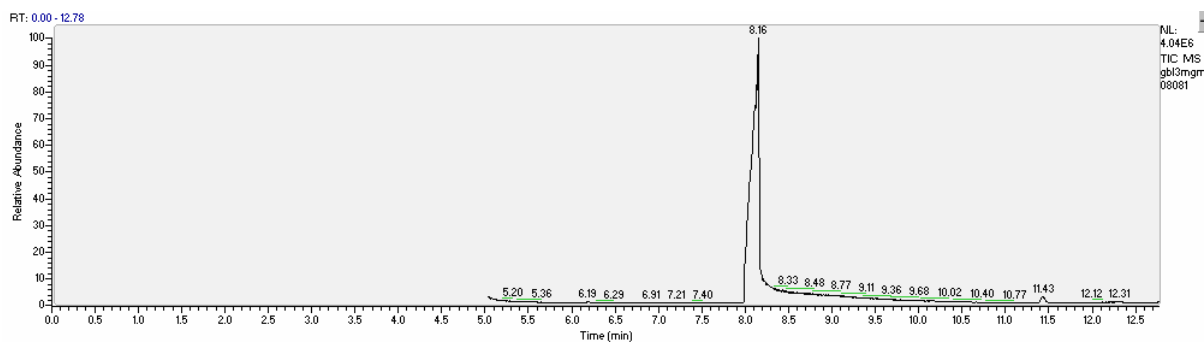


Figura 30: Cromatograma da GBL

Substância	Tempo de retenção (min)
Derivado dissililado do GHB	9,90
Derivado dissililado do 1,4-BD	9,17
Derivado dissililado do GABA	10,59
Derivado trissililado do GABA	12,60
Derivado dissililado do ácido 2-hidroxicapróico	10,34
GBL	8,16

Tabela 8: Tempos de retenção das substâncias em análise

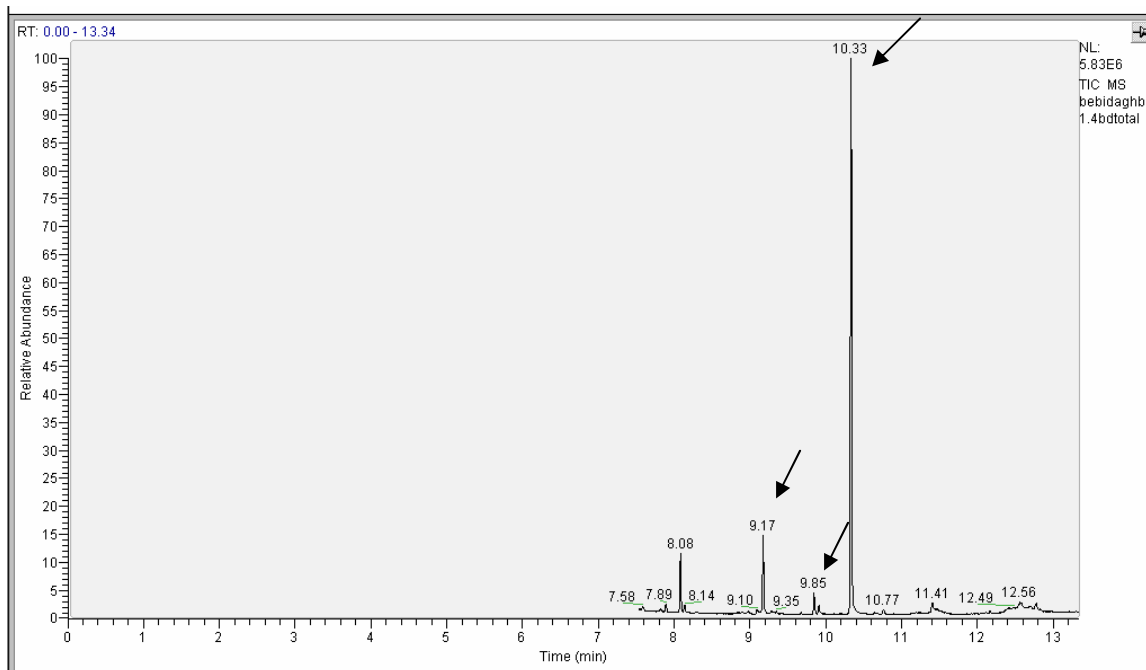


Figura 31: Cromatograma dos derivados silylados do GHB, 1,4-BD e ácido 2-hidroxicapróico obtido a partir da bebida adicionada de GHB e 1,4-BD.

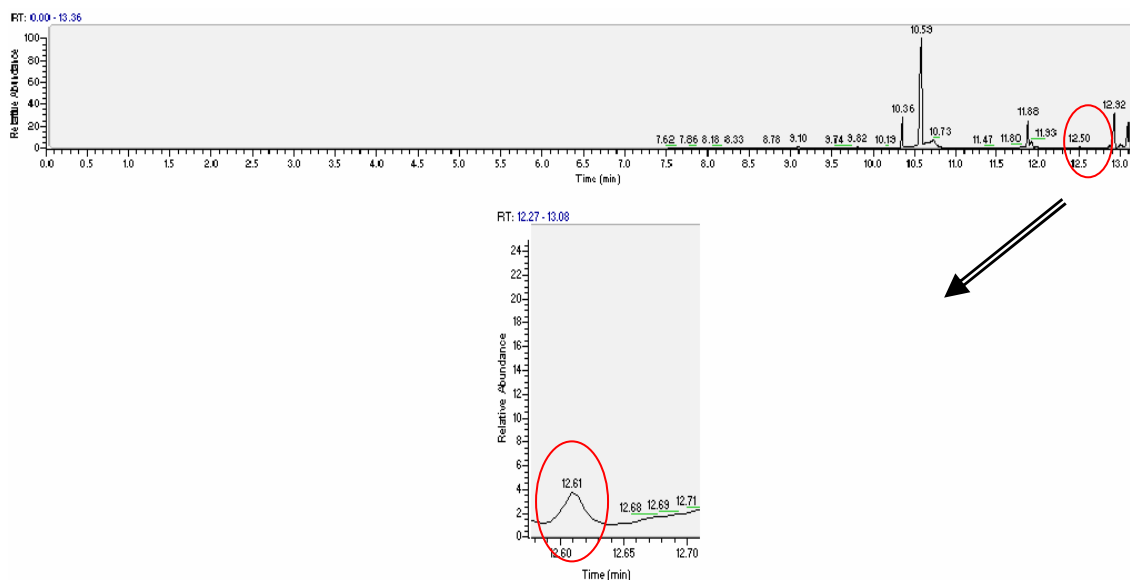


Figura 32: Cromatograma dos derivados silylados do GABA e ácido 2-hidroxicapróico obtido a partir da bebida adicionada de GABA.

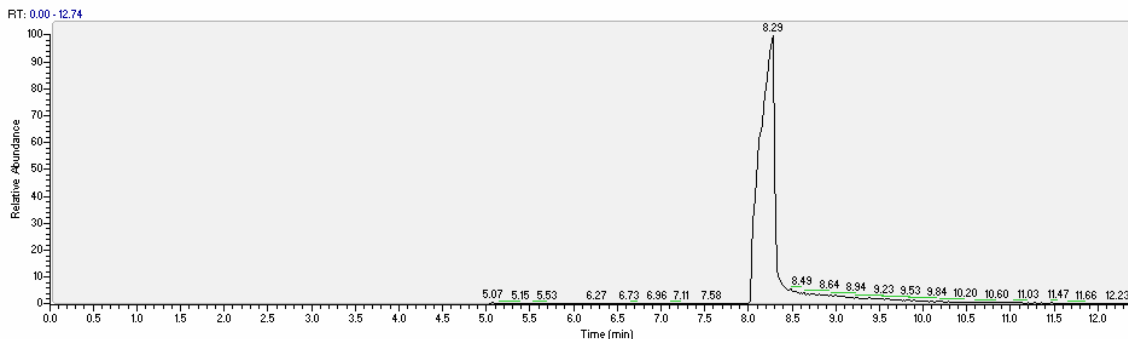


Figura 33: Cromatograma obtido a partir da bebida adicionada de GBL.

Todas as substâncias foram caracterizadas pelos respectivos espectros de massa.

A **Figura 34** mostra o espectro de massa do derivado siliado do GHB e a **Figura 35** mostra a formação dos principais fragmentos. Este espectro de massa foi já discutido em 3.1, a propósito da sua síntese.

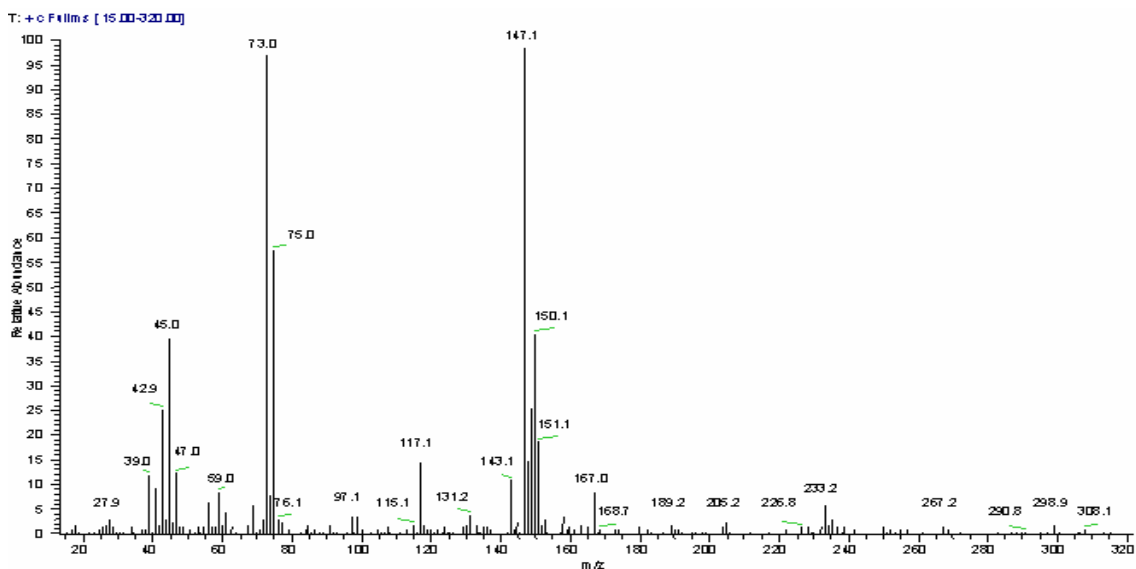


Figura 34: Espectro de massa obtido em modo TIC do derivado siliado do GHB.

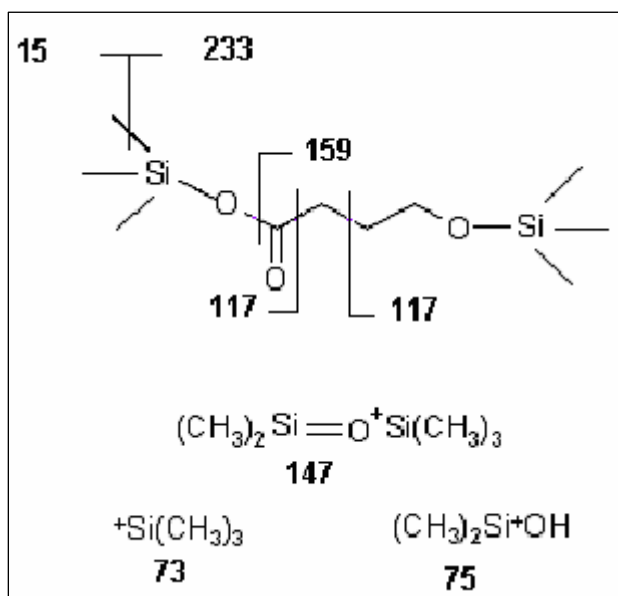


Figura 35: Principais fragmentos do derivado sililado do GHB

A **Figura 36** mostra o espectro de massa do derivado sililado do 1,4-BD e a **Figura 37** mostra a formação dos principais fragmentos. O íon molecular ($m/z=234$) não é visível, surgindo o pico com $m/z=235$ que corresponde ao fragmento $[\text{MH}]^+$. A inexistência do pico molecular em éteres é comum (McLafferty 1993). O pico base ($m/z=73$) corresponde ao grupo trimetilsililo. O fragmento $m/z = 177$ corresponde a um rearranjo e é comum em espectros de massa de éteres bistrimetilsililados de polimetilenoglicóis (Diekman 1968).

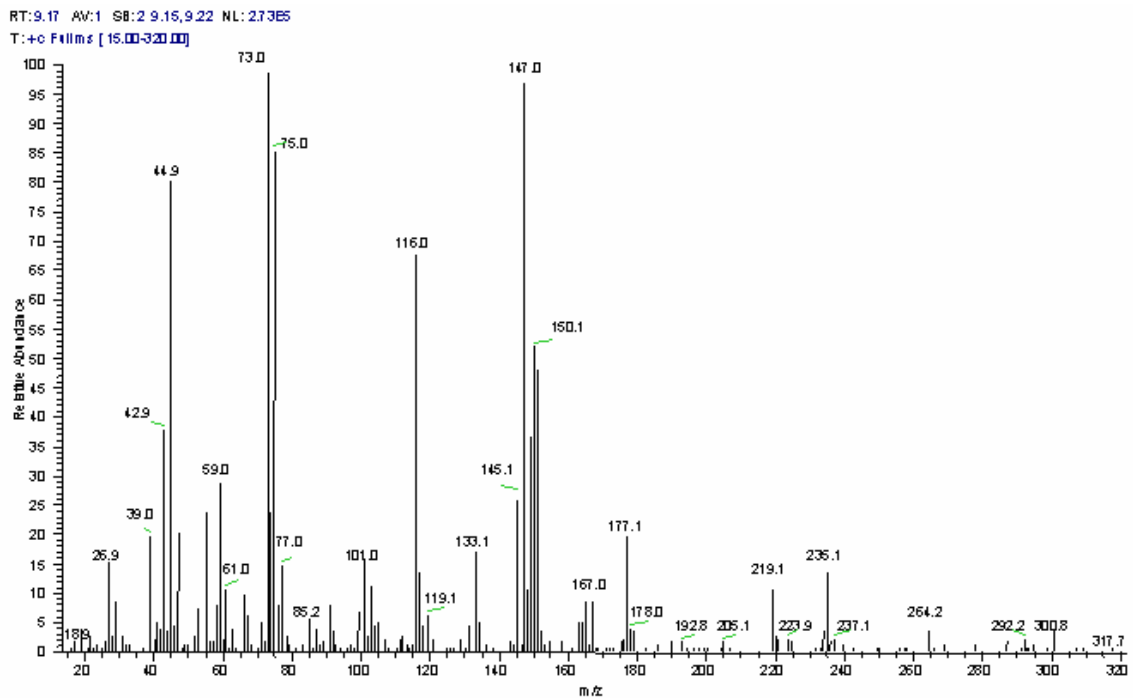


Figura 36: Espectro de massa obtido em modo TIC do derivado siliado do 1,4-BD.

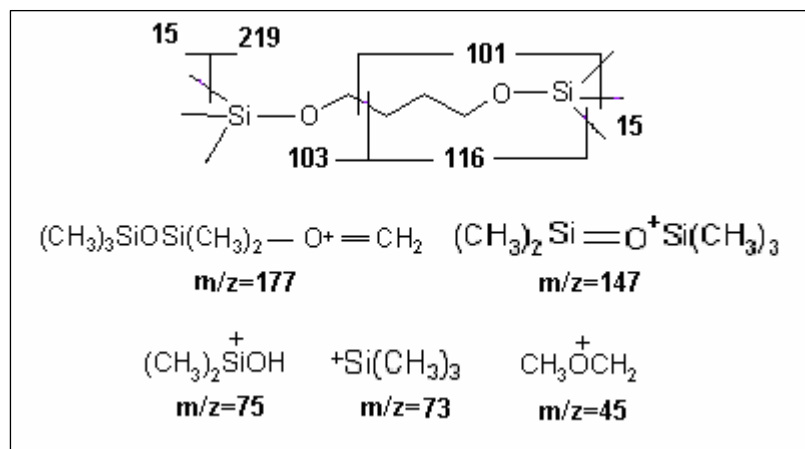


Figura 37: Principais fragmentos do derivado siliado do 1,4-BD

A Figura 38 mostra o espectro de massa do derivado dissiliado do GABA e a Figura 39 mostra a formação dos principais fragmentos. O íon molecular ($m/z=247$) não é visível surgindo o pico com $m/z=248$ que corresponde ao fragmento $[\text{MH}]^+$. O pico base tem o valor $m/z=73$ e corresponde ao grupo trimetilsililo.

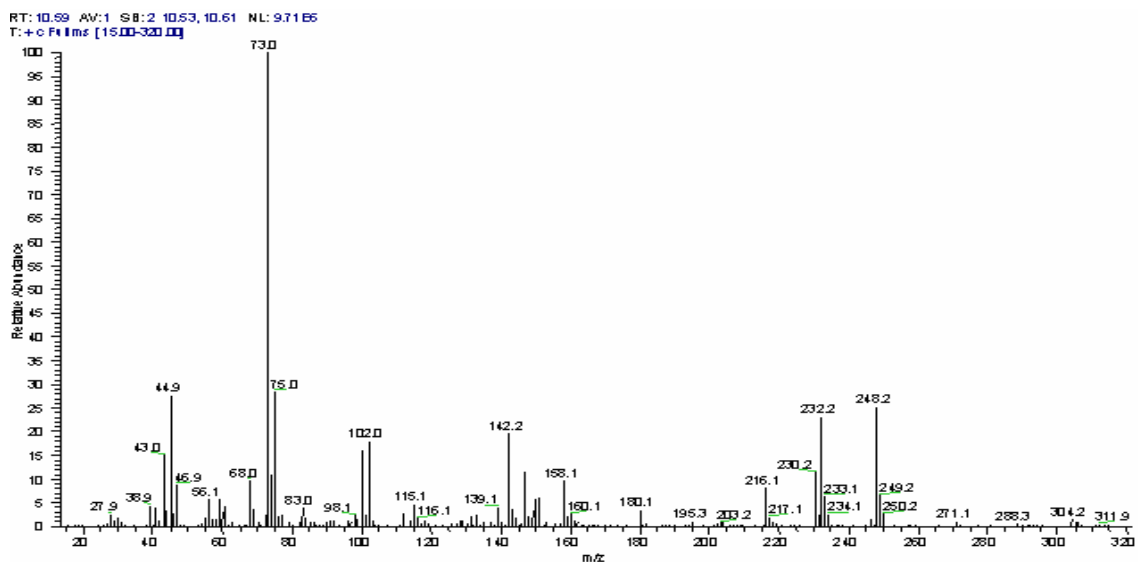


Figura 38: Espectro de massa obtido em modo TIC do derivado dissilado do GABA.

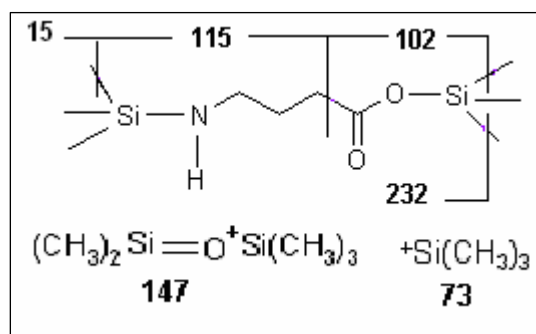


Figura 39: Principais fragmentos do derivado dissilado do GABA

A Figura 40 mostra o espectro de massa do derivado trissilado do GABA e a Figura 41 mostra a formação dos principais fragmentos. O íon molecular ($m/z=319$) não é visível surgindo o pico com $m/z=304$ como último pico do espectro e que é originado por perda de um grupo metilo a partir do íon molecular. O pico base tem o valor de $m/z=73$ e corresponde ao grupo trimetilsililo.

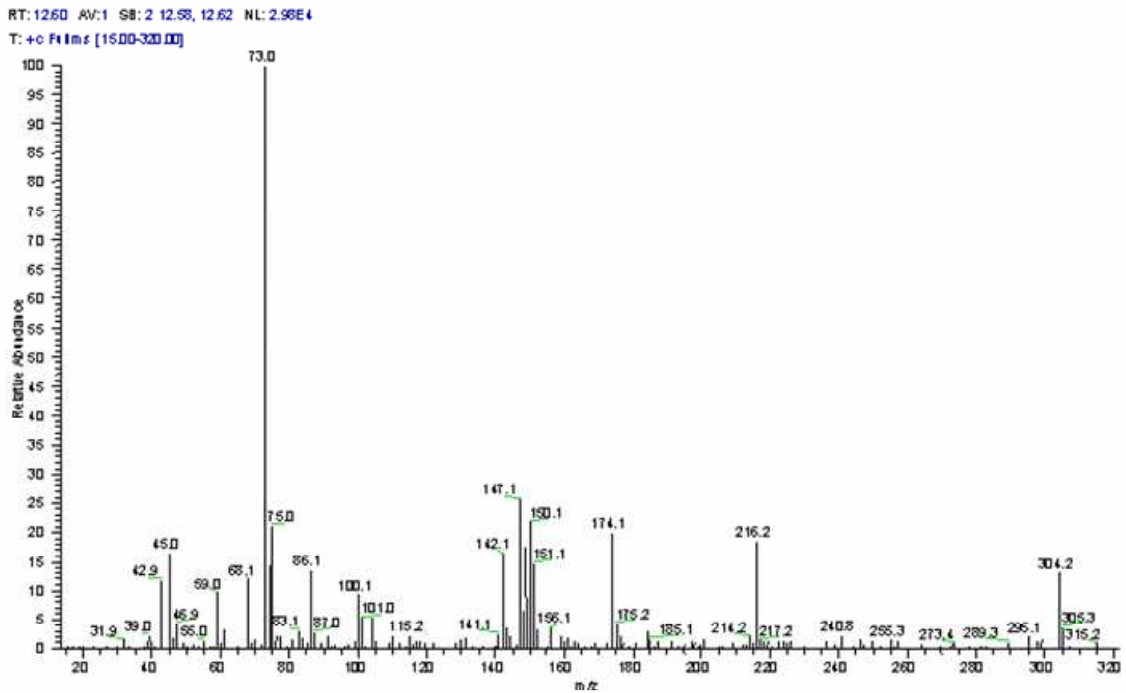


Figura 40: Espectro de massa obtido em modo TIC do derivado trissililado do GABA

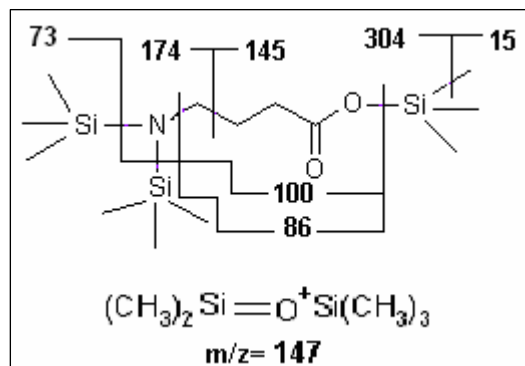


Figura 41: Principais fragmentos do derivado trissililado do GABA

A Figura 42 mostra o espectro de massa do derivado sililado do ácido 2-hidroxicapróico e a Figura 43 mostra a formação dos principais fragmentos. O íon molecular ($m/z=276$) não é visível, surgindo o pico com $m/z=277$ que corresponde ao fragmento $[\text{MH}]^+$. O pico base tem o valor $m/z=73$ e corresponde ao grupo trimetilsililo.

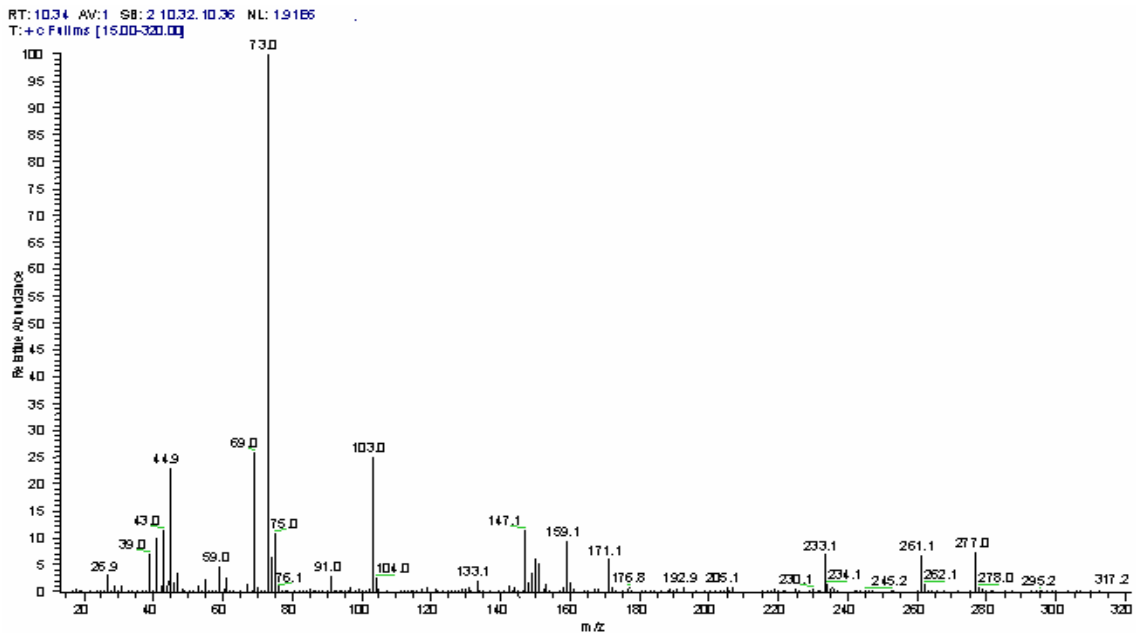


Figura 42: Espectro de massa obtido em modo total do derivado siliado do padrão interno.

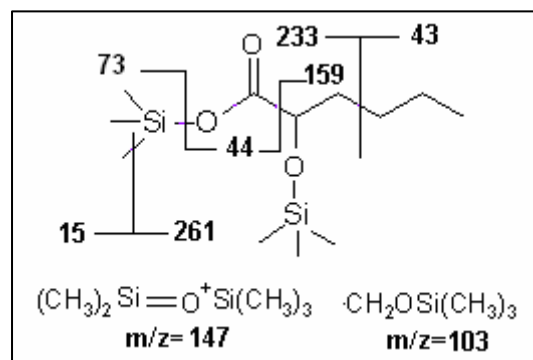


Figura 43: Principais fragmentos do derivado siliado do ácido 2-hidroxicapróico

A Figura 44 mostra o espectro de massa da GBL e a Figura 45 mostra a formação dos principais fragmentos. O íon molecular ($m/z=86$) não é visível, surgindo o pico com $m/z=87$ que corresponde ao fragmento $[\text{MH}]^+$, que é também o pico base. Este comportamento é frequente nas lactonas saturadas onde M^+ é em geral inexistente ou de pequena intensidade e existe uma forte tendência para a protonação (Seibl 1973).

gbl3mgml1308081#506 RT: 8.16 AV: 1 SB: 2 7.79,10.45 NL: 8.52E5
T: + c Full ms [15.00-320.00]

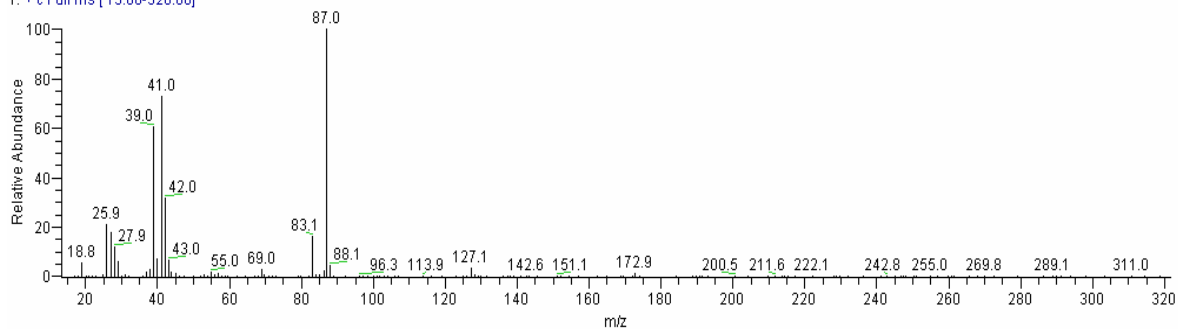


Figura 44: Espectro de massa da GBL obtido em modo total

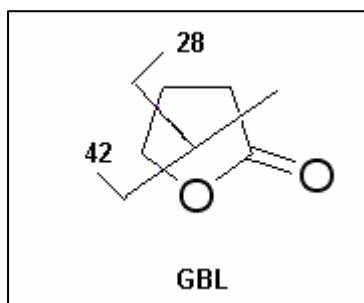


Figura 45: Principais quebras da GBL

Para a análise quantitativa obtiveram-se espectros de massa em modo SIM (Figura 46, Figura 47, Figura 48, Figura 49 e Figura 50). Para a análise dos derivados sililados do GHB, do 1,4-BD e do GABA escolheram-se os fragmentos $m/z=116$, 147, 159, 204, 232, 233, 261 e 304. Para a análise da GBL escolheram-se os fragmentos $m/z=28$, 41, 87. A escolha dos fragmentos esteve relacionada com o facto de serem picos característicos e significativos das substâncias em estudo. O fragmento $m/z=73$ embora correspondesse ao fragmento base da maioria das substâncias em análise não foi escolhido uma vez que para esse valor de m/z se verificou na análise da bebida o aparecimento de mais picos cromatográficos sem interesse analítico.

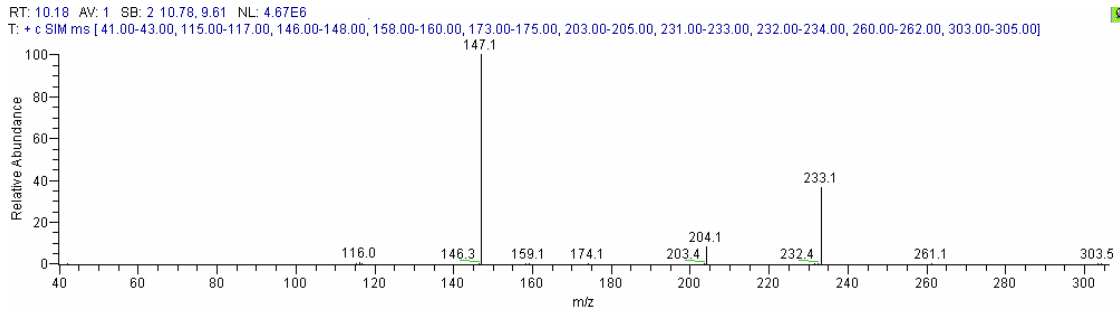


Figura 46: Espectro de massa obtido em modo SIM do derivado siliado do GHB.

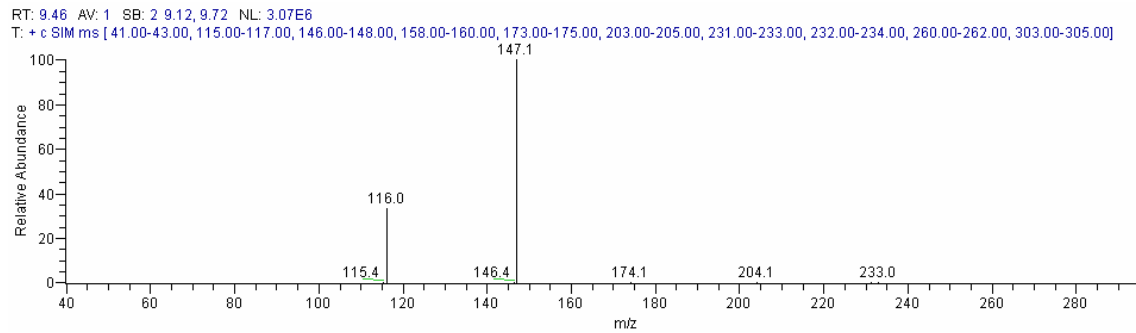


Figura 47: Espectro de massa obtido em modo SIM do derivado siliado 1,4-BD.

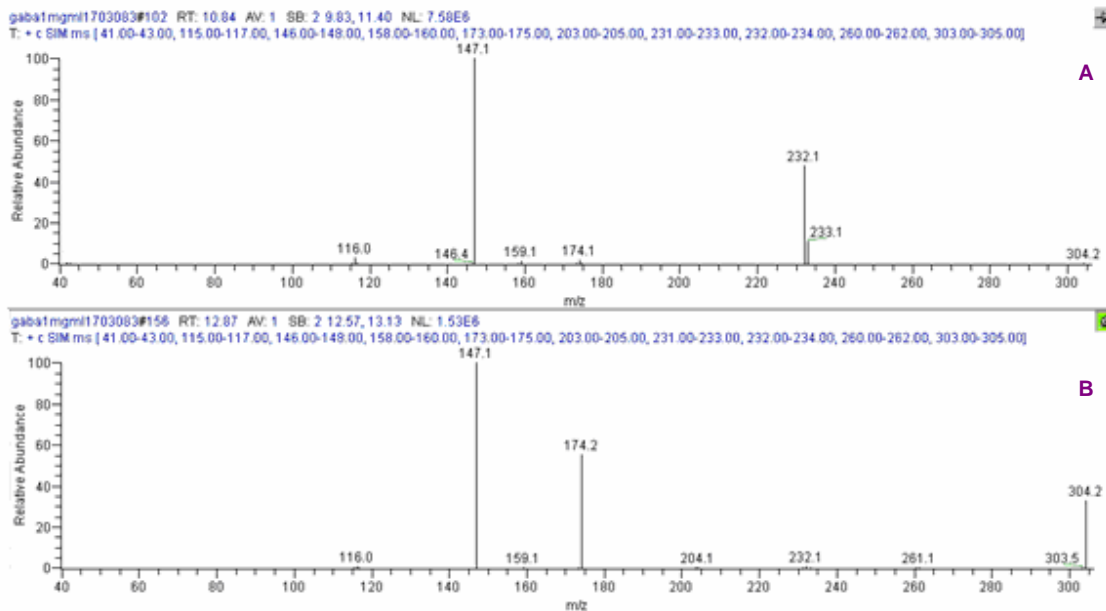


Figura 48: Espectros de massa obtidos em modo SIM dos derivados siliados do GABA. (A) Espectro de massa obtido em modo SIM do derivado dissiliado do GABA; (B) espectro de massa obtido em modo SIM do derivado trissiliado do GABA.

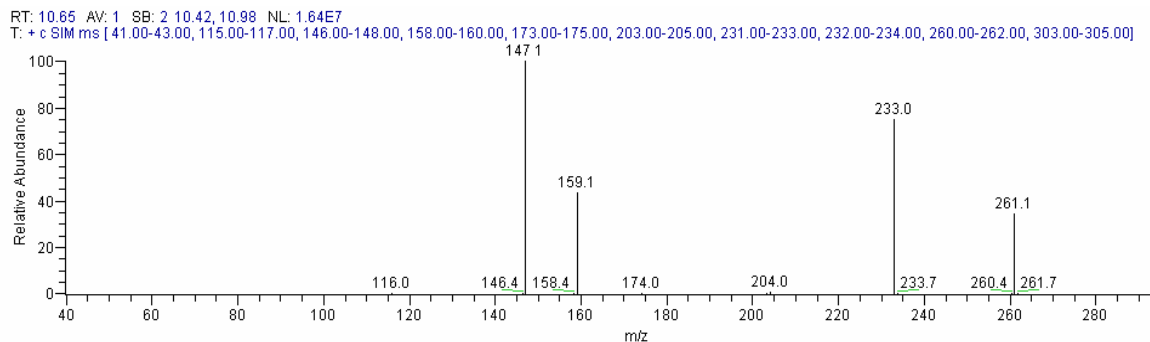


Figura 49: Espectro de massa obtido em modo SIM do derivado siliado do ácido 2-hidroxicapróico.

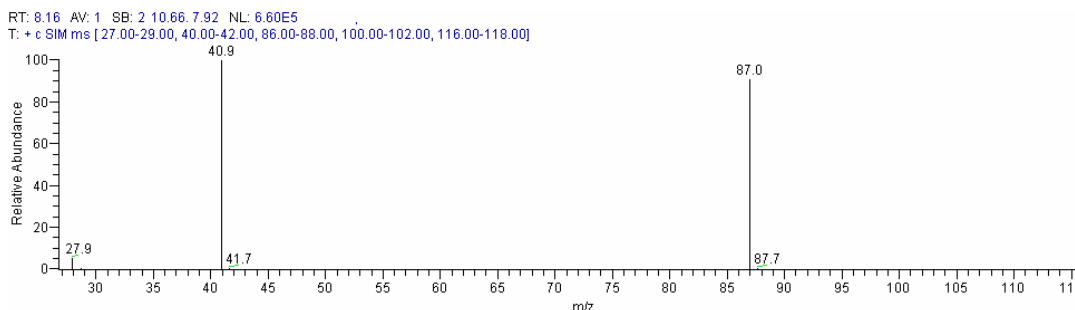


Figura 50: Espectro de massa obtido em modo SIM da GBL

3.3. Validação do Método

Para validar um método analítico é necessário ter em conta vários parâmetros para garantir que esse método é adequado para o fim a que se destina. Neste trabalho seguiram-se as recomendações da International Conference on Harmonization (ICH). Foram avaliados a selectividade, a linearidade, o limite de detecção, o limite de quantificação, a precisão (repetibilidade e precisão intermédia) e a exactidão.

Selectividade

O método mostrou ser selectivo uma vez que nenhum interferente eluiu com o mesmo tempo de retenção das substâncias de interesse, quando comparada a matriz isenta das substâncias de interesse (Figura 51 e Figura 52) com a matriz adicionada dessas substâncias.

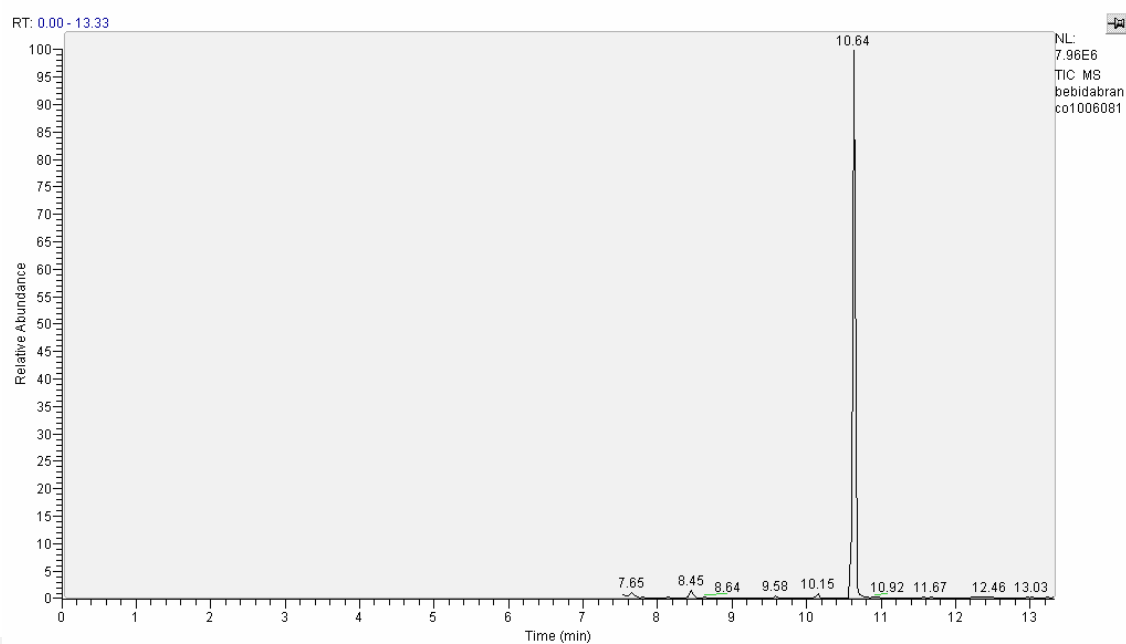


Figura 51: Cromatograma da matriz derivatizada isenta das substâncias de interesse e adicionada de padrão interno

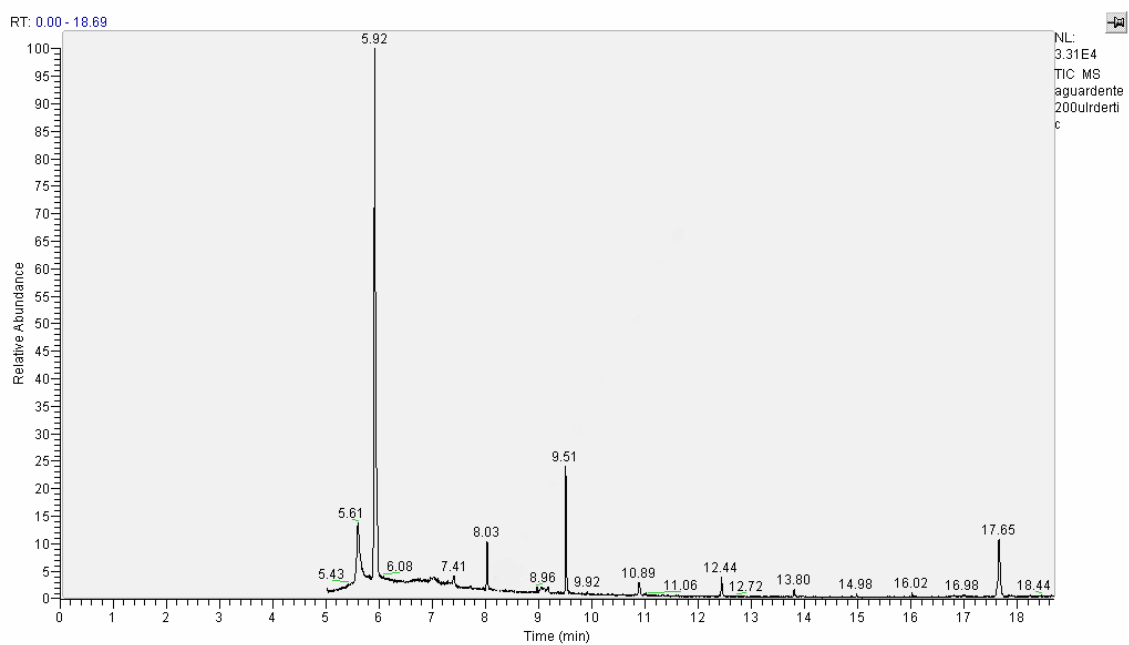


Figura 52: Cromatograma da matriz isenta das substâncias de interesse

Linearidade

Observaram-se para cada uma das substâncias as seguintes linearidades: GHB (0,0035 - 0,035mg/ml); GABA (0,2 – 2mg/ml); 1,4-BD (0,005 - 0,050 mg/ml); ácido 2-hidroxicapróico (0,05 – 1mg/ml) e GBL (0,375 - 3 mg/ml) (Figura 53 e Tabela 9).

O doseamento do GHB, 1,4-BD e GABA na bebida foi efectuado pelo método do padrão interno. Tendo em conta as linearidades obtidas para cada uma das substâncias traçaram-se curvas de calibração pelo método do padrão interno (Figura 54 e Tabela 10). Para isso utilizou-se uma solução de padrão interno 0,2mg/ml.

A GBL foi doseada pelo método do padrão externo (Figura 55).

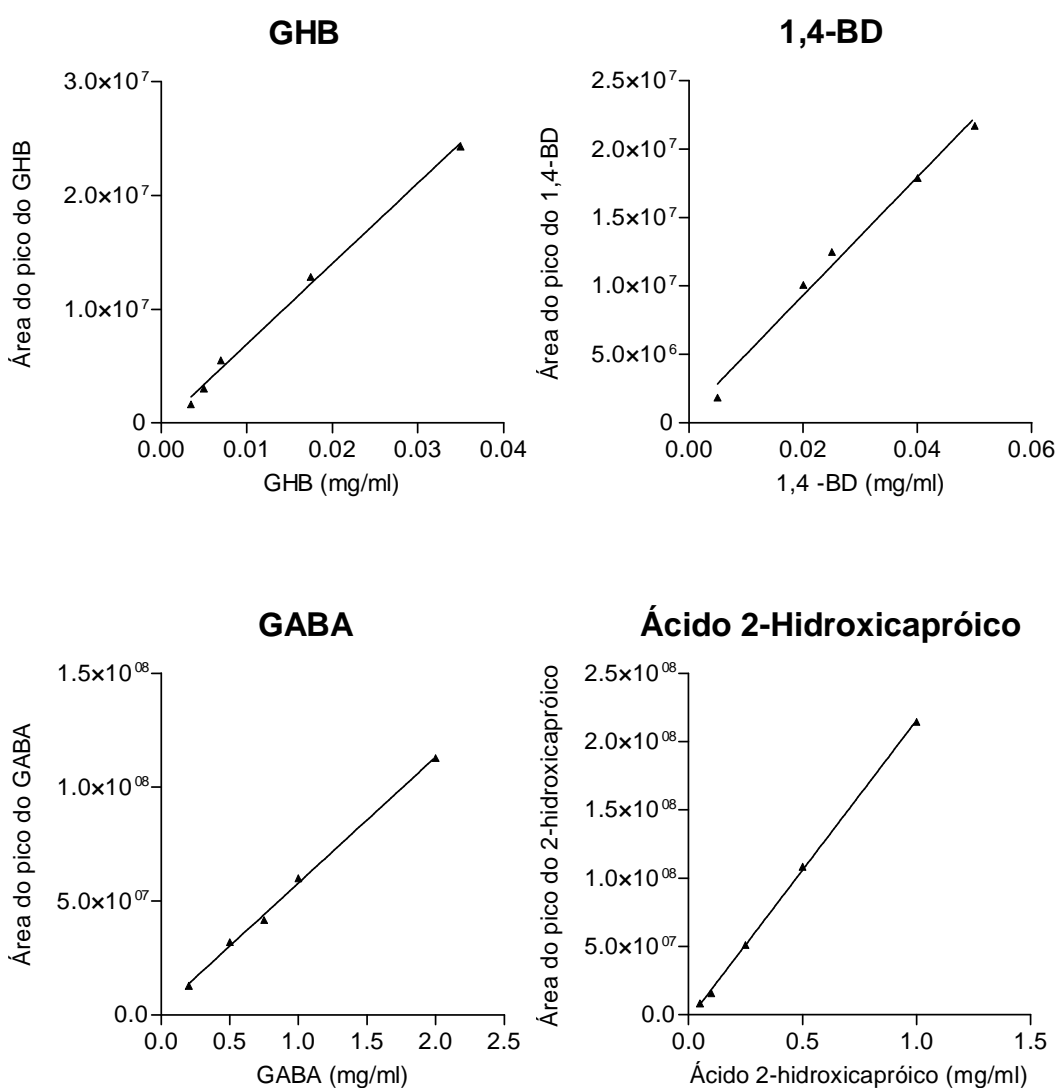


Figura 53: Linearidade obtida para o GHB, 1,4-BD, GABA e ácido 2-hidroxicapróico.

Substância	Zona Linear (mg/ml)	Equação da Recta	Coefficiente de Correlação (R ²)
GHB	0,0035-0,035	$y = 7 \cdot 10^8 x - 159719$	0,9954
1,4-BD	0,005-0,05	$y = 432224x + 691965$	0,9900
GABA	0,2-2	$y = 6 \cdot 10^7 x + 3 \cdot 10^6$	0,9976
Ácido 2-hidroxicapróico	0,05-1	$y = 2 \cdot 10^8 x - 4 \cdot 10^6$	0,9995

Tabela 9: Zona linear, equação da curva e coeficiente de correlação do GHB, 1,4-BD, GABA e ácido 2-hidroxicapróico.

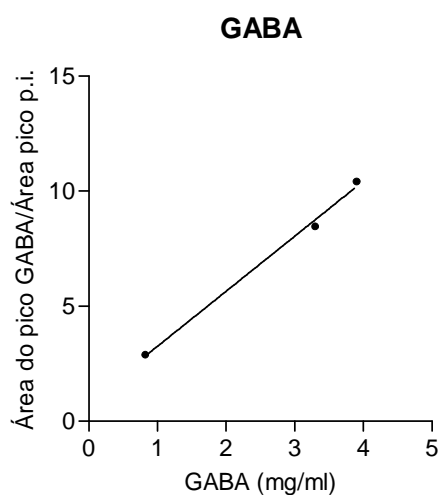
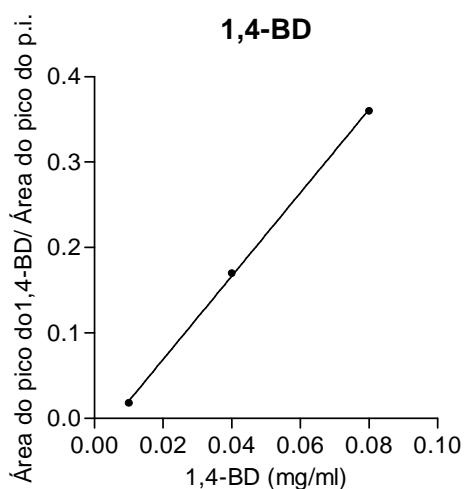
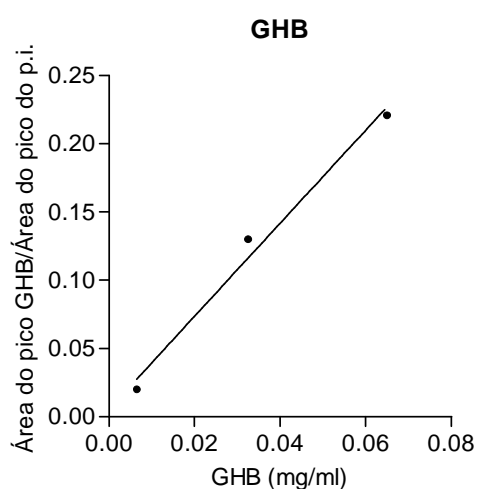


Figura 54: Curvas de calibração obtidas pelo método do padrão interno para o GHB, 1,4-BD e GABA.

Substância	Zona Linear (mg/ml)	Equação da Recta	Coefficiente de Correlação (R ²)
GHB	0,0065-0,065	y = 3,4098x + 0,0055	0,9900
1,4-BD	0,010-0,08	y = 4,8784x - 0,0287	0,9997
GABA	0,825-3,9	y = 2,3922x + 0,8608	0,9955

Tabela 10: Equação da curva de calibração e factor de correlação para o GHB, 1,4-BD e GABA

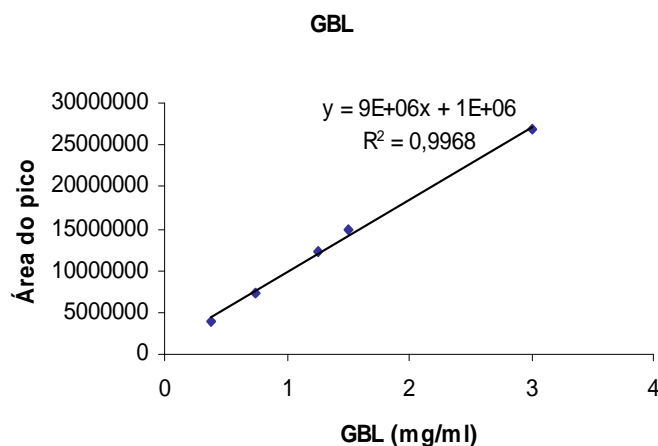


Figura 55: Curva de calibração obtida pelo método do padrão externo para a GBL

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação para cada uma das substâncias foram calculados de acordo com as normas ICH. O limite de detecção (LD) foi calculado segundo a fórmula $LD=3.3\sigma/S$, o limite de quantificação (LQ) foi calculado segundo a fórmula $LQ=10\sigma/S$ em que σ é o desvio padrão da resposta ao branco e S é o declive da curva de calibração do analito. Os valores do limite de detecção e de quantificação encontram-se na **Tabela 11**.

	GHB (mg/ml)	1,4-BD (mg/ml)	GABA (mg/ml)	GBL (mg/ml)
Limite de detecção	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$6,2 \cdot 10^{-6}$	0,210	0,0004
Limite de quantificação	$5,9 \cdot 10^{-3}$	$18,8 \cdot 10^{-6}$	0,635	0,0013

Tabela 11: Limite de detecção e quantificação do GHB, 1,4-BD, GABA e GBL.

Precisão

Repetibilidade

O estudo da repetibilidade foi efectuado utilizando as concentrações com que se construíram as curvas de calibração realizando a análise em triplicado para cada concentração, de acordo com o recomendado pela ICH. Os valores da repetibilidade para cada uma das concentrações estudadas encontram-se na: **Tabela 12**, **Tabela 13**, **Tabela 14**, **Tabela 15**, **Tabela 19**, **Tabela 16**, **Tabela 17**, **Tabela 18** e **Tabela 19** consoante o caso.

Concentração de GHB	Precisão
(mg/ml)	(RSD%)
0,035	3,4
0,0175	8,2
0,007	4,7
0,005	4,5
0,0035	4,4

Tabela 12: Repetibilidade para diferentes concentrações de GHB, obtida para o estudo da linearidade.

Concentração de 1,4-BD	Precisão
(mg/ml)	(RSD%)
0,05	1,0
0,04	2,2
0,025	4,2
0,020	4,7
0,005	10

Tabela 13: Repetibilidade para diferentes concentrações de 1,4-BD, obtida para o estudo da linearidade.

Concentração de GABA (mg/ml)	Precisão (RSD%)
2	2,1
1	5,3
0,75	1,8
0,5	0,1
0,2	7,7

Tabela 14: Repetibilidade para diferentes concentrações de GABA, obtida para o estudo da linearidade.

Concentração de ácido 2-hidroxicapróico (mg/ml)	Precisão (RSD%)
1	1,6
0,5	4,2
0,25	2,3
0,1	6,6
0,05	2,1

Tabela 15: Repetibilidade para diferentes concentrações de ácido 2-hidroxicapróico, obtida para o estudo da linearidade.

Concentração de GHB (mg/ml)	Precisão (RSD%)
0,065	5,85
0,0125	6,94
0,0065	8,76

Tabela 16: Repetibilidade para diferentes concentrações de GHB, obtida pelo método do padrão interno.

Concentração 1,4-BD	Precisão
(mg/ml)	(RSD%)
0,08	1,45
0,04	2,10
0,010	4,22

Tabela 17: Repetibilidade para diferentes concentrações de 1,4-BD, obtida pelo método do padrão interno.

Concentração de GABA	Precisão
(mg/ml)	(RSD%)
3,9	7,22
3,3	1,60
0,825	1,92

Tabela 18: Repetibilidade para diferentes concentrações de GABA, obtida pelo método do padrão interno.

Concentração de GBL	Precisão
(mg/ml)	(RSD%)
3	3,9
1,5	1,5
1,25	5,1
0,75	0,1
0,375	5,3

Tabela 19: Repetibilidade para diferentes concentrações de GBL, obtida pelo método do padrão externo.

Os valores obtidos (inferiores a 10%) estão de acordo com o requerido pela ICH.

Precisão intermédia

O estudo da precisão intermédia foi efectuado para três concentrações diferentes dos analitos

em dias diferentes não consecutivos e realizando a análise em triplicado de acordo com o recomendado pela ICH. Os valores da precisão intermédia para cada uma das concentrações estudadas encontram-se na: **Tabela 20**, **Tabela 21**, **Tabela 22** e **Tabela 23**.

Concentração de GHB	Precisão
(mg/ml)	(RSD%)
0,065	6,3
0,0125	4,4
0,0065	4,4

Tabela 20: Precisão intermédia para diferentes concentrações de GHB, obtida pelo método do padrão interno.

Concentração 1,4-BD	Precisão
(mg/ml)	(RSD%)
0,08	10
0,05	6,2
0,010	10

Tabela 21: Precisão intermédia para diferentes concentrações de 1,4-BD, obtida pelo método do padrão interno.

Concentração de GABA	Precisão
(mg/ml)	(RSD%)
3,9	7,5
3,3	2,4
0,825	6,7

Tabela 22: Precisão intermédia para diferentes concentrações de GABA, obtida pelo método do padrão interno.

Concentração de GBL	Precisão
(mg/ml)	(RSD%)
3	5,8
1,25	6,8
0,375	8,2

Tabela 23: Precisão intermédia para diferentes concentrações de GBL, obtida pelo método do padrão externo.

Os valores obtidos (inferiores a 10%) estão de acordo com o requerido pela ICH.

Exactidão

A recuperação da extracção foi calculada segundo a seguinte fórmula.

$$\% \text{ Recuperação} = \left[\frac{\text{Área do analito}_{\text{extracção}}}{\text{Área do analito}_{\text{padrão}}} \right] * 100$$

A recuperação da extracção foi de 73,3%.

O estudo da exactidão foi efectuado para três concentrações diferentes dos analitos e realizando a análise em triplicado de acordo com o recomendado pela ICH. Para estudar a exactidão do método prepararam-se soluções de três concentrações diferentes nos solventes indicados em 2.4 e calculou-se a percentagem de recuperação segundo a seguinte fórmula.

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

Os valores da exactidão para cada uma das concentrações estudadas encontram-se na: **Tabela 24, Tabela 25, Tabela 26 e Tabela 27.**

Concentração de GHB	Exactidão
(mg/ml)	(%)
0,065	97,2
0,0125	112,3
0,0065	90,2

Tabela 24: Exactidão para diferentes concentrações de GHB, obtida pelo método do padrão interno.

Concentração 1,4-BD	Exactidão
(mg/ml)	(%)
0,08	100,0
0,05	100,0
0,010	96,0

Tabela 25: Exactidão para diferentes concentrações de 1,4-BD, obtida pelo método do padrão interno.

Concentração de GABA	Exactidão
(mg/ml)	(%)
3,9	102,6
3,3	96,4
0,825	101,8

Tabela 26: Exactidão para diferentes concentrações de GABA, obtida pelo método do padrão interno.

Concentração de GBL	Exactidão
(mg/ml)	(%)
3	95,3
1,25	100,0
0,375	86,2

Tabela 27: Exactidão para diferentes concentrações de GBL, obtida pelo método do padrão externo.

Os valores obtidos (compreendidos entre 80%-120%) estão de acordo com o requerido pela ICH.

3.4. Doseamento de GHB, 1,4-BD, GABA e GBL numa Bebida Alcoólica

Como referido anteriormente o GHB, o 1,4-BD e o GABA foram doseados em aguardente pelo método do padrão interno. A GBL foi doseada pelo método do padrão externo. A Figura 56, a Figura 57 e a Figura 58 apresentam os cromatogramas obtidos a partir da bebida adicionada de GHB e 1,4- BD; de GABA e de GBL, respectivamente.

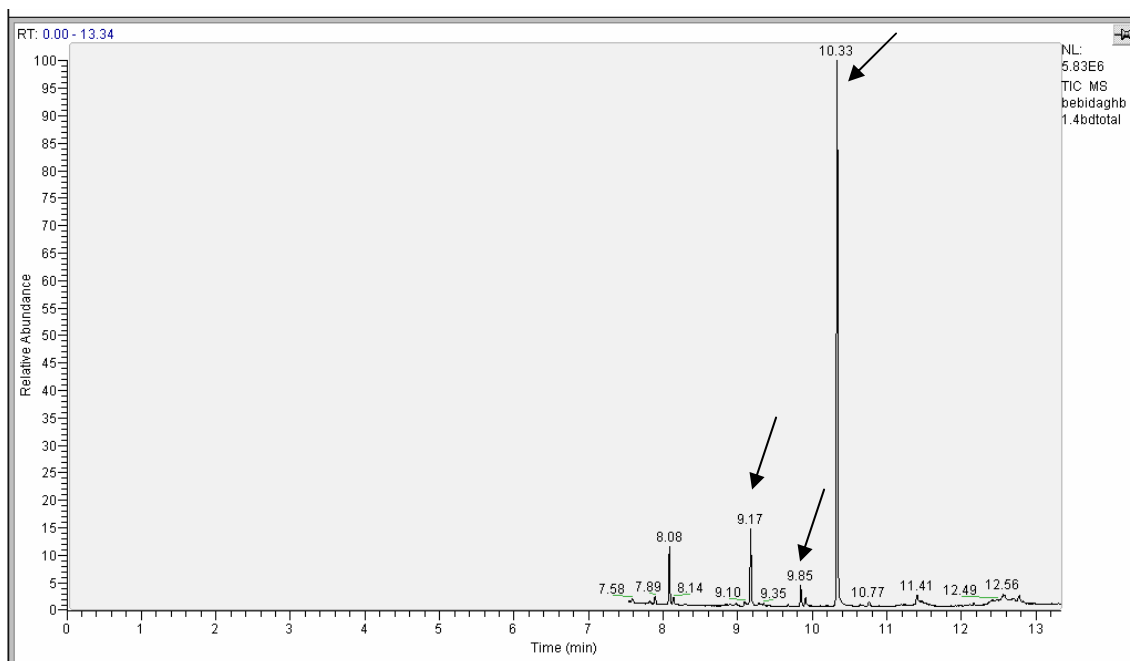


Figura 56: Cromatograma dos derivados sililados do GHB, 1,4-BD e ácido 2-hidroxicapróico obtido a partir da bebida adicionada de GHB e 1,4-BD.

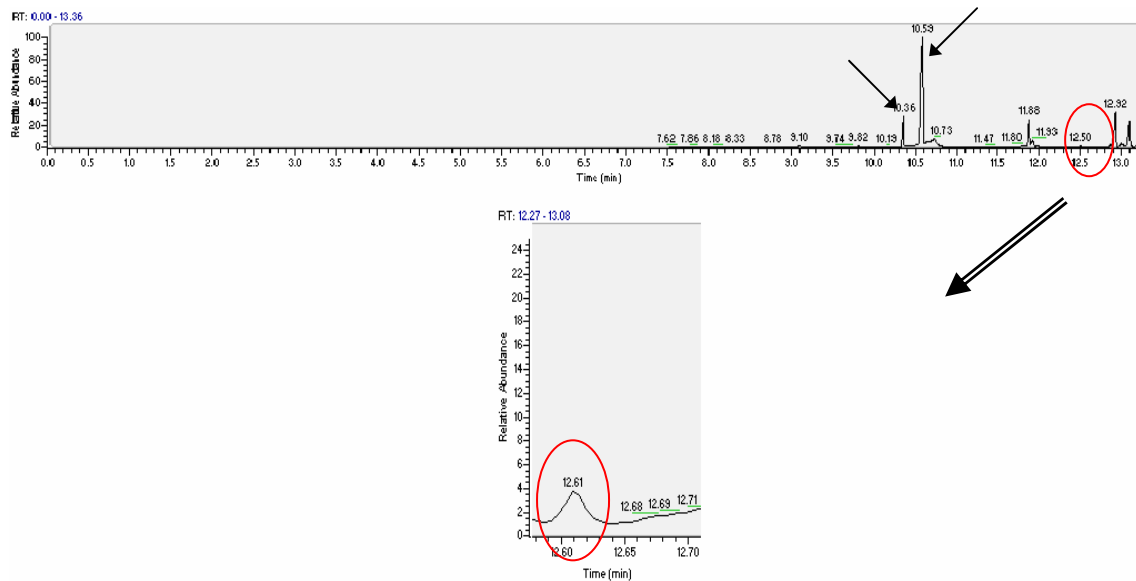


Figura 57: Cromatograma dos derivados sililados do GABA e ácido 2-hidroxicapróico obtido a partir da bebida adicionada de GABA.

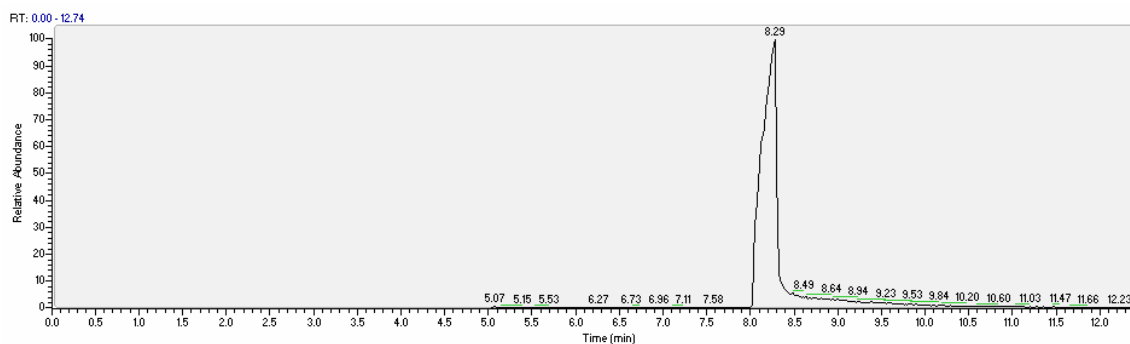


Figura 58: Cromatograma obtido a partir da bebida adicionada de GBL.

As concentrações das soluções alcoólicas preparadas encontram-se em 2.4. As concentrações obtidas encontram-se na **Tabela 28**. A precisão do doseamento (inferior ou igual a 10%) está de acordo com o recomendado pela ICH.

Substância	Concentração (mg/ml)	RSD (%)
GHB	7,38	10
1,4-BD	43,8	10
GABA	1,54	8,4
GBL	63,4	7,0

Tabela 28: Concentração de GHB, 1,4-BD, GABA e GBL na aguardente

Para as concentrações utilizadas para dopar a bebida este método apresentou boa recuperação para o GHB, 1,4-BD e GBL em bebidas alcoólicas. Este método não apresentou boa recuperação para a determinação do GABA em bebidas alcoólicas. Este facto pode dever-se à formação de uma mistura de derivados sililados durante a derivatização do GABA ou à menor reactividade do grupo amina com o reagente de derivatização, quando comparado com os grupos hidroxilo ou carboxilo. Embora não haja registos de utilização do GABA como droga de abuso seria interessante, com base na metodologia aqui descrita e utilizada para o estudo das outras substâncias, poder encontrar um processo que permitisse também o doseamento do GABA. Uma hipótese a estudar futuramente seria a de aumentar a selectividade na derivatização do GABA, de forma a originar maioritariamente um único derivado sililado.

Este método foi ainda utilizado num caso real de suspeita de intoxicação por GHB (**Figura 59**). Pela análise da solução suspeita adicionada de GHB verificou-se que não se tratava de GHB uma vez que surgem dois picos cromatográficos: um originado pelo derivado sililado do GHB (tempo de retenção=9,94min) e outro pelo derivado sililado da substância suspeita (tempo de retenção=10,30min) (**Figura 60**). Contudo, o espectro de massa obtido a partir do derivado sililado da substância suspeita era muito semelhante ao do derivado sililado do GHB, pelo que parece tratar-se de uma substância relacionada com o GHB, nomeadamente ácido α -hidroxibutírico. Este método mostrou então poder ser utilizado em situações práticas, permitindo discriminar o GHB de outras substâncias relacionadas. Assim sendo a utilidade deste método abrange o domínio prático da toxicologia forense podendo ser facilmente implementado em qualquer laboratório da especialidade.

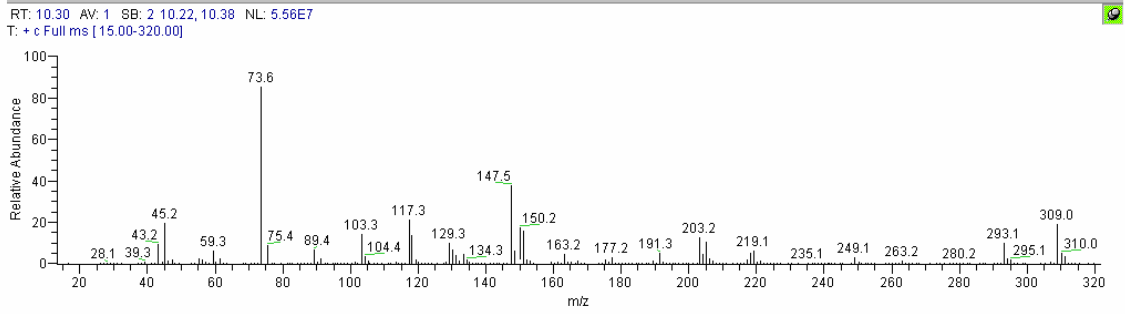
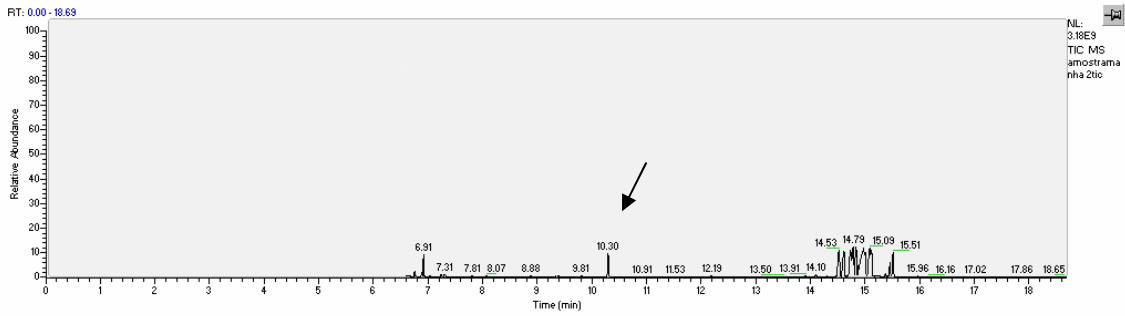


Figura 59: Cromatograma e espectro de massa obtido em modo TIC a partir da solução desconhecida.

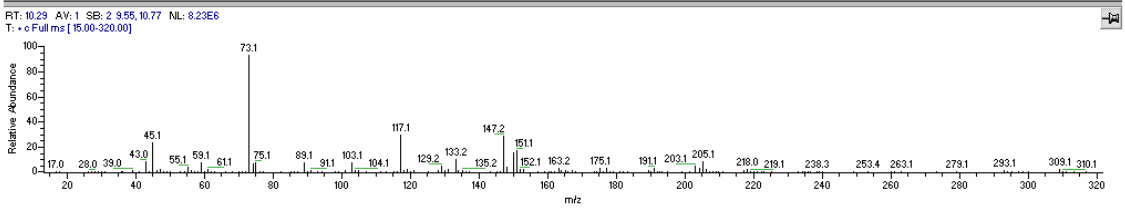
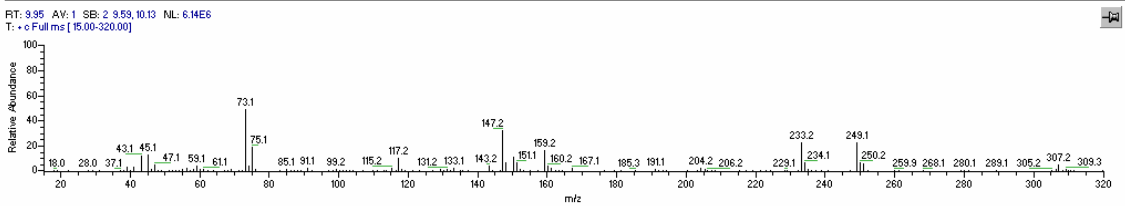
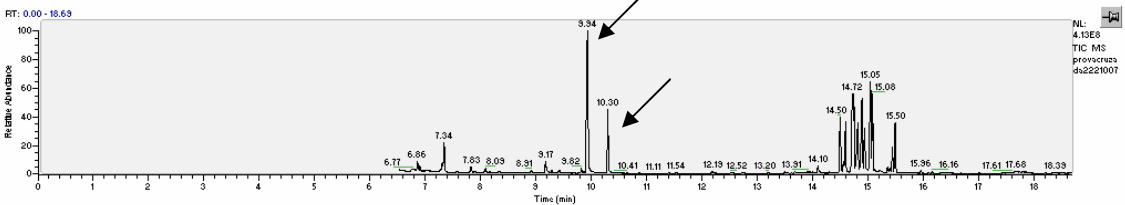


Figura 60: Cromatograma e espectro de massa obtido em modo TIC a partir da solução desconhecida adicionada de GHB.

4. Conclusões

Neste trabalho desenvolveu-se e optimizou-se um método que permite fazer o doseamento de uma forma simples e rápida quer do GHB, quer dos seus precursores, GBL e 1,4-BD em bebidas e recorrendo a uma pequena quantidade de amostra. O método desenvolvido é exacto, preciso e sensível para determinar estas substâncias em bebidas alcoólicas. Relativamente ao GABA o método terá de ser optimizado de forma a conseguir uma melhor recuperação e assim poder utilizá-lo para a análise deste precursor. O método desenvolvido é o primeiro método, que tenhamos conhecimento, que permite fazer o doseamento de GHB e seus precursores em bebidas alcoólicas por GC-MS. Este método constitui pois uma boa opção para determinar quer o GHB quer os seus precursores em bebidas alcoólicas suspeitas e poderá ser ainda aplicado a outras matrizes desde que com as devidas alterações.

De futuro é necessário verificar se a metodologia desenvolvida é susceptível de ser aplicada à identificação e doseamento dos ésteres etílico e metílico do GHB. Isto porque o GHB e a GBL em soluções alcoólicas podem ser convertidos nos ésteres etílico e metílico (Hennessy 2004) e portanto a pesquisa de GHB e derivados a quando da análise de bebidas alcoólicas suspeitas terá de incluir obrigatoriamente esses ésteres.

Bibliografia

Index Merck.

34thECDD (2006). Pre-review of gamma-hydroxybutyric acid (GHB). W. H. Organization.

Alston, W. C. I. k. N. (2002). "Rapid colorimetric screening test for gamma-hydroxybutyric acid (liquid X) in human urine." Forensic Sci. Int. **126**(2): 114-7.

Baldacci, A., Theurillat, R., Caslavská, J., Pardubská, H., Brenneisen, R., Thormann, W. (2003). "Determination of gamma-hydroxybutyric acid in human urine by capillary electrophoresis with indirect UV detection and confirmation with electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. ." J Chromatogr A **990**(1-2): 99-110.

Bennett, M. J., Steiner, R.R. (2009). "Detection of Gamma-Hydroxybutyric Acid in Various Drink Matrices via AccuTOF-DART." J Forensic Sci **54**(2): 370-375.

Bernasconi, R., Mathivet, P., Bischoff, S., Marescaux, C. (1999). "Gamma-hydroxybutyric acid: an endogenous neuromodulator with abuse potential?" TiPS **20**: 135-140.

Bishop, S. C., Lerch, M., McCord, B. R. (2004). "Micellar electrokinetic chromatographic screening method for common sexual assault drugs administered in beverages." Forensic Sci. Int. **141**(1): 7-15.

Bosman, I. J., Lusthof, K. J. (2003). "Forensic cases involving the use of GHB in The Netherlands." Forensic Sci. Int. **133**(1-2): 17-21.

Bravo, D. T., Harris, D.O., Parsons, S.M. (2004). "Reliable, sensitive, rapid and quantitative enzyme-based assay for gamma-hydroxybutyric acid (GHB)." J Forensic Sci **49**(2): 379-87.

Brenneisen, R., Elsohly, M.A., Murphy, T.P., Passarelli, J., Russmann, S., Salamone, S. J., Watson, D. E. (2004). "Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects." J Anal Toxicol. **28**(8): 625-30.

Carter, L. P., Koek, W., France, C.P. (2009). "Behavioral analyses of GHB: Receptor mechanisms." Pharmacology & Therapeutics **121**: 100–114.

Couper, F., Marinetti L. (2002). "γ-Hydroxybutyrate(GHB) - Effects on Human Performance and Behaviour." Forensic Sci. Rev **101**(14): 102-121.

Dahlen, J., Vriesman, T. (2002). "Simultaneous analysis of gamma-hydroxybutyric acid, gamma-butyrolactone, and 1,4-butanediol by micellar electrokinetic chromatography. ." Forensic Sci. Int. **125**(2-3): 113-9.

de Vriendt, C. A., van Sassenbroeck, D.K., Rossell, M.T., van de Velde, E.J., Verstraete, A.G., Vander, Heyden, Y., Belpaire, F.M. (2001). "Development and validation of a high performance liquid chromatography method for the determination of gamma-hydroxybutyric acid in rat plasma. ." Chromatogr B Biomed Sci Appl. **752**(1): 85-90.

DeFrancesco, J., Witkowski, M.R., Ciolino, L. (2006). "GHB Free Acid: I Solution Formation Studies and Spectroscopic Characterization by 1HNMR an TF-IR." J Forensic Sci **51**(2): 321-29.

- Del Signore, A. G., McGregor, M., Cho, B.P. (2005). "1H NMR analysis of GHB and GBL: further findings on the interconversion and a preliminary report on the analysis of GHB in serum and urine." J Forensic Sci **50**(1): 81-6.
- Diekman, J., Thomson, J. B., Djerassi, C. (1968). "Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. CLV. Electron Impact Induced Fragmentations and Rearrangements of Some Trimethylsilyl Ethers of Aliphatic Glycols and Related Compounds." The Journal of Organic Chemistry **33**(6): 2271-84.
- Drasbek, K. R., Christensen, J., Jensen, K. (2006). "Gamma-hydroxybutyrate – a drug of abuse." Acta Neurol Scand **114**: 145 -156.
- Duer, W. C., Byers, K. L., Martin, J. V. (2001). "Application of a convenient extraction procedure to analyze gamma-hydroxybutyric acid in fatalities involving gamma-hydroxybutyric acid, gamma-butyrolactone, and 1,4-butanediol." J Anal Toxicol. **25**(7): 576-82.
- Ellian, A. (2001). "GC-MS determination of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in blood. ." Forensic Sci. Int. **122**(1): 43-7.
- Elliott, S., Burgess, V. (2005). "The presence of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) in alcoholic and non-alcoholic beverages." Forensic Sci. Int. **151**: 289-292.
- Elliott, S., Lowe, P., Symonds, A. (2004). "The possible influence of micro-organisms and putrefaction in the production of GHB in post-mortem biological fluid. ." Forensic Sci. Int. **139**(2-3): 183-90.
- Esselman, W. J., Clagett, C.O. (1969). "Gas-liquid chromatography-mass spectrometry of hydroxylated octadecanols derived from hydroxylated stearic acids." Journal of Lipid Research **10**: 234-9.
- Frison, G., Tedeschi, L., Maietti, S., Ferrara, S.D. (2000). "Determination of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in plasma, urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/positive ion chemical ionization mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom. **14**(24): 2401-7.
- Fung, H. L., Haas, E., Raybon, J., Xu, J., Fung, S. M. (2004). "Liquid chromatography-mass spectrometry determination of endogenous gamma-hydroxybutyrate concentrations in rat brain regions and plasma." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **807**(2): 287-91.
- Galicía, M., Nogué, S., To-Figueras, J., Echarte, J.L., Iglesias, M.L., Miró, O. (2008). "Poisoning by liquid ecstasy (GHB) in hospital emergency departments of Barcelona: a 2-years study." Med CLin (Barc) **130**(7): 254-8.
- Gobaille, S., Schleef, C., Hechler, V., Viry, S., Aunis, D., Maitre, M. (2002). "Gamma-hydroxybutyrate increases tryptophan availability and potentiates serotonin turnover in rat brain. ." Life Sci **70**(18): 101-12.
- Gonzalez, A., Nutt, D. J. (2005). "Gamma hydroxybutyrate abuse and dependency." J Psychopharmacol. **19**(2): 195-204.
- Gottardo, R., Bortolotti, F., Trettene, M., De PAoli, G., Tagliaro, F. (2004). "Rapid and direct analysis of gamma-hydroxybutyric acid in urine by capillary electrophoresis-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry." J Chromatogr **1051**(1-2): 207-11.
- Gouille, J. P., Cheze, M., Pepin, G. (2003). "Determination of endogenous levels of GHB in human hair. Are there possibilities for the identification of GHB administration through air analysis in cases of drug-facilitated sexual assault?" J Anal Toxicol. **27**(8): 574-80.
- Hennessy, S. A., Moane, S. M., McDermott, S. D. (2004). "The reactivity of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) in alcoholic solutions." J Forensic Sci **49**(6): 1220-9.
- Hornfeldt, C. S., Lothridge, K., Upshaw Downs, J.C. (2002). "Forensic Science Update:

- Gamma-Hydroxybutyrate (GHB). ." Forensic Science Communications **4**(1).
- Kintz, P., Cirimele, V., Jamey, C., Ludes, B. (2003). "Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault." J Forensic Sci **48**(1): 195-200.
- Knudsen, K., Greter, J., Verdicchio, M. (2008). "High mortality rates among GHB abusers in Western Sweden." Clinical Toxicology **46**: 187-192.
- Lebau, M. A., Miiller, M.L., Levine, B. (2001). "Effect of storage temperature on endogenous GHB levels in urine. ." Forensic Sci. Int. **119**(2): 161-7.
- Lebau, M. A., Montgomery, M.A., Miller, M.L., Burmeister, S.G. (2000). "Analysis of biofluids for gamma-hydroxybutyrate (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) by headspace GC-FID and GC-MS." J Anal Toxicol. **24**(6): 421-8.
- Maitre, M. (1997). "The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications." Progress in Neurobiology **51**: 337-361.
- Marinetti, L. J., Isenschmid, D.S., Helper, B.R., Kanluen, S. (2005). "Analysis of GHB and 4-methyl-GHB in post-mortem matrices after long-term storage. ." J Anal Toxicol. **29**(1): 41-7.
- McCusker, R. R., Paget-Wilkes, H., Chronister, C.W., Goldberger, B.A. (1999). "Analysis of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine by gas chromatography-mass spectrometry. ." J Anal Toxicol. **23**(5): 301-5.
- McLafferty, F. W., Turecek, F. (1993). Interpretation of Mass Spectra, university Science - books.
- Meyers, J. E., Almirall, J. R. (2005). "Analysis of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in spiked water and beverage samples using solid phase microextraction (SPME) on fiber derivatization/gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)." J Forensic Sci **50**(1): 31-6.
- Moriya, F., Hashimoto, Y. (2004). "Endogenous gamma-hydroxybutyric acid levels in post-mortem blood. ." Leg Med (Tokyo) **6**(1): 47-51.
- Nicholson, K. L., Balster, R.L. (2001). "GHB: a new and novel drug of abuse." Drug and Alcohol Dependence **63**(1): 1-22.
- Okun, M. S., Boothby, L. A., Bartfield, R.B., Doering, P.L. (2001). "GHB an important pharmacologic and clinical update." J Pharm Pharmaceut Sci **4**(2): 167-175.
- Palatini, P., Tedeschi, L., Frison, G., Padrini, R., Zordan, R., Orlando, R., Gallimberti, L., Gessa, G.L., Ferrara, S.D. (1993). "Dose-dependent absorption and elimination of gamma-hydroxybutyric acid in healthy volunteers." Eur J Clin Pharmacol. **45**(4): 353-6.
- Pearl, P. L., Gibson, K.M., Cortez, M.A., Wu, Y., Snead, O.C. III, Knerr, I., Forester, K., Pettiford, J.M., Jakobs, C., Theodore, W.H. (2009). "Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: Lessons from mice and men." J Inher Metab Dis **Epub ahead of print**.
- Richard, D., Ling, B., Authier, N., Faict, T. W., Eschaliere, A., Coudore, F. (2005). "GC/MS profiling of gamma-hydroxybutyrate and precursors in various animal tissues using automatic solid-phase extraction. Preliminary investigations of its potential interest in post-mortem interval determination. ." Anal Chem. **77**: 1354-60.
- Sabucedo, A. J., Furton, K. G. (2004). "Extractionless GC/MS analysis of gamma-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone with trifluoroacetic anhydride and heptafluoro-1-butanol from aqueous samples." J Sep Sci **27**(9): 703-9.
- Seibl, J. (1973). Espectrometría de masas, Editorial Alhambra.
- Shaw, L. M., Kwong, T. C., Rosano, T. G., Orsulak, P. J., Wolf, B. A., Magnani, B. (2002). The Clinical Toxicology Laboratory - Contemporary Practice of Poisoning Evaluation.

Clinical Chemistry. **48**: 538.

- Shima, N., Miki, A., Kamata, T., Katagi, M., Tsuchihashi, H. (2005). "Endogenous Level and *in vitro* Production of GHB in Blood from Healthy Humans, and the Interpretation of GHB Levels Detected in Antemortem Blood Samples." Journal of Health Science **51**(2): 147-154.
- Sumnall, H. R., Woolfall, K., Edwards, S., Cole, J.C., Beynon, C.M. (2008). "Use, function, and subjective experiences of gamma-hydroxybutyrate (GHB)." Drug Alcohol Depend. **92**(1-3): 286-90.
- Villain, M., Cirimele, V., Ludes, B., Kintz, P. (2003). "Ultra-rapid procedure to test for gamma-hydroxybutyric acid in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **792**(1): 83-7.
- Wood, M., Laloup, M., Samyn, N., Morris, M. R., de Bruijn, E. A., Maes, R. A., Young M.S., Maes, V., De Boek, G. (2004). "Simultaneous analysis of gamma-hydroxybutyric acid and its precursors in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Chromatogr A **1056**(1-2): 83-90.
- Wu, Y., Ali, S., Ahmadian, G., Liu, C. C., Wang, Y. T., Gibson, K. M., Calver, A. R., Francis, J., Pangalos, M. N., Carter, Snead O 3 rd (2004). "Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-aminobutyric acid B receptor (GABABR) binding sites are distinctive from one another: molecular evidence." Neuropharmacology **47**(8): 1146-56.

