

Susana Filipa Gonçalves Pacheco

Avaliação toxicológica do ácido gama-hidroxibutírico em contexto forense

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2017

Susana Filipa Gonçalves Pacheco

Avaliação toxicológica do ácido gama-hidroxibutírico em contexto forense

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2017

Susana Filipa Gonçalves Pacheco

Avaliação toxicológica do ácido gama-hidroxitúrico em contexto forense

Trabalho original realizado por:

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como partes dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Doutora Márcia Cláudia Dias de Carvalho

RESUMO

O ácido gama-hidroxibutírico (GHB) ocorre naturalmente no corpo humano, sendo um metabolito do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA), mas pode igualmente ter origem exógena. Foi inicialmente usado como anestésico, mas foi retirado devido a efeitos colaterais que incluíam convulsões e coma. No final do séc. XX emergiu como droga de abuso, popularmente designado de “ecstasy líquida”, “easy lay” e “fantasia”. Podem ser definidos 3 grupos principais de consumidores de GHB: os fisiculturistas enquanto anabolizante, devido à estimulação da libertação da hormona do crescimento; os predadores sexuais enquanto droga facilitadora de agressões sexuais, devido aos seus efeitos sedativos e amnésicos; e os frequentadores de ambientes recreativos noturnos que tomam a droga devido aos seus efeitos eufóricos. Indivíduos que consomem repetidamente doses elevadas de GHB podem desenvolver tolerância e dependência. Além disso, o consumo de GHB e dos seus análogos gama-butirolactona e 1,4-butanodiol (que são rapidamente metabolizados a GHB) está associado a casos de intoxicações e morte por depressão respiratória. Deste modo, a determinação de GHB e dos seus análogos em amostras biológicas assume grande interesse em Toxicologia Forense. Neste trabalho pretende-se efetuar uma revisão dos aspetos mais relevantes do GHB para a perícia em Toxicologia Forense, com ênfase na farmacocinética e farmacodinâmica, mecanismo de ação e toxicidade. No final, serão abordadas as análises toxicológicas de matrizes biológicas e apresentados alguns casos de estudo nesta temática.

Palavras-Chave: ácido gama-hidroxibutírico, 1,4-butanodiol, gama-butirolactona, farmacocinética, farmacodinâmica, toxicidade, abuso, forense.

ABSTRACT

Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) occurs naturally in the human body, being a metabolite of the neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA), but may also have exogenous origin. It was initially used as an anesthetic but was withdrawn due to side effects that included seizures and coma. At the end of the century XX, GHB has emerged as a drug of abuse, popularly termed "Liquid Ecstasy", "Easy Lay" and "Fantasy". Three main groups of GHB consumers can be defined: bodybuilders as an anabolic drug due to stimulation of growth hormone release; sexual predators as a drug that facilitates sexual aggression due to its sedative and amnestic effects; and recreational nightclubs who take the drug because of its euphoric effects. Individuals who repeatedly consume high doses of GHB may develop tolerance and dependence. In addition, the consumption of GHB and its γ -butyrolactone and 1,4-butanediol analogues (which are rapidly metabolized to GHB) is associated with cases of intoxication and death from respiratory depression. Thus, the determination of GHB and its analogues in biological samples assumes great interest in Forensic Toxicology. In this work we intend to review the most relevant aspects of the GHB for expertise in Forensic Toxicology with emphasis on pharmacokinetics and pharmacodynamics, mechanism of action and toxicity. At the end, the toxicological analyzes of biological matrices will be approached and some case studies will be presented.

Keywords: gamma-hydroxybutyric acid, 1,4-butanediol, gama-butyrolactone, pharmacodynamics, pharmacokinetics, toxicity, abuse, forensic.

AGRADECIMENTOS

Qualquer realização humana, mesmo que individual, é sempre o resultado de um conjunto diversificado de contextos, de instituições e, sobretudo, de pessoas que de uma forma ou de outra contribuem para o sucesso. A todos que cooperaram para que esta tarefa se tornasse uma realidade, o meu profundo agradecimento.

À minha orientadora, Professora Doutora Márcia Cláudia Dias de Carvalho, por toda a competência científica, acompanhamento do trabalho, disponibilidade, compreensão e incentivo. Também não poderia deixar de referir e agradecer, o contributo dado para o despertar do meu interesse pela área da Toxicologia, durante o meu percurso académico.

A todos os restantes professoras, que contribuíram para o meu crescente conhecimento e gosto por este curso.

Aos meus amigos, pelo apoio incondicional, amizade, afeto, companhia e paciência.

Aos meus tios, pela forma como me acolheram, por toda a paciência e apoio.

E, por fim, aos meus pais, por terem acreditado desde o início que o sonho era possível, pelo amor incondicional e por mostrarem diariamente o orgulho sentido. Espero que esta etapa, que agora termino, possa de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me ofereceram.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| RESUMO | iv |
| ABSTRACT | v |
| AGRADECIMENTOS | vi |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xi |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xii |
| I. INTRODUÇÃO | 1 |
| II. MATERIAS E MÉTODOS | 2 |
| III. GHB | 3 |
| 3.1. Perspetiva histórica | 3 |
| 3.2. Prevalência e padrões de consumo..... | 5 |
| 3.3. Produção endógena | 6 |
| 3.4. Farmacocinética | 7 |
| 3.4.1. Absorção..... | 7 |
| 3.4.2. Distribuição | 8 |
| 3.4.3. Metabolismo | 8 |
| 3.4.4. Eliminação..... | 10 |
| 3.4.5. Interação GHB-etanol..... | 11 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.5. | Farmacodinâmica | 11 |
| 3.6. | Toxicidade..... | 12 |
| 3.7. | Síndrome de abstinência..... | 14 |
| 3.8. | Tratamento da intoxicação aguda..... | 15 |
| 3.9. | Tratamento da dependência..... | 16 |
| IV. | GHB EM TOXICOLOGIA FORENSE | 18 |
| 4.1. | Importância da droga em toxicologia forense | 18 |
| 4.2. | Investigação toxicológica..... | 18 |
| 4.2.1. | Aspetos pré-analíticos na análise toxicológica <i>post mortem</i> | 19 |
| 4.2.1.1. | Recolha, envio e conservação de amostras | 19 |
| 4.2.1.2. | Importância da cadeia de custódia | 21 |
| 4.2.1.3. | Redistribuição <i>post mortem</i> | 22 |
| 4.2.1.4. | Estabilidade química e metabólica..... | 22 |
| 4.2.2. | Amostras biológicas empregues na análise de GHB | 23 |
| 4.2.2.1. | Sangue | 23 |
| 4.2.2.2. | Urina..... | 24 |

| | | |
|------------|---|----|
| 4.2.2.3. | Cabelo | 25 |
| 4.2.2.4. | Humor vítreo | 26 |
| 4.2.2.5. | Bílis | 26 |
| 4.2.2.6. | Fígado..... | 27 |
| 4.2.2.7. | Conteúdo gástrico..... | 28 |
| 2.2.2.8. | Suor..... | 28 |
| 2.2.2.9. | Saliva | 29 |
| 4.2.2.10. | Líquido cefalorraquidiano | 30 |
| 2.2.3. | Métodos de análise do GHB em amostras biológicas | 30 |
| 2.2.3.8. | Métodos de triagem..... | 31 |
| 2.2.3.8.1. | Ensaio colorimétricos e enzimáticos..... | 31 |
| 2.2.3.9. | Métodos de confirmação | 32 |
| 2.2.3.9.1. | Preparação da amostra..... | 32 |
| 2.2.3.9.2. | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS)..... | 33 |
| 2.2.3.9.3. | Cromatografia gasosa com detetor de ionização em chama (GC-FID) | 34 |

| | |
|--|----|
| 2.2.3.9.4.Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em série (LC-MS/MS)..... | 34 |
| 2.2.3.9.5.Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em série (UHPLC-MS/MS)..... | 35 |
| 2.2.4. Valores de <i>cut-off</i> | 36 |
| 3. ESTUDO DE CASOS FORENSES..... | 38 |
| 4. CONCLUSÃO | 41 |
| 5. BIBLIOGRAFIA | 43 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura química do GHB (à esquerda) e do GABA (à direita). | 3 |
| Figura 2. Estrutura química do GBL (à esquerda) e do 1,4-BD..... | 4 |
| Figura 3. Formação endógena do GHB..... | 7 |
| Figura 4. Metabolismo do GHB | 9 |
| Figura 5. Metabolismo do 1,4-BD | 10 |
| Figura 6. Metabolismo do GBL | 10 |
| Figura 7. Princípio do ensaio enzimático | 32 |

LISTA DE ABREVIATURAS

1,4-BD – 1,4-Butanodiol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*)

FDA – *Food and Drug Administration*

FID – Detetor de ionização em chama (do inglês *flame ionization detector*)

GABA – Ácido gama-aminobutírico (do inglês *gamma aminobutyric acid*)

GABAT – GABA transaminase (do inglês *gamma aminobutyric acid transaminase*)

GBL – Gama-butirolactona (do inglês *gamma-butyralactone*)

GC – Cromatografia gasosa (do inglês *gas chromatography*)

GC-FID – Cromatografia gasosa com detetor de ionização em chama (do inglês *gas chromatography-flame ionization detector*)

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

GHB – Ácido gama-hidroxitubúrico (do inglês *gamma-hydroxybutyrate*)

GHBDH – GHB desidrogenase (do inglês *gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase*)

GHBR – Recetor GHB (do inglês *GHB receptor*)

HS – Extração por *headspace*

LC – Cromatografia líquida (do inglês *liquid chromatography*)

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em série (do inglês *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*)

LLE – Extração líquido-líquido (do inglês *liquid-liquid extraction*)

MS – Espectrometria de massa (do inglês *mass spectrometry*)

NAD⁺– Dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*)

SA – Ácido succínico (do inglês *succinic acid*)

SNC– Sistema nervoso central

SPE – Extração em fase sólida (do inglês *solid-phase extraction*)

SSA – Semialdeído succínico (do inglês *succinic semialdehyde*)

SSADH – SSA desidrogenase (do inglês *succinic semialdehyde dehydrogenase*)

SSAR – SSA redutase (do inglês *succinic semialdehyde reductase*)

UHPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*)

UHPLC-MS/MS – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em série (do inglês *ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer*)

I. INTRODUÇÃO

O consumo de drogas ilícitas é um problema grave de saúde pública e de grande impacto na sociedade moderna. Entre estas drogas encontra-se o GHB que ganhou notoriedade como droga recreativa devido aos seus efeitos euforizantes semelhantes aos do etanol e, sobretudo, devido ao seu uso como droga facilitadora de agressões sexuais, sendo conhecido como droga pertencente ao grupo das “drogas da violação”. Além de ser consumido para fins recreativos e do seu uso criminal, o GHB foi ainda utilizado para diversas finalidades terapêuticas, entre as quais como anestésico geral, no tratamento do alcoolismo e da síndrome de abstinência alcoólica e opiácea (Kapoor *et al.*, 2013). Hoje em dia encontra-se aprovado, sob a designação de oxibato de sódio, para utilização no tratamento da narcolepsia com cataplexia (Busardo e Jones, 2015; Kapoor *et al.*, 2013).

O GHB tem a particularidade de ter origem exógena, mas também endógena, ocorrendo naturalmente no nosso organismo como metabolito do ácido gama-aminobutírico (GABA; neurotransmissor inibitório). É uma substância depressora do sistema nervoso central (SNC), tal como os seus precursores, nomeadamente a gama-butirolactona (GBL) e o 1,4-butanodiol (1,4-BD), embora estes apenas o sejam pela sua rápida conversão a GHB após entrada no organismo (Andresen-Streichert *et al.*, 2015; White, 2017).

Apesar do GHB estar classificado como sendo uma droga ilícita, os seus análogos GBL e 1,4-BD encontram-se disponíveis legalmente, pois são solventes industriais utilizados na produção de produtos de limpeza, pesticidas, fibras elásticas, plásticos, entre outros. Isto faz com que estes produtos sejam relativamente de fácil acesso e, por isso, utilizados para a produção do GHB (Gonzalez e Nutt, 2005).

Como consequência da sua rápida metabolização e eliminação, a deteção de GHB em fluídos biológicos torna-se complexa sendo praticamente indetetável no sangue após 4 horas do consumo e na urina após 12 horas. Assim, para se obter resultados positivos, é perentório que as amostras sejam recolhidas o mais rapidamente possível após o seu consumo. Além disso, foi necessário desenvolver e otimizar métodos analíticos sensíveis e precisos para a deteção e quantificação do GHB e dos seus metabolitos nas

amostras biológicas. Embora já tenha sido desenvolvido um teste de rastreio enzimático para o GHB na urina, as análises toxicológicas de rotina para drogas de abuso não incluem a sua análise, exceto se houver suspeita de uso em casos de agressões sexuais. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS) é a técnica mais utilizada hoje em dia na análise de GHB.

No âmbito da Toxicologia Forense, o GHB encontra-se envolvido em questões do foro judicial (por exemplo, em situações de *overdose* e violação). Está igualmente envolvido na alteração do comportamento humano (por exemplo, efeitos na condução rodoviária) e em situações de rastreio de drogas ilícitas (por exemplo, requisito para desempenhar determinadas atividades profissionais).

Este trabalho surge com o intuito de enfatizar a importância do GHB em contexto forense. Para o desenvolvimento do trabalho, foi realizada primeiramente uma revisão da literatura científica sobre as características principais do GHB e seus análogos, de modo a auxiliar a interpretação de dados em contexto forense, procedendo à descrição das formas de consumo, das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, dos fatores que afetam a sua concentração *post mortem*, da estabilidade química e metabólica, da utilização das várias matrizes biológicas e dos métodos analíticos disponíveis para a análise. Por último, serão apresentados alguns casos de estudo nesta temática.

II. MATERIAS E MÉTODOS

Foi efetuada uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados científicas PubMed, B-on, Future Science, e Science Direct, utilizando as seguintes palavras-chave: “gamma-hydroxybutyric acid”, “1,4-butanediol”, “gama-butyrolactona”, “pharmacodynamics”, “pharmacokinetics”, “abuse”, “forensic” e “toxicity”. Os critérios de inclusão basearam-se nas palavras-chave, artigos científicos em inglês e português. Foi ainda recolhida informação em livros didáticos e websites governamentais através do monitor de busca “Google”. A pesquisa foi contínua ao longo do desenvolvimento deste trabalho, tendo-se realizado deste outubro de 2016 a setembro de 2017.

III. GHB

3.1. Perspetiva histórica

O GHB foi sintetizado pela primeira vez na década de 1960 pelo investigador francês Henri Laborit com o objetivo de descobrir um análogo do GABA capaz de atravessar a barreira hematoencefálica para um possível uso no tratamento de convulsões (Couper e Marinetti, 2002; Oliveira *et al.*, 2015). Mais tarde, descobriu-se que o GHB é um composto natural presente no SNC, fluídos corporais e tecidos periféricos dos mamíferos e um precursor do neurotransmissor inibitório GABA. Dada a estrutura análoga do GHB ao GABA (Figura 1) e a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, foi hipotetizado que o mesmo poderia facilitar a síntese de GABA no cérebro. Embora se tenha concluído que o GHB não produzia uma quantidade elevada de GABA, foram descobertas algumas propriedades farmacológicas que o tornaram potencialmente útil como anestésico intravenoso. O GHB foi então usado clinicamente como anestésico, no entanto, o seu uso foi descontinuado devido à falta de propriedades analgésicas, efeito anestésico imprevisível, dificuldade de controlar a dose mais adequada e devido aos efeitos adversos provocados, como convulsões e coma (Andresen *et al.*, 2010; Bisardò e Jones, 2015; Couper e Marinetti, 2002; Kam e Yoong, 1998).

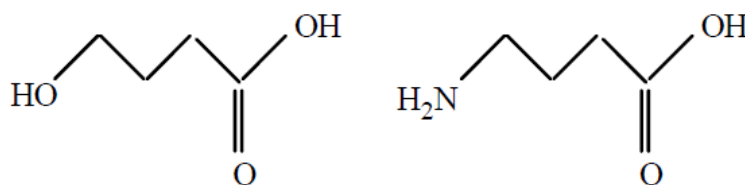


Figura 1. Estrutura química do GHB (à esquerda) e do GABA (à direita) (Fonte: Couper e Marinetti, 2002).

Em 1966, os análogos e precursores metabólicos GBL e 1,4-BD (Figura 2) foram também investigados de modo a averiguar as suas propriedades anestésicas (Couper e Marinetti, 2002).

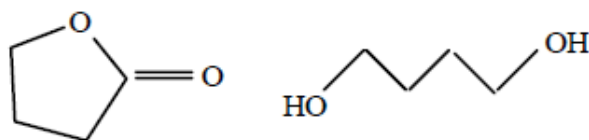


Figura 2. Estrutura química do GBL (à esquerda) e do 1,4-BD (à direita) (Fonte: Couper e Marinetti, 2002).

Na década de 1970, o GHB foi utilizado pela primeira vez no tratamento da insónia e da narcolepsia dado os seus efeitos hipnoindutores (Gallimberti *et al.*, 2000; Gonzalez e Nutt, 2005; Oliveira *et al.*, 2015).

Na década de 1980, o GHB popularizou-se como suplemento dietético anabolizante, devido à estimulação da hormona de crescimento que é responsável pelo aumento da massa muscular e redução da massa adiposa (Andresen *et al.*, 2010 e Oliveira *et al.*, 2015). O produto passou a poder ser comprado em lojas de alimentos saudáveis, sendo principalmente procurado por fisiculturistas.

Ao longo dos anos 1980-1990, o GHB também começou a ser popular em clubes gays pela sua capacidade de aumentar a libido (Busardò e Jones, 2015; Smith *et al.*, 2002).

Na década de 1990, em alguns países da Europa, o GHB foi aprovado para o tratamento da dependência alcoólica e de opiáceos (Caputo *et al.*, 2009; Gallimberti *et al.*, 2000).

O facto desta droga poder causar sedação e amnésia anterógrada levou a que o GHB fosse usado como droga facilitadora de agressões sexuais e, por isso, a *Food and Drug Administration* (FDA) em 1990 proibiu o seu uso sem receita médica (Kam e Yoong, 1998; Li *et al.*, 1998). Em 2002, a FDA aprova o uso de GHB sob a forma de oxibato de sódio para o tratamento da cataplexia em doentes com narcolepsia (Fuller e Hornfeldt, 2003).

Em 2009, foi realizada em Portugal uma avaliação para a introdução no mercado do oxibato de sódio (Xyrem®). No entanto, o INFARMED, não verificou a existência de vantagens económicas/custo-efetividade para esta substância, ficando impedida a aquisição do medicamento (INFARMED, 2009).

3.2. Prevalência e padrões de consumo

A representação da prevalência e dos padrões de consumo ilícito do GHB está sempre associado à credibilidade e representatividade das fontes de informação e dos dados disponíveis, dado que esta informação é obtida maioritariamente mediante entrevistas a consumidores. Por outro lado, qualquer documento referindo o consumo de GHB não permitirá, possivelmente, uma distinção relativa ao consumo deste ou dos seus precursores, já que o próprio consumidor não faz essa mesma distinção.

Em comparação com outras drogas, a informação disponível sobre o uso do GHB e dos seus precursores é bastante limitada. Existem poucos dados relativos quanto ao uso pela população em geral de GHB nos países europeus. No entanto, segundo o último relatório europeu sobre drogas, a prevalência do consumo tanto de GHB como dos seus precursores na Europa é baixo, apesar de em algumas subpopulações e áreas geográficas ser comumente utilizado, como por exemplo em clubes noturnos gays (EMCDDA, 2008; OEDT, 2017).

Em 2003, foi realizado o primeiro estudo sobre o consumo de GHB em ambiente escolar na União Europeia, tendo os resultados demonstrado que apenas 0,5 a 1,4% referiram ter tido contacto com a droga. Em ambientes de clubes de dança ou grupos específicos, as prevalências de consumo já apresentam resultados mais marcados, tendo-se obtido valores de 3 a 19%. Desta forma, ficou evidenciado um padrão de consumo específico associado ao GHB e seus análogos, sendo importante referir que nestes estudos não foi considerado o consumo com outros fins que não os recreativos (EMCDDA, 2008).

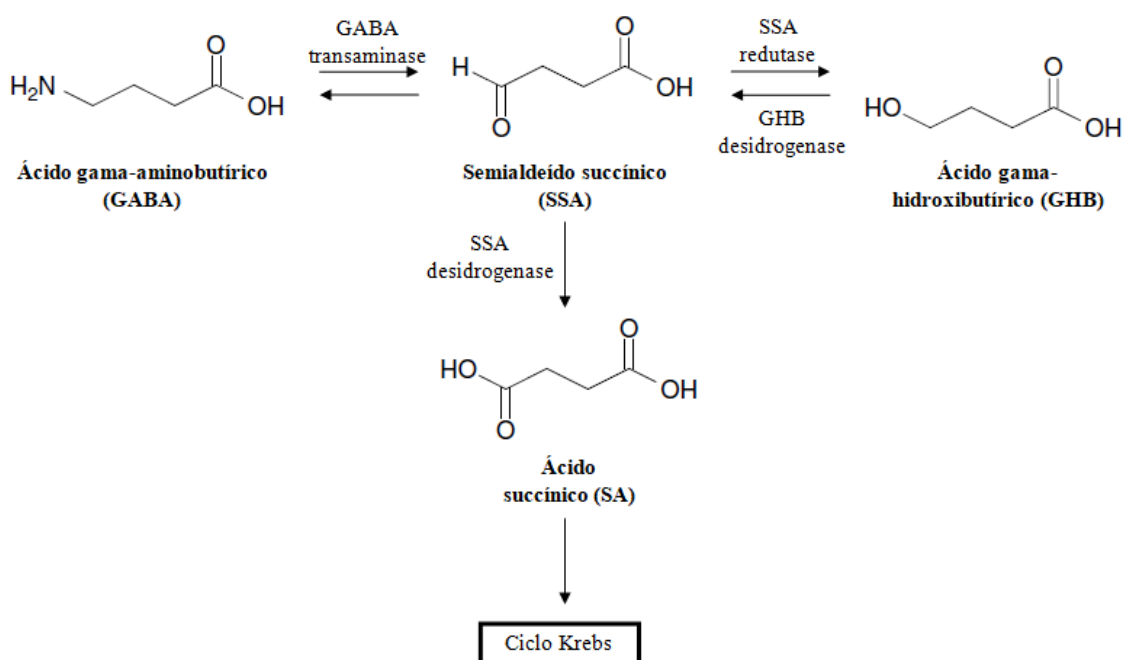
Em Portugal, as autoridades competentes, nomeadamente a Polícia Judiciária, não refere nos seus relatórios anuais relativos ao combate ao tráfico de estupefacientes qualquer apreensão de GHB desde 2000. Contudo, observando o contexto europeu, o cenário já é diferente. Desde 2004 existem registos de apreensões em diversos países europeus, tanto de GHB como de GBL e de 1,4-BD. No entanto, a partir de 2007, não há qualquer registo de apreensão de 1,4-BD, o que pode ser justificado pelo facto deste precursor, apesar de legal tal como o GBL, apresentar um processo mais complexo e moroso de transformação quando comparado com o GBL. Desta forma, não é de admirar que os

produtores clandestinos escolham a via mais fácil, rápida e económica de se obter o composto ilícito alvo (Hillebrand, *et al.*, 2008).

O GHB apresenta um baixo custo, quando comparado com outras drogas recreativas, sendo por isso utilizado por adolescentes em substituição às bebidas alcoólicas dada a semelhança dos efeitos causados, nomeadamente a desinibição e euforia (Busardò e Jones, 2015).

3.3. Produção endógena

O GHB é um componente endógeno presente no SNC, tecidos periféricos e fluidos corporais dos mamíferos nunca expostos à droga. Este apresenta-se como sendo tanto um metabolito como um precursor do neurotransmissor GABA (Andresen *et al.*, 2011; Busardò e Jones, 2015).



O GHB endógeno é formado a partir do GABA que, através da enzima GABA transaminase (GABAT), leva à formação do semialdeído succínico (SSA), o qual por sua vez origina o GHB através da ação da enzima semialdeído succínico redutase (SSAR). O GHB pode novamente ser oxidado em SSA através da enzima GHB desidrogenase (GHBDH). Após um novo passo de oxidação por meio da enzima semialdeído succínico desidrogenase (SSADH), o SSA pode dar origem ao ácido succínico (SA) que entra no ciclo do ácido cítrico (Figura 3) (Andresen *et al.*, 2011).

Figura 3. Formação endógena do GHB (adaptado de Andresen *et al.*, 2011).

Apesar da concentração do GHB no organismo se encontrar na ordem dos nanogramas, esta produção endógena pode tornar-se um problema aquando da interpretação de eventuais resultados analíticos. Por esta razão, é de grande importância estabelecer valores de *cut-off* que auxiliem na distinção entre valores endógenos e exógenos (Busardò e Kyriakou, 2014; Castro *et al.*, 2014).

3.4. Farmacocinética

3.4.1. Absorção

A dose de GHB, tipicamente, utilizada para fins recreativos varia entre 2 a 6 g, o que corresponde a um intervalo entre os 25 e 75 mg/Kg de peso corporal. Os efeitos sofridos após o uso recreativo de GHB variam, sobretudo, de acordo com a dose ingerida. É também importante referir que o GHB tem uma curva dose-resposta acentuada, com uma margem estreita entre os efeitos terapêuticos ou desejados e tóxicos (Ann-Sofie *et al.*, 2014).

O GHB é mais comumente utilizado na forma líquida e administrado por via oral. Também está disponível na forma de pó branco ou comprimido (Gonzalez e Nutt, 2005; Oliveira *et al.*, 2015). Apresenta-se ilicitamente com vários nomes de rua, entre os quais “ecstasy líquida”, “easy lay” (sexo fácil) e “fantasia” (Kapoor *et al.*, 2013). O GHB e os seus precursores não apresentaram sabor, cor e cheiro, o que facilita a adulteração de bebidas ou comida (Oliveira *et al.*, 2015).

O GHB é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, sendo o pico de concentração plasmática atingido em apenas 20-40 minutos após a ingestão (Busardò e Jones, 2015). Contudo, a sua absorção também é um processo de capacidade limitada, pois para doses elevadas verifica-se tempos mais longos até se atingir o pico máximo de concentração (Borgen *et al.*, 2003; Couper e Marinetti, 2002). A biodisponibilidade oral do GHB é relativamente baixa devido à extensa metabolização de primeira passagem a nível hepático. Também depende se a ingestão é feita com o estômago vazio ou depois de uma refeição, pois a ingestão concomitante de alimentos atrasa a absorção oral do GHB (Busardò e Jones, 2015; Schep *et al.*, 2012).

Tal como GHB, os seus precursores, 1,4-BD e GBL, são também rapidamente absorvidos e posteriormente metabolizados em GHB. O GBL é mais lipofílico que o GHB, sendo por isso mais rapidamente absorvido e apresenta maior duração de ação. A absorção do 1,4-BD é muito semelhante à do GHB, já que, tal como este, é um composto polar (Couper e Marinetti, 2002; Irwin, 1996; Thai *et al.*, 2007).

3.4.2. Distribuição

A distribuição do GHB nos fluídos biológicos e tecidos depende essencialmente da distribuição da água corporal total dado que a ligação da droga às proteínas plasmáticas é negligenciável (Busardò e Jones, 2015). A distribuição de GHB no organismo ocorre rapidamente e segue um modelo de dois compartimentos, apresentando um volume aparente de distribuição de 0,19 a 0,4 L/Kg (Andresen *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2015; Schep *et al.*, 2012). O volume de distribuição não é significativamente afetado pelo sexo, alimentos ou cirrose hepática (Borgen *et al.*, 2003; Ferrara *et al.*, 1996). O GHB é capaz de atravessar a placenta e a barreira hematoencefálica em humanos (Schep *et al.*, 2012).

3.4.3. Metabolismo

A biossíntese e o metabolismo do GHB encontram-se estritamente ligados ao metabolismo do GABA, sendo que o GHB pode ser considerado tanto um metabolito como um precursor do GABA (Busardò e Jones, 2015; M Brunt *et al.*, 2014).

Baixas concentrações de GHB são encontradas no cérebro, sendo estas resultantes da conversão do GABA em semialdeído succínico através da enzima GABA transaminase. Posteriormente, o semialdeído succínico é convertido em GHB através da enzima semialdeído succínico redutase (Brunt *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2004).

A maior parte da dose de GHB administrada é metabolizada a nível hepático, onde sofre o efeito de primeira passagem pelo citocromo P450. A principal via de metabolização é a oxidação catalisada por uma enzima citosólica dependente de NADP⁺, a GHB desidrogenase, originando o semialdeído succínico (Figura 4). A enzima GHB desidrogenase encontra-se presente em diversos tecidos, nomeadamente cérebro, fígado, rim, vesícula biliar, coração e testículos. Por sua vez, o semialdeído succínico é metabolizado através da enzima dependente do NAD⁺ designada semialdeído succínico

desidrogenase em ácido succínico, que entra no ciclo de Krebs formando dióxido de carbono e água. Por outro lado, o semialdeído succínico, pode também ser convertido em GABA através da enzima GABA transaminase (Busardò e Jones, 2015; Couper e Marinetti, 2002; Oliveira *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2004).

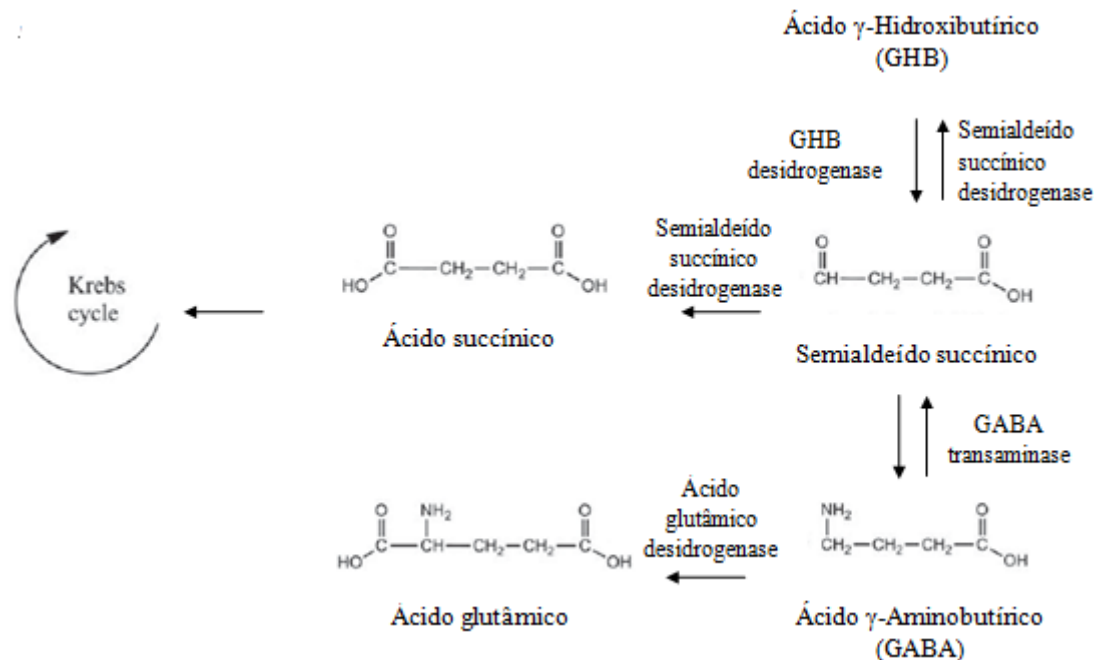


Figura 4. Metabolismo do GHB (adaptado de Schep *et al.*, 2012).

O 1,4-BD e o GBL são também metabolizados endogenamente em GHB. O metabolismo do 1,4-BD ocorre em dois passos, o que resulta num aumento do tempo necessário para atingir a concentração plasmática máxima e, conseqüentemente, o aparecimento dos seus efeitos. O 1,4-BD sofre oxidação através da enzima álcool desidrogenase levando à formação do gama-hidroxibutiraldeído que, por sua vez, origina o GHB através da enzima aldeído desidrogenase (Figura 5).

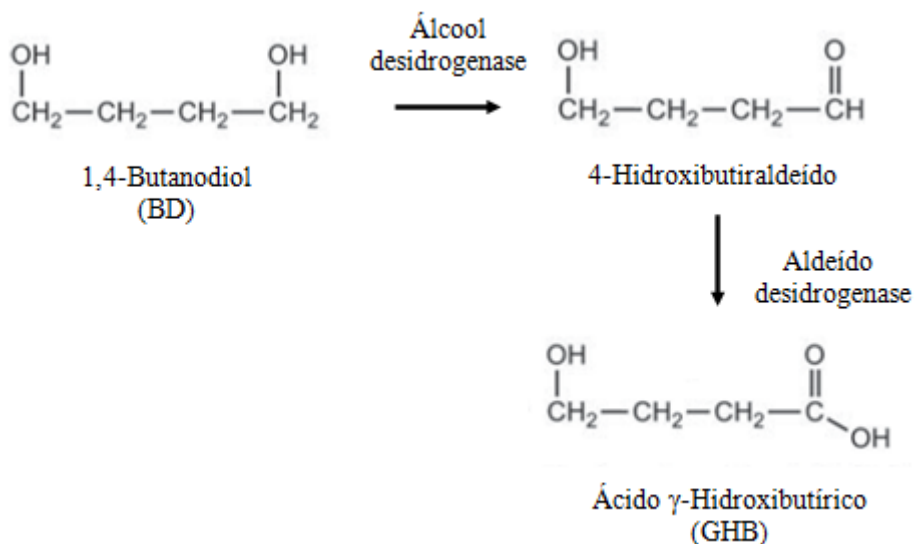


Figura 5. Metabolismo do 1,4-BD (adaptado de Schep *et al.*, 2012).

O GBL é também convertido em GHB, através de uma lactonase que se encontra presente no fígado e no soro, mas ausente no cérebro (Figura 6) (Busardò e Jones, 2015; Brunt *et al.*, 2014; Fuller e Hornfeldt, 2003).

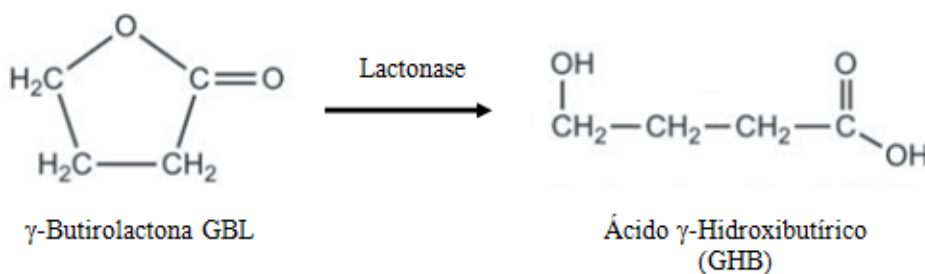


Figura 6. Metabolismo do GBL (adaptado de Schep *et al.*, 2012).

3.4.4. Eliminação

O GHB exógeno apresenta uma cinética de eliminação não linear, dose-dependente, provavelmente devido à saturação da reabsorção renal (Ferrara *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). É predominantemente eliminado pela urina após sofrer biotransformação e é praticamente indetetável nesta matriz 12 horas após o consumo (Brenneisen *et al.*, 2004; Schep *et al.*, 2012). Apenas uma pequena percentagem do GHB ingerido (< 2%) é excretado inalterado na urina (Abanades *et al.*, 2007).

Dada a sua rápida metabolização, o tempo de semi-vida do GHB é de 20-53 minutos e a maior parte da dose é eliminada 4-6 horas após ingestão (Ferrara *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 2015).

3.4.5. Interação GHB-etanol

A co-ingestão de GHB e etanol poderia levar a um aumento dos efeitos sedativos dado que as duas drogas são depressoras do SNC (Busardò e Jones, 2015). No entanto, verificou-se que não há interações farmacocinéticas significativas entre o GHB e o etanol. Contudo, a ingestão simultânea das duas drogas leva a um agravamento dos efeitos adversos, nos quais se inclui distúrbios gastrointestinais, hipotensão e diminuição da saturação de oxigénio (Thai *et al.*, 2006).

3.5. Farmacodinâmica

O GHB é um neurotransmissor presente predominantemente no cérebro dos mamíferos, embora também possa ser encontrado no sangue, urina e outros tecidos periférico (Andresen *et al.*, 2011). É também um metabolito e precursor do neurotransmissor inibitório GABA, sendo considerado uma substância depressora do SNC, bem como os seus precursores. Este composto é capaz de afetar os sistemas neurotransmissores endógenos, nomeadamente da dopamina, da serotonina e da acetilcolina (Oliveira *et al.*, 2015; Ricaurte e McCann, 2005; Schep *et al.*, 2012).

O GHB apresenta um perfil farmacológico duplo, conforme se trata de GHB de origem exógena ou endógena (Gervasi *et al.*, 2003). O GHB endógeno é sintetizado a partir do glutamato, presente dentro dos neurónios de libertação de GABA que se localizam predominantemente no hipocampo, córtex e amígdala (Schep *et al.*, 2012). A atividade endógena do GHB é mediada pelo recetor do GHB (GHBR) presente em abundância no hipocampo e córtex (Crunelli *et al.*, 2006; Snead, 2000). O GHB atua principalmente sobre os recetores acoplados à proteína G (Andriamampandry *et al.*, 2007; Snead, 2000). Por outro lado, a atividade do GHB exógeno (presente em doses supra-fisiológicas, como em casos de sobredosagem) é mediada pela atividade intrínseca no recetor GABA_B (Couper e Marinetti, 2002; Crunelli *et al.*, 2006; Snead, 2000). É principalmente através deste recetor que o GHB exerce os seus efeitos farmacológicos, clínicos, comportamentais e toxicológicos (Wong *et al.*, 2004).

Em doses suprafisiológicas, o GHB é responsável por provocar uma excitação dos neurónios dopaminérgicos centrais, levando a níveis elevados de dopamina. Por outro lado, o GHB também é capaz de bloquear o fluxo de dopamina nos neurónios dopaminérgicos centrais, o que resulta num aumento dos níveis de dopamina nas terminações nervosas (Couper e Marinetti, 2002; Uys *et al.*, 2005).

Em doses farmacológicas, o GHB induz o aumento da concentração de serotonina. Este aumento deve-se ao facto do GHB aumentar a concentração e biodisponibilidade do triptofano que é o precursor da serotonina (Uys *et al.*, 2005).

A cessação ou a diminuição do uso de GHB resulta numa desinibição dos neurotransmissores excitatórios, nomeadamente o glutamato, noradrenalina e dopamina, o que leva ao aparecimento de sintomas associados à síndrome de abstinência (Rodgers *et al.*, 2004).

O GBL e 1,4-BD podem ser classificados como pró-fármacos dada a sua rápida metabolização no organismo em GHB após a sua administração (Goodwin *et al.*, 2009). Os efeitos toxicológicos e comportamentais do GBL e do 1,4-BD são resultado da rápida conversão em GHB, sendo que não há uma diferença significativa entre os efeitos clínicos do GHB e dos seus análogos (Control *et al.*, 1999; Ingels *et al.*, 2000; Palmer, 2004; Wood *et al.*, 2008).

3.6. Toxicidade

Os sintomas de uma intoxicação por GHB dependem da dose administrada, da via de administração e da tolerância de cada indivíduo a fármacos depressores. Por outro lado, os sintomas de uma intoxicação por GHB não são específicos e podem ser confundidos com os sintomas de uma intoxicação por etanol ou outras drogas com características sedativas e hipnóticas como, por exemplo, os barbitúricos e benzodiazepinas (Busardò e Jones, 2015).

Os efeitos clínicos tornam-se aparentes cerca de 15-50 minutos após a ingestão e resolvem-se em relativamente pouco tempo, geralmente havendo uma recuperação da consciência ao fim de 4 a 8 horas (Busardò e Jones, 2015; Schep *et al.*, 2012).

A ingestão de doses de GHB abaixo de 10 mg/Kg desencadeiam efeitos clínicos leves, tais como amnésia anterógrada a curto prazo, hipotonia e euforia. Doses entre 20-30

mg/Kg são responsáveis por provocar sonolência e mioclonia, enquanto que doses superiores a 50 mg/Kg podem levar ao aparecimento de efeitos clínicos mais graves como coma, bradicardia e/ou depressão respiratória (Couper e Marinetti, 2002; Schep *et al.*, 2012).

Os efeitos neurológicos mais frequentemente observados numa intoxicação por GHB incluem ataxia, desorientação, tonturas, confusão, alucinações, sonolência, fala arrastada, disartria, dor de cabeça, incoordenação, euforia, amnésia, hipotonia, hiporreflexia, tremor e mioclonia (Andresen *et al.*, 2011; Brunt *et al.*, 2014; Schep *et al.*, 2012).

Em alguns pacientes têm-se observado sintomas como agitação, comportamento bizarro e agressividade. Os pacientes também podem alternar entre agitação e sonolência.

Outros efeitos neurológicos menos comuns incluem bruxismo, vertigens, desinibição, aumento da excitação sexual, delírios, efeitos colaterais extrapiramidais, distonia, miose, nistagmo horizontal e vertical e pupilas lentas ou não reativas (Schep *et al.*, 2012).

As convulsões também são um dos sintomas reportados, contudo, a maioria dos estudos mostram que as convulsões são incomuns.

Os efeitos cardiovasculares mais comuns são a bradicardia e a hipotensão (Brunt *et al.*, 2014; Schep *et al.*, 2012). A bradicardia leve sem compromisso hemodinâmico é o efeito cardiovascular mais comum quando usado para fins anestésicos ou recreativo. Muito raramente é desenvolvida bradicardia severa o suficiente que requeira o uso de atropina. A hipotensão é rara quando o GHB é ingerido sozinho, contudo é relatado mais frequentemente em situações de co-ingestão de outras drogas. Reciprocamente, sintomas como taquicardia e hipertensão também são reportados. Aperto no peito e palpitações também podem ocorrer.

Os principais efeitos respiratórios incluem depressão respiratória, bradipneia, respiração de Cheyne-Stokes, apneia, insuficiência respiratória, taquipneia, pneumotórax e cianose. O edema pulmonar também é reportado durante intoxicações e é uma observação comum na autópsia (Oliveira *et al.*, 2015; Schep *et al.*, 2012; White, 2016).

São também observados distúrbios metabólicos tais como hiperglicemia, hipocalemia e potencialmente hipernatremia quando ingeridas grandes quantidades do sal sódico. Pode também ser observado um aumento da atividade da creatina cinase originando rabdomiólise (Schep *et al.*, 2012).

Os sintomas gastrointestinais mais frequentemente observados são náuseas e vômitos. Outros sintomas, tais como a salivação, dor abdominal, incontinência de fezes e urina e diaforese, também podem ocorrer.

A hipotermia também é um dos sintomas observados, contudo, normalmente não é grave.

A maioria dos doentes intoxicados por GHB recuperam sem qualquer sequela desde que recebam os cuidados de suporte adequados. No entanto, também já foram documentados casos fatais, sendo a morte geralmente resultado de insuficiência respiratória.

O co-consumo do GHB com outras drogas depressoras do SNC é responsável pelo aumento da toxicidade, devido ao efeito sinérgico depressor do SNC, e também pelo aumento do número de casos fatais (Busardó e Jones, 2015; Oliveira *et al.*, 2015; Schep *et al.*, 2012).

3.7. Síndrome de abstinência

O uso regular e contínuo do GHB e dos seus análogos leva ao desenvolvimento de dependência e tolerância (Brunt *et al.*, 2014; Schep *et al.*, 2012). Após o uso continuado de doses crescentes, a cessação do GHB pode levar ao desenvolvimento de um síndrome de abstinência que tende a aparecer ao fim de 24 horas após a última toma e pode durar entre 3 e 21 dias (McDonough *et al.*, 2004; Schep *et al.*, 2012).

Os sintomas mais comumente observados na síndrome de abstinência do GHB são ansiedade, insónias, tremor, taquicardia, confusão, paranóia, agitação, delírios e alucinações visuais e auditivas (Brunt *et al.*, 2014; Busardó e Jones, 2015). Outras manifestações clínicas frequentemente descritas são desorientação e hipertensão. Estão ainda descritos outros sintomas menos frequentes como hipertermia, fadiga, diaforese, arritmias, prurido, depressão, miose, nistagmo, palpitações cardíacas, dispneia, náuseas,

vômitos, diarreia e dor abdominal (Busardò e Jones, 2015; McDonough *et al.*, 2004; Schep *et al.*, 2012).

Após a desintoxicação, alguns doentes continuam a sofrer de ansiedade contínua, depressão, défice cognitivo e insónias persistentes (Busardò e Jones, 2015).

3.8. Tratamento da intoxicação aguda

A estratégia usada no tratamento de doentes que se apresentam nas urgências hospitalares com uma intoxicação por GHB, GBL ou 1,4-BD passa essencialmente por medidas gerais de suporte e monitorização dos sinais vitais (Busardó e Jones, 2015; White, 2016). Isto inclui garantir o acesso intravenoso, acompanhamento cardíaco e da pressão arterial juntamente com a oximetria de pulso e monitorização dos gases sanguíneos arteriais. Deve-se prestar especial atenção aos sintomas cardiovasculares e respiratórios. Os sintomas cardiovasculares resultantes de uma *overdose* por GHB normalmente não requerem intervenção farmacológica; no entanto, em situações de bradicardia pode ser necessário a administração de atropina. Em casos de hipotensão leve, são administrados fluidos endovenosos e apenas quando não há resposta a esta terapia é que se recorre à administração de agentes vasopressores e/ou com propriedades inotrópicas (Busardò e Jones, 2015; Li *et al.*, 1998; Schep *et al.*, 2012).

A proteção das vias aéreas com entubação endotraqueal e/ou ventilação assistida é também um procedimento recorrente e importante em indivíduos intoxicados que se encontram inconsciente de maneira a prevenir o risco de aspiração pulmonar durante o vômito. Este procedimento é igualmente importante em situação de hipercapnia ou hipoxia (Schep *et al.*, 2012; Wood *et al.*, 2011).

No caso de intoxicados que apresentem convulsões, a oxigenação e ventilação adequada é normalmente suficiente, porém, no caso das convulsões persistirem pode ser necessário a administração de uma benzodiazepina, nomeadamente, lorazepam ou diazepam (Schep *et al.*, 2012).

Não há nenhum antídoto específico capaz de reverter os sintomas agudos causados pelo GHB e seus análogos (Schep *et al.*, 2012; Wood *et al.*, 2011). A naloxona (antagonista dos recetores opióides) apresenta um efeito limitado na reversão dos efeitos sedativos do GHB, e por isso o seu uso não está recomendado (Schep *et al.*, 2012; Busardò e

Jones, 2015). O flumazenil, que é um antagonista seletivo dos recetores das benzodiazepinas, demonstrou ter efeito na redução da libertação da hormona de crescimento induzida pelo GHB, contudo o seu uso também não está indicado (Schep *et al.*, 2012). Apesar destes dois compostos se mostrarem ineficazes na alteração do curso clínico de uma sobredosagem por GHB, a naloxona e o flumazenil podem ser úteis na reversão dos efeitos provocados pela co-ingestão de GHB com benzodiazepinas ou opióides que complicam o quadro clínico (White, 2016). Outro potencial antídoto é a fisostigmina; no entanto, o seu mecanismo não está bem esclarecido e por isso o seu uso não é recomendado (Caravati *et al.*, 2004; Schep *et al.*, 2012).

3.9. Tratamento da dependência

Os sinais e sintomas observados no síndrome de abstinência variam de pessoa para pessoa, do tempo de exposição à droga, da frequência do uso e da dose diária (Busardò e Jones, 2015; McDonough *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2011). A interrupção abrupta da toma continuada de GHB representa uma emergência médica e requer uma intervenção de especialistas.

Não existe um protocolo definido para o tratamento da dependência do GHB e/ou dos seus análogos. No entanto, estão descritas algumas diretrizes gerais. Foi também proposto um algoritmo para o tratamento de indivíduos intoxicados. Este algoritmo depende da frequência do consumo de GHB ou da dose diária administrada (Busardò e Jones, 2015; McDonough *et al.*, 2004).

As benzodiazepinas, como por exemplo o diazepam e lorazepam, são o grupo terapêutico mais frequentemente utilizado para o tratamento da síndrome de abstinência do GHB. A duração do tratamento pode variar entre 1 a 7 dias dependendo da severidade da síndrome de abstinência (Busardò e Jones, 2015; Wood *et al.*, 2011). De acordo com o algoritmo proposto por McDonough *et al.*, em casos menos graves, isto é, quando a frequência de administração é inferior a três vezes por dia ou quando a dose diária é inferior a 30 g, o tratamento passa pela administração de doses baixas de diazepam. Em casos mais graves, isto é, quando há um uso bastante frequente e/ou são usadas doses altas, é recomendado o internamento hospitalar, sendo usadas doses mais elevadas de diazepam para o tratamento (McDonough *et al.*, 2004).

Também já foram reportados casos em que o tratamento anteriormente descrito é ineficaz e por isso são usados outros agentes terapêuticos em combinação com as benzodiazepinas ou até mesmo a sua substituição. Nestes casos, a terapêutica passa pela utilização de anticonvulsivantes como os barbitúricos, de um agonista do recetor GABA_B como o baclofeno, ou até mesmo de um antipsicótico como a olanzapina (Busardò e Jones, 2015; White, 2017; Wood *et al.*, 2011).

IV. GHB EM TOXICOLOGIA FORENSE

4.1. Importância da droga em toxicologia forense

A Toxicologia Forense é uma ciência multidisciplinar, com características essencialmente analíticas que procura esclarecer questões do âmbito judicial. É uma ciência que se encontra ao serviço da aplicação da justiça em situações de crime, acidente, infração e intenção. Apresenta um vasto campo de ação envolvendo áreas relacionadas com o indivíduo vivo ou vitimado, tais como ocupacional, ambiental, saúde pública e regulamentar (Oliveira *et al.*, 2015).

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

O GHB encontra-se envolvido em questões do foro judicial (por exemplo, em situações de *overdose* e violação), alteração do comportamento humano (por exemplo, efeitos na condução rodoviária) e em situações de rastreio de drogas ilícitas (por exemplo, requisitos para desempenhar determinadas atividades profissionais).

4.2. Investigação toxicológica

A investigação toxicológica consiste num conjunto de processos analíticos que tem como principal objetivo o reconhecimento, identificação e quantificação de substâncias exógenas ao organismo. Esta investigação é realizada em matrizes biológicas recolhidas ao indivíduo vivo ou *post mortem*, tendo como principal objetivo o esclarecimento de questões judiciais relacionadas com a presença ou não de dadas substâncias ou elucidar sobre a causa de morte (Bordin *et al.*, 2015; Flanagan *et al.*, 2008).

A investigação toxicológica de uma intoxicação fatal apresenta três etapas fundamentais, a fase pré-analítica, fase analítica propriamente dita e a fase pós-analítica. Na fase pré-analítica é importante o conhecimento da história completa (como, por exemplo, o local do crime, dados do período *peri mortem*, achados autópticos, história social e médica da vítima, tratamento ministrado antes da morte, tempo decorrido entre a morte e a descoberta do cadáver), seguindo-se a colheita das amostras mais adequadas. A fase analítica consiste na análise toxicológica para a identificação qualitativa e quantitativa do(s) agente(s) tóxico(s). A última fase tem como objetivo a

interpretação e discussão das análises e o diagnóstico (Cooper e Negrusz, 2013; Dinis-Oliveira *et al.*, 2012; Flanagan *et al.*, 2008; Klaassen e Watkins, 2001).

A detecção do xenobiótico em casos *post mortem* pode ser dificultada devido a vários fatores tais como a estabilidade da droga nos tecidos, a extensão das alterações químicas e o metabolismo *post mortem*. Todos estes fatores podem afetar significativamente a interpretação dos resultados obtidos (Drummer, 2004).

4.2.1. Aspectos pré-analíticos na análise toxicológica *post mortem*

Os aspetos pré-analíticos são de grande importância pois garantem a qualidade e fiabilidade dos resultados analíticos, uma vez que permitem a recolha de amostras de qualidade. A fase pré-analítica inclui a requisição, a colheita das amostras biológicas, o armazenamento, o transporte e a preparação das mesmas (Bordin *et al.*, 2015; Skopp, 2004).

Durante todos estes processos é importante ter em consideração todas as variações pré-analíticas que podem ocorrer, podendo estas serem classificadas em fatores *in vivo* e/ou fatores *in vitro*. Os fatores *in vivo* são diferenciados em fatores não-variáveis, como por exemplo a idade, sexo, raça e predisposição genética, fatores variáveis onde se enquadram fatores como o polimorfismo enzimático, peso corporal, nutrição e tratamentos terapêuticos, por fim, fatores fisiológicos que se referem ao ritmo circadiano. Dentro dos fatores *in vitro* incluem-se os fatores relativos à composição, processamento e armazenamento da amostra (Skopp, 2004). A concentração de xenobiótico entre o momento da morte e a autópsia pode também ser alterada devido aos processos autolíticos e de putrefação, podendo desta forma condicionar a escolha de certas amostras (Nelson *et al.*, 2011).

4.2.1.1. Recolha, envio e conservação de amostras

A seleção, recolha, envio e conservação da amostra são etapas de extrema importância numa análise toxicológica e que exigem alguns cuidados para uma correta interpretação dos resultados obtidos. Desta forma, durante o processo de seleção da amostra é fundamental ter em atenção alguns fatores, tais como a natureza do(s) xenobiótico(s), a sua estabilidade e possível biotransformação, tipo e quantidade de amostras necessárias, assim como o uso necessário ou não de preservante nas amostras, possíveis

interferências, putrefação, entre outros (Cooper e Negrusz, 2013; Klaassen e Watkins, 2001).

A seleção das amostras colhidas é muitas vezes ditada pelo caso a ser investigado, aspetos legais e disponibilidade de amostras, contudo as amostras mais comumente recolhidas para a análise de drogas de abuso em casos *post mortem* são o sangue periférico, urina, bÍlis, líquido cefalorraquidiano, humor vítreo, conteúdo gástrico e tecidos de órgãos como o fígado. Amostras como cabelo, humor vítreo, cérebro, musculo, tecido adiposo e osso são apenas requeridas em situações mais específicas. Amostras como cabelo e unhas são importantes na investigação toxicológica quando se pretende diferenciar uma exposição recente de um uso crónico do xenobiótico. Em casos de cadáveres em estado avançado de putrefação, podem ser importantes amostras como tecido muscular, cabelo e osso (Drummer, 2004; Skopp, 2004).

A colheita de amostras de fluidos e tecidos deve ser realizada o mais cedo possível, para assim diminuir a possibilidade de interferências relacionadas com o processo de putrefação. Por outro lado, o GHB é rapidamente metabolizado e excretado e por isso a sua deteção em amostras biológicas é dificultada passadas 6 a 12 horas da sua administração (Busardò e Kyriakou, 2014).

As amostras devem ser recolhidas separadamente para frascos limpos de forma a evitar possíveis contaminações. Os fracos devem ter um tamanho adequado ao volume da amostra de modo a diminuir o espaço livre e assim evitar as perdas por volatilização e oxidação dos xenobióticos. Cada amostra deve ser rotulada adequadamente, incluindo o número do caso institucional, nome do falecido, data da colheita e o tipo de amostra, o local anatómico de onde foi recolhida e a rubrica do perito (Skopp, 2004).

As condições de armazenamento das amostras podem variar de acordo com o analito em questão; no entanto, as amostras armazenadas a curto prazo são mantidas a uma temperatura de 4 °C, com a exceção de amostras como cabelo, unhas e sangue seco que são armazenadas à temperatura ambiente. Qualquer amostra residual deve ser mantida a uma temperatura de -20 °C até que a investigação esteja concluída (Flanagan *et al.*, 2008). No caso do GHB, verificou-se um aumento da sua concentração em amostras de sangue e urina, durante o período de armazenamento, sendo por isso recomendado

manter estas amostras a uma temperatura de -20 °C (Ann-Sofie *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2014; Fjeld *et al.*, 2012).

Alguns dos mecanismos de degradação que ocorrem durante o processo de armazenamento são similares aos que ocorrem durante a autólise e a putrefação. A diminuição da temperatura de armazenamento e a adição de um preservante às amostras permitem minimizar a ocorrência de reações de hidrólise, oxidação e redução, que são responsáveis pela degradação do analito. Este processo ocorre devido à presença de enzimas endógenas como esterases, glucuronidasas ou invasão bacteriana, ocorrendo durante o intervalo *post mortem* (Skopp, 2004).

No caso do GHB, para além do abaixamento da temperatura até aos -20°C, o uso de um preservante em amostras de sangue *post mortem*, permitem uma maior estabilidade do GHB ao longo do tempo. Dentro dos preservantes existentes, o azida sódica, o fluoreto de sódio e o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) são os que mostram melhores resultados. O citrato de sódio deve ser evitado, uma vez que leva a um aumento da concentração de GHB em amostras de sangue *post mortem*. Em amostras *ante mortem*, vários estudos demonstram que o GHB é estável em diferentes condições de armazenamento (Castro *et al.*, 2014; Fjeld *et al.*, 2012).

4.2.1.2. Importância da cadeia de custódia

A cadeia de custódia consiste numa série de procedimentos que tem como objetivo manter e verificar a adequada integridade das amostras que se destinam a exames periciais, de forma a assegurar a inviolabilidade e identidade das amostras. Durante a recolha, todas as amostras devem ser identificadas com o número do caso ou o número do pedido, identificação da vítima, data e hora da recolha da amostra, identificação do perito que realizou a recolha, descrição da amostra, quem fez o transporte para o laboratório e a confirmação da entrega. No laboratório, todas as amostras são confirmadas com base na requisição que as acompanha, verificando-se o número de cada amostra e o cumprimento das recomendações das condições de colheita e transporte (Flanagan *et al.*, 2005; Karch, 1998).

4.2.1.3. Redistribuição *post mortem*

O processo de redistribuição *post mortem* consiste na difusão dos tóxicos após a morte a favor do gradiente de concentração, levando a uma variação da concentração do tóxico. Isto acontece devido a vários fatores, como a morte e lise celular, putrefação, propriedades inerentes às próprias substâncias, posição e movimento do corpo após a morte e difusão dos compostos. O processo de difusão dos compostos inclui a passagem dos compostos para o sangue a partir de órgãos sólidos, como o pulmão, fígado e o coração e a difusão passiva do conteúdo estomacal para os órgãos vizinhos. Deste modo, o processo de redistribuição *post mortem* afeta significativamente a interpretação dos resultados analíticos, pois a concentração de tóxico analisada pode não corresponder à concentração exata na altura da morte. Este processo é altamente significativo em tóxicos que apresentam uma elevada lipofilia e/ou um elevado volume de distribuição (Cooper e Negrusz, 2013; Drummer, 2004). Contudo, verifica-se que a redistribuição *post mortem* do GHB não é altamente significativa, dado que a concentração de GHB no sangue cardíaco não é muito diferente da encontrada no sangue femoral (Kintz *et al.*, 2005).

4.2.1.4. Estabilidade química e metabólica

O processo de transformação *post mortem* do GHB leva a consequências analíticas e forenses relevantes, havendo por isso a necessidade de realizar estudos para perceber quais os fatores que influenciam este processo, de modo a interrompê-lo ou pelo menos minimizá-lo (Fjeld *et al.*, 2012). A síntese de GHB *post mortem* é um fator importante que deve ser levado em conta na altura de interpretar os resultados analíticos, de forma a diferencial uma possível ingestão de GHB *ante mortem* de uma formação endógena *post mortem*. Esta produção endógena pode ser devida aos processos habituais de autólise celular e ação microbiana. A autólise celular é responsável pela formação de GABA, ácido succínico e putrescina. Por sua vez, o GABA como é um produto intermediário do GHB leva a um aumento da concentração deste nas amostras biológicas. No caso da ação microbiana, as bactérias são responsáveis por metabolizar a glicose a ácido succínico que entra na via de produção do GHB (Castro *et al.*, 2014; Couper e Marinetti, 2002). Em amostras de sangue *post mortem*, também se verifica que as condições de armazenamento e a substância preservante são capazes de influenciar as concentrações de GHB (Busardò *et al.*, 2017b; Fjeld *et al.*, 2012). Foram também

realizados estudos para avaliar a estabilidade do GHB em amostras *ante mortem* de sangue total ou plasma, tendo-se verificado que o GHB se mantém estável em diferentes condições de armazenamento. O mesmo não acontece com as amostras de urina onde se verifica um ligeiro aumento da concentração de GHB (Andresen *et al.*, 2010; LeBeau *et al.*, 2007).

4.2.2. Amostras biológicas empregues na análise de GHB

O processo de seleção e recolha de amostras é de extrema importância para assim se garantir resultados fidedignos e precisos durante a interpretação dos resultados. Na maior parte dos casos existe uma grande variedade de amostras, sendo por isso necessário a utilização de critérios de seleção (Drummer, 2004; Skopp, 2004). No caso do GHB, as amostras preferencialmente recolhidas na análise *post mortem* são o sangue, urina, cabelo e o humor vítreo. Outras amostras como a bÍlis, fÍgado, conteúdo gástrico, suor, saliva e o líquido cefalorraquidiano podem em alguns casos serem também recolhidas, contudo não apresentam grande interesse do ponto de vista analítico, dada a falta de estudos que suportem a utilização destas amostras para a pesquisa de GHB.

4.2.2.1. Sangue

O sangue é a matriz biológica mais comumente utilizada nas análises toxicológicas forenses, pois fornece de forma apropriada a correlação da concentração do tóxico no sangue com o estado clínico do indivíduo. Por outro lado, a relação tóxico/metabolito pode ser bastante útil para a determinação do período decorrido desde a administração. Preferencialmente é recolhido sangue periférico através da veia femoral de forma a diminuir o risco de contaminação. Outra possibilidade é a recolha de sangue cardíaco. No entanto, em condições de elevada putrefação ou de trauma apresenta um maior risco de contaminação e é mais facilmente afetado pela redistribuição *post mortem* por se localizar numa região central e próximo de órgãos com capacidade de acumular elevadas quantidades de compostos (Drummer, 2004; Skopp, 2004).

Em testes de rastreio recomenda-se o uso de uma amostra de sangue cardíaco, contudo para uma posterior confirmação de um resultado positivo, é necessária uma análise simultânea em amostras de sangue femoral e humor vítreo para que se possa diferenciar uma possível formação *post mortem* de uma exposição exógena de GHB (Kintz *et al.*, 2004).

Na recolha de sangue é necessário a adição de um preservante sendo que este é escolhido mediante o tóxico a analisar. No caso específico do GHB, é normalmente usado o fluoreto de sódio como preservante. Dependendo do tóxico a analisar também se pode optar pela análise do sangue total, plasma ou soro. Quando o objetivo é a quantificação de drogas é mais indicado a utilização de sangue total, pois as drogas apresentam diferentes afinidades por proteínas podendo por isso serem descartadas quando se utiliza uma amostra de plasma ou de soro (Bordin *et al.*, 2015; Couper e Marinetti, 2002).

A ausência do tóxico na amostra de sangue não exclui a possibilidade de intoxicação, pois o GHB apresenta um tempo de semi-vida curto sendo rapidamente eliminado do sangue. Nestes casos, é sempre necessário confirmar o resultado, através da análise em amostras de urina e/ou cabelo (Busardò, 2016; Kankaapää *et al.*, 2017; Kintz *et al.*, 2004).

4.2.2.2. Urina

A urina é uma matriz biológica habitual em análises de toxicologia forense pois permite a identificação de compostos tóxicos, bem como dos seus metabolitos. É bastante útil para orientar a pesquisa no sangue e por isso é utilizada rotineiramente no *screening* de agentes tóxicos (Cooper e Negrusz, 2013).

Os compostos tóxicos e seus metabolitos são, geralmente, encontrados em concentrações elevadas na urina, sendo que a excreção urinária dos metabolitos é mais rápida e extensa que a dos tóxicos originais. Estes compostos encontram-se presentes na urina por um período de 2 a 5 dias após o consumo, indicando um uso recente da droga (Bordin *et al.*, 2015).

Quando a morte ocorre rapidamente, o resultado da pesquisa pode ser negativo. Além disso, não é possível correlacionar a concentração da droga na urina com os efeitos farmacológicos e tóxicos. Desta forma, a deteção da droga na urina é apenas indicativo de que a droga estava presente no organismo algum tempo antes da morte sendo sempre necessário a confirmação através de outra amostra (Nelson *et al.*, 2011; Skopp, 2004).

A urina, sempre que possível, é uma das amostras rotineiramente coletadas para a pesquisa tanto do GHB como dos seus metabolitos, uma vez que, esta amostra apresenta

uma grande janela de detecção quando comparada com outras amostras, nomeadamente o sangue (Kankaapäa *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2011).

4.2.2.3. Cabelo

O cabelo é uma amostra que permite obter informação retrospectiva da exposição a uma droga uma vez que retêm estes compostos durante longos períodos de tempo.

Esta matriz fornece inúmeras vantagens como a facilidade de amostragem, não requerer cuidados de transporte e armazenamento, é de difícil adulteração e permite distinguir um uso esporádico da droga de um uso crónico. Outra vantagem desta matriz face às amostras de sangue e urina é a grande janela de detecção que pode ir desde 3 dias a meses ou mesmo anos após o consumo (Bulcão *et al.*, 2012). No caso do GHB, esta vantagem é uma mais-valia, dado que o GHB é rapidamente eliminado do sangue e da urina (Castro *et al.*, 2014). A possibilidade de utilização desta matriz mesmo em cadáveres em estado avançado de decomposição constitui outra vantagem do uso deste tipo de matriz em estudos *post mortem* (Flanagan *et al.*, 2005).

Para análise toxicológica *post mortem* é cortada uma madeixa de cabelo, o mais próximo possível ao couro cabeludo, na região do vértice posterior da cabeça, pois é onde se verifica uma menor variabilidade no crescimento capilar (LeBeau *et al.*, 2011).

O cabelo é uma das amostras bastante utilizada para pesquisa de GHB, especialmente, nos casos em que se pretende comprovar o uso crónico da droga e suspeita de abuso sexual. Para tal, é feita uma análise segmentar comparando as concentrações de GHB detetadas nos segmentos proximais ao bulbo capilar com os segmentos mais distais de forma a avaliar os níveis basais e assim provar se houve ou não uma exposição exógena. A deteção de uma única exposição ao GHB é importante para confirmar casos em que há suspeita do uso da droga como facilitadora de agressões sexuais. É importante ter em consideração que é necessário algum tempo para a migração do GHB ao longo do eixo do cabelo recomendando-se um intervalo de três semanas entre o consumo e a recolha da amostra (Castro *et al.*, 2014; Busardò, 2016).

A quantidade de tóxico depositada no cabelo varia em função do tipo de exposição e da atividade metabólica. Outros fatores como a cultura, a etnia e cuidados capilares também influenciam a concentração de droga no cabelo (Skopp, 2004). Estudos

realizaram mostraram que o GHB é detetado em amostras de cabelo mesmo quando presente em concentrações endógenas (Busardó e Kyriakou, 2015; Bertol *et al.*, 2012). A análise dos segmentos de cabelo pode definir o histórico de uso da droga. A diminuição da concentração de droga nas secções proximais do cabelo pode indicar uma situação de abstinência ou de diminuição do seu consumo (Skopp, 2004).

4.2.2.4. Humor vítreo

O humor vítreo é o líquido gelatinoso encontrado no globo ocular, constituído maioritariamente por água (99%), sais e proteínas. O ambiente isolado e protegido onde se encontra e a baixa atividade enzimática (ausência de esterases responsáveis pela rápida degradação de substância) fazem com que esta amostra seja menos propensa à decomposição bacteriana, o que justifica a sua resistência aos fenómenos de putrefação e redistribuição *post mortem*. Estas características fazem com que o humor vítreo seja uma amostra de grande importância nas situações em que não é possível obter sangue em quantidades suficientes e nos casos em que o cadáver evidencia elevada putrefação (Bordin *et al.*, 2015; Dinis-Oliveira *et al.*, 2010; Skopp, 2004). O humor vítreo é, portanto, uma matriz confiável para avaliar a concentração de GHB em amostras *post mortem* pois verifica-se que a sua concentração não varia significativamente durante o intervalo *post mortem* (Busardó *et al.*, 2017b). As características aquosas desta amostra fazem com que compostos extensivamente ligados a proteínas ou com características lipofílicas exibam baixas concentrações no humor vítreo comparativamente a amostras de sangue. Nesta matriz, a presença de droga no estado original é predominante em relação aos seus metabolitos (Bordin *et al.*, 2015; Cooper e Negrusz, 2013).

O humor vítreo é colhido por aspiração com o auxílio de uma seringa inserida no centro do globo ocular. Um dos inconvenientes desta amostra é o facto de não representar exatamente as concentrações sanguíneas (Skopp, 2004).

4.2.2.5. BÍlis

A bílis é um fluido complexo e variável, recolhido através da vesícula biliar por aspiração com seringa ou por incisão (Dinis-Oliveira *et al.*, 2010). Funciona como reservatório de xenobióticos e metabolitos que sofrem excreção biliar e circulação entero-hepática. É uma amostra de grande interesse em casos de ausência de urina e quando a droga não é encontrada no sangue. A presença dos xenobióticos ou

metabolitos na bÍlis não permite distinguir uma exposição recente de uma exposição crnica da droga (Skopp, 2004). A bÍlis, apesar de se encontrar incluÍda em alguns estudos, não é uma amostra de eleição quando se pretende comprovar a existência de GHB de origem exógena no organismo. Isto porque pouco se sabe sobre a concentração endógena de GHB nesta amostra, o que faz com que não se consiga diferenciar nÍveis endógenos de GHB de uma exposição exógena à droga (Castro *et al.*, 2014; Kintz *et al.*, 2004; Mehling *et al.*, 2016; Moriya e Hashimoto, 2005). De acordo com o estudo realizado por Moriya e Hashimoto, as concentrações endógenas de GHB na bÍlis são semelhantes às concentrações encontradas na urina e significativamente menores do que as encontradas no sangue (Moriya e Hashimoto, 2005).

4.2.2.6. FÍgado

O fÍgado é o tecido mais frequentemente colhido e analisado em casos *post mortem* para completar os dados toxicológicos obtidos no sangue. Por outro lado, o fÍgado apresenta uma grande quantidade de tecido disponÍvel, é de fácil recolha e preparação da amostra quando comparado com outros tecidos disponÍveis (Dinis-Oliveira *et al.*, 2010).

O fÍgado é o principal órgão metabólico, o que explica as concentrações elevadas de tóxicos observadas neste órgão, fazendo com que sejam facilmente detetados nesta matriz mesmo quando presentes em baixas concentrações no sangue. Hoje em dia, com os métodos analÍticos cada vez mais sensÍveis, a maioria das drogas é detetada no sangue, não sendo necessária a análise do fÍgado para a confirmação do resultado. No entanto, o fÍgado é um tecido bastante útil para a análise de drogas que sofram redistribuição *post mortem*, uma vez que as concentrações no fÍgado são relativamente estáveis após a morte (Cooper e Negrusz, 2013).

Preferencialmente, a amostra deve ser recolhida do lobo direito do fÍgado para reduzir o risco de contaminação provocado pela bÍlis e pela difusão do contuido estomacal (Flanagan *et al.*, 2008).

Apesar de todas as caracterÍsticas descritas tornarem o fÍgado uma amostra de eleição na pesquisa de vários xenobióticos, esta amostra raramente é recolhida para a identificação de GHB, dada a carência de estudos. Por outro lado, o estudo realizado por Sakurada *et al.* sugere que o GHB presente nesta amostra resulta do processo de decomposição *post mortem* (Mazarr-Proo e Kerrigans, 2005; Skurada *et al.*, 2002).

4.2.2.7. Conteúdo gástrico

Em casos de suspeita de intoxicação *per os*, o conteúdo gástrico pode ser uma amostra bastante útil por diversas razões. Após sobredosagem a concentração de tóxico no estômago pode ser bastante alta. Além disso, algumas drogas que podem ser difíceis de detetar no sangue devido à sua ampla distribuição no organismo, podem ser mais facilmente detetadas no estômago (Cooper e Negrusz, 2013; Dinis-Oliveira et al., 2010).

A observação macroscópica e organoléptica do conteúdo estomacal fornece orientações que ajudam no processo analítico, sendo que os cheiros e as colorações podem ser associadas a determinados compostos. Além disso, podem estar presentes cápsulas ou comprimidos, intactos ou parcialmente desfeitos, que devem ser imediatamente separados, secos e acondicionados num contentor isento de humidade e bem fechado para posterior análise (Nelson *et al.*, 2011; Skopp, 2004).

A deteção de grandes quantidades de droga no conteúdo estomacal não fornece informação suficiente para estabelecer a causa da morte, sendo sempre necessário cruzar esta informação com os dados obtidos no sangue e/ou tecidos. O mesmo acontece quando a concentração da droga é baixa, pois pode ter ocorrido uma difusão passiva da droga para o sangue (Skopp, 2004).

A desvantagem do conteúdo estomacal é a sua composição, que pode variar de um fluido aquoso a um semissólido, dependendo da quantidade e do tipo de alimento presente. Por outro lado, o conteúdo estomacal raramente é homogéneo, o que dificulta a medição com precisão da concentração representativa de fármaco no volume de conteúdo estomacal recebido (Cooper e Negrusz, 2013).

Apesar da sua utilidade, o conteúdo gástrico não é uma amostra com grande interesse para a análise de GHB. No entanto, verifica-se que em alguns casos de intoxicação esta amostra é também recolhida (Bodson *et al.*, 2008; Grarff *et al.*, 2017).

2.2.2.8. Suor

O suor libertado pelas glândulas sudoríparas aprócrinas e écrinas é constituído maioritariamente por uma solução aquosa hipertónica (99%), e outros constituintes como lactato, gama albumina, ureia, iões amónio, enzimas e compostos orgânicos (Bordin *et al.*, 2015; Dinis-oliveira *et al.*, 2010). Devido à sua composição, o suor, quando comparado

com outras matrizes biológicas, apresenta uma maior concentração de GHB mesmo em indivíduos nunca expostos à droga, sendo isto um dado importante aquando da interpretação dos resultados analíticos (Bordin *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2014).

As características físico-químicas das drogas, tais como a massa molecular, pKa, grau de ligação às proteínas plasmáticas e lipofilia influenciam a incorporação das drogas no suor por difusão passiva através dos capilares sanguíneos ou por passagem transdérmica (Bordin *et al.*, 2015; Levisky *et al.*, 2000).

A recolha do suor é simples, não invasiva, com poucos riscos de adulteração e interferentes. As espécies predominantemente encontradas são as próprias substâncias utilizadas e não os seus metabolitos. Apesar das vantagens mencionadas, esta matriz também apresenta algumas desvantagens onde se inclui a falta de informação sobre a relação dose-resposta, a quantidade limitada de amostra e a falta de informação sobre o uso desta matriz. Além disso, as concentrações encontradas dos analitos são relativamente baixas, exigindo técnicas analíticas com elevada sensibilidade e seletividade (Bordin *et al.*, 2015; Nelson *et al.*, 2011).

Dentre as drogas de abuso já estudadas e detetadas no suor incluem-se o GHB, o etanol, as anfetaminas, o fenobarbital, a cocaína, a heroína, a morfina, a fenciclidina e a metadona. Foram já descritos ensaios imunoenzimáticos e radioimunoensaios como métodos de triagem para avaliar a presença de drogas no suor, sendo por isso o suor uma matriz recorrente para a monitorização da exposição a drogas de abuso durante o tratamento de desintoxicação, no âmbito da justiça criminal e como pré-requisito para o emprego (Bordin *et al.*, 2015; Samyn *et al.*, 2002). No entanto, a grande variedade endógena do GHB no suor, impede a utilização desta matriz em métodos de triagem para pesquisa do GHB (Demoranville e Verkouteren, 2013; Abanadas *et al.*, 2007).

2.2.2.9. Saliva

A saliva, secretada pelas glândulas presentes na mucosa bucal, pode ser útil para pesquisa do consumo recente de drogas. As drogas são transferidas do sangue para a saliva por difusão passiva, podendo a droga ser detetada nesta matriz na forma não metabolizada. A incorporação de drogas nesta matriz depende do pH do fluido oral e do sangue e da percentagem de ligação da droga às proteínas plasmáticas (Bordin *et al.*, 2015).

A saliva apresenta especial interesse quando se pretende fazer um teste de rastreio para pesquisa de GHB, já que a sua colheita é simples, rápida e não envolve métodos invasivos (Grootveld *et al.*, 2006).

A administração de uma dose única de GHB por via oral pode permanecer detetável na saliva por 5 horas (Verstraete, 2004).

4.2.2.10. Líquido cefalorraquidiano

O líquido cefalorraquidiano é um material aquoso e transparente que se encontra anatomicamente protegido, estando por isso mais protegido de contaminações e invasões microbianas. Dada a sua composição, é de esperar que compostos ligados em grande extensão a proteínas ou muito lipofílicos apresentem maior concentração no sangue do que neste fluido (Skopp, 2004).

O líquido cefalorraquidiano não é uma amostra frequentemente usada para a pesquisa de GHB, uma vez que existem poucos estudos publicados sobre as concentrações de GHB nesta amostra, o que torna a interpretação dos resultados analíticos mais difícil. Contudo, dos estudos existentes, verifica-se que a concentração de GHB encontrada no líquido cefalorraquidiano é semelhante à encontrada em amostras de urina e significativamente menor à encontrada em amostras de sangue (Andresen-Stricher *et al.*, 2014; Busardò *et al.*, 2017a; Moriya e Hashimoto, 2005).

2.2.3. Métodos de análise do GHB em amostras biológicas

Numa análise toxicológica, a seleção do método analítico deve ser feita perante as amostras e técnicas disponíveis, tendo em conta a sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão dos métodos utilizados. As técnicas adotadas devem ser as mais convenientes para que se obtenha resultados fidedignos, que contribuam para uma correta identificação e confirmação da substância (da Costa *et al.*, 2010).

Após a colheita da amostra, é realizada uma análise qualitativa através de métodos de rastreio. Estes métodos incluem técnicas de execução simples e rápida, altamente sensíveis de baixo custo, mas pouco específicas. Os resultados positivos necessitam de uma confirmação através dos métodos analíticos de confirmação, uma vez que estes apresentam uma grande especificidade, sensibilidade e um grau de certeza elevado. Contudo, são métodos que apresentam um custo mais elevado. Dentro dos métodos de

confirmação distinguem-se os métodos de confirmação qualitativos, em que se identificam inequivocamente a presença de uma substância na amostra, não mencionando a sua quantidade, e os métodos de confirmação quantitativos que, além de identificar inequivocamente uma substância numa amostra, também indicam a respetiva concentração (Ann-Sofie *et al.*, 2014; Cooper e Negrusz, 2013).

No final da análise toxicológica é feita a interpretação dos resultados obtidos e o relatório é enviado às autoridades judiciais. O relatório final da análise deve ser explícito quanto ao método utilizado, à sensibilidade da técnica, valores de *cut-off*, principais limitações e cumprimento da cadeia de custódia.

2.2.3.8. Métodos de triagem

Os ensaios colorimétricos e enzimáticos são as técnicas de rastreio mais utilizadas numa análise de GHB em amostras biológicas. São ensaios que permitem uma resposta qualitativa rápida mas que necessitam de serem validados através de testes de confirmação (Ann-sofie *et al.*, 2014).

2.2.3.8.1. Ensaios colorimétricos e enzimáticos

Os ensaios colorimétricos descritos para a pesquisa de GHB são testes rápidos que permitem uma leitura do resultado em apenas 5 minutos. Estes ensaios permitem identificar a presença de GHB na urina com base na conversão do GHB em GBL. Desta forma, estes ensaios não são adequados para distinguir uma intoxicação por GHB de uma intoxicação por GBL. Outra desvantagem deste método é a falta de sensibilidade pois apresentam um limite de deteção entre 100 mg/L a 500 mg/L (Alston e Ng, 2002; Andresen *et al.*, 2011; Ann-sofie *et al.*, 2014; Parkin e Brailsford, 2009). Mais recentemente, surgiu um ensaio enzimático para a deteção de GHB em amostras de urina e soro. Como ilustra a Figura 7, esta técnica baseia-se na degradação do GHB em semialdeído succínico (SSA), através da enzima GHB-desidrogenase e do cofator dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺). O aumento da absorvância a 340 nm é resultado da redução do NAD⁺ em NADH que é proporcional à quantidade existente de GHB na amostra (Andresen *et al.*, 2011).

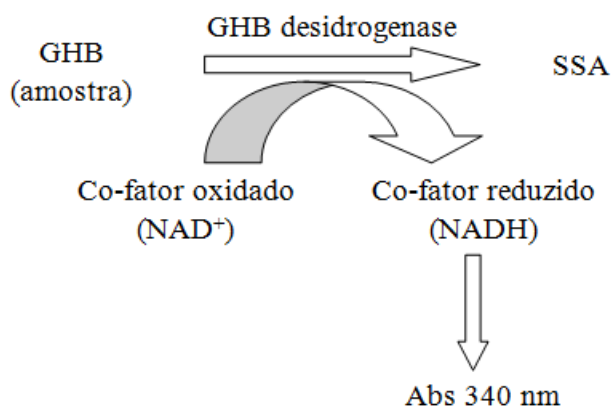


Figura 7. Princípio do ensaio enzimático (Fonte: Andresen *et al.*, 2011).

A sensibilidade deste método é de 7 mg/L em amostras de soro e de 5 mg/L em amostras de urina. No entanto, apesar do aumento de sensibilidade em relação ao método anterior, é igualmente indispensável a aplicação de testes de confirmação no caso de resultados positivos (Andresen *et al.*, 2011; Ann-sofie *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2004; Grenier *et al.*, 2012).

2.2.3.9. Métodos de confirmação

2.2.3.9.1. Preparação da amostra

Dada a complexidade das amostras biológicas em proteínas, lípidos e outras macromoléculas, é necessária uma prévia preparação da amostra antes de iniciar as técnicas de confirmação. Este processo é importante para isolar o analito num solvente que seja compatível com os processos analíticos a utilizar.

As técnicas utilizadas para o tratamento das amostras biológicas incluem diluição, filtração, desproteinização, modificação química, extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e extração por *headspace* (HS). Estas técnicas podem ser usadas sozinhas mas por vezes são usadas em combinação (Ann-sofie *et al.*, 2014; Cooper e Negrusz, 2013).

A precipitação de proteínas é uma técnica adequada para a remoção de uma grande parte de interferentes presentes no soro e plasma, uma vez que o GHB não se apresenta ligado às proteínas plasmáticas.

A modificação química é uma técnica importante para a formação da lactona através do GHB. Esta conversão melhora tanto o processo de extração como a análise e deteção

cromatográfica, uma vez que a lactona é mais estável e menos polar quando comparado com a molécula de GHB. A maior volatilidade da lactona também permite melhorar as propriedades da cromatografia gasosa.

A extração líquido-líquido consiste na extração do analito recorrendo ao uso de solventes orgânicos. Quando se pretende extrair o GHB são usados solventes como o acetato de etilo, o éter metil-terc-butílico ou o hexano. No caso do analito ser o GBL são usados solventes como o diclorometano, o clorofórmio ou o benzeno. Posteriormente, o solvente é evaporado, obtendo-se um resíduo seco que será reconstituído com o solvente apropriado à análise cromatográfica (Ann-sofie *et al.*, 2014; Bordin *et al.*, 2015).

A técnica de SPE baseia-se na separação líquido-sólido através de diferentes afinidades. Esta técnica pode ser utilizada para extrair o GHB da amostra biológica, bem como para reter substâncias interferentes, permitindo que o analito de interesse passe pelo solvente e seja recolhido para análise posterior.

A extração por *headspace* é uma técnica de extração pouco usada devido à complexidade de optimização do procedimento e à necessidade de um volume de amostra superior para se obter uma sensibilidade semelhante à dos procedimentos de preparação de amostras anteriores (Ann-sofie *et al.*, 2014).

2.2.3.9.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS)

A GC-MS consiste numa combinação de duas técnicas analíticas, a cromatografia gasosa e a espectrometria de massa. Atualmente, esta técnica é um procedimento padrão em laboratórios forenses devido à sua versatilidade, especificidade e sensibilidade (Yuan *et al.*, 2015).

A cromatografia gasosa (GC) consiste na volatilização da amostra após esta ser introduzida no injetor e posterior distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária sólida ou líquida e uma fase móvel gasosa, normalmente azoto, hélio, argón ou hidrogénio. A separação depende da interação diferencial entre a fase móvel e a fase estacionária, sendo os analitos separados de acordo com as suas propriedades físico-químicas, como a polaridade e a volatilidade. A principal limitação desta técnica reside na incapacidade da análise de substâncias não voláteis, termolábeis e de elevado peso molecular.

Após a separação dos analitos pelos métodos cromatográficos, estes são posteriormente detetados no espectrómetro de massa (MS). O MS só funciona a partir da ionização do analito, obtendo-se fragmentos e massa a partir deste ião, sendo estes posteriormente separados de acordo com a relação massa/carga de cada fragmento e detetados proporcionalmente à sua abundância, produzindo assim um espectro de massa completo que permite a sua identificação e quantificação mediante o uso de padrões adequados. É importante referir que o MS apenas é capaz de detetar espécies iónicas e não átomos ou moléculas neutras (Ann-sofie *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2015).

A GC-MS é um método sensível para a quantificação de GHB assim como de GBL e 1,4-BD. É um método bastante adequado para análise forense que possibilita a deteção de várias substâncias em simultâneo numa pequena quantidade de amostra (Ann-sofie *et al.*, 2014).

2.2.3.9.3. Cromatografia gasosa com detetor de ionização em chama (GC-FID)

A GC-FID tem por base o mesmo princípio de funcionamento que a técnica anteriormente descrita, sendo que a principal diferença reside no método de deteção usado que, neste caso, é um detetor de ionização em chama (FID).

Após a separação dos analitos através da GC, estes são detetados pelo FID. O fluxo de gás que sai da coluna de cromatografia passa através de um queimador, onde os compostos orgânicos são queimados originando iões que são recolhidos por eléctrodos dando origem a uma variação de corrente.

A deteção de GHB através desta técnica pressupõe a adição de ácido sulfúrico concentrado para a ciclização do GHB em GBL. Para distinguir uma intoxicação por GHB de uma intoxicação por GBL, são utilizadas duas alíquotas de amostra, uma onde se adiciona um ácido que é responsável pela conversão do GHB em GBL e a outra em que não se adiciona ácido (Andresen *et al.*, 2011; Couper e Marinetti, 2002; Elliott, 2003).

2.2.3.9.4. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em série (LC-MS/MS)

O método de LC-MS/MS tem por base a junção de duas técnicas analíticas, a cromatografia líquida e a espectrometria de massa.

A cromatografia líquida (LC) é uma técnica que permite a separação de um grande número de compostos similares. É uma técnica bastante utilizada que permite a análise de compostos orgânicos e inorgânicos, podendo as amostras ser líquidas ou sólidas, iônicas ou covalentes, de baixo peso molecular e termolábeis. Amostras gasosas são as únicas que não podem ser analisadas por esta técnica. Por estas razões, a LC é uma técnica com um espectro de aplicação complementar à GC (Oliveira *et al.*, 2015).

Apesar das técnicas de GC serem mais utilizadas, a LC pode ser mais vantajosa, isto porque, apesar da sensibilidade do método ser semelhante, esta técnica é menos laboriosa, o uso de solventes orgânicos é reduzido e não exige a conversão do GHB em GBL (Ann-sofie *et al.*, 2014).

A LC pressupõe o mesmo princípio de separação que a GC, no entanto a sua fase móvel é um líquido. Após a separação dos analitos, estes são então analisados e detetados pelo MS em série.

A técnica de LC-MS/MS permite uma análise simultânea de GHB, GBL e 1,4-BD, num curto período de tempo, sendo por isso um método bastante útil em casos de intoxicação por GHB (Parkin e Brailsford, 2009).

2.2.3.9.5. Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em série (UHPLC-MS/MS)

A técnica de UHPLC-MS/MS é semelhante à anteriormente descrita, embora esta apresente tempos de execução mais curtos e uma sensibilidade e precisão superiores (Ann-sofie *et al.*, 2014).

A fase estacionária da UHPLC é a coluna cromatográfica que é constituída por partículas de tamanho muito reduzido que são responsáveis pela alta eficiência da técnica. A fase móvel deve ser um solvente que dissolva a amostra sem ocorrência de interferentes. Após a separação, os compostos seguem para o espectrómetro de massa em série onde sofrem ionização e separação de acordo com a razão massa/carga (Maldaner e Jardim, 2012).

Esta técnica permite identificar e quantificar não só o GHB mas todos os seus metabolitos em diferentes matrizes biológicas, tais como sangue, urina, líquido cefalorraquidiano e cabelo. Para além de amostras biológicas, é também possível aplicar

esta técnica a material apreendido. É uma técnica rápida e que exige um pequeno volume de amostra (Busardò *et al.*, 2017a).

2.2.4. Valores de *cut-off*

Os valores de *cut-off* são valores numéricos que servem de comparação para os resultados analíticos e que orientam as conclusões para a interpretação final dos resultados. São dados de extrema importância na análise dos resultados toxicológicos, pois permitem distinguir um resultado positivo (quando o valor obtido se encontra acima do valor de *cut-off*) de um resultado negativo (quando o valor obtido se encontra abaixo do valor de *cut-off*) (Tsanaclis *et al.*, 2015). Estes valores podem ser determinados no processo de validação dos métodos analíticos ou sugeridos por sociedades científicas.

Cada droga ou metabolito apresenta o seu valor de *cut-off* próprio. Este valor também pode variar dependendo do tipo de matriz analisada e da metodologia utilizada (Tsanaclis *et al.*, 2015; Andresen-Streichert *et al.*, 2015).

Para a determinação dos valores de *cut-off* do GHB é necessário ter em consideração que o GHB é uma substância endógena em todos os fluidos corporais e que a sua concentração aumenta após a morte (Andresen-Streichert *et al.*, 2015). Por esta razão, foi também necessário estabelecer um valor de *cut-off* para amostras *ante mortem* e para amostras *post mortem*. No caso de amostras *ante mortem* o valor de *cut-off* é de 5 mg/L no sangue e de 10 mg/L na urina. Quando se trata de amostras *post mortem* o valor de *cut-off* é de 50 mg/L no sangue e de 20 mg/L na urina. No caso de elevada putrefação, vários autores sugerem o uso do humor vítreo para a pesquisa de GHB, pois, como já referido anteriormente, esta matriz encontra-se isolada e é, por isso, menos afetada pelas alterações *post mortem*. Neste caso, o valor de *cut-off* proposto para esta amostra é de 50 mg/L (Andresen *et al.*, 2011; Andresen-Streichert *et al.*, 2015; Busardò *et al.*, 2017b; Busardò e Kyriakou, 2014).

Quando são encontrados valores de GHB no sangue na ordem dos 100-200 mg/L deve-se considerar a possibilidade de existir a GHB acidúria. A GHB acidúria é uma desordem genética rara que resulta na acumulação de GHB devido a uma deficiência na enzima semialdeído succínico desidrogenase. Desta forma, é necessário recolher uma segunda amostra de sangue, num tempo posterior, para que se possa avaliar a

concentração basal de GHB e assim comparar com a concentração na primeira amostra (Busardò e Kyriakou, 2014; Castro *et al.*, 2014).

3. ESTUDO DE CASOS FORENSES

Caso 1

Duas crianças, uma do sexo masculino e outra do sexo feminino, com 2 e 10 anos respetivamente, foram admitidas no Serviço de Urgência com um nível de consciência diminuído. O rapaz de 2 anos torna-se totalmente alerta e cooperativo 7 horas após entrada no hospital. A menina apresentou vômitos persistentes e uma convulsão. Os testes de rastreio de drogas na urina foram positivos para o GHB. Descobriu-se que ambas as crianças tinham ingerido bolas do jogo “Bindeez”. As bolas deste brinquedo continham na sua composição 1,4-butanodiol, que uma vez no organismo é rapidamente metabolizado e convertido em GHB. As autoridades reguladoras foram notificadas e a comercialização do brinquedo foi proibida (Gunja *et al.*, 2008).

Caso 2

Homem de 39 anos foi encontrado em casa inconsciente. Ao seu lado foi encontrada uma garrafa meia vazia, a qual, segundo o seu colega de quarto, continha GHB. Após a sua entrada no hospital, verificou-se uma acidose metabólica e respiratória combinada grave, o que contribuiu para uma paragem cardíaca. Para o tratamento da acidose o homem foi sujeito a uma hemodiafiltração venosa contínua, verificando-se uma rápida recuperação nas horas seguintes.

A concentração plasmática de GHB foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, tendo-se obtido uma concentração de 2498 mg/L (24 mmol/L). As concentrações plasmáticas de GHB foram as mais altas relatadas em sobreviventes. O conteúdo da garrafa encontrada ao lado do homem também foi analisado e confirmou-se a presença de GBL no líquido (Roberts *et al.*, 2011).

Caso 3

Uma mulher de 52 anos, com história de narcolepsia com cataplexia foi encontrada morta de manhã. No mesmo local foi encontrada uma garrafa com uma solução oral de Xyrem® (oxibato de sódio) e uma seringa doseadora parcialmente cheia.

A análise toxicológica a uma amostra de sangue *post mortem* revelou a presença de GHB, fentermina, paroxetina e zolpidem, todos eles em níveis terapêuticos. Através de

uma análise complementar à urina, percebeu-se que a quantidade de Xyrem® ingerida pela vítima corresponde à dose terapêutica. Contudo, a toma concomitante do Xyrem® com o zolpidem (agente hipnótico sedativo) pode ter agravado possíveis efeitos depressivos respiratórios e, conseqüentemente, levar à morte (Zvosec *et al.*, 2009).

Caso 4

Mulher de 21 anos com história de quatro anos de dependência de GHB e anfetaminas submete-se a quatro processos de desintoxicação de GHB, tendo estes sido bem-sucedidos. Posteriormente, foi-lhe prescrito o baclofeno como um tratamento experimental no processo de prevenção de recaídas. Após algum tempo de tratamento, a mulher entra em coma associado a bradipneia. No bolso da mulher foi encontrada uma garrafa com GHB. Após a sua estabilização, a mulher admitiu inconsistências na toma do baclofeno, isto é, descartava tomas para serem utilizadas em doses mais elevadas como sedativo e ansiolítico. A mulher também admitiu o abuso ilícito de GHB. A toma conjunta destas duas substâncias estará na origem dos sintomas descritos (Kamal *et al.*, 2015).

Caso 5

Menina de 6 anos foi sedada várias vezes com GHB pelo seu tio a fim de ser abusada sexualmente. No decorrer de um abuso sexual, o homem percebeu que a menina deixou de respirar, tentando reanimá-la, mas sem sucesso.

Para a análise toxicológica foram recolhidas amostras de sangue cardíaco, humor vítreo, tecido cerebral e renal e cabelo. As amostras de sangue venoso femoral e urina não se encontraram disponíveis, o que dificultou a interpretação dos resultados analíticos. Apesar da causa da morte ser atribuída à intoxicação por GHB, não se conseguiu perceber se a morte resultou de uma depressão respiratória devido a uma dose elevada de GHB ou se resultou de uma asfixia, uma vez que foi encontrado conteúdo estomacal na secção central do trato respiratório (Mehling *et al.*, 2016).

Caso 6

Indivíduo de sexo masculino admitido numa unidade de emergência médica após duas tentativas de reanimação cardiopulmonar na rua. Através de uma conversa com uns amigos que acompanhavam o doente, apurou-se que este teria ingerido GHB em

grandes quantidades. O doente foi colocado em coma induzido devido aos sintomas sofridos.

As análises toxicológicas realizadas ao soro e à urina revelaram a presença de GHB em concentrações letais, bem como de etanol e *cannabis*.

O efeito depressivo combinado do GHB e do etanol no sistema nervoso central e no sistema respiratório terão levado a uma paragem cardíaca e, conseqüentemente, à morte do indivíduo (Wiergowski *et al.*, 2016).

4. CONCLUSÃO

O GHB é uma droga de abuso com propriedades depressoras do SNC. Apesar do seu baixo consumo, é frequentemente reportado o seu uso como droga facilitadora de agressões sexuais. Atualmente apresenta um lugar de destaque no âmbito da Toxicologia Forense por estar envolvido em casos criminais, como por exemplo violações e *overdoses*, alteração do comportamento e rastreio de drogas ilícitas. Ainda que a regulamentação do GHB seja apertada, este permanece disponível através da Internet, onde se pode comprar facilmente os reagentes necessários para a sua produção. Apesar do seu uso ilícito, o GHB sob a forma de oxibato de sódio é utilizado na terapêutica para o tratamento da cataplexia em doentes com narcolepsia.

A ampla variedade de matrizes biológicas associadas à tecnologia moderna cada vez mais sensível e precisa permite uma identificação da droga mesmo quando presente em baixas concentrações. Contudo, a rápida eliminação da droga e dos seus metabolitos do organismo, bem como a presença endógena do GHB e a sua produção *post mortem* podem dificultar a interpretação dos resultados obtidos. Desta forma, é de extrema importância definir valores de *cut-off* tanto para amostras *post mortem* como *ante mortem*. As amostras biológicas de eleição recolhidas para análise do GHB são o sangue, urina, cabelo e o humor vítreo. Existem outras amostras alternativas como a bÍlis, fÍgado, conteúdo gástrico, saliva, suor e líquido cefalorraquidiano, contudo, a falta de estudos nestas amostras limitam o seu uso. Hoje em dia para a quantificação do GHB nas amostras biológicas recorre-se frequentemente à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, devido à versatilidade, especificidade e sensibilidade da técnica.

Com este trabalho foi possível reunir informação científica sobre a exposição ao GHB, esclarecendo aspetos com relevância para a perícia em Toxicologia Forense. Nesta nota final importa ressaltar que:

1. O GHB é um potente depressor do SNC sendo considerado uma droga de abuso;
2. Apesar da origem exógena do GHB, este composto é encontrado endogenamente em pequenas concentrações nos mamíferos nunca expostos à droga;

3. Além do seu uso recreativo e criminal, o GHB também tem sido utilizado para fins terapêuticos, nomeadamente para o tratamento de cataplexia em doentes com narcolepsia;
4. A sintomatologia descrita associada ao uso de GHB é muitas vezes confundida com os sintomas associados ao abuso de etanol devido à sua semelhança;
5. Os principais efeitos associados ao uso do GHB relacionam-se com a depressão do SNS, nomeadamente relaxamento, euforia, confusão, amnésia, alucinações e coma;
6. O GHB quando utilizado por longos períodos de tempo leva ao desenvolvimento de dependência;
7. Para auxiliar a interpretação dos resultados analíticos existem valores de *cut-off* para amostras *ante mortem* e *post mortem*;
8. As concentrações *post mortem* desta droga dependem da amostra recolhida e do intervalo *post mortem*;
9. Sempre que possível devem ser recolhidas amostras de sangue, urina, cabelo e humor vítreo;
10. O cabelo é uma amostra com particular importância quando se pretende distinguir o uso crónico da droga de um ocasional e em casos de suspeita de abusos sexuais;
11. Para manter a estabilidade do GHB em amostras de sangue *post mortem* (de forma a evitar a alteração da sua concentração) é recomendado a adição de fluoreto de sódio e a sua conservação a uma temperatura de -20 °C.

5. BIBLIOGRAFIA

Abanades, S., Farré, M., Segura, M., *et al.* (2007). Disposition of gamma-hydroxybutyric acid in conventional and nonconventional biologic fluids after single drug administration: issues in methodology and drug monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*, 29, pp. 64–70.

Alston, W. C. e Ng, K. (2002). Rapid colorimetric screening test for γ -hydroxybutyric acid (liquid X) in human urine. *Forensic Science International*, 126, pp. 114–117.

Andresen, H., Aydin, B.E., Mueller, A., S., *et al.* (2011). An overview of gamma-hydroxybutyric acid: pharmacodynamics, pharmacokinetics, toxic effects, addiction, analytical methods, and interpretation of results. *Drug Testing and Analysis*, 3, pp. 560–568.

Andresen, H., Sprys, N., Schmoldt, A., *et al.* (2010). Gamma-hydroxybutyrate in urine and serum: additional data supporting current cut-off recommendations. *Forensic Science International*, 200, pp. 93–99.

Andresen-Streichert, H., Jensen, P., Kietzerow, J., *et al.* (2015). Endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in post mortem specimens and further recommendation for interpretative cut-offs. *International Journal of Legal Medicine*, 129, pp. 57–68.

Andriamampandry, C., Taleb, O., Kemmel, V., *et al.* (2007). Cloning and functional characterization of a gamma-hydroxybutyrate receptor identified in the human brain. *The FASEB Journal*, 21, pp. 885–895.

Ann-sofie, M., Ingels, E., Sarah, M., *et al.* (2014). Screening and confirmation methods for GHB determination in biological fluids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, p. 3553.

Bertol, E., Argo, A., Procaccianti, P., *et al.* (2012). Detection of gamma-hydroxybutyrate in hair: validation of GC-MS and LC-MS/MS methods and application to a real case. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, pp. 518-522.

Bodson, Q., Denooz, R., Serpe, P., *et al.* (2008). Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) measurement by GC-MS in blood, urine and gastric contents, following an acute intoxication in Belgium. *Acta Clinica Belgica*, 63(3), pp. 200-208.

Bordin, D. C. M., Monedeiro, F. F. S. S., de Campos, E.G. (2015). Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. *Scientia Chromatographica*, 7, pp. 125-143.

Borgen, L. A., Okerholm, R., Morrison, D., *et al.* (2003). The influence of gender and food on the pharmacokinetics of sodium oxybate oral solution in healthy subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 43, pp. 59-65.

Bravo, D. T., Harris, D. O. e Parsons, S. M., (2004). Reliable, sensitive, rapid and quantitative enzyme-based assay for gamma-hydroxybutyric acid (GHB). *Journal of Forensic Science*, 49, pp. 1-9.

Brenneisen, R., ElSohly, M. A., Murphy, T. P., *et al.* (2004). Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects. *Journal of Analytical Toxicology*, 28, pp. 625-630.

Brunt, T. B, van Amsterdam, J. G. C. e van den Brink, W. (2014). GHB, GBL and 1, 4-BD Addiction. *Current Pharmaceutical Design*, 20, pp. 4076-4085.

Bulcão, R. P., Garcia, S. C., Limberger, R. P., *et al.* (2012). Designer drugs: aspectos analíticos e biológicos. *Química Nova*, 35(1), pp. 149-158.

Busardò, F. (2016). The importance of hair testing in GHB facilitated sexual assault cases. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 39, pp. 74-75.

Busardò, F. P e Jones, A. W. (2015). GHB Pharmacology and Toxicology: Acute Intoxication, Concentrations in Blood and Urine in Forensic Cases and Treatment of the Withdrawal Syndrome. *Current Neuropharmacology*, 13, pp. 47–70.

Busardò, F. P. e Kyriakou, C. (2014). GHB in biological specimens: which cut-off levels should be taken into consideration in forensic toxicological investigation?. *Recent Patents on Biotechnology*, 8, pp. 206–214.

Busardò, F. P., Kyriakou, C., Marchei, E., *et al.* (2017a.) Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) for determination of GHB, precursors and metabolites in different specimens: Application to clinical and forensic cases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 137, pp. 123–131.

Busardò, F. P., Mannocchi, G., Giorgetti, R., *et al.* (2017b). Stability of endogenous GHB in vitreous humor vs peripheral blood in dead bodies. *Forensic Science International*, 274, pp. 64–69.

Caputo, F., Vignoli, T., Maremmani, I., *et al.* (2009). Gamma hydroxybutyric acid (GHB) for the treatment of alcohol dependence: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(6), pp. 1917-1929.

Caravati, E. M., McGuigan, M.A., Whyte, I. M., *et al.* (2004). *Medical toxicology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Castro, A. L., Dias, M., Reis, F. e Teixeira, H. M. (2014). Gamma-hydroxybutyric acid endogenous production and post mortem behaviour—the importance of different biological matrices, cut-off reference values, sample collection and storage conditions. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 27, pp. 17–24.

Control, C. (1999). Adverse events associated with ingestion of gamma-butyrolactone—Minnesota, New Mexico, and Texas, 1998-1999. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 48 (7), p. 137.

Cooper, G. e Negrusz, A. (2013). Clarke's analytical forensic toxicology. *Pharmaceutical Press*.

Couper, F.J. e Marinetti, L.J. (2002). gamma-Hydroxybutyrate (GHB) – Effects on Human Performance and Behavior. *Forensic science review*, 14, pp. 101–121.

Crunelli, V., Emri, Z. e Leresche, N. (2006). Unravelling the brain targets of γ -hydroxybutyric acid. *Current Opinion in Pharmacology*, 6, pp. 44–52.

da Costa, K. N., Cruz, R. A. P. e Franco-Oshima, Y. (2010). A Contribuição da toxicologia analítica na aplicação da toxicologia forense: exemplos da cocaína e do álcool etílico. *Revista de Estudos Universitários-REU*, 36(2), pp. 19-30.

Demoranville, L. e Verkouteren, J. (2013). Measurement of drug facilitated sexual assault agents in simulated sweat by ion mobility spectrometry. *Talanta*, 106, pp. 375-380.

Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., Duarte, J. A., *et al.* (2010). Collection of biological samples in forensic toxicology. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20(7), pp. 363-414.

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

Elliott, S.P. (2003). Gamma hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in humans and factors affecting endogenous production. *Forensic Science International*, 133, pp. 9–16.

EMCDDA (2008). GHB and its precursor GBL: an emerging trend case study. [Em linha]. Disponível em <http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/505/TP_GHB_and_GBL_107300.pdf_en> [Consultado em 16/09/2017].

Ferrara, S. D., Tedeschi, L., Frison, G., *et al.* (1996). Effect of moderate or severe liver dysfunction on the pharmacokinetics of γ -hydroxybutyric acid. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 50, pp. 305–310.

Fjeld, B., Burns, M. L., Karinen, R., *et al.* (2012). Long-term stability of GHB in post mortem samples and samples from living persons, stored at- 20° C, using fluoride preservatives. *Forensic Science International*, 222, pp. 47–51.

Flanagan, R. J., Connally, G. e Evans, J. M. (2005). Analytical toxicology: guidelines for sample collection postmortem. *Toxicological Reviews*, 24(1), pp. 63-71.

Flanagan, R. J., Taylor, A., Watson, I. D., *et al.* (2008). Fundamentals of analytical toxicology. *John Wiley & Sons, Ltd.*

Fuller, D. E. e Hornfeldt, C. S. (2003). From club drug to orphan drug: sodium oxybate (Xyrem) for the treatment of cataplexy. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 23, pp. 1205–1209.

Gallimberti, L., Spella, M., Soncini C., *et al.* (2000). Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcohol and heroin dependence. *Alcohol*, 20(3), pp. 257-262.

Gervasi, N., Monnier, Z., Vincent, P., *et al.* (2003). Pathway-specific action of γ -hydroxybutyric acid in sensory thalamus and its relevance to absence seizures. *Journal of Neuroscience*, 23, pp. 11469–11478.

Gonzalez, A. e Nutt, D. J. (2005). Gamma hydroxy butyrate abuse and dependency. *Journal of Psychopharmacology*, 19, pp. 195–204.

Goodwin, A. K., Brown, P. R., Jansen, E. E. W., *et al.* (2009). Behavioral effects and pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyrate (GHB) precursors gamma-butyrolactone (GBL) and 1, 4-butanediol (1, 4-BD) in baboons. *Psychopharmacology*, 204, pp. 465–476.

Graeff, E. L., Mesli, V., Cournez, R., *et al.* (2017). Fatal Overdose of Gamma-hydroxybutyrate Acid After Ingestion of 1, 4-Butanediol. *Journal of Forensic Sciences* (*in press*).

Grenier, V., Huppé, G., Lamarche, M., *et al.*, (2012). Enzymatic assay for GHB determination in forensic matrices. *Journal of Analytical Toxicology*, 36, pp. 523–528.

Grootveld, M., Algeo, D., Silwood, C., *et al.* (2006). Determination of the illicit drug gamma-hydroxybutyrate (GHB) in human saliva and beverages by ¹H NMR analysis. *Biofactors*, 27(1-4), pp. 121-136.

Gunja, N., Doyle, E., Carpenter, K., *et al.* (2008). γ -Hydroxybutyrate poisoning from toy beads. *The Medical Journal of Australia*, 188, pp. 54–55.

INFARMED (2009). Relatório de avaliação prévia de medicamento para uso humano em meio hospitalar - oxibato de sódio. [Em linha]. Disponível em <http://www.infarmed.pt/documents/15786/1424140/032_oxibato_ParecerNet.pdf/efee5849-f60d-4770-ac0a-ba496d25e54b> [Consultado em 16/09/2017].

Ingels, M., Rangan, C., Bellezzo, J., *et al.* (2000). Coma and respiratory depression following the ingestion of GHB and its precursors: three cases. *The Journal of Emergency Medicine*, 19, pp. 47–50.

Irwin, R. D. (1996). NTP summary report on the metabolism, disposition, and toxicity of 1, 4-butanediol (CAS No. 110-63-4). Toxicity Report Series, 54, pp. 1–28.

Kam, P. C. A. e Yoong F. F. Y. (1998). Gamma-hydroxybutyric acid: an emerging recreational drug. *Anaesthesia*, 53(12), pp. 1195-1198.

Kamal, R. M., Qurishi, R. e De Jong, C. A.(2015). Baclofen and γ -hydroxybutyrate (GHB), a dangerous combination. *Journal of Addiction Medicine*., 9, pp. 75–77.

Kankaanpää, A., Liukkonen, R. e Ariniemi, K. (2007). Determination of γ -hydroxybutyrate (GHB) and its precursors in blood and urine samples: A salting-out approach. *Forensic Science International*, 170(2), pp. 133-138.

Kapoor, P., Deshmukh, R. e Kukreja, I. (2013). GHB acid: A rage or reprove. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(4), pp. 173-178.

Karch, S.B.(1998). *Drug abuse handbook*. São Francisco. CRC Press.

Kintz, P., Villain, M., Cirimele, V., *et al.* (2004). GHB in postmortem toxicology: Discrimination between endogenous production from exposure using multiple specimens. *Forensic Science International*, 143(2), PP. 177-181.

Kintz, P., Villain, M., Péssier, A., *et al.* (2005). Unusually high concentrations in a fatal GHB case. *Journal of Analytical Toxicology*, 29(6), pp. 582-585.

Klaassen, C. D. e Watkins, J. B. (2001). *Toxicologia, a ciência básica dos tóxicos de Casarett & Doull's*. McGraw-Hill de Portugal, Lda.

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

LeBeau, M. A., Montgomery, M. A., Morris-Kukoski, C., *et al.* (2007). Further evidence of in vitro production of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine samples. *Forensic Science International*, 169, pp. 152–156.

Levisky, J. A., Bowerman, D. L., Jenkins, W. W., *et al.* (2000). Drug deposition in adipose tissue and skin: evidence for an alternative source of positive sweat patch tests. *Forensic Science International*, 110, pp. 35–46.

Li, J., Stokes, S. A. e Woeckener, A. (1998). A tale of novel intoxication: a review of the effects of γ -hydroxybutyric acid with recommendations for management. *Annals of Emergency Medicine*, 31, pp. 729–736.

Maldaner, L. e Jardim, I. C. S. F. (2012). UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Scientia Chromatographica*, 4(3), pp. 197-207.

Mazarr-Proo, S. e Kerrigans, S. (2005). Distribution of GHB in tissues and fluids following a fatal overdose. *Journal of Analytical Toxicology*, 29(5), pp. 398-400.

McDonough, M., Kennedy, N., Glasper, A., *et al.* (2004). Clinical features and management of gamma-hydroxybutyrate (GHB) withdrawal: a review. *Drug and Alcohol Dependence*, 75, pp. 3–9.

Mehling, L. M., Johansen, S. S., Wang, X., *et al.* (2016). Drug facilitated sexual assault with lethal outcome: GHB intoxication in a six-year-old girl. *Forensic Science International*, 259, pp. e25–e31.

Moriya, F. e Hashimoto, Y. (2005). Site-dependent production of γ -hydroxybutyric acid in the early postmortem period. *Forensic Science International*, 148 (2), pp. 139-142.

Morris, M. E., Hu, K. e Wang, Q. (2005). Renal clearance of γ -hydroxybutyric acid in rats: increasing renal elimination as a detoxification strategy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313(3), pp. 1194–1202.

Nelson, L. S., Lewin, N., Howland, M. A., *et al.* (2011). *Goldfrank's toxicologic emergencies*. 9^a ed. The McGraw-Hill.

OEDT (2017). Relatório Europeu sobre Drogas - Tendências e evoluções. **[Em linha]**.

Disponível em <

http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/4541/TDAT17001PTN.pdf_en

> [Consultado em 16/09/2017].

Oliveira, R. J., Carvalho, F. D. e Bastos, M. D. L. (2015). *Toxicologia Forense*. 1^a ed. Lidel.

Palmer, R. B. (2004). γ -Butyrolactone and 1, 4-Butanediol. *Toxicological Reviews*, 23, pp. 21–31.

Parkin, M. C. e Brailsford, A. D. (2009). Retrospective drug detection in cases of drug-facilitated sexual assault: challenges and perspectives for the forensic toxicologist. *Bioanalysis*, pp. 1001–1013.

Ricaurte, G. A. e McCann, U. D. (2005). Recognition and management of complications of new recreational drug use. *The Lancet*, 365, pp. 2137–2145.

Roberts, D. M., Smith, M. W., Gopalakrishnan, M., *et al.* (2011). Extreme γ -butyrolactone overdose with severe metabolic acidosis requiring hemodialysis. *Annals of emergency medicine*, 58, pp. 83–85.

Rodgers, J., Ashton, C. H., Gilvarry, E., *et al.* (2004). *Liquid ecstasy: a new kid on the dance floor*. RCP.

Sakurada, K., Kabayashi, M., Iwase, H. *et al.* (2002). Production of γ -hydroxybutyric acid in postmortem liver increases with time after death. *Toxicology Letters*, 129(83), pp. 207-217.

Samyn, N., De Boeck, G. e Verstraete, A. G. (2002). The use of oral fluid and sweat wipes for the detection of drugs of abuse in drivers. *Journal of Forensic Science*, pp. 1380–1387.

Schep, L. J., Knudsen, K., Slaughter, R. J., *et al.* (2012). The clinical toxicology of gamma-hydroxybutyrate, gamma-butyrolactone and 1, 4-butanediol. *Clinical Toxicology*, 50, pp. 458–470.

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

Smith, K. M., Larive, L. L., Romanelli, F., *et al.* (2002). Club drugs: methylenedioxy-methamphetamine, flunitrazepam, ketamine hydrochloride, and gamma-hydroxybutyrate. *American Journal of Health System Pharmacy*, 59, pp. 1067–1076.

Snead, O. C. (2000). Evidence for a G Protein-Coupled γ -Hydroxybutyric Acid Receptor. *Journal of Neurochemistry*, 75, pp. 1986–1996.

Thai, D., Dyer, J. E., Benowitz, N. L., *et al.* (2006). GHB and ethanol effects and interactions in humans. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 26, p. 524.

Thai, D., Dyer, J. E., Jacob, P., *et al.* (2007). Clinical Pharmacology of 1, 4-Butanediol and Gamma-hydroxybutyrate After Oral 1, 4-Butanediol Administration to Healthy Volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 81, pp. 178–184.

Thomsen, R., Rasmussen, B. S., Johansen, S. S., *et al.* (2017). Postmortem concentrations of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in peripheral blood and brain tissue—Differentiating between postmortem formation and antemortem intake. *Forensic Science International*, 272, pp. 154–158.

Tsanaclis, L. M., Wicks, J. F. e da Matta Chasin, A. A. (2015). Análises de drogas em cabelos ou pêlos. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, 4(1), pp. 6-46.

Uys, J. D., Uys, J. D. e Niesink, R. J. (2005). Pharmacological aspects of the combined use of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) and gamma-hydroxybutyric acid (GHB): a review of the literature. *Drug and Alcohol Review*, 24, pp. 359–368.

Verstraete, A.G. (2004). Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid. *Therapeutic Drug Monitoring*, 26, pp. 200–205.

Wang, Q., Darling, I. M. e Morris, M. E. (2006). Transport of γ -hydroxybutyrate in rat kidney membrane vesicles: role of monocarboxylate transporters. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318, pp. 751–761.

White, C. M. (2017). Pharmacologic, Pharmacokinetic, and Clinical Assessment of Illicitly Used γ -Hydroxybutyrate. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 57, pp. 33–39.

Wiergowski, M., Anand, J. S., Karnecki, K., Soltyszewski, *et al.* (2016). Diagnostics of fatal poisoning with 4-hydroxybutyric acid, ethanol and cannabinoids. *Romanian Journal of Legal Medicine*, 24, pp. 219–225.

Wong, C. G. T., Gibson, K. M. e Snead, O. C. (2004). From the street to the brain: neurobiology of the recreational drug γ -hydroxybutyric acid. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25, pp. 29–34.

Wood, D. M., Brailsford, A. D. e Dargan, P. I. (2011). Acute toxicity and withdrawal syndromes related to gamma-hydroxybutyrate (GHB) and its analogues gamma-butyrolactone (GBL) and 1,4-butanediol (1,4-BD). *Drug Testing and Analysis*, 3, pp. 417–425.

Wood, D. M., Warren-Gash, C., Ashraf, T., *et al.* (2008). Medical and legal confusion surrounding gamma-hydroxybutyrate (GHB) and its precursors gamma-butyrolactone (GBL) and 1, 4-butanediol (1, 4BD). *QJM*, pp. 23–29.

Yuan, C., Chen, D. e Wang, S., (2015). Drug confirmation by mass spectrometry: Identification criteria and complicating factors. *Clinica Chimica Acta*, 438, pp. 119–125.

Zvosec, D. L., Smith, S. W. e Hall, B. J. (2009). Three deaths associated with use of Xyrem®. *Sleep Medicine*, 10, pp. 490–493.