



INTRODUÇÃO

GHB

O ácido γ -hidroxi-butírico (GHB) é um componente endógeno dos tecidos de mamíferos, nomeadamente do tecido cerebral, sendo caracterizado como um hidróxiácido carboxílico de cadeia curta (Figura 1). O GHB foi inicialmente desenvolvido em 1960, como anestésico, tendo uma história de utilização médica de mais de 30 anos, tanto na Europa como nos EUA, onde foi inclusivamente vendido como suplemento dietético para culturistas, encontrando-se actualmente ainda na cadeia de consumo de substâncias ilegais desse meio desportivo. Devido aos seus efeitos "relaxantes", o GHB é utilizado como indutor do sono após o consumo de estimulantes, designadamente por indivíduos frequentadores de *rave parties*. Tornou-se também comum como uma *club drug*, sozinho ou associado ao álcool ou a outras drogas, tendo como objectivo prolongar o efeito dessas mesmas substâncias, nomeadamente MDMA, cocaína e metanfetaminas. Paralelamente, o GHB é também utilizado, associado ou não ao álcool, em casos de crimes sexuais.

A sua determinação em amostras biológicas torna-se fundamental, quer em indivíduos vivos, quer *post-mortem*, face ao aumento da utilização abusiva deste composto e às suas implicações médico-legais.

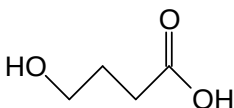


Figura 1 – Estrutura Química do GHB



Figura 2 – Padrão de GHB.



Figura 3 – Modo de consumo de GHB.

GC/MS/MS

Nos últimos anos, a aplicação e utilização de técnicas hífenadas nas ciências forenses, nomeadamente na Toxicologia Forense, tornou-se numa ferramenta fundamental para esta ciência, quer através da qualidade dos resultados atingidos, quer através dos novos horizontes analíticos que as sucessivas evoluções associadas a estas técnicas foram permitindo.

A capacidade de identificação de um composto, a confirmação inequívoca da sua presença numa determinada amostra biológica e, inclusivamente, a sua quantificação, com a possibilidade de obtenção de limites de detecção cada vez mais baixos, são, actualmente, as grandes armas que estas técnicas oferecem, fornecendo informação fiável a qualquer perito, favorecendo um diagnóstico médico-legal bem fundamentado.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem (GC-MS-MS) permite o cumprimento de todos estes pressupostos, fornecendo, portanto, resultados fiáveis e com elevada qualidade.

A escolha do Padrão Interno recaiu sobre o HCA (Ácido 6-hidroxicapríco), conforme sugerido pela literatura consultada (Figura 4).

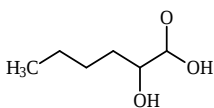


Figura 4 – Estrutura Química do HCA.

Figura 5 – Cromatógrafo Gasoso acoplado a espectrómetro de Massa tipo Triplo Quadrupolo.



MATERIAL E MÉTODOS

Os padrões analíticos utilizados foram os seguintes: GHB 1 mg/mL (LIPOMED) e HCA 10 g (SIGMA). O reagente de derivatização utilizado foi o BSTFA:TMCS (99:1) da Supelco. Para a extracção em fase sólida foram utilizadas as colunas OASIS MCX® (WATERS™). O equipamento analítico utilizado foi um GC-450 acoplado a um MS-300 (BRUKER – Figura 5). Os procedimentos de SPE testados estão descritos na tabela 1 e as condições da corrida cromatográfica estão descritas na tabela 2.

Tabela 1 – Sequências de Extracção em Fase Sólida testadas.

SPE 1	SPE 2	SPE 3	SPE 4	SPE 5
Metanol	Metanol	Metanol	Metanol	Metanol
H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
Secagem sob vácuo	Secagem sob vácuo	Lavagem com H ₂ O	Lavagem com H ₂ O	Lavagem com H ₂ O
Eluição:	Eluição:	Lavagem com	Lavagem com	Lavagem com
MetOH/CCOOH em	MetOH/CCOOH em	H ₂ O/MetOH/NH ⁴ OH	H ₂ O/MetOH/NH ⁴ OH	H ₂ O/MetOH/NH ⁴ OH
Acetonitrilo (10:90	Acetonitrilo (10:90	(94,5/5/0,5%)	(94,5/5/0,5%)	(94,5/5/0,5%)
v/v)	v/v)			
Lavagem com H ₂ O		Secagem sob vácuo	Secagem sob vácuo	Secagem sob vácuo
Lavagem com		Eluição:	Eluição:	Eluição:
H ₂ O/MetOH/NH ⁴ OH		MetOH/CCOOH em	MetOH/NH ⁴ OH	MetOH/CCOOH em
(94,5/5/0,5%)		Acetonitrilo (10:90	(95:5%)	Acetonitrilo (10:90
		v/v)		v/v)
Secagem sob vácuo				
Eluição:				Eluição:
MetOH/NH ⁴ OH				MetOH/NH ⁴ OH
(95:5%)				(95:5%)

Tabela 2 – Corrida Cromatográfica e parâmetros do MS.

Injector	Temperatura	250 °C
	Volume de Amostra	1 µL
	Modo de Injecção	Splitless
Coluna	Gás de arraste	Hélio
	Factor Four VF 5-MS	0,25 mm / 15 m / 0,25 µm
	Temperatura Inicial	60° C
Forno	Tempo Inicial	2 min
	Rampa de Temperatura 1	10°C/min
	Temperatura Final	120°C
	Rampa de Temperatura 2	30° C/min
	Tempo Final	2 min
	Tempo Total de Corrida	16 min
Espectrómetro de Massa	Linha de Transferência	280°
	Temperatura do Quadrupolo	150°C
	Temperatura da Fonte de Ionização	250°C
	Solvent Delay	7 min
	Fluxo de Gás de Colisão (Argon)	2,00 torr.
GHB	Ião Precursor 1	233
	Iões-produto 1	114 ; 141
	Ião Precursor 2	147
GHB	Iões-Produto 2	105 ; 131
HCA	Ião produto do Ião 159	103

RESULTADOS

A injeção e caracterização analítica dos padrões de GHB e HCA seguiu sempre a mesma sequência: injeção nas condições cromatográficas em modo SCAN, para caracterização espectral.

Após a avaliação dos espectros em SCAN, foram seleccionadas, para o GHB, duas possibilidades de iões precursores: Ião 233 e Ião 147.

O estudo do comportamento destes dois iões na célula de colisão do 2º quadrupolo implicou a verificação do seu comportamento de quebra numa gama de voltagens, entre os 5 e os 50 V, tendo a escolha final recaído nos 25 V para o Ião 147 e os 15 V para o Ião 233 (Tabela 2).

Para o HCA, o Ião precursor escolhido foi o 159, o qual, após a aplicação de uma voltagem na célula de colisão de 15V, traduziu-se no Ião-produto 103.

A aplicação dos diversos procedimentos de extracção descritos a amostras fortificadas numa concentração de 500 ng/mL e amostras brancas (250 µL) conduziu aos cromatogramas representados nas figuras 6 a 9.

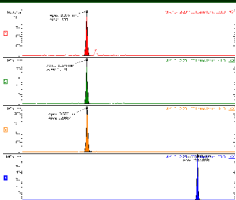


Figura 6 – Espectro de amostra positiva para GHB e HCA. Ião-precursor: 233

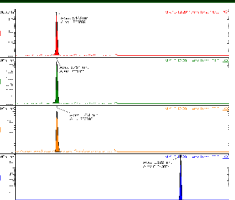


Figura 7 – Espectro de amostra positiva para GHB e HCA. Ião-precursor: 147

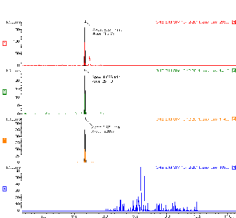


Figura 8 – Espectro de amostra positiva para GHB. Note-se a negatividade no HCA.

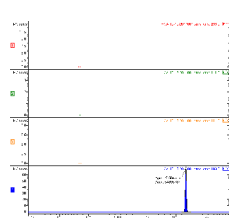


Figura 9 – Espectro de amostra positiva para HCA. Note-se a negatividade no GHB.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados preliminares obtidos sugerem a possibilidade de selecção do Ião-precursor 147, já que tanto este como os Iões-produto (105 e 131) apresentaram sinais analíticos mais intensos do que o Ião-precursor 233 e os respectivos Iões-produto.

A comparação dos sinais analíticos das amostras positivas com os sinais analíticos das amostras negativas permitiu também uma distinção total ao nível dos mesmos, sugerindo bons resultados ao nível da especificidade, selectividade e capacidade de identificação.

Desse modo, a validação dos parâmetros quantitativos afigura-se agora como o passo a seguir, bem como a optimização do procedimento de extracção a partir das hipóteses testadas. Os resultados mais coerentes apontam para a optimização dos métodos SPE 2 e SPE 5, no sentido de se tentar obter um extracto mais limpo, que permita melhorar os sinais analíticos e minorar as interferências de matriz.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.