

**Perfil Metabólico de Catinonas Sintéticas *in vitro*:
Identificação de metabolitos de Fase I por
Espectrometria de Massa de Alta Resolução**

Ana Margarida Alves Figueira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química

Dissertação orientada por:

Prof. Alexandra Maria Moita Antunes

Prof. Helena Margarida Guerreiro Galla Gaspar

Júri:

Presidente de júri: Prof. Dr^a. Maria Matilde Soares Duarte Marques

Vogais: Prof. Dr^a. Alexandra Maria Moita Soares

Prof. Dr^a. Noélia Maria da Silva Dias Duarte

Janeiro 2021

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à Professora Alexandra Antunes e à Professora Helena Gaspar toda a paciência e disponibilidade demonstrada durante esta última etapa do meu percurso académico.

Agradeço também a todos os meus amigos que permitiram que durante estes anos no IST eu tivesse momentos incríveis e, conseqüentemente memórias inesquecíveis, vocês sabem quem são.

Não poderia deixar de agradecer às minhas melhores amigas Inês Teodoro e Mariana Chichkova, por toda a paciência e flexibilidade para conseguirmos estar juntas, mesmo em condições por vezes duvidosas mantendo esta amizade espetacular.

Quero agradecer ao Bernardo Lopes por todo o apoio que sempre me deu, por ter sido a minha paz e a minha alegria durante tempos mais difíceis, e por ser a minha companhia de todas as ocasiões.

Por último, mas muito importante quero agradecer à minha família, à minha Mãe, ao meu Irmão Zé, ao meu Pai, ao meu irmão Lourenço, aos meus avós Raul e Fátima, e aos meus Tios Zé Hugo e Helenice e ao meu primo Rodrigo por serem o meu maior e mais fiel apoio durante todas as alturas da minha vida.

Resumo

O presente trabalho foi realizado no âmbito do protocolo estabelecido entre o Instituto Superior Técnico, a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e o Laboratório da Polícia Científica da Polícia Judiciária, que visa a identificação e análise de Novas Substâncias Psicoativas (NSP) em Portugal.

O objetivo deste trabalho foi a identificação do perfil metabólico das catinonas 4'-Metil-*N*-etilnorbufedrona (4-MNEB), 4'-Metil-*N,N*-dimetilnorpentedrona (4-MDMP), 4'-Metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (4-MDMB) e 4'-Metil-*N*-etilnorpentedrona (4-MNEP). Das catinonas mencionadas apenas a 4-MNEP já foi reportada no Luxemburgo em 2014. As catinonas 4-MDMB e 4-MNEP encontram-se à venda como padrão na *Cayman Chemical*. No entanto, tal como as catinonas 4-MDMP e 4-MNEB, nunca foi reportada a utilização da catinona 4-MDMB como NSP. No entanto, a semelhança estrutural com outras catinonas já reportadas faz antever a sua introdução no mercado das NSP como altamente provável.

Os metabolitos destas catinonas foram gerados em sistemas *in vitro* metabolicamente competentes - microssomas de fígado humano (HLM), de fígado de rato (RLM), fração S9 de fígado humano (S9H) e fração S9 de fígado de rato (S9R). Estas incubações foram realizadas na presença dos cofatores de Fase I e de Fase II, e os metabolitos gerados foram identificados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria e massa de alta resolução.

Esta estratégia possibilitou a identificação, pela primeira vez, de dois metabolitos de Fase I da catinona 4-MNEB, três metabolitos de Fase I da catinona 4-MDMP e três metabolitos de Fase I da catinona 4-MDMB. Estes resultados poderão auxiliar as autoridades competentes a validar o consumo destas catinonas em amostras biológicas através da identificação dos metabolitos caracterizados no âmbito do presente estudo.

Palavras-chave: NSP; microssomas; metabolitos; LC-ESI-HRMS; catinonas sintéticas.

Abstract

The present work was carried out within the scope of the protocol established between the Instituto Superior Técnico, the Faculty of Sciences of the University of Lisbon and the Scientific Police Laboratory of the Judicial Police, which encompasses the identification and analysis of New Psychoactive Substances (NPS) in Portugal in multiple matrices.

This work was aimed at identifying the metabolic profiles of four synthetic cathinones: 4'-Methyl-*N*-ethylnorbufedrone (4-MNEB), 4'-Methyl-*N,N*-dimethylnorpentedrone (4-MDMP), 4'-Methyl-*N,N*-dimethylnorbufedrone (4-MDMB) and 4'-Methyl-*N*-ethylnutrentedrone (4-MNEP). Of the cathinones mentioned, only 4-MNEP was reported in Luxembourg in 2014. The 4-MDMB and 4-MNEP cathinones are available as standard from Cayman Chemical. However, similarly with 4-MDMP and 4-MNEB, 4-MDMB has never been reported as NPS. Nonetheless, their structural similarity with other NPS establishes their introduction in the NPS market as highly probable.

The metabolites were generated in metabolically competent *in vitro* systems: human liver (HLM), rat liver (RLM), S9 fraction of human liver (S9H) and S9 fraction of rat liver (S9R) microsomes. These incubations were performed in the presence of Phase I and Phase II cofactors. The metabolites generated were subsequently identified by LC-ESI-HRMS.

This strategy allowed the first hand identification of two Phase I metabolites of 4-MNEB, three Phase I metabolites of 4-MDMP and three Phase I metabolites of 4-MDMB, which are expected help the competent authorities to validate the consumption of these cathinones upon the identification of their metabolites in biological samples.

Keywords: NSP; microsomes; metabolites; LC-ESI-HRMS; synthetic cathinones.

Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice de Esquemas	vii
Índice de Figuras	viii
Lista de abreviaturas	ix
1. Introdução	1
1.1. Novas Substâncias Psicoativas	2
1.1.1. Regulamentações e Políticas sobre as NSP	4
1.2. Catinonas Sintéticas.....	6
1.2.1. Catinonas sintéticas: Farmacodinâmica e Farmocinética	8
1.2.2. O metabolismo de catinonas	9
1.3. Objetivos	14
2. Parte experimental.....	15
2.1. Materiais e Métodos	15
2.1.1. Reagentes e solventes	15
2.1.2. Soluções	15
2.2. Técnicas e Equipamentos	16
2.3. Métodos para a geração de metabolismos de Fase I e Fase II <i>in vitro</i>	17
2.3.1. Reações de Fase I	17
2.3.1.1. Incubações das catinonas em microsomas de fígado de humano e de fígado de rato.....	17
2.3.1.2. Incubações das catinonas na fração S9 de fígado humano e de rato	18
2.3.2. Reações de Fase II	18
2.3.2.1. Incubações das catinonas em microsomas de fígado de humano e de fígado de rato.....	18
2.3.2.2. Incubações das catinonas nas frações S9 de fígado humano e de rato.....	19
3. Resultados e discussão.....	21
3.1. Identificação de metabolitos de catinonas sintéticas <i>in vitro</i>	21
3.1.1. Identificação de metabolitos da catinona alfa-pirrolidinovalerofenona (α -PVP).....	23
3.1.2. Identificação de metabolitos da catinona 4 ¹ -Metil-N-etilnorbufedrona (4-MNEB).....	27
3.1.3. Identificação de metabolitos da catinona 4 ¹ -Metil-N,N-dimetilnorpentedrona (4-MDMP)....	31
3.1.4. Identificação de metabolitos da catinona 4 ¹ -Metil-N,N-dimetilnorbufedrona (4-MDMB).....	35
3.1.5. Identificação de metabolitos da catinona 4 ¹ -Metil-N-etilnorpentedrona (4-MNEP).....	39
4. Conclusão	42
5. Referências.....	43
6. Anexos.....	50
6.1. Anexo I – Vias metabólicas plausíveis de Fase I e Fase II (glucoronidação) das catinonas selecionadas para este estudo: α -PVP, 4-MNEB, 4-MDMP, 4-MDMB e 4-MNEP.....	50
6.2. Anexo II – Espectros <i>full scan</i> e MS/MS das catinonas α -PVP, 4-MNEB, 4-MDMP, 4-MDMB e 4-MNEP, e respectivos metabolitos identificados no presente estudo.....	55

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Quantidades utilizadas para a preparação das soluções padrão de catinonas utilizadas nas incubações.	15
Tabela 2 - Condições experimentais utilizadas nas incubações das catinonas em microsomas de fígado de rato e de fígado humano, na presença do cofator de Fase I.	17
Tabela 3 - Condições experimentais utilizadas nas incubações das catinonas em frações S9 de fígado humano e de rato, na presença do cofator de Fase I.	18
Tabela 4 - Condições experimentais utilizadas nas incubações das catinonas em microsomas de fígado humano e de rato, na presença do cofator de Fase II.	19
Tabela 5 - Condições experimentais utilizadas nas incubações das catinonas em frações S9 de fígado humano e de rato, na presença do cofator de Fase II.	20
Tabela 6 - Condições de incubação in vitro em HLM, RLM, S9H e S9R para a deteção de metabolitos de Fase I e Fase II.	22
Tabela 7 – Tempo de retenção e valores de m/z experimentais para a molécula protonada e para os iões fragmento característicos (apresentados com o erro associado em ppm) para a catinona α -PVP e para os seus metabolitos identificados em incubações com HLM, RLM, S9H e S9R.	24
Tabela 8 -Tempo de retenção e valores de m/z experimentais para a molécula protonada e para os iões fragmento característicos (apresentados com o erro associado em ppm) para a catinona 4-MNEB e para os seus metabolitos identificados em incubações com HLM, RLM, S9H e S9R.	28
Tabela 9 - Tempo de retenção e valores m/z experimentais para a molécula protonada e para os iões fragmento característico (apresentados com o erro associado em ppm) para a catinona 4-MDMP e para os seus metabolitos identificados em incubações com HLM, RLM, S9H e S9R.	32
Tabela 10 - Tempo de retenção e valores m/z experimentais para a molécula protonada e para os iões fragmento característico (apresentados com o erro associado em ppm) para a catinona 4-MDMB e para os seus metabolitos identificados em incubações com HLM, RLM, S9H e S9R.	36
Tabela 11 - Tempo de retenção e valores m/z experimentais para a molécula protonada e para os iões fragmento característico (apresentados com o erro associado em ppm) para a catinona 4-MDMB e para os seus metabolitos identificados em incubações com HLM, RLM, S9H e S9R.	40

Índice de Esquemas

Figura 1 - Número de NSP notificadas pela primeira vez ao Mecanismo de Alerta Rápido da UE, entre 2008 e 2019 [2].	3
Figura 2 - Apreensões notificadas ao Mecanismo de Alerta Rápido da UE: tendências do número total de apreensões e número de apreensões por categoria em 2018 [2].	3
Figura 3 - Novos procedimentos acelerados da UE para identificar e responder às NSP que surgem na EU [7].	5
Figura 4 - Estrutura química da catinona, anfetamina, metanfetamina e MDMA.	6
Figura 5 - Estrutura química base das catinonas sintéticas, com exemplo de regiões de inserção de variados substituintes.	6
Figura 6 – Estrutura química da 3-CMC e 4-CMC.	7
Figura 7 - Estrutura das catinonas sintéticas α -PVP, 4-MDMP, 4-MDMB, 4-MNEP e 4-MNEB.	14
Figura 8 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) da catinona α -PVP.	55
Figura 9 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M1- α -PVP.	55
Figura 10 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M6- α -PVP.	56
Figura 11 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M7- α -PVP.	56
Figura 12 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) da catinona 4-MNEB.	57
Figura 13 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M1-4-MNEB.	57
Figura 14 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M2-4-MNEB.	58
Figura 15 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) da catinona 4-MDMP.	58
Figura 16 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M1-4-MDMP.	59
Figura 17 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M2-4-MDMP.	59
Figura 18 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M7-4-MDMP.	60
Figura 19 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) da catinona 4-MDMB.	60
Figura 20 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M1-4-MDMB.	61
Figura 21 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M2-4-MDMB.	61
Figura 22 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M6-4-MDMB.	62
Figura 23 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) da catinona 4-MNEP.	62

Índice de Figuras

Figura 1 - Número de NSP notificadas pela primeira vez ao Mecanismo de Alerta Rápido da UE, entre 2008 e 2019 [2].	3
Figura 2 - Apreensões notificadas ao Mecanismo de Alerta Rápido da UE: tendências do número total de apreensões e número de apreensões por categoria em 2018 [2].	3
Figura 3 - Novos procedimentos acelerados da UE para identificar e responder às NSP que surgem na EU [7].	5
Figura 4 - Estrutura química da catinona, anfetamina, metanfetamina e MDMA.	6
Figura 5 - Estrutura química base das catinonas sintéticas, com exemplo de regiões de inserção de variados substituintes.	6
Figura 6 – Estrutura química da 3-CMC e 4-CMC.	7
Figura 7 - Estrutura das catinonas sintéticas α -PVP, 4-MDMP, 4-MDMB, 4-MNEP e 4-MNEB.	14
Figura 8 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) da catinona α -PVP.	55
Figura 9 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M1- α -PVP.	55
Figura 10 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M6- α -PVP.	56
Figura 11 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M7- α -PVP.	56
Figura 12 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) da catinona 4-MNEB.	57
Figura 13 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M1-4-MNEB.	57
Figura 14 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M2-4-MNEB.	58
Figura 15 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) da catinona 4-MDMP.	58
Figura 16 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M1-4-MDMP.	59
Figura 17 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M2-4-MDMP.	59
Figura 18 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M7-4-MDMP.	60
Figura 19 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) da catinona 4-MDMB.	60
Figura 20 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M1-4-MDMB.	61
Figura 21 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M2-4-MDMB.	61
Figura 22 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M6-4-MDMB.	62
Figura 23 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) da catinona 4-MNEP.	62

Lista de abreviaturas

3-CMC	3-clorometcatinona
4-CMC	4-clorometcatinona
4-MNEB	4'-Metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (ou 4'-metil- α -etilaminobutiofenona)
4-MDMP	4'-Metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona
4-MDMB	4'-Metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona
4-MNEP	4'-Metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (ou 4'-metil- α -etilaminopentiofenona, 4-MEAP)
α-PVP	Alfa-pirrolidinovalerofenona do inglês <i>alpha-pyrrolidinovalerophenone</i>
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Transporte
CC	Controlo catinona
CHD	Controlo de desnaturação
CNADPH	Controlo de NADPH
CYP	Citocromo P450
DDA	Análise dependente de dados do inglês <i>Data dependent analysis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico do inglês Deoxyribonucleic acid
EMCDDA	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, do inglês <i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>
ESI	<i>Electrospray</i>
ESPAD	Projeto Europeu de Inquérito às Escolas Europeias sobre Álcool e Outras Drogas
EU	União Europeia, do inglês <i>European Union</i>
EUROPOL	Serviço Europeu de Polícia, do inglês <i>European Union's Law Enforcement Agency</i>
EWS	Sistema de Alerta Rápido, do inglês <i>Early Warning System</i>
FCUL	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
FIA	Análise por injeção de fluxo do inglês <i>Flow Injection Analysis</i>
FMO	Flavina-monooxigenase
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espetrometria de Massa, do inglês <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
GSH	Glutaciona na forma reduzida
GST	Glutacionatranferase
HLM	Microssomas de fígado de humano, do inglês <i>Human Liver Microsome</i>
HRMS-ESI(+)	Espetrometria de massa de alta resolução com ionização por Electrospray em modo positivo
INML-CF	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses
IST	Instituto Superior Técnico
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espetrometria de Massa, do inglês <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LPC-PJ	Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária

MDMA	3',4'-metilenodioximetanfetamina (<i>ecstasy</i>)
min	Minuto(s)
MS	Espectrometria de Massa, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
m/z	Razão Massa/Carga
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NSP	Nova(s) Substância(s) Psicoativa(s)
NRS	Sistema regenerador, do inglês <i>Vivid Regeneration System</i>
PAPS	Adenosina 3'-fosfato 5'-fosfossulfato
ppm	Partes por Milhão
QTOF	Quadrupolo-tempo de voo
REITOX	Rede Europeia de Informação sobre Droga e Toxicodependência
RLM	Microssomas de fígado de rato, do inglês <i>Rat Liver Microsome</i>
S9R	Fração S9 de fígado de rato
S9H	Fração S9 de fígado humano
SICAD	Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências
SNC	Sistema Nervoso Central
SULT	Sulfonação
t_R	Tempo de retenção
UDPGA	Sal trissódico do ácido uridina 5'-difosfoglucurônico
UGT	5'-difosfo-glucuronosiltransferase de uridina
UGT	5'-difosfo-glucuronosiltransferase de uridina

1. Introdução

Nos últimos 20 anos o mercado de drogas de abuso sofreu uma grande alteração com o aparecimento e introdução contínua no mercado de uma vasta variedade de Novas Substâncias Psicoativas (NSP).

As NSP possuem um mercado dinâmico, global, adaptado e diversificado, o que se traduz numa constante mudança em relação às substâncias que são disponibilizadas e a uma rápida distribuição, atingido o mercado global de forma eficiente graças à internet. Assim, é necessário que sejam tomadas medidas que visem mitigar o avanço e rápida distribuição destas substâncias. A nível Europeu as NSP são monitorizadas através do Mecanismo de Alerta Rápido (EWS) operado pelo Observatório Europeu da Droga e Toxicodependência (EMCDDA) em estrita colaboração com o serviço europeu de polícia (Europol) [1]. No ano de 2019 foram notificadas 53 NSP pela primeira vez ao EWS, tendo o EMCDDA até ao final desse ano monitorizado cerca de 790 NSP [2]. O EWS proporciona uma rápida troca de informação sobre NSP entre os estados-membros e prevê uma avaliação dos riscos associados ao seu consumo [1]. Portugal encontra-se representado no EWS através do Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD) [1]. A monitorização destas substâncias a nível nacional é da responsabilidade de duas entidades públicas – o Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC-PJ) e o Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INML-CF). Ao LPC-PJ cumpre o objetivo de identificar drogas e outras substâncias potencialmente tóxicas em material apreendido em Portugal, enquanto que o INML-CF, por sua vez, analisa também este tipo de substâncias, mas em matrizes biológicas [3,4].

Deste modo, no contexto da toxicologia forense é importante conseguir identificar as NSP não só em produtos apreendidos, mas também em matrizes biológicas, sendo nestas últimas também relevante a identificação dos respetivos metabolitos, pois a maioria das NSP são rapidamente metabolizados para que possam ser excretadas do organismo.

Ao invés das drogas controladas, para as quais já existem inúmeros estudos sobre a sua identificação e quantificação em diferentes matrizes, bem como da sua toxicidade, são escassos os de NSP, desde logo porque a velocidade a que entram no mercado dificultam uma reposta rápida por parte das entidades competentes [5].

Assim, torna-se urgente que se ampliem os estudos de identificação de NSP e respetivos metabolitos para que seja possível o seu controlo de uma forma rápida e eficaz não só para fins forenses, mas também para o contexto hospital, onde em caso de intoxicação é crucial a identificação do agente causador da toxicidade para que seja possível aplicar a terapia adequada [5].

1.1. Novas Substâncias Psicoativas

Segundo a Diretiva (UE) 2017/2103, as novas substâncias psicoativas são, “novas substâncias na forma pura ou numa preparação (uma mistura que contém uma ou mais substâncias psicoativas) que não se encontram abrangidas na lista de substância controladas pela Convenção Única de Estupefacientes de 1961, alterada pelo Protocolo de 1972, nem pela Convenção das Substâncias Psicotrópicas de 1971, mas que podem representar riscos sociais ou para a saúde semelhantes aos colocados pelas substâncias que se encontram abrangidas nas supracitadas Convenções das Nações Unidas”[6].

O termo “novas” não significa que as substâncias foram sintetizadas e/ou inventadas recentemente, mas que são substâncias que apareceram recentemente no mercado de drogas de abuso, onde se podem incluir também alguns fármacos psicoativos quando utilizados de forma imprópria [1,5].

As NSP representam uma ampla diversidade de compostos tais como, catinonas sintéticas, canabinóides sintéticos, benzodiazepínicos, opióides, alucinogénios, estimulantes e dissociativos [7]. As catinonas sintéticas e os canabinóides sintéticos são as substâncias mais preponderantes dentro das NSP comercializadas nos mercados de substâncias ilícitas [8].

Estas NSP podem ser produtos naturais (plantas, sementes ou extratos) ou sintéticos e são geralmente comercializadas como *legal highs*, *herbal highs/ dietary supplements*, *research chemicals* (substâncias químicas de investigação), *party pills* (drogas recreativas) ou *designer drugs* (drogas de síntese) [1]. Sendo que as três categorias principais são as *legal highs*, *research chemicals* e *dietary supplements*. As *legal highs* são comercializadas em embalagens coloridas sugestivas com nomes de substâncias controladas ou de efeitos psicoativos, já as *research chemicals* são, normalmente, rotuladas como reagente laboratorial, enquanto que as *dietary supplements* são comercializadas como produtos naturais e promovidas como opções saudáveis e seguras [2].

As NSP atualmente sintetizadas visam mimetizar ou até melhorar os efeitos das drogas de abuso já existentes e controladas pelas Convenções das Nações Unidas. Apresentando-se com uma estrutura química diferente ou ligeiramente alterada, as NSP contornam as restrições, e são as alternativas legais para os consumidores [1,7,8]. Estas exibem avisos de que não são próprias para consumo humano ou de que apenas servem para fins de pesquisa, permitindo assim aos fornecedores das NSP evitar as leis de defesa do consumidor [9].

O fenómeno das NSP revela-se emergente, dinâmico e flexível no qual à medida que é exercido controlo sob as novas substâncias vão surgindo variantes das mesmas [1]. Apesar de o número de NSP reportadas ao Mecanismo de Alerta Rápido da UE estar tendencialmente a decrescer comparativamente a anos anteriores a produção de drogas sintéticas na Europa aparentemente encontra-se a crescer, a diversificar-se e a tornar-se mais inovadora de acordo com os dados recentes que revelam um aumento nas apreensões de precursores químicos (Figura 1) [2].

NÚMERO E CATEGORIAS DE NOVAS SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS NOTIFICADAS PELA PRIMEIRA VEZ AO MECANISMO DE ALERTA RÁPIDO DA UE, 2008–19

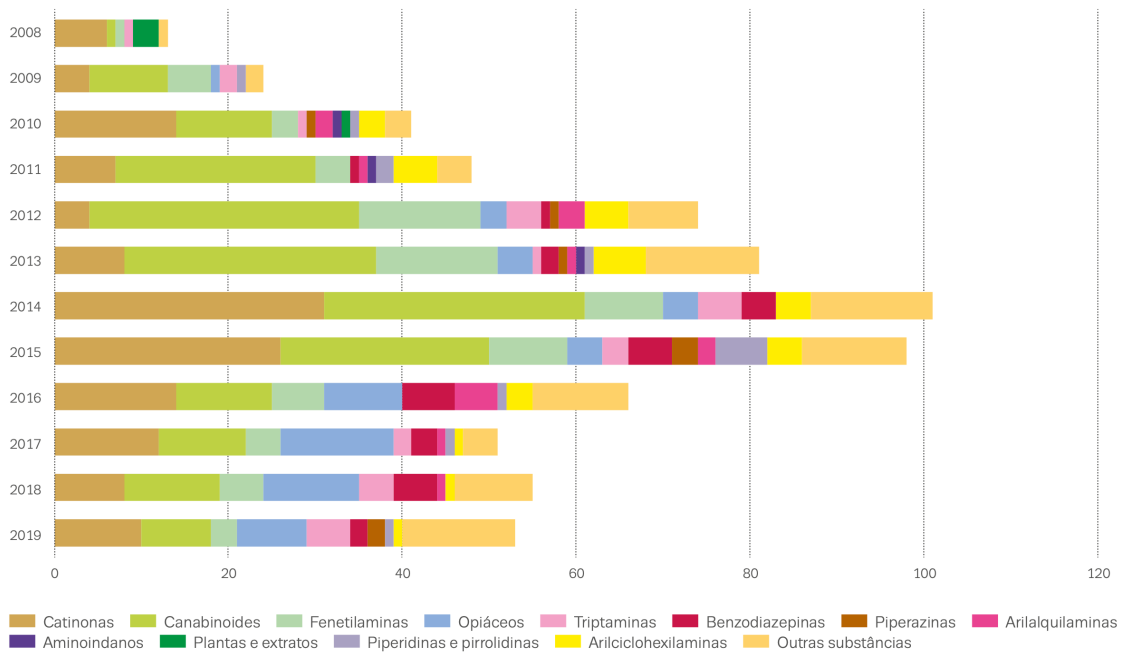


Figura 1 - Número de NSP notificadas pela primeira vez ao Mecanismo de Alerta Rápido da UE, entre 2008 e 2019 [2].

Na Europa em 2018, as apreensões de NSP foram essencialmente dominadas pelos catinonas sintéticas e canabinóides sintético (Figura 2) [2].

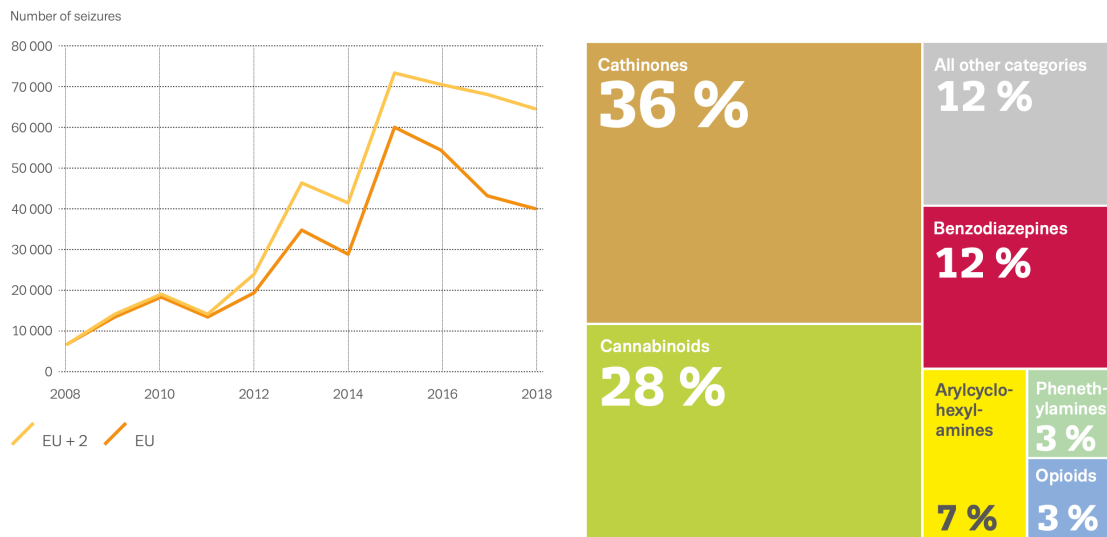


Figura 2 - Apreensões notificadas ao Mecanismo de Alerta Rápido da UE: tendências do número total de apreensões e número de apreensões por categoria em 2018 [2].

A partir do ano de 2008 verificou-se um grave crescimento no mercado das NSP que se deve à globalização e às novas tecnologias, como a internet, que permitiram que estas fossem produzidas, vendidas e distribuídas à escala industrial. Como se pode verificar a partir da Figura

2, o pico verificou-se em 2015 e desde então tem-se verificado um abrandamento das apreensões de NSP devido aos esforços dos vários países tanto da UE como os países que são os maiores fornecedores (China e Índia) em aplicar medidas e legislação cada vez mais eficaz no sentido de diminuir as NSP em circulação [2].

Apesar do decréscimo na notificação de NSP estas continuam a apresentar sérias ameaças à saúde individual e pública da população. Isto é evidenciado pelo número de NSP potentes que aparecem no mercado e os relatórios associados de emergências e overdoses [2]. Estas NSP têm surgido cada vez mais potentes e, naturalmente, apresentam maior risco de intoxicação e possível overdose dos consumidores por sobredosagem involuntária. Este risco é especialmente grande quando as substâncias são novas no mercado e, portanto, há um desconhecimento geral por parte dos consumidores. É, também, igualmente problemático quando estas NSP são vendidas como se fossem outras drogas ilícitas como o MDMA, a cocaína, as anfetaminas ou a heroína. Esta situação acontece quando estas drogas ilícitas se encontram escassas no mercado, e conseqüentemente os consumidores não têm conhecimento de que estão a consumir NSP. Um exemplo prático é o carfentanil que foi vendido como heroína em partes da UE em 2017, e resultou em várias intoxicações graves e overdoses [7].

Em Portugal, segundo os dados mais recentes do Projeto Europeu de Inquérito às Escolas Europeias sobre Álcool e Outras Drogas (ESPAD) realizado em 35 países, os estudantes portugueses apresentam um consumo ao longo da vida de NSP muito abaixo da média europeia (com base em dados de 35 países) [10].

A despeito desta atual ameaça por parte das NSP as entidades não possuem capacidade para detetar e comunicar o consumo de NSP e as conseqüências do mesmo, visto que estas criam um contexto político difícil para a conceção e implementação de respostas eficazes, devido à sua natureza altamente dinâmica e diversificada [7].

1.1.1. Regulamentações e Políticas sobre as NSP

Na prática quando é notificada uma NSP no mercado europeu através do mecanismo de alerta rápido os estados-membros asseguram a transmissão de informação sobre o seu fabrico, tráfico e consumo ao EMCDDA e à Europol através das instituições nacionais da Rede Europeia de Informação sobre Drogas e Toxicodependência (REITOX) e das unidades nacionais da Europol [1].

A legislação atualmente aplicada em Portugal para o controlo de NSP: o Decreto-lei nº 15/1993, de 22 de Janeiro na redação da 27ª versão que revê a legislação de combate à droga e pelo Decreto-lei nº 54/2013, 17 de abril que define o regime jurídico de prevenção e proteção contra a publicidade e comércio das NSP já conhecidas e de outras que surjam no mercado, proibindo a sua produção, importação, exportação, publicidade, distribuição, venda, detenção, ou disponibilização, prevê ainda a possibilidade das autoridades de saúde territorialmente competentes determinarem o encerramento dos estabelecimentos, ou outros locais abertos ao público, ou ainda a suspensão da atividade para os fins considerados de grave risco para a saúde

pública no âmbito das NSP [11]; e pela Portaria n.º 154/2013 de 17 de abril que aprova a lista de NSP a que se refere o Artigo 3.º do Decreto-lei nº54/2013, de 17 de abril, tornando-as ilícitas [12]. Nesta lista encontram-se contempladas 159 substâncias das quais 34 são catinonas sintéticas [1].

Na UE há um quadro jurídico cujo objetivo é ter uma resposta e possível mitigação face às NSP. Este quadro jurídico inclui três etapas: a deteção e elaboração de relatórios iniciais, a avaliação de riscos e a resposta perante as ameaças sociais e à saúde pública e individual que as NSP provocam através de medidas de controlo. Sendo que o EMCDDA, o Mecanismo de Alerta Rápido da UE e a Europol são responsáveis pelas primeiras duas etapas do processo, ou seja, pela deteção e avaliação das NSP e, posteriormente a Comissão Europeia, o Conselho da UE e o Parlamento Europeu são responsáveis pela terceira e última etapa, elaboram assim respostas através de medidas de controlo às NSP. A legislação aplicada inclui o Regulamento da UE 2017/2101 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de novembro de 2017, que altera o Regulamento da CE nº 1920/2006 no que diz respeito ao intercâmbio de informações, a um sistema de alerta rápido e a uma avaliação de riscos da NSP [7, 13]. E inclui, ainda uma nova legislação aplicada na Europa desde 23 de novembro de 2018, na qual é mantida a abordagem de três etapas supracita, reforçando simultaneamente a aceleração e simplificação dos processos com a aplicação de prazos muito curtos para a aprovação e implementação das medidas de controlo, 2 e 6 meses, respetivamente (Figura 3) [7].

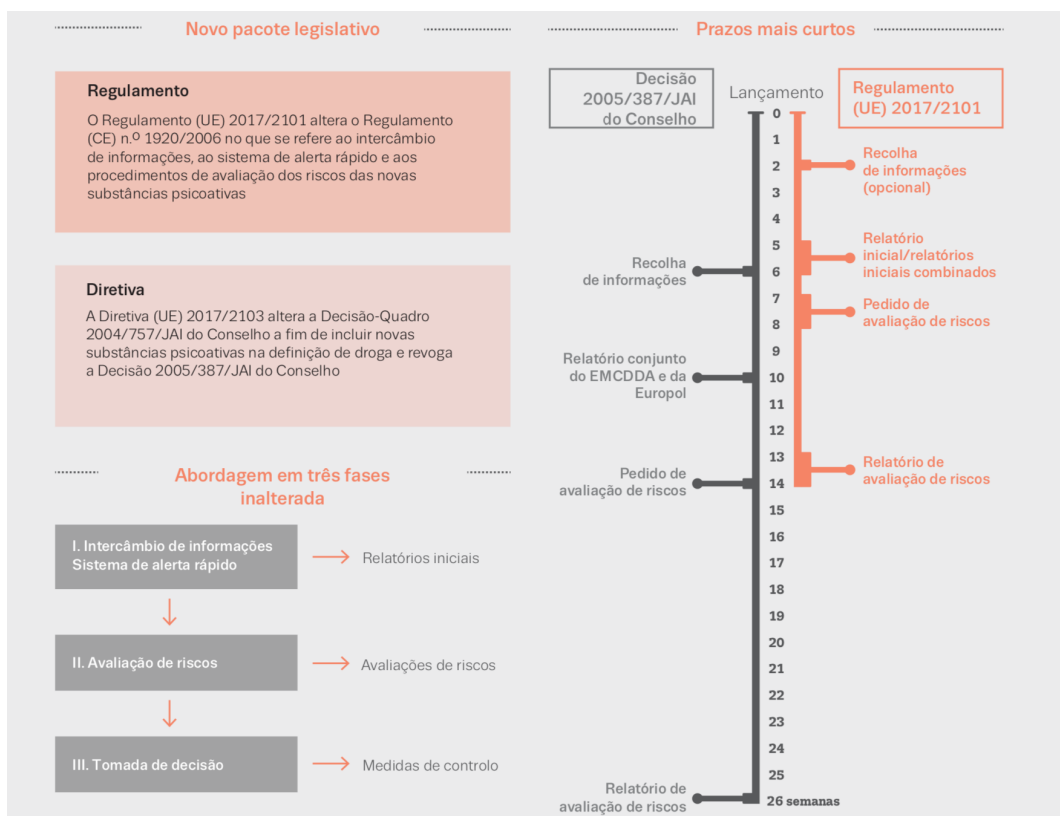


Figura 3 - Novos procedimentos acelerados da UE para identificar e responder às NSP que surgem na UE [7].

1.2. Catinonas Sintéticas

A catinona [(S)-2-amino-1-fenil-1-propanona] é uma β -ceto-feniletilamina ou β -ceto-anfetamina, uma vez que a sua estrutura possui uma cetona na posição β da cadeia aminada, ligada ao anel aromático. A catinona, um alcaloide natural com propriedades psicoativas, é a principal substância estimulante presente nas folhas e caules frescos da planta *Catha edulis* [14,15]. As catinonas sintéticas são substâncias psicoestimulantes análogas da catinona, sintetizadas propositalmente para a obtenção de compostos legais com efeitos estimulantes semelhantes a diversas drogas controladas tais como as anfetaminas, cocaína, MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina, *ectasy*) e metanfetaminas (Figura 4) [9,16,17].

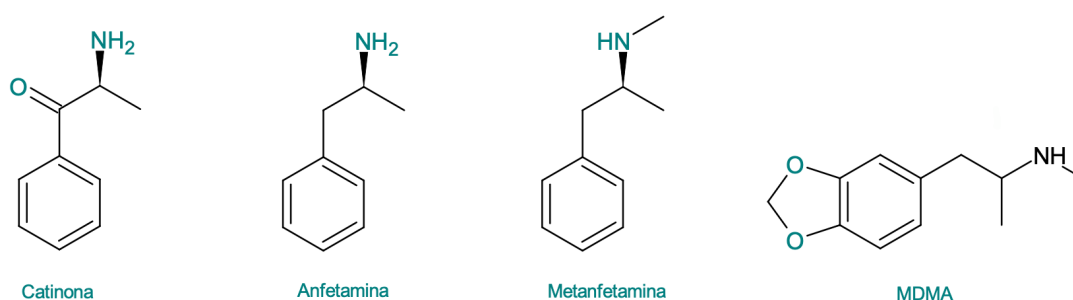


Figura 4 - Estrutura química da catinona, anfetamina, metanfetamina e MDMA.

As catinonas sintéticas, devido à sua semelhança estrutural com as anfetaminas e análogos (Figura 4), foram inicialmente sintetizadas para fins terapêuticos [18].

As catinonas sintéticas tal como as anfetaminas possuem na sua estrutura química um centro quiral, ou seja, existem sob a forma de dois enantiômeros *S* e *R*. A catinona presente na *Catha edulis forsk* apresenta-se só sob a forma de enantiômero *S*. No caso das catinonas sintéticas, estas apresentam-se, geralmente sob a forma de misturas racêmicas, uma vez que estas substâncias são sintetizadas a partir de processos baratos que não são estereoseletivos [19].

A metilona, um análogo do MDMA, foi a primeira catinona sintética reportado ao EMCDDA em 2005 [20]. A partir desta data o mercado cresceu e diversificou-se com relativa facilidade, surgindo assim a maior parte das catinonas sintéticas, sintetizadas através da adição de variados substituintes em diferentes locais da molécula de catinona, como é ilustrado na Figura 5.

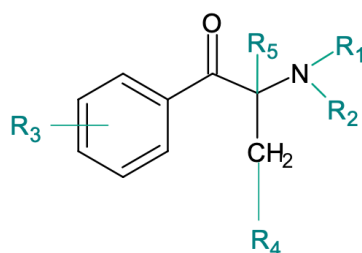


Figura 5 - Estrutura química base das catinonas sintéticas, com exemplo de regiões de inserção de variados substituintes.

Rapidamente a popularidade das catinonas sintéticas aumentou, o que se deve a diversos fatores, tais como, os fortes efeitos estimulantes (semelhantes aos das anfetaminas e cocaína), a facilidade de acesso devido à globalização e conseqüentemente à internet, o baixo preço quando comparado com outras drogas que produzam o mesmo efeito e o facto de algumas das catinonas sintéticas ainda não serem controladas [21].

As catinonas sintéticas representam atualmente a segunda maior classe de NSP monitorizadas pelo EMCDDA, tendo sido reportadas mais de 138 catinonas sintéticas até dezembro de 2019, das quais 10 foram reportadas pela primeira vez em 2019 (Figura 1). Apesar da dinâmica altamente rápida deste mercado o número de catinonas sintéticas novas reportadas a cada ano está a decrescer (Figura 2) [2, 7].

O controlo de catinonas sintéticas (e das outras NSP) é particularmente difícil, uma vez que há possibilidade de uma constante modificação da estrutura química com relativa facilidade de síntese laboratorial. Isto permite que surjam no mercado novos análogos estruturalmente modificados contornando as lacunas legislativas, visto que surgem novas catinonas sintéticas (e outras NSP) alternativas às que se encontram controladas legalmente [14, 22, 23, 24].

Estruturalmente existem variadas semelhanças entre todas as catinonas sintéticas, pelo que a sua identificação é difícil e exige técnicas como a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GS-MS) ou Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS). Com estas técnicas torna-se possível ter em conta os vários isómeros estruturais e respetivos metabolitos, o que permite a correta identificação das catinonas sintéticas [18].

Em 2019 as catinonas sintéticas mais apreendidas na UE foram a 3-CMC e 4-CMC (Figura 6) [2].

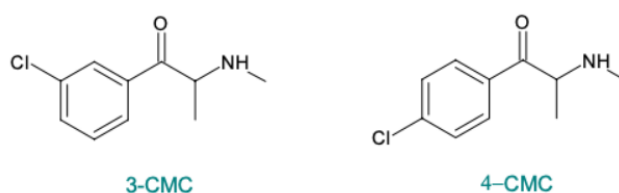


Figura 6 – Estrutura química da 3-CMC e 4-CMC.

As catinonas sintéticas costumam ser consumidas de diversas formas, sendo as mais comuns por injeção, inalação nasal, via oral (ingestão, via gengival ou sublingual) ou através de fumar [14, 16, 19, 22, 25, 26].

Nos 27 hospitais da Europa controlados pelo Euro-DEN Plus foram identificadas cerca de 80 intoxicações relacionadas com catinonas sintéticas em 2018. Outro risco inerente ao uso destas

substâncias, quando injetadas, são os surtos localizados de HIV entre populações marginalizadas. [2]

Assim, é urgente que os laboratórios precisam de desenvolver metodologias analíticas e quantitativas confiáveis e criar padrões de referência para a detecção de catinonas sintéticas e respetivos metabolitos em matrizes biológicas, para que se consiga vincular a toxicidade a agentes causadores e auxiliar na identificação destas substâncias nos casos de suspeita de consumo e *postmortem* [28].

1.2.1. Catinonas sintéticas: Farmacodinâmica e Farmocinética

As catinonas sintéticas exercem o seu efeito psicoestimulante através do aumento da concentração sináptica dos neurotransmissores dopamina, noradrenalina e serotonina. As catinonas podem inibir as recaptações destes neurotransmissores através da interação com os transportadores de monoaminas, diminuindo assim a remoção destas durante a sinapse. Este processo de inibição competitiva (semelhante ao desempenhado pela cocaína) leva à diminuição da sua recaptação e, conseqüentemente ao aumento da sua concentração na fenda sináptica [9, 14, 29, 30]. Em alternativa, as catinonas sintéticas também podem proporcionar a libertação pré-sináptica das catecolaminas (dopamina, noradrenalina e serotonina) através da alteração do pH vesicular e por inibição do recetor do transportador de monoaminas. Este encontra-se localizado na membrana vesicular e é responsável pela entrada das catecolaminas na vesícula. Assim, as catinonas são recaptadas para o interior das células, destabilizando as vesículas que armazenam estes neurotransmissores, o que resulta na sua libertação prematura. Este processo é semelhante ao desencadeado pelas anfetaminas [9, 14, 29, 30, 31, 32]. Por outro lado, as catinonas sintéticas, são inibidores parciais de monoamina oxidase – enzima responsável pela metabolização de monoaminas que poderão estar em excesso na fenda sináptica - o que provoca uma diminuição da degradação de dopamina e, conseqüentemente a sua acumulação na fenda sináptica [25, 33].

Muito embora as catinonas sintéticas sejam consideradas o segundo grupo de NSP mais preponderante e estudado, os seus perfis farmacocinéticos tanto *in vivo* como *in vitro* não se encontram devidamente documentados. No entanto, estes perfis são essenciais não só para compreender os potenciais efeitos adversos e ligar os agentes causadores à toxicidade, mas também para identificar biomarcadores únicos de sua ingestão, que permitirão sua identificação inequívoca em matrizes biológicas [28].

As catinonas sintéticas começaram por ser utilizadas para fins medicinais devido às suas propriedades psicoestimulantes. No entanto, a ocorrência de reações adversas teve na origem no abandono da utilização destas moléculas para fins terapêuticos [14].

Os conceitos de farma(toxi)cinética, biodisponibilidade e ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Transporte são essenciais para se perceber os mecanismos subjacentes à toxicidade induzida por xenobióticos em geral, e das catinonas em particular [34].

A absorção das cationonas sintéticas depende da biodisponibilidade e esta por sua vez depende principalmente da combinação das vias de administração, da composição química e dos transportadores e enzimas gastrointestinais e hepáticas. Por sua vez, a distribuição é efetuada pelo sistema linfático e pelo sistema circulatório e, é condicionada pelas vias de administração ou de exposição, pelas características químicas e físicas das substâncias, pela ação dos transportadores e pelos mecanismos de passagem das substâncias através das barreiras [14, 35].

A permeabilidade das barreiras hematoencefálicas é bastante seletiva visto que protege o Sistema Nervoso Central de substâncias tóxicas, sendo essencial para o metabolismo cerebral [34]. Quanto mais polar for uma substância maior será a dificuldade em atravessar as barreiras hematoencefálica e lipídicas [25, 36, 37]. As cationonas sintéticas possuem um grupo carbonilo que aumenta a polaridade das mesmas, logo têm alguma dificuldade em atravessar estas barreiras, tornando-as menos potentes. Isto poderá explicar o que potencia que os consumidores recorram a maiores doses e ao consumo excessivo para atingirem os efeitos pretendidos [15, 37]. Por outro lado, a presença do grupo carbonilo concede às cationonas uma estrutura mais planar, o que poderá levar a uma maior inserção da molécula no ADN [15]. Contudo, as cationonas que derivam da cationona pirrolidina, como por exemplo o α -PVP, têm uma maior facilidade ao atravessar as barreiras hematoencefálicas devido à presença deste grupo, que lhe reduz a polaridade.

Ao ser ingerido o xenobiótico pode ser limitado por um de dois fatores: 1) o metabolismo, pelo organismo inativa a ação do xenobiótico através da atuação das enzimas metabólicas produzidas, sobretudo pelo fígado devido ao facto de este permitir a entrada de alguns compostos hidrofílicos nos hepatócitos [35]; 2) a excreção, em que o xenobiótico e respetivos metabolitos são eliminados do organismo através principalmente do fígado, rins e fezes.

1.2.2. O metabolismo de cationonas

Como já foi referido, a identificação do perfil metabólico de cationonas sintéticas é essencial não só para a avaliação dos riscos toxicológicos, principalmente quando os metabolitos se revelam ativos, mas também, para o desenvolvimento de técnicas de identificação e quantificação de biomarcadores de exposição em amostras biológicas para aplicações forenses [36, 38, 39]. A identificação das vias metabólicas necessita de técnicas analíticas eficientes que se encontrem desenvolvidas e validadas para a identificação/quantificação de metabolitos. Este estudo pode ser dividido em três âmbitos distintos: 1) a elucidação das vias de biotransformação; 2) a determinação da farmacocinética das cationonas sintéticas e dos seus metabolitos; e 3) a avaliação da toxicidade da cationona e dos seus metabolitos, nomeadamente a identificação de metabolitos reativos, que têm um papel de grande importância na toxicidade induzida por drogas [40, 41].

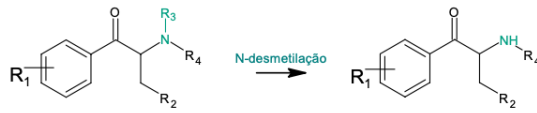
As vias metabólicas são classificadas em duas fases distintas, a Fase I e a Fase II [42, 43]. As transformações químicas que decorrem de processos metabólicos quer de Fase I quer de Fase

II, são principalmente impulsionados por enzimas hepáticas (mas não só), que modificam o xenobiótico quimicamente tornando-o inativo ou favorecendo a sua eliminação [35]. Normalmente, os metabolitos de Fase I e de Fase II são mais solúveis em água do que o xenobiótico de partida, o que facilita a excreção através da urina e/ou biliar [43]. Os processos metabólicos de Fase I englobam reações de oxidação e redução ou a clivagem de um grupo funcional. O complexo enzimático Citocromo P450 (CYP), é um dos mais importantes catalisadores de biotransformações de Fase I, que incluem nomeadamente as reações de hidroxilação e a desalquilação [43, 44]. Por sua vez, os processos metabólicos de Fase II incluem reações de conjugação do xenobiótico ou do metabolito de Fase I com moléculas endógenas, tais como o ácido glucorónico, o sulfonato, a glutatona, o acetato ou aminoácidos [43]. Nas reações de Fase II os metabolitos resultantes são mais polares do que os que lhe deram origem, o que facilita a sua excreção. A Fase I pode ocorrer simultaneamente com a Fase II, não sendo necessário que ocorram reações da Fase I para que se deem as reações de Fase II [41, 44].

Muito embora, como foi já referido, as reações de Fase I e Fase II gerem, em geral, metabolitos menos tóxicos e mais polares do que o xenobiótico de partida, o que promove a excreção, estes processos podem dar origem a processos de bioactivação. Nestes processos são gerados metabolitos reativos, que têm a capacidade de estabelecer ligações covalentes com bionucleófilos (DNA ou proteínas) formando adutos covalentes, que poderão estar na origem de eventos tóxicos como a genotoxicidade e reações imunológicas [44].

No Esquema 1 são apresentados os principais mecanismos de Fase I previstos para catinonas sintéticas.

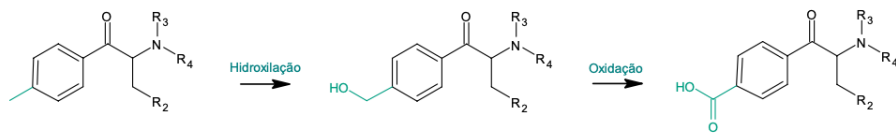
1) Remoção de um grupo metilo na posição R₃.



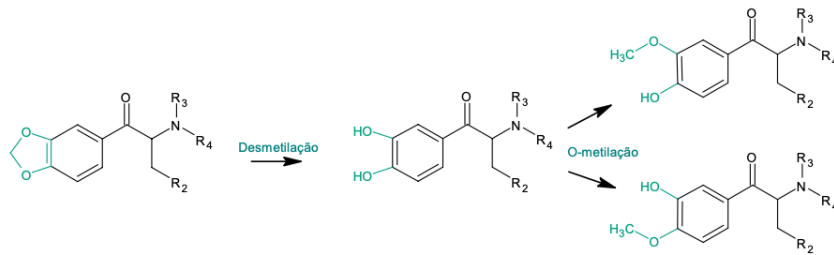
2) Redução de uma β-cetona a álcool.



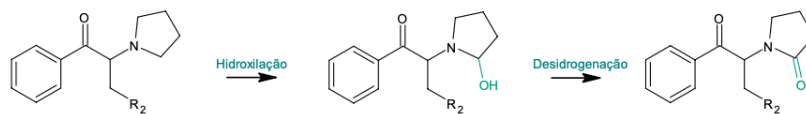
3) Formação de um ácido carboxílico a partir do grupo metilo no anel.



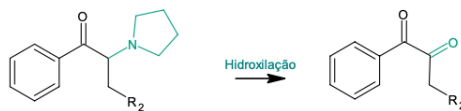
4) Quebra da estrutura de dioximetileno, primeiro por desmetilação e, em seguida de O-metilação num dos seus grupos hidroxilo.



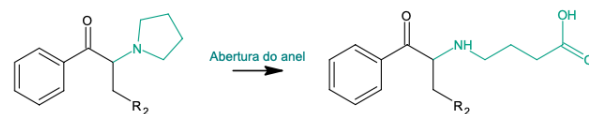
5) Metabolismo de pirrolidina a lactama.



6) Desaminação oxidativa.



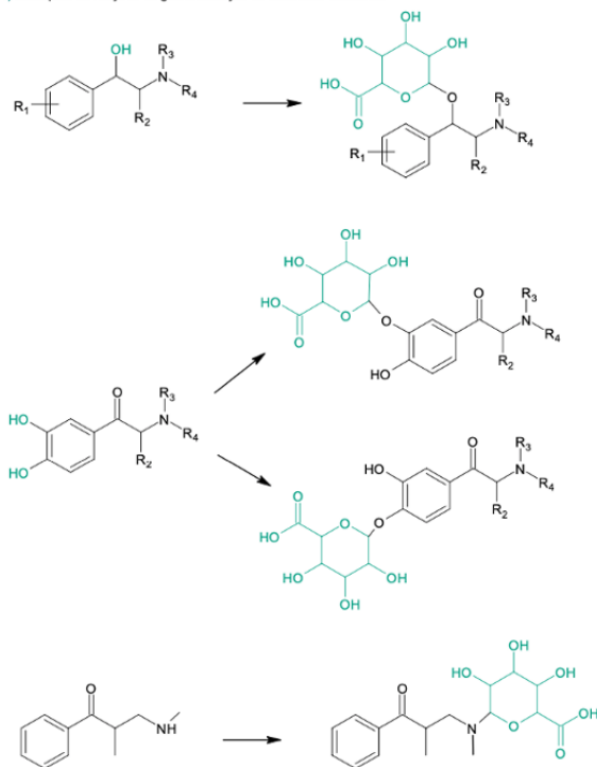
7) Abertura do anel pirrolidina.



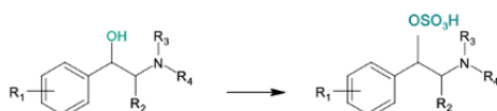
Esquema 1 - Mecanismos relevantes de Fase I de cationas sintéticas [18, 45-59].

No Esquema 2 são apresentados os principais mecanismos de Fase II expectáveis para cationonas sintéticas.

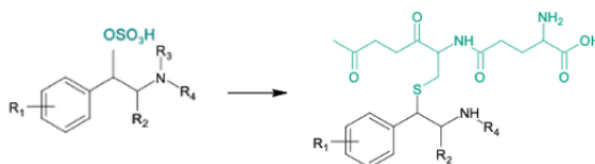
1) Exemplos de reações de glucoronidação de cationonas sintéticas.



2) Exemplos de reações de sulfonação de cationonas sintéticas.



3) Exemplos de reações de glutanilação de cationonas sintéticas.



Esquema 2 - Mecanismos relevantes de Fase II de cationonas sintéticas [18, 45-59].

A identificação dos metabolitos de cationonas sintéticas é absolutamente fundamental no contexto criminal. Isto deve-se ao facto de muitas moléculas desta classe serem extensamente metabolizada, o que leva a que a cationona (intacta) seja apenas detetada em quantidades muito minoritárias nos biofluidos. Assim, a identificação dos metabolitos, nomeadamente na urina, por métodos analíticos apropriados constitui a única forma de identificação da cationona sintética que foi consumida.

A identificação do perfil metabólico pode ser efetuado *in vivo* ou *in vitro* [28]. Muito embora a validação das vias metabólicas *in vivo*, em animais ou em humanos, seja importante, os estudos *in vitro* são fundamentais para a determinação de perfis metabólicos e descoberta de novas estruturas de catinonas sintéticas que ainda não estão documentadas na literatura [41, 60].

A realização de incubações com microsomas de fígado humano (HLM), fígado de rato (RLM), frações de S9 de fígado humano e de rato (S9H e S9H, respetivamente), bem como frações citosólicas, constitui uma forma adequada e bastante expedita de determinar o perfil metabólico *in vitro* [35]. Em particular, a incubação de catinonas em microsomas hepáticos conduziu à identificação de metabolitos que foram também identificados *in vivo* [46, 47, 57, 58, 61].

Os RLM e HLM são vesículas do retículo endoplasmático de hepatócitos e contêm diversas enzimas de Fase I, tais como o CYP, o carboxil esterases, epóxido hidrolases, e flavina-monooxigenase (FMO), e a enzima de Fase II o 5'-difosfo-glucuronosiltransferase de uridina (UGT) [62]. Estes têm como principal vantagem o seu baixo custo, a abundância no mercado e a facilidade de utilização. Para que a incubação com microsomas de fígado seja viável e sejam ativadas as reações de Fase I é necessário recorrer ao cofator dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), em simultâneo com um sistema de regeneração (NRS 100x), uma vez que naturalmente os microsomas só têm atividade até duas horas. Os HLM e RLM não possuem enzimas citosólicas, pelo que não permitem o estudo de reações de Fase II, além da glucoronidação [41]. Para a reação de glucoronidação é necessário o uso do cofator sal trissódico do ácido uridina 5'-difosfoglucurónico (UDPGA). A ativação desta via metabólica, por pré-incubação com alamecicina, poderá facilitar a formação de glucorónidos nestes sistemas *in vitro*, como já foi demonstrado para vários substratos, em particular para a catinona o α -PVP [41, 62].

Os S9R e S9H englobam frações microsomias e citosólicas, o que leva a que contenha uma vasta gama de enzimas metabólicas tanto de Fase I (para além das que estão nas frações microsomias, contêm outras como a aldeído desidrogenases) como de Fase II, nomeadamente glutathionatranferase (GST), acetiltransferases, sulfotransferases (SULT), carboxilesterases, 5'-difosfo-glucuronosiltransferase de uridina, e metiltransferases. Tal como descrito para o estudo *in vitro* com RLM e HLM, nas incubações com frações de S9 de fígado humano e de rato também é necessário recorrer à adição dos seguintes cofatores: NADPH em simultâneo com um sistema regenerador (NRS 100x) para os CYP, adenosina 3'-fosfato 5'-fosfossulfato (PAPS) para os enzimas de sulfonação e ácido uridina 5'-difosfo-glucurónico (UDPGA) para as glucuronosiltransferase. Assim, a vantagem da utilização da fração S9 de fígado em relação aos microsomas de fígado é a presença de enzimas de Fase I e de Fase II que se irá traduzir numa representação mais robusta do perfil metabólico. Contudo, apresenta a desvantagem de possuir uma menor atividade enzimática consequentemente alguns metabolitos não são detetados [41, 62].

1.3. Objetivos

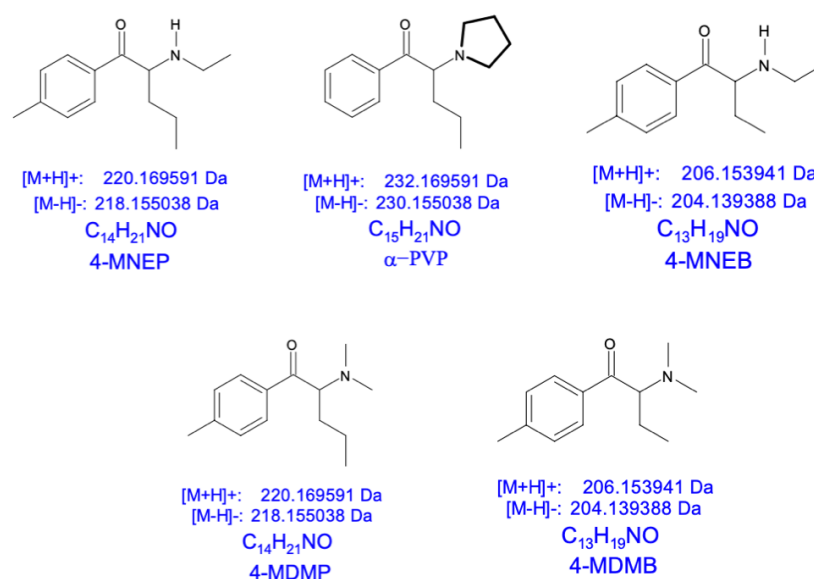


Figura 7 - Estrutura das catinonas sintéticas α -PVP, 4-MDMP, 4-MDMB, 4-MNEP e 4-MNEB.

Este trabalho tem como objetivo a identificação dos perfis metabólicos de quatro catinonas sintéticas (Figura 7): 4'-Metil-N-etilnorpentedrona (4-MNEP), 4'-Metil-N-etilnorbufedrona (4-MNEB), 4'-Metil-N,N-dimetilnorpentedrona (4-MDMP) e 4'-Metil-N,N-dimetilnorbufedrona (4-MDMB). Das catinonas selecionadas para este estudo apenas a 4-MNEP já foi reportada no Luxemburgo em janeiro de 2014 [64], tendo sido já reportado um estudo do seu metabolismo *in vitro* em HLM, que possibilitou a identificação de 3 metabolitos de Fase I, sendo que dois destes metabolitos, o produto de N-didesalquilação e o produto de hidroxilação foram também identificados em urina humana [64]. A catinona 4-MDMP nunca foi reportada e as catinonas 4-MDMB e 4-MNEB, muito embora não ainda não tenha sido reportada, encontram-se à venda como padrões no site *Cayman Chemical* [65]. No entanto, a semelhança estrutural destas catinonas com outras catinonas já reportadas leva a crer que poderão vir a ser introduzidas no mercado. Nunca foi reportado qualquer estudo do metabolismo das catinonas 4-MDMB, 4-MDMP e 4-MNEB.

O perfil metabólico destas catinonas será estabelecido por recurso à técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução por ionização por *electrospray* (LC-ESI-HRMS), usando um analisador quadropolo – tempo de voo (QTOF). Os metabolitos serão gerados por recurso a sistemas *in vitro* metabolicamente competentes HLM, RLM, S9H e S9R. A catinona α -PVP, irá ser utilizada como controlo positivo, uma vez que os perfis metabólicos desta *in vitro* e *in vivo* desta catinona já se encontram descritos na literatura.

2. Parte experimental

2.1. Materiais e Métodos

2.1.1. Reagentes e solventes

Os padrões das catinonas α -PVP, 4-MNEB, 4-MDMP, 4-MDMB e 4-MNEP utilizados neste trabalho foram previamente sintetizados na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa [66].

Os microssomas de fígado humano (*Pooled*), os microssomas de fígado de rato (*Sprague-Dawley*), a fração S9 de fígado humano (*Pooled*) e a fração S9 de fígado de rato (*Sprague-Dawley*) são da GIBCO, com concentração de 20 mg/mL, o sistema de regeneração “*Vivid Regeneration System (x 100)*” é da Life Technologies e todos os restantes reagentes foram adquiridos na Sigma-Aldrich e foram utilizados como recebidos. Todos os solventes utilizados apresentam grau de pureza p.a. ou de LC-MS.

2.1.2. Soluções

As soluções “mãe” de cada uma das catinonas utilizadas nas incubações foram preparadas com uma concentração de 10 mM em água destilada, tendo-se utilizado as quantidades especificada na Tabela 1.

Tabela 1 - Quantidades utilizadas para a preparação das soluções padrão de catinonas utilizadas nas incubações.

Catinonas	Solução padrão de catinonas (1 mM)
α -PVP	1,3 mg em 5 mL de H ₂ O
4-MNEB	0,54 mg em 2,5 mL de H ₂ O
4-MDMP	0,53 mg em 2,5 mL de H ₂ O
4-MDMB	0,53 mg em 2,5 mL de H ₂ O
4-MNEP	0,54 mg em 2,5 mL de H ₂ O

Foi utilizada nas incubações uma solução tampão de bicarbonato de amónio (ABIC) 50 mM e pH de 7.4. Utilizou-se uma solução NADPH 100 mM, que foi preparada por dissolução de 8,4 mg de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) em tampão ABIC 50 mM (300 μ L). Utilizou-se uma solução de sal trissódico do ácido uridina 5'-difosfoglucurónico (UDPGA) 50 mM (5,86 mg) e de cloreto de magnésio com concentração de 50 mM (1,02 mg), que foi preparada para um volume final de 200 μ L em água destilada. A solução de MgCl₂ 400 mM foi preparada por dissolução de 38,3 g deste sal em 100 μ L de água destilada.

2.2. Técnicas e Equipamentos

Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa de Alta Resolução de tandem (LC-ESI-HRMS/MS)

Esta técnica foi efetuada num sistema de UPLC Elute (Bruker, Bremen, Alemanha). conectado com um espectrómetro de massa híbrido quadrupolo-tempo de voo (QTOF) IMPACT II (Bruker Daltonics, Bremen) e equipado com uma fonte de ionização por electrospray (Bruker Daltonics, Bremen). As amostras foram separadas em colunas Luna® (Phenomenex) 3 μm Polar C18 (2) 100 Å (150*2 mm). O fluxo definido para a fase móvel foi de 170 μLmin^{-1} recorrendo ao seguinte gradiente: inicia-se com 95% de ácido fórmico 0,1% em água (eluente A), que é mantido por 1.5 min, seguindo-se um gradiente linear de 6.20 min até 100% de acetonitrilo (eluente B), mantendo-se estas condições por 1.8 min, seguiu-se um gradiente de 0.5 min até às condições iniciais, que são mantidas por 1 min.

Os espetros de MS foram adquiridos nos modos positivo e negativo com os seguintes parâmetros: voltagem do capilar, $\pm 4,5$ kV; gás nebulizador, 4 Bar; fluxo do gás de secagem, 8 Lmin^{-1} , temperatura do gás de secagem, 200 °C.

A calibração de cada espetro foi efetuada com uma amostra formato de amónio que foi analisada por FIA. As recolhas de dados foram realizadas no modo *data-dependent* (DDA, Auto MS) com m/z compreendido entre 50 a 1500 Da.

Os dados recolhidos foram processados pelo *software* Compass Data Analysis Version 4.4 e a identificação dos compostos foi efetuada através de análise manual detalhada dos espetros *full scan* e MS/MS.

Foi previamente construída com os valores de m/z expectáveis para os metabolitos de Fase I e Fase II de cada uma das catinonas selecionadas para este estudo. Esta base de dados foi construída tendo em conta as várias vias metabólicas já descritas na literatura para esta família de compostos [17, 46, 47, 57, 58, 61].

Em todo o caso, os resultados obtidos serão atendidos na seguinte ordem: Razão massa carga (m/z), atribuição do ião ou fragmento correspondente molecular e erro associado (ppm). Todos os espetros correspondentes aos metabolitos foram verificados manualmente. O desvio de massa exata dos metabolitos de catinona identificados permaneceu abaixo de 5 ppm para o precursor e abaixo de 10 ppm para os fragmentos obtidos. Os espetros de MS/MS das quatro catinonas selecionadas e dos metabolitos identificados são apresentados no Anexo 6.2..

2.3. Métodos para a geração de metabolismos de Fase I e Fase II *in vitro*

2.3.1. Reações de Fase I

2.3.1.1. Incubações das catinonas em microsomas de fígado de humano e de fígado de rato

Os ensaios onde se gerou metabolitos de Fase I em HLM e RLM foram realizadas na presença de cofator de Fase I NADPH, para um volume total de incubação de 200 μL , de acordo com as condições especificadas na Tabela 2. Todas as incubações foram efetuadas em duplicado. Especificamente, os HLM e RLM foram descongelados lentamente em gelo e foram retirados 20 μL para cada incubação, de modo a perfazer uma concentração de 1 mg/mL na incubação. De seguida, adicionou-se sucessivamente as seguintes soluções: tampão de bicarbonato de amónio (50 mM, pH 7.4), solução “mãe” de catinona e, por fim, o *Vivid Regeneration System 100x* (NRS 100x) – o sistema de regeneração é necessário uma vez que os microsomas só têm atividade até 2 horas naturalmente. Estes ensaios foram pré-incubados a 37 °C durante 5 minutos. Posteriormente, iniciou-se as reações de Fase I através da adição de 1 μL de NADPH e as amostras foram incubadas a 37 °C com agitação suave. Recolheram-se alíquotas de 75 μL a vários tempos: 2 h, 4 h e 24 h. Para parar a reação enzimática foi adicionado 75 μL de acetonitrilo gelado. Por fim, centrifugou-se as incubações a 10.000 g durante 15 minutos e recolheu-se o sobrenadante e guardou-se a - 20 °C, para posterior análise por LC-ESI-HRMS.

Foram efetuadas em paralelo diversas incubações controlo, que foram efetuadas em condições similares descritas anteriormente, onde lhe foram alteradas as seguintes condições: 1) o controlo de catinona (CC), na ausência de catinona; 2) controlo de cofator de Fase I, na ausência de NADPH (CNADPH) e 3) controlo de desnaturação (CHD) onde foram utilizados microsomas desnaturados (pré-aquecidos a 90 °C durante 15 minutos).

Tabela 2 - Condições experimentais utilizadas nas incubações das catinonas em microsomas de fígado de rato e de fígado humano, na presença do cofator de Fase I.

Soluções padrão	Condições na incubação	V _{Fase I} (μL)	V _{CC} (μL)	V _{CNADPH} (μL)	V _{CHD} (μL)
Catinona 1mM	Catinona 10 μM	2	0	2	2
ABIC 50 mM		185	187	186	185
Microsomas 20mg/mL	Microsomas 1mg/mL	10	10	10	10
NADPH 100 mM	NADPH 0.5 mM	1	1	0	1
NRS 100x		2	2	2	2

V_{total}	200	200	200	200
--------------------------	-----	-----	-----	-----

2.3.1.2. Incubações das catinonas na fração S9 de fígado humano e de rato

As catinonas selecionadas para este estudo foram incubadas nas frações S9H e S9R (numa concentração de 2 mg/mL) na presença do cofator de Fase I NADPH, para um volume total de incubação de 200 μ L, de acordo com as condições especificadas na Tabela 3. Todas as incubações foram efetuadas em duplicado. O procedimento experimental foi análogo ao descrito no ponto 2.3.1.1.

Tabela 3 - Condições experimentais utilizadas nas incubações das catinonas em frações S9 de fígado humano e de rato, na presença do cofator de Fase I.

Soluções padrão	Condições na incubação	V_{Fase I} (μL)	V_{CC} (μL)	V_{CNADPH} (μL)	V_{CHD} (μL)
Catinona 1mM	Catinona 10 μM	2	0	2	2
ABIC 50 mM		175	177	176	175
S9 mix 20mg/mL	S9 mix 2 mg/mL	20	20	20	20
NADPH 100 mM	NADPH 0.5 mM	1	1	0	1
NRS 100x		2	2	2	2
V_{total}		200	200	200	200

2.3.2. Reações de Fase II

2.3.2.1. Incubações das catinonas em microsomas de fígado de humano e de fígado de rato

As catinonas selecionadas para este estudo foram incubadas em RLM e HLM (numa concentração de 1 mg/mL), previamente incubados com alameticina, na presença dos cofatores de Fase I e II, NADPH e UDPGA, respetivamente, para um volume total de incubação de 200 μ L, de acordo com as condições especificadas na tabela 4. Todas as incubações foram efetuadas em duplicado.

Especificamente, os RLM e HLM foram descongelados lentamente em gelo, que foram pré incubados com alameticina, de modo a ativar as vias metabólicas de Fase II. De seguida,

adicionou-se sucessivamente as seguintes soluções: tampão de bicarbonato de amónio (50 mM, pH 7.4), solução “mãe” de catinona e, por fim, o *Vivid Regeneration System 100x* (NRS 100x). Estes ensaios foram pré-incubados a 37 °C durante 5 minutos. Posteriormente, iniciou-se as reações de Fase I através da adição de 1 μL de NADPH e de seguida iniciou-se a reação de Fase II (reações de glucoronidação) através da adição de 4 μL de alameticina, 4 μL de UDPGA e 1 μL de cloreto de magnésio, pela ordem referida. As amostras foram incubadas a 37 °C com agitação suave. Foram recolhidas alíquotas de 75 μL a vários tempos: 2 horas e 24 horas. Para parar a reação enzimática foi adicionado μL de acetonitrilo gelado. Por fim, centrifugou-se as incubações a 10.000 g durante 15 minutos e recolheu-se o sobrenadante e guardou-se a - 20 °C, para posterior análise por LC-ESI-HRMS.

Tabela 4 - Condições experimentais utilizadas nas incubações das catinonas em microsomas de fígado humano e de rato, na presença do cofator de Fase II.

Soluções padrão	Condições na incubação	V_{Fase II} (μL)
Catinona 1mM	Catinona 10 μM	2
ABIC 50 mM		176
Microsomas 20mg/mL	Microsomas 1mg/mL	10
NADPH 100 mM	NADPH 0.5 mM	1
NRS 100x		2
UDPGA 50 mM	UDPGA 1 mM	4
Alameticina 5 mg/mL	Alameticina 0.1 mg/mL	4
MgCl₂ 400 mM	MgCl₂ 2 mM	1
V_{total}		200

2.3.2.2. Incubações das catinonas nas frações S9 de fígado humano e de rato

Para a geração de metabolitos de Phase II as catinonas selecionadas para este estudo foram incubadas em S9R e S9H (numa concentração de 2 mg/mL), que foram previamente incubados com alameticina, na presença dos cofatores de Fase I e Fase II, NADPH e UDPGA, para um

volume total de incubação de 200 μL , de acordo com as condições especificadas na Tabela 5. Todas as incubações foram efetuadas em duplicado. O procedimento experimental foi análogo ao descrito no ponto 2.3.2.1.

Tabela 5 - Condições experimentais utilizadas nas incubações das catinonas em frações S9 de fígado humano e de rato, na presença do cofator de Fase II.

Soluções padrão	Condições na incubação	V_{Fase II} (μL)
Catinona 1mM	Catinona 10 μM	2
ABIC 50 mM		166
S9 mix 20mg/mL	S9 mix 2 mg/mL	20
NADPH 100 mM	NADPH 0.5 mM	1
NRS 100x		2
UDPGA 50 mM	UDPGA 1 mM	4
Alameticina 5 mg/mL	Alameticina 0.1 mg/mL	4
MgCl₂ 400 mM	MgCl₂ 2 mM	1
V_{total}		200

3. Resultados e discussão

O mercado das NSP, por ser tão mutável e rápido, exige da parte das autoridades uma resposta e atenção constantes para as substâncias que entram no mesmo, o que muitas vezes não é possível e acaba por se traduzir em falta de resposta. Uma vez que algumas NSP são metabolizadas rápida e extensivamente, a identificação da NSP consumida por parte das autoridades poderá só ser possível pela identificação dos respetivos metabolitos em matrizes biológicas. Assim, torna-se essencial um estudo prévio das suas vias metabólicas, por forma a apurar o método analítico que mais se adequa e a identificar os dados de LC-MS para cada metabolito. Desta forma, no âmbito do protocolo estabelecido entre o Instituto Superior Técnico (IST), a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) e o Laboratório da Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC/PJ) surgiu este trabalho que visa a identificação do perfil metabólico de quatro catinonas sintéticas (4-MNEB, 4-MDMP, 4-MDMB e 4-MNEP – Figura 9) por análise por LC-ESI-HRMS dos metabolitos gerados *in vitro* em quatro sistemas metabolicamente competentes: HLM, RLM, S9H e S9R.

3.1. Identificação de metabolitos de catinonas sintéticas *in vitro*

Tendo em consideração o facto de a utilização de microsomas hepáticos já terem sido utilizadas com sucesso para a geração de metabolitos que ocorrem *in vivo* para outras catinonas [17, 46, 47, 57, 58, 61], decidimos utilizar este modelo *in vitro* para estudar o metabolismo das catinonas selecionadas para este estudo. A fração S9 de fígado foi já também utilizada com sucesso para a geração *in vitro* de metabolitos de catinonas e foi aqui também utilizada para avaliar se poderiam ser formados metabolitos adicionais neste modelo *in vitro*, uma vez que possui para além das enzimas metabolizantes microsomias contém também as citosólicas [67, 68]. A escolha dos modelos *in vitro* de rato e humanos prende-se com a experiência anterior do grupo de investigação [67]. Efetivamente nas incubações *in vitro* do fármaco anti-HIV etravirina, foram identificados consideravelmente mais metabolitos nas incubações efetuadas em S9R em comparação com as incubações correspondentes efectuadas em S9H, possivelmente devido à maior atividade enzimática da fração do roedor. No entanto, os metabolitos que foram identificados exclusivamente *in vitro* nas incubações em S9R também foram identificados *in vivo* na urina de pacientes com HIV em terapia com etravirina. Portanto, o facto de um metabolito específico ser detetado apenas em incubações de fração de rato não significa necessariamente que esse metabolito não possa ser formado *in vivo* em humanos.

A técnica utilizada para estas análises foi a Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução de tandem com ionização por *Electrospray* (LC-ESI-HRMS/MS). Para a identificação dos metabolitos foi construída inicialmente uma base de dados com os valores *m/z* de todos os metabolitos expectáveis para cada uma das catinonas, tendo em conta as vias metabólicas já conhecidas de outras catinonas estruturalmente similares. Posteriormente, utilizou-se o programa *Compass DataAnalysis Version 4.4* e, manualmente efetuaram-se os

cromatogramas iónicos extraídos para cada *m/z* presente na base de dados e foi depois procurado o respetivo espectro de MS/MS de cada um dos metabolitos identificados. As análises das incubações de Fase I foram todas efetuadas por *electrospray* no modo positivo (ESI+), no entanto, as análises das incubações de Fase II efetuaram-se no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-).

Os critérios utilizados para a identificação de um metabolito foram o facto: 1) a identificação no espectro de *full scan* de um valor de *m/z* compatível com a molécula protonada/desprotonada com um erro inferior a 5 ppm; e 2) o facto desse não possuir espectro MS/MS, onde são identificados iões fragmento compatíveis com a estrutura, com um erro inferior a 10 ppm. Foram analisados 885 espectros de *full scan* e MS/MS por LC-ESI-HRMS, sendo que apenas os que respeitam os critérios mencionados foram considerados.

Doravante serão apresentados e analisados os resultados obtidos na identificação de metabolitos e fragmentos de 4 catinonas sintéticas, 4-MNEB, 4-MDMP, 4-MDMB e 4-MNEP, formados em incubações *in vitro* em HLM, RLM, S9H e S9R, nas condições apresentadas na Tabela 1. É importante referir que a catinona α -PVP foi utilizada como controlo positivo nas incubações, uma vez que, as suas vias metabólicas já se encontram amplamente descritas na literatura [17, 53, 54, 56, 59]. De notar que apenas será discutida a identificação dos metabolitos de Fase I, uma vez que, nas condições experimentais utilizadas para a geração de metabolitos de Fase II não foi possível obter evidencias conclusivas para a formação de glucorónidos. O facto de não se terem também identificado metabolitos de Fase I, nem sequer o controlo positivo (α -PVP), sugere a falta de atividade enzimática das frações utilizadas.

Tabela 6 - Condições de incubação *in vitro* em HLM, RLM, S9H e S9R para a deteção de metabolitos de Fase I e Fase II.

Condições de incubação	Fase I	Fase II
Catinona	10 μ M	10 μ M
ABIC	50 mM	50 mM
HLM/RLM	1mg/mL	1mg/mL
S9H/S9R	2mg/mL	2mg/mL
NADPH	0.5 mM	0.5 mM
UDPGA	-	UDPGA 1 mM
Alameticina	-	2 mg/mL
MgCl ₂	-	1 mM

3.1.1. Identificação de metabolitos da catinona alfa-pirrolidinovalerofenona (α -PVP)

A catinona α -PVP foi utilizada como controlo positivo com o objetivo de avaliar se as metodologias de incubação e de deteção dos metabolitos efetuadas são viáveis. Esta catinona foi escolhida para desempenhar esta função devido ao facto de as suas vias metabólicas já serem conhecidas. A identificação de metabolitos de Fase I já identificados *in vitro*, em condições similares, atesta que as condições experimentais escolhidas para este estudo são adequadas para gerar metabolitos de Fase I para as 4 catinonas seleccionadas para este estudo.

Para a identificação dos metabolitos nas condições experimentais utilizadas foi feita uma compilação de todos os m/z dos metabolitos já identificados para esta catinona. Fez-se uma previsão de outros possíveis metabolitos tanto para Fase I como para Fase II, com vista à identificação de possíveis novos metabolitos (Anexo 6.1., Esquema 25).

O Esquema 3 apresenta um esquema de todos os metabolitos que se encontrou evidencia no espetro de *full scan* para a sua formação. No entanto, apenas para os metabolitos M1-, M6- e M7- α -PVP (representados a preto no Esquema 3) foram obtidos espetros MS/MS com fragmentos com um erro inferior a 10 ppm, que confirmem a sua formação destes metabolitos nas incubações efetuadas na presença de cofator de Fase I (NADPH) com a catinona α -PVP.

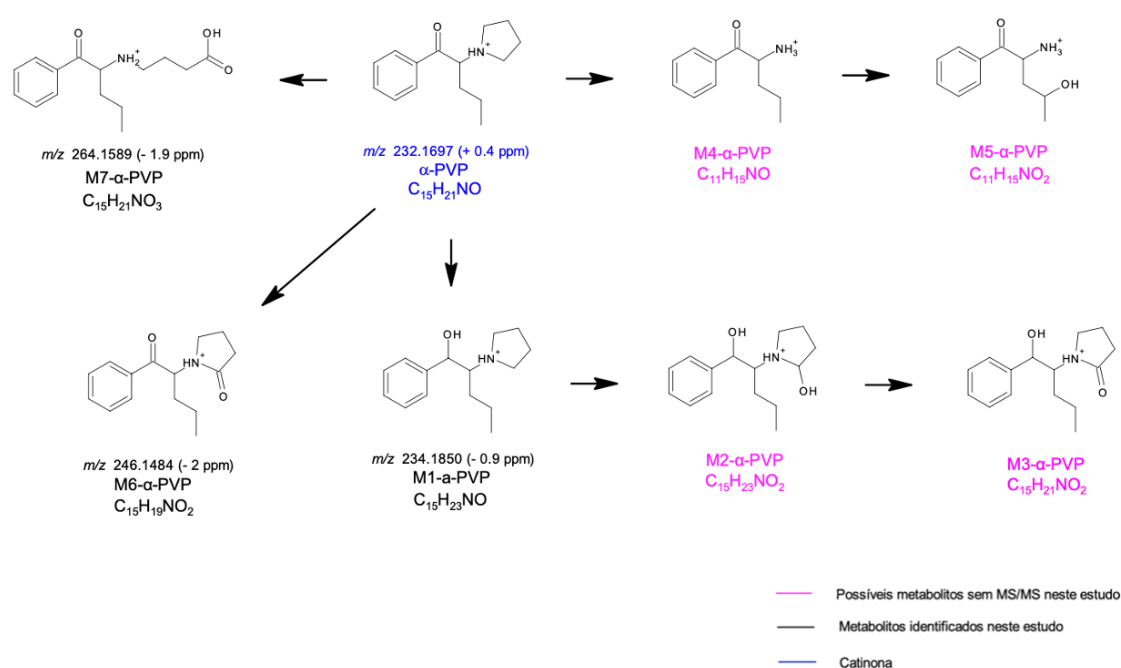


Tabela 7 – Tempo de retenção e valores de m/z experimentais para a molécula protonada e para os iões fragmento característicos (apresentados com o erro associado em ppm) para a cationona α -PVP e para os seus metabolitos identificados em incubações com HLM, RLM, S9H e S9R.

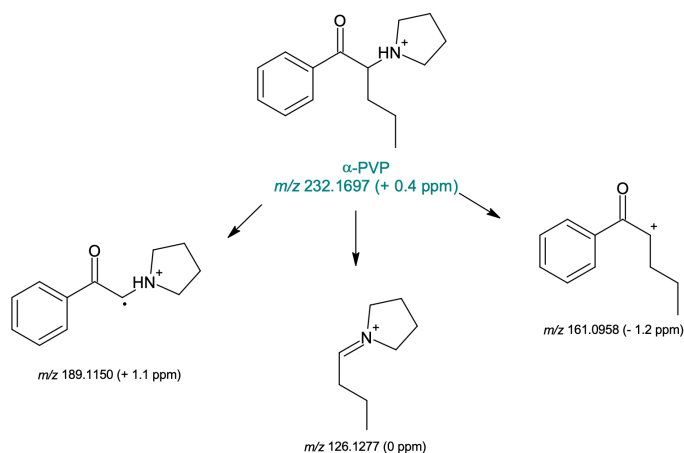
Nome do metabolito	t_R (min)	m/z exp. $[M+H]^+$ [\pm erro (ppm)]	Iões fragmento [\pm erro (ppm)]	Identificação
α -PVP	6.6	232.1697 (+ 0.4 ppm)	161.0958 (-1.2 ppm) 126.1277 (0 ppm) 189.1150 (+ 1.1 ppm)	HLM RLM S9H S9R
M1- α -PVP	6.8	234.1850 (- 0.9 ppm)	216.1737 (- 4.6 ppm) 173. 1188 (-6.4 ppm)	HLM RLM S9R
M6- α -PVP	12.5	246.1480 (- 3.7 ppm)	161.0948 (-8.1 ppm) 228.1373 (-4.4 ppm)	S9R
M7- α -PVP	6.5	264.1589 (- 1.9 ppm)	246.1495 (+ 2.4 ppm) 228.1370 (-5.7 ppm)	HLM S9R

As incubações em HLM e RLM foram efetuadas segundo o método descrito na secção 2.3.1.1. e as incubações em S9H e S9R foram efetuadas segundo o procedimento descrito na secção 2.3.1.1.

Analisando a Tabela 7 conseguimos concluir que todos os metabolitos identificados foram gerados nas incubações com S9R e que todos, à exceção do M6- α -PVP foram identificados em HLM, assim sendo estes foram os dois sistemas com resultados mais positivos neste estudo. É de notar que no caso das incubações efetuadas em S9H apenas se observou a cationona α -PVP, pelo que se concluí que este modelo *in vitro* é o que apresenta piores resultados na identificação dos metabolitos da cationona α -PVP. O facto de se ter identificado o metabolito M1- α -PVP valida as condições experimentais para a identificação de metabolitos expectáveis *in vivo*. De facto, este metabolito, que se forma pela redução do grupo carbonilo da cationona α -PVP, é o metabolito mais abundante identificado na literatura em trabalhos experimentais tanto *in vitro* como *in vivo* na urina humana [54].

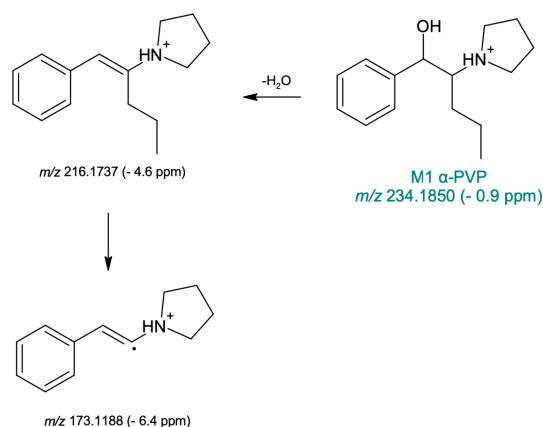
Nas condições analíticas da análise por LC-ESI-HRMS a cationona α -PVP com tempo de retenção (t_R) igual a 6.6 minutos, apresentou um sinal m/z 232.1697 (+ 0.4 ppm) correspondente à molécula protonada. Quanto à análise do espetro MS/MS da cationona α -PVP (Anexo 6.2., Figura 8), como podemos observar no Esquema 4, foram observados três fragmentos, sendo que o

fragmento maioritário tem sinal m/z 126.1277 (0 ppm) e corresponde à perda do grupo benzoilo. Este íon fragmento é reportado na literatura como um dos íões fragmento maioritários característicos desta catinona, quando analisado por LC-MS [17, 53, 59]. Os outros dois íões fragmento observados no espectro MS/MS são observados a m/z 189.1150 (+ 1.1 ppm) e m/z 161.0958 (- 1.2 ppm), e são resultantes da perda da cadeia lateral de propilo como radical e da perda do grupo pirrolidino, respetivamente. Ambos os íões são característicos da catinona, segundo a literatura [59].



Esquema 4 - Esquema de fragmentação proposto para a catinona α -PVP.

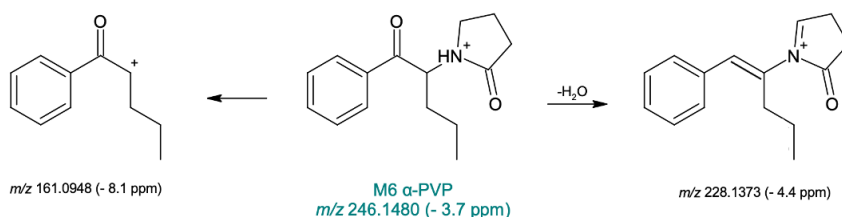
O metabolito M1- α -PVP com sinal m/z 234.1850 (+ 0.9 ppm) (Anexo 6.2., Figura 9), com t_R igual a 6.8 minutos, foi identificado nas incubações com HLM e RLM, bem como nas incubações de S9R. Este metabolito forma-se através da redução do grupo carbonilo da catinona α -PVP, e é o metabolito mais abundante identificado na literatura em trabalhos experimentais tanto *in vitro* como *in vivo*, na urina humana [54]. O íon fragmento maioritário observados através da análise ESI(+) para o M1- α -PVP tem sinal m/z 216.1737 (- 4.6 ppm), que corresponde à perda de uma molécula de água a partir da molécula protonada deste metabolito. O outro íon observado apresenta sinal a m/z 173.1188 (- 6.4 ppm) e forma-se através quebra homolítica da cadeia lateral de propilo. Estes dois íões fragmento são os principais descritos na literatura para o M1- α -PVP (Esquema 5) [54].



Esquema 5 - Esquema de fragmentação proposto para o metabolito M1- α -PVP.

O metabolito M6- α -PVP resulta da oxidação do metabolito M3- α -PVP. A molécula protonada deste metabolito apresenta, no espetro de HRMS-ESI(+) de *full scan* um sinal a m/z 246.1480 (- 3.7 ppm), com t_R igual a 12.5 minutos (Anexo 6.2., Figura 10), este foi detetado nas incubações de S9R. Este metabolito identificado na literatura em trabalho experimentais *in vitro* e foi também observado em urina humana e de rato [54].

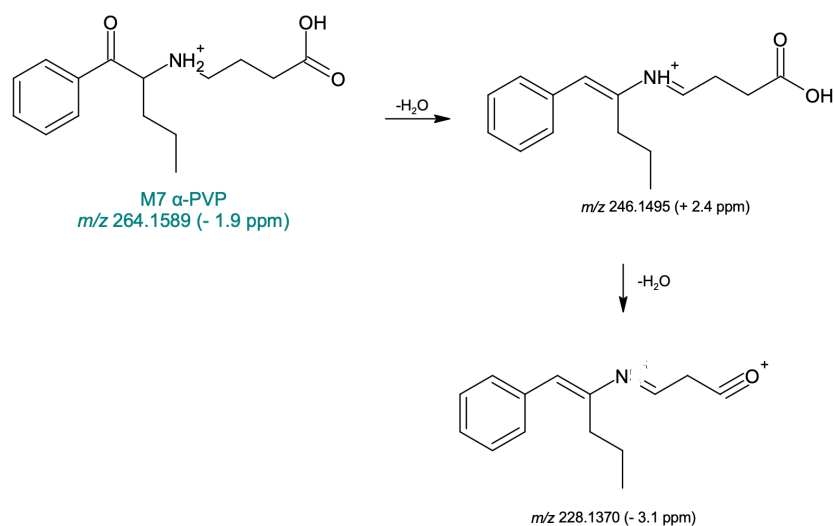
Quanto à análise do espetro MS/MS o ião fragmento maioritário apresenta um sinal m/z 161.0948 (- 8.1 ppm), este ião forma-se através da perda do grupo pirrolidino e é o ião fragmento diagnóstico que atesta que a transformação metabólica ocorreu no anel pirrolidínico. O outro ião fragmento principal tem sinal a m/z 228.1373 (- 4.4 ppm) correspondente à perda de uma molécula de água, que é uma perda característica das cationas e seus metabolitos, que ocorre por rearranjo molecular (Esquema 6).



Esquema 6 - Esquema de fragmentação proposto para o metabolito M6- α -PVP.

O metabolito M7- α -PVP é obtido através da abertura do anel e posterior oxidação e tem sinal a m/z 264.1589 (- 1.9 ppm), com t_R igual a 6.5 minutos (Anexo 6.2., Figura 11), este foi detetado nas incubações de HLM e S9R. Este metabolito encontra-se reportado na literatura [54, 58].

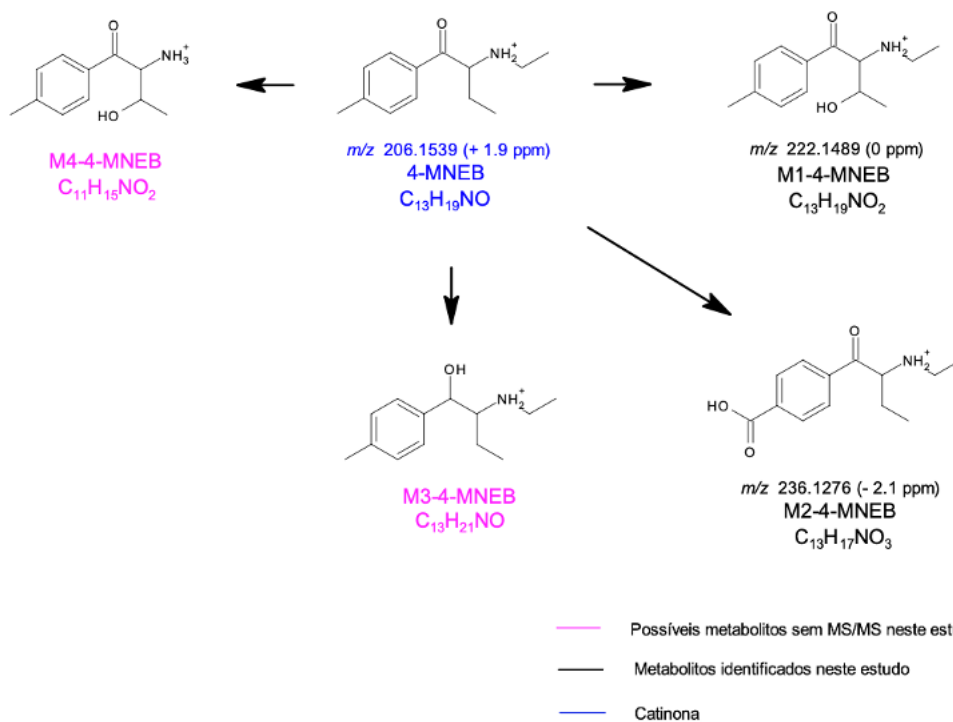
No que diz respeito à análise do espetro de MS/MS o ião fragmento maioritário apresenta o sinal m/z 246.1495 (+ 2.4 ppm) correspondente à perda de uma molécula de água a partir da molécula protonada deste metabolito. O outro ião fragmento identificado também correspondem à perda de uma molécula de água em relação ao fragmento anterior cujo sinal foi observado a m/z 228.1370 (- 3.1 ppm) (Esquema 7).



Esquema 7 - Esquema de fragmentação proposto para o metabolito M7- α -PVP.

3.1.2. Identificação de metabolitos da catinona 4'-Metil-N-etilnorbufedrona (4-MNEB)

Tal como referido anteriormente a catinona 4-MNEB nunca foi reportada. De forma análoga ao que foi efetuado para o α -PVP, começou por se fazer um esquema das possíveis vias metabólicas de Fase I e Fase II da 4-MNEB, baseados em metabolitos de catinonas já reportadas na literatura (ANEXO 6.1., Esquema 26). Para a identificação dos metabolitos nas várias alíquotas recolhidas das várias incubações efetuadas, fez-se o cromatograma iónico extraído, no espectro de *full scan*, de todos os iões correspondentes aos metabolitos expectáveis para esta catinona. Quando se encontrou um valor de m/z compatível com o espectro de *full scan* (com um erro inferior a 5 ppm) procurou-se a confirmação da formação do metabolito nos espectros de MS/MS. O Esquema 8 apresenta um esquema dos metabolitos para os quais foi possível encontrar alguma evidência da sua formação nos espectros *full scan* nas incubações efetuadas na presença de cofatores de Fase I com a catinona 4-MNEB. No entanto, foi apenas confirmada, através da interpretação dos espectros de MS/MS, a formação dos metabolitos M1-4-MNEB e M2-4-MNEB (representados a preto na Esquema 8).



Esquema 8 - Esquema dos possíveis metabolitos gerados nas incubações de Fase I da catinona 4-MNEB.

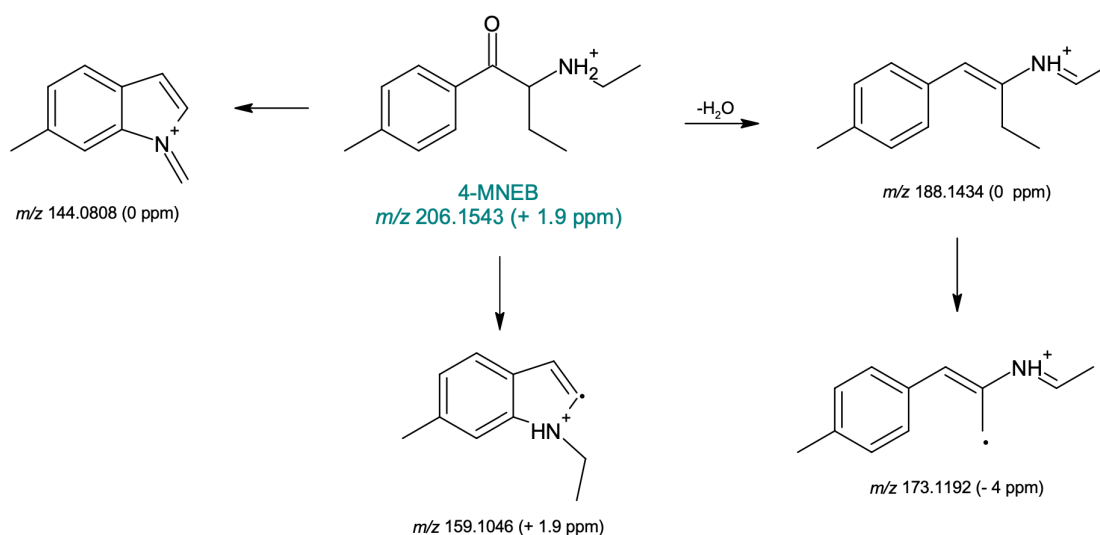
Tabela 8 - Tempo de retenção e valores de m/z experimentais para a molécula protonada e para os iões fragmento característicos (apresentados com o erro associado em ppm) para a catinona 4-MNEB e para os seus metabolitos identificados em incubações com HLM, RLM, S9H e S9R.

Nome do metabolito	t_R (min)	m/z exp. $[M+H]^+$ [\pm erro (ppm)]	Iões fragmento [\pm erro (ppm)]	Identificação
4-MNEB	7.7	206.1543 (+ 1.9 ppm)	188.1434 (0 ppm)	HLM
			173.1192 (- 4 ppm)	RLM
			159.1046 (+ 1.9 ppm)	S9H
			144.0808 (0 ppm)	S9R
M1-4-MNEB	5.1	222.1480 (- 4.1 ppm)	204.1377 (- 2.9 ppm)	HLM
			186.1266 (- 5.9 ppm)	RLM
			159.1046 (+ 1.9 ppm)	S9R
			174.1164 (- 7.5 ppm)	
M2-4-MNEB	5.3	236.1276 (- 2.1 ppm)	218.1169 (- 3.2 ppm)	HLM
			200.1079 (+ 4.5 ppm)	S9H
			174.1271 (- 3.4 ppm)	S9R

As incubações em HLM e RLM foram efetuadas segundo o método descrito na secção 2.3.1.1. e as incubações em S9H e S9R foram efetuadas segundo o procedimento descrito na secção 2.3.1.1.

Analisando a Tabela 8 conseguimos concluir que todos os metabolitos identificados foram observados nas incubações em HLM e S9R.

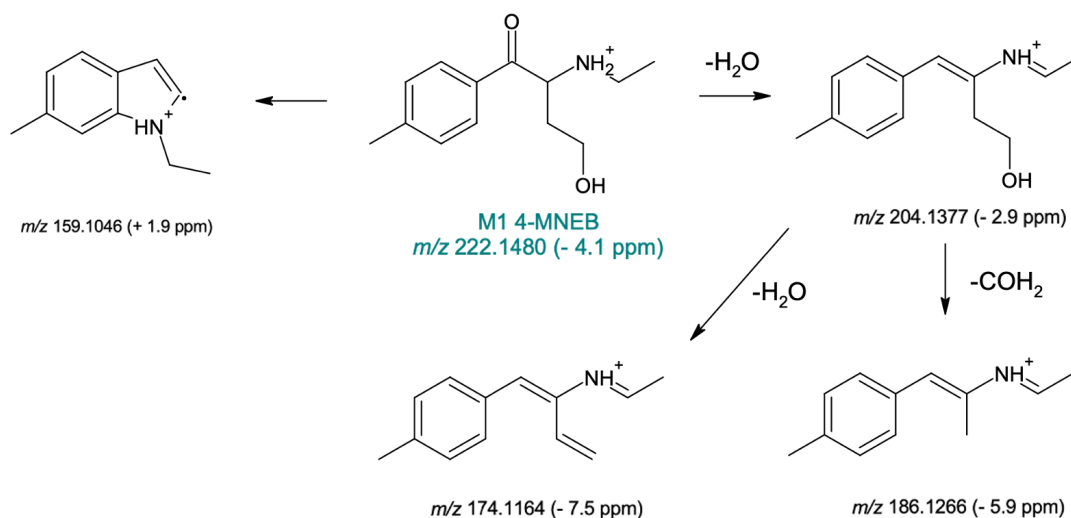
Com vista à correta identificação dos metabolitos é essencial conhecer-se os mecanismos de fragmentação da catinona precursora, neste caso a catinona 4-MNEB. Nas condições analíticas utilizadas na análise por LC-ESI-HRMS a catinona 4-MNEB tem um tempo de retenção (t_R) igual a 7.7 minutos, apresentou um sinal a m/z 206.1543 (+ 1.9 ppm) correspondente à molécula protonada. Quanto à análise do espectro MS/MS da catinona 4-MNEB (Anexo 6.2., Figura 12), como podemos observar no Esquema 9, foram observados quatro fragmentos, sendo que o fragmento maioritário tem sinal a m/z 188.1434 (0 ppm) e corresponde à perda de uma molécula de água a partir da molécula protonada desta catinona, esta perda resulta de um rearranjo que é característico de outras catinonas [71]. A subsequente perda do radical metilo resulta na formação do ião fragmento a m/z 173.1192 (- 4 ppm). Os outros dois iões observados no espectro MS/MS possuem sinais a m/z 144.0808 (0 ppm) e m/z 159.1046 (+ 1.9 ppm), e resultam da ciclização da molécula com formação de um anel indol, que também foi reportado no esquema de fragmentação de outras catinonas [68].



Esquema 9 - Esquema de fragmentação proposto para a catinona 4-MNEB.

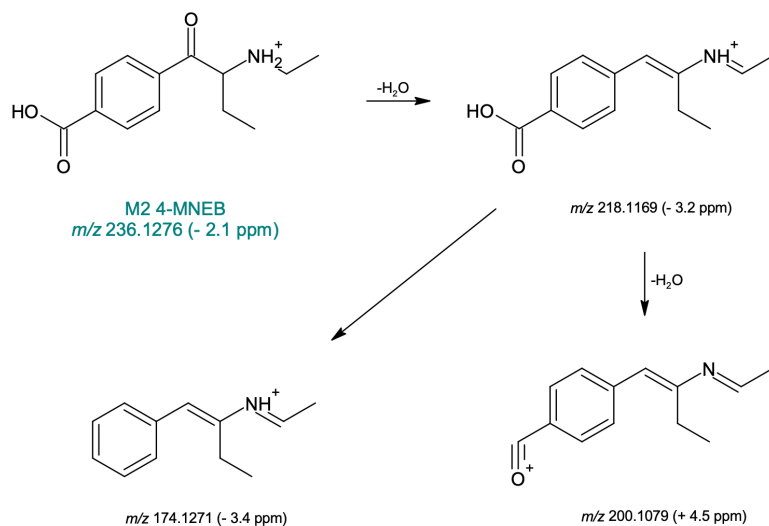
O metabolito M1-4-MNEB com sinal m/z 222.1480 (- 4.1 ppm), eluí a t_R igual 5.1 minutos (Anexo 6.2., Figura 13), resulta da hidroxilação da catinona precursora (4-MNEB) na cadeia alquílica. Na análise do espectro MS/MS do metabolito M1-4-MNEB identificou-se o ião fragmento maioritário a m/z 204.1377 (- 2.9 ppm) que resulta da perda de água característica das catinonas. O fragmento a m/z 186.1266 (- 5.9 ppm) subsequente perda a partir do ião fragmento anterior. O sinal base do espectro de MS/MS deste metabolito é identificado a m/z 174.1164 (- 7.5 ppm) e resulta da perda formaldeído a partir do fragmento a m/z 204.1377 (- 2.9 ppm). De realçar que este ião fragmento sugere que a hidroxilação ocorreu na cadeia alquílica, uma vez que qualquer

das outras posições de hidroxilação (grupo metilo aromático ou grupo substituinte do azoto) nunca resultaria num fragmento idêntico. Esta atribuição é ainda reforçada pela identificação do ião fragmento a m/z 159.1046 (+1.9 ppm), que só é possível caso a hidroxilação tenha ocorrido na cadeia alquílica.



Esquema 10 - Esquema de fragmentação proposto para o metabolito M1-4-MNEB.

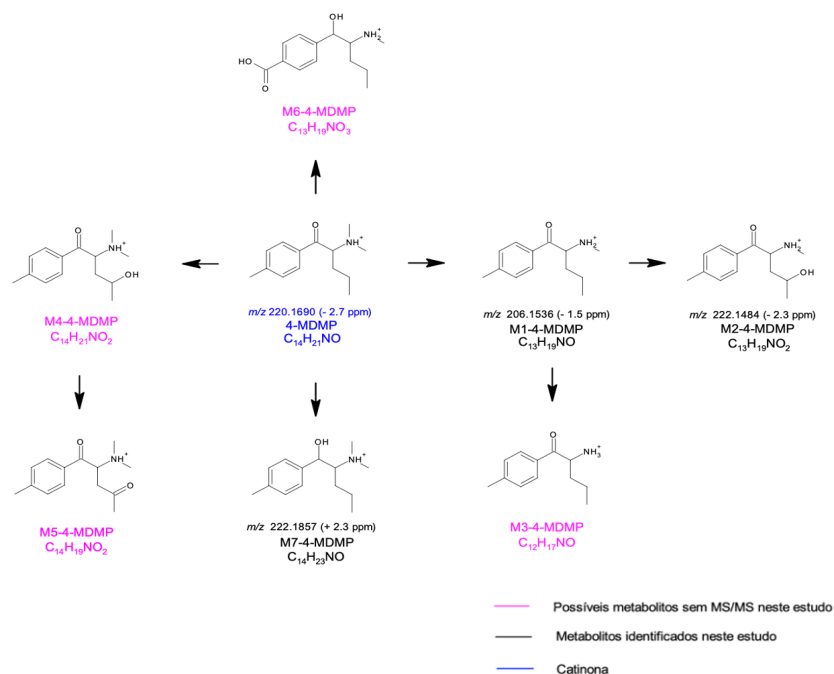
O metabolito M2-4-MNEB que eluí a t_R igual a 5.3 minutos, apresenta no espectro de full scan um sinal m/z 236.1276 (- 2.1 ppm) (Anexo 6.2., Figura 14), que é compatível com a molécula protonada de um metabolito que resulta de três reações metabólicas consecutivas: 1) hidroxilação do grupo metilo na posição 4' do anel aromático; 2) oxidação do álcool benzílico a aldeído; e 3) oxidação do aldeído a ácido carboxílico. Ao analisar o espectro MS/MS do metabolito M2-4-MNEB constatou-se a presença de três iões fragmento: 1) a m/z 218.1169 (- 2.1 ppm) o ião fragmento de resulta da perda de água característica das cationas; 2) a m/z 174.1271 (-3.4 ppm), a perda de CO_2 a partir do ião anterior; 3) m/z 200.1079 (+ 4.5 ppm), a perda de água a partir do primeiro ião fragmento (Esquema 11).



Esquema 11 - Esquema de fragmentação proposto para o metabolito M2-4-MNEB.

3.1.3. Identificação de metabolitos da catinona 4'-Metil-N,N-dimetilnorpentedrona (4-MDMP)

Tal como referido anteriormente, nunca foram reportados quaisquer estudos de identificação de metabolitos da catinona 4-MDMP na literatura. Tal como já foi explicado anteriormente, começou por se fazer um esquema das possíveis vias metabólicas de Fase I e Fase II da 4-MDMP, baseados em metabolitos de catinonas já reportadas na literatura (Anexo 6.1., Esquema 27). O Esquema 12 apresenta um esquema dos metabolitos de Fase I potencialmente identificado neste estudo nas incubações da catinona 4-MDMP, tendo em conta a identificação de sinais no espetro de *full scan* com valores de *m/z* compatíveis. No entanto apenas para os metabolitos M1-, M2- e M7-4-MDMP (apresentados a preto na Figura 20) foi comprovada a formação pela análise dos respetivos espetros de MS/MS.



Esquema 12 - Esquema dos possíveis metabolitos gerados nas incubações de Fase I da citalinona 4-MDMP.

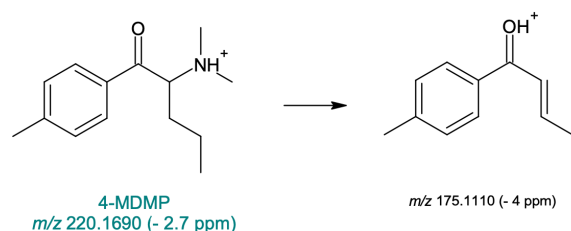
Tabela 9 - Tempo de retenção e valores m/z experimentais para a molécula protonada e para os iões fragmento característico (apresentados com o erro associado em ppm) para a citalinona 4-MDMP e para os seus metabolitos identificados em incubações com HLM, RLM, S9H e S9R.

Nome do metabolito	t_R (min)	m/z exp. $[M+H]^+$ [\pm erro (ppm)]	Iões fragmento [\pm erro (ppm)]	Identificação
4-MDMP	8.3	220.1690 (- 2.7 ppm)	175.1110 (- 4 ppm)	HLM RLM S9H S9R
M1-4-MDMP	8.2	206.1536 (- 1.5ppm)	188.1440 (+ 3.2 ppm)	HLM RLM S9H S9R
M2-4-MDMP	5.6	222.1484 (- 2.3 ppm)	174.1271 (- 2.3 ppm) 144.0808 (0 ppm) 161.0954 (- 4.3 ppm) 186.1272 (- 2.7 ppm) 204.1388 (+ 2.4 ppm)	HLM S9R
M7-4-MDMP	8.4	222.1857 (+ 2.3 ppm)	204.1756 (+ 4.4 ppm) 161.1216 (+ 9.9 ppm)	HLM S9H

As incubações em HLM e RLM foram efetuadas segundo o método descrito na secção 2.3.1.1. e as incubações em S9H e S9R foram efetuadas segundo o procedimento descrito na secção 2.3.1.1.

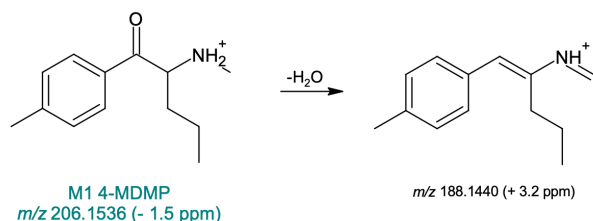
Analisando a Tabela 9 conseguimos concluir que todos os metabolitos identificados para a 4-MDMP foram identificados em HLM. É de referir que o sistema onde menos metabolitos foram identificados para a cationona 4-MDMP é RLM, uma vez que apenas se identificou o metabolito M1-4-MDMP neste sistema.

Nas condições analíticas da análise por LC-ESI-HRMS a cationona 4-MDMP com tempo de retenção (t_R) igual a 8.3 minutos, apresenta no espectro de *full scan* um sinal a m/z 220.1690 (- 2.7 ppm) correspondente à molécula protonada. Quanto à análise do espectro MS/MS desta cationona (Anexo 6.2., Figura 15), como podemos observar no Esquema 13, foi identificado um ião fragmento maioritário a m/z 175.1110 (- 4 ppm), resultante da perda da amina.



Esquema 13 - Esquema fragmentação proposto para a cationona 4-MDMP.

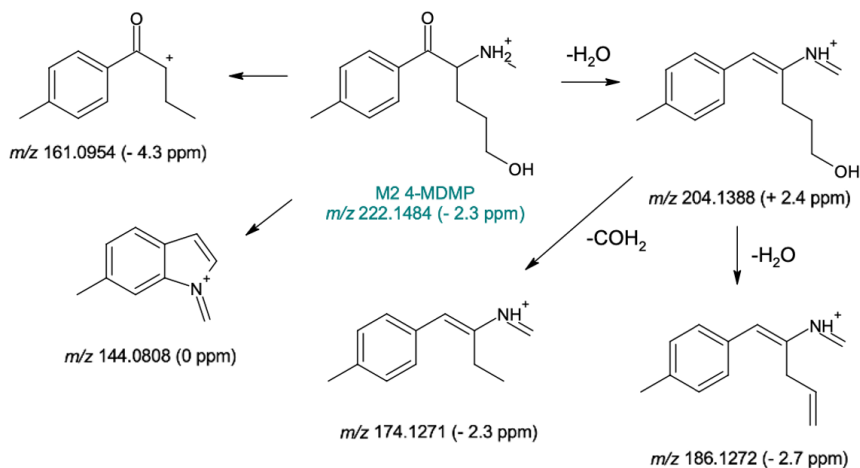
O metabolito M1-4-MDMP com sinal m/z 206.1536 (- 1.5 ppm), eluí a t_R igual 8.2 minutos (Anexo 6.2., Figura 16), e provém da *N*-desmetilação da cationona 4-MDMP. Na análise do espectro MS/MS deste metabolito identificou-se o ião fragmento maioritário característico nas cationonas com sinal m/z 188.1440 (+ 3.2 ppm), que correspondente à perda de uma molécula de água em relação à molécula protonada (Esquema 14).



Esquema 14 - Esquema de fragmentação proposto para o metabolito M1-4-MDMP.

O metabolito M2-4-MDMP (Anexo 6.2., Figura 17) eluí a t_R igual 5.6 minutos e apresenta um sinal no espectro de *full scan* a m/z 222.1484 (- 2.3 ppm), compatível com a molécula protonada de um metabolito resultante da *N*-desmetilação seguida de hidroxilação da cationona 4-MDMP. Pela análise do espectro MS/MS do metabolito M2-4-MDMP foi possível determinar que a hidroxilação ocorreu na cadeia alquílica, nomeadamente pela identificação o ião fragmento diagnóstico a m/z 174.1171 (- 2.3 ppm). Efetivamente, a perda de água a partir da molécula protonada leva à formação do ião fragmento a m/z 204.1388 (+ 2.4 ppm), que perde posteriormente formaldeído

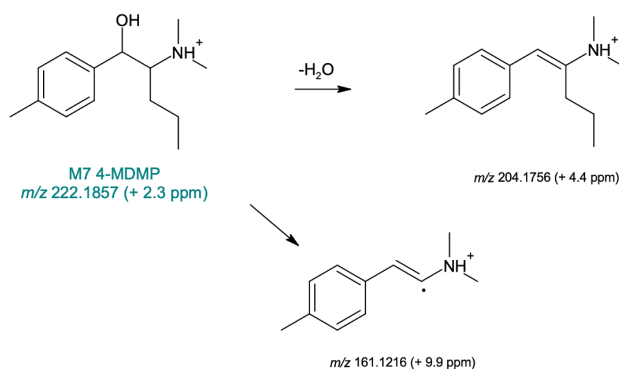
para formar o ião a m/z 174.1171 (- 2.3 ppm), só explicável caso a hidroxilação tenha ocorrido na cadeia alquílica. A identificação do ião fragmento a m/z 144.0808 (0 ppm), com formação do anel indólico, corrobora esta identificação. Identificou-se, ainda o ião fragmento a m/z 161.0954 (- 4.3 ppm) resultante da perda de formaldeído e do grupo amina (Esquema 15).



Esquema 15 - Esquema de fragmentação proposto para o metabolito M2-4-MDMP.

O metabolito M7-4-MDMP com sinal m/z 222.1857 (+ 2.3 ppm), eluí a t_R igual 8.4 minutos (Anexo 6.2., Figura 18), resulta da redução do grupo carbonilo da catinona 4-MDMP.

Na análise do espectro MS/MS do metabolito M7-4-MDMP identificou-se o ião fragmento maioritário com sinal m/z 204.1756 (+ 4.4 ppm), que correspondente à perda de uma molécula a partir da molécula protonada deste metabolito, a perda subsequente do radical propilo leva à formação do ião fragmento m/z 161.1216 (+ 9.9 ppm) (Esquema 16).

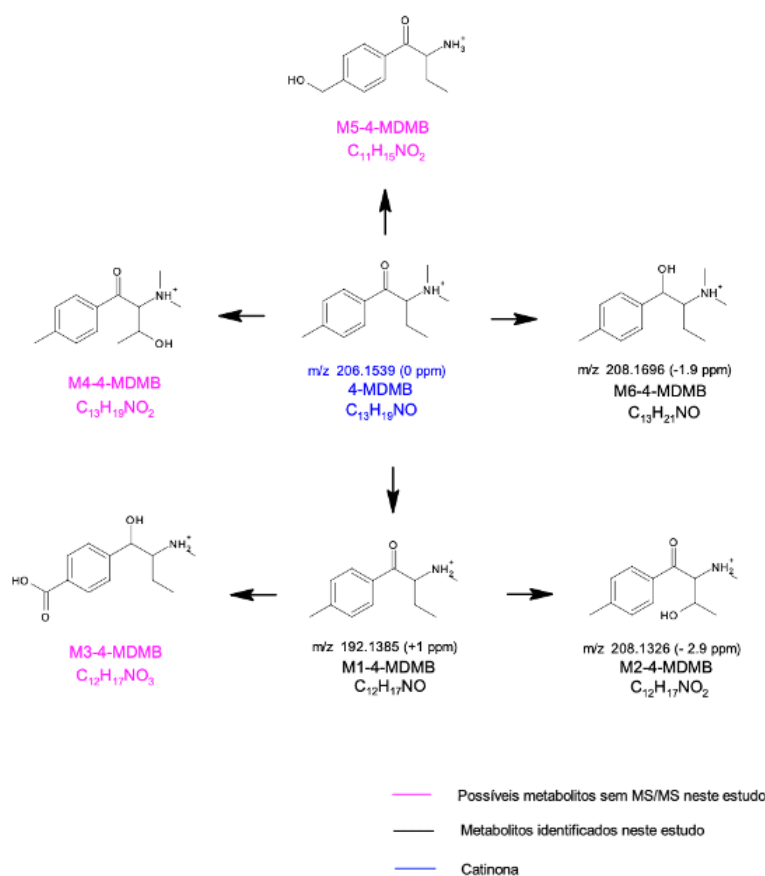


Esquema 16 - Esquema de fragmentação proposto para o metabolito M7-4-MDMP.

3.1.4. Identificação de metabolitos da catinona 4'-Metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (4-MDMB)

Tal como referido anteriormente a catinona 4-MDMB está à venda na *Cayman Chemical*. No entanto, nunca foram reportados quaisquer estudos de identificação de metabolitos desta catinona na literatura. Assim, foi efetuado um esquema das possíveis vias metabólicas da 4-MDMB para Fase I e Fase II, baseados em metabolitos de catinonas já reportadas na literatura (Anexo 6.1., Esquema 28).

O Esquema 17 apresenta um esquema dos metabolitos de Fase I da catinona 4-MDMB para os quais foi encontrado *m/z* compatível com as suas moléculas protonadas, no espetro de *full scan* obtidos nas várias incubações efetuadas com esta catinona, na presença do cofactor de Fase I, NADPH. No entanto, apenas para os metabolitos M1-, M2- e M6-4-MDMB foi comprovada a sua formação por interpretação do espetro de MS/MS.



Esquema 17 - Esquema dos possíveis metabolitos gerados nas incubações de Fase I da catinona 4-MDMB.

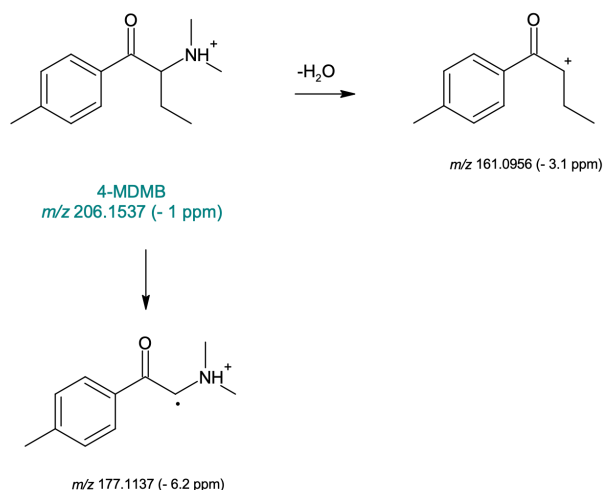
Tabela 10 - Tempo de retenção e valores m/z experimentais para a molécula protonada e para os iões fragmento característico (apresentados com o erro associado em ppm) para a catinona 4-MDMB e para os seus metabolitos identificados em incubações com HLM, RLM, S9H e S9R.

Nome do metabolito	t_R (min)	m/z exp. $[M+H]^+$ [\pm erro (ppm)]	Iões fragmento [\pm erro (ppm)]	Identificação
4-MDMB	7.4	206.1537 (- 1 ppm)	161.0956 (- 3.1 ppm) 177.1137 (- 6.2 ppm)	HLM RLM S9H S9R
M1-4-MDMB	7.3	192.1385 (+ 1 ppm)	174.1293 (+ 9.2 ppm) 145.0894 (+ 5.5 ppm)	HLM RLM S9R
M2-4-MDMB	4.7	208.1326 (- 2.9 ppm)	190.1218 (- 4.2 ppm) 172.1114 (- 4.1 ppm) 147.0809 (+ 3.4 ppm) 131.0735 (+ 3.8 ppm) 160.1120 (- 0.6 ppm) 177.1137 (- 6.2 ppm)	HLM S9R
M6-4-MDMB	7.5	208.1692 (- 1.9 ppm)	190.1595 (+ 2.6 ppm)	HLM RLM S9H

As incubações em HLM e RLM foram efetuadas segundo o método descrito na secção 2.3.1.1. e as incubações em S9H e S9R foram efetuadas segundo o procedimento descrito na secção 2.3.1.1.

Analisando a Tabela 10 conseguimos concluir que todos os metabolitos identificados para a 4-MDMB foram gerados nas incubações com HLM, desta forma este foi o sistema que resultou na identificação de mais metabolitos para a catinona 4-MDMB. É de referir que o sistema onde menos metabolitos foram identificados foi o S9H, uma vez que apenas o metabolito M6-4-MDMB foi identificado neste sistema.

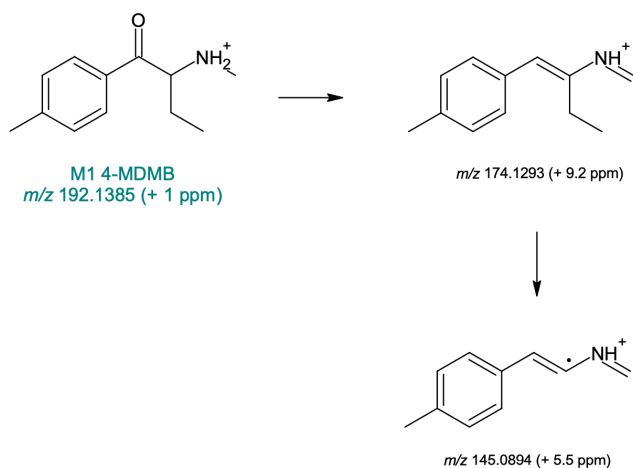
Nas condições analíticas da análise por LC-ESI-HRMS a catinona 4-MDMB apresenta um tempo de retenção (t_R) de 7.4 minutos, e o espetro de *full scan* desta cationa apresenta um sinal m/z 206.1537 (- 1 ppm) que correspondente à molécula protonada. Quanto à análise do espetro MS/MS da catinona 4-MDMB (Anexo 6.2., Figura 19), como podemos observar na Figura 18, foram identificados dois iões fragmento maioritários com sinal a m/z 161.0956 (- 3.1 ppm) e m/z 177.1137 (- 1 ppm), resultante da perda da amina e resultante da perda homolítica da cadeia lateral de etilo, respetivamente.



Esquema 18 - Esquema de fragmentação proposto para a cationona 4-MDMB.

O metabolito M1-4-MDMB com sinal a m/z 192.1385 (± 1 ppm), eluí a t_R igual 7.3 minutos (Anexo 6.2., Figura 20), resulta da *N*-desmetilação da cationona 4-MDMB.

Na análise do espectro MS/MS do deste metabolito identificou-se o ião fragmento maioritário a m/z 174.1293 (+ 9.2 ppm) que correspondente à perda de uma molécula de água característica das cationonas. A subsequente perda de radical etilo a partir deste este ião fragmento leva à formação do ião a m/z 145.0894 (+ 5.5 ppm) (Esquema 19).

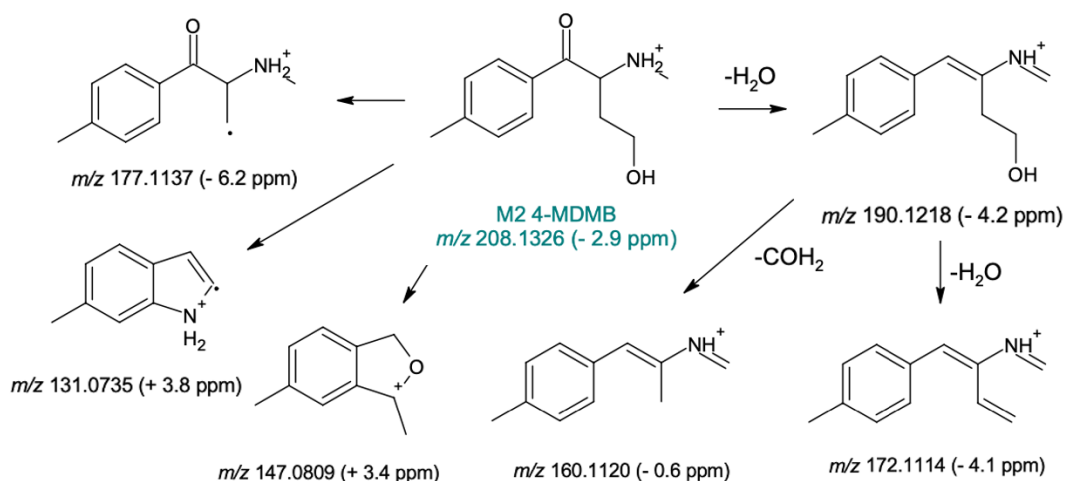


Esquema 19 - Esquema de fragmentação proposto para o metabolito M1-4-MDMB.

O metabolito M2-4-MDMB (Anexo 6.2., Figura 21) eluí a t_R igual 4.7 minutos e apresenta um sinal no espectro de *full scan* a m/z 208.1326 (- 2.9 ppm), compatível com a molécula protonada do metabolito resultante da *N*-desmetilação e hidroxilação da cadeia lateral alquílica da cationona 4-MDMB.

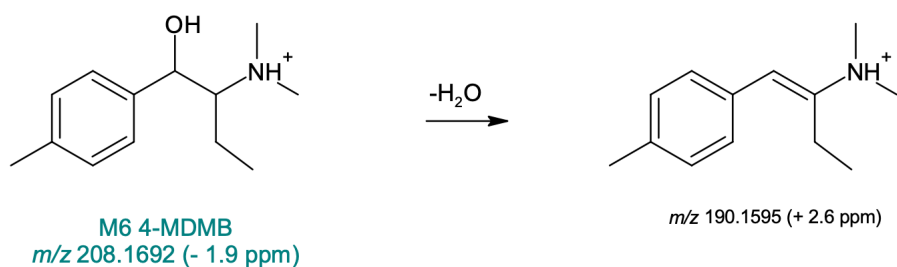
Na análise do espectro MS/MS do metabolito M2-4-MDMB identificou-se o ião fragmento maioritário com sinal m/z 160.1120 (- 0.6 ppm) resulta de duas quebras consecutivas: perda de uma molécula de água a partir da molécula protonada, que leva à formação do fragmento a m/z 190.1218 (- 4.2 ppm) seguida de perda de formaldeído da cadeia alquílica. Este fragmento sugere que a hidroxilação ocorreu na cadeia alquílica. O ião fragmento a m/z 172.1114 (- 4.1 ppm), também se forma a partir do ião a m/z 190.1218, mas pela perda de água. O ião fragmento a m/z 177.1137 (- 6.2 ppm) é também um fragmento diagnóstico que atesta que a hidroxilação ocorreu na cadeia alquílica, que resulta da perda homolítica da cadeia lateral (que leva consigo o grupo hidroxilo);

Os outros três iões identificados apresentam os seguintes sinais: 1) m/z 131.0735 (+ 3.8 ppm) corresponde à perda de uma molécula de água e ciclização como catião radical; e, por fim, 2) m/z 147.0809 (+ 3.4 ppm) que resulta de um rearranjo com perda da amina primária e da ciclização da molécula [68] (Esquema 20).



Esquema 20 - Esquema de fragmentação proposto para o metabolito M2-4-MDMB.

O metabolito M6-4-MDMB eluí a t_R igual 7.5 minutos e apresenta no espectro de *full scan* um sinal a m/z 208.1692 (- 1.9 ppm) (Anexo 6.2., Figura 22), compatível com a molécula protonada de um metabolito resultante da redução do grupo carbonila da catinona 4-MDMB. O pico base do espectro MS/MS do metabolito M6-4-MDMB é identificado a m/z 190.1595 (+ 2.6 ppm) que correspondente à perda de uma molécula de água a partir da molécula protonada deste metabolito.

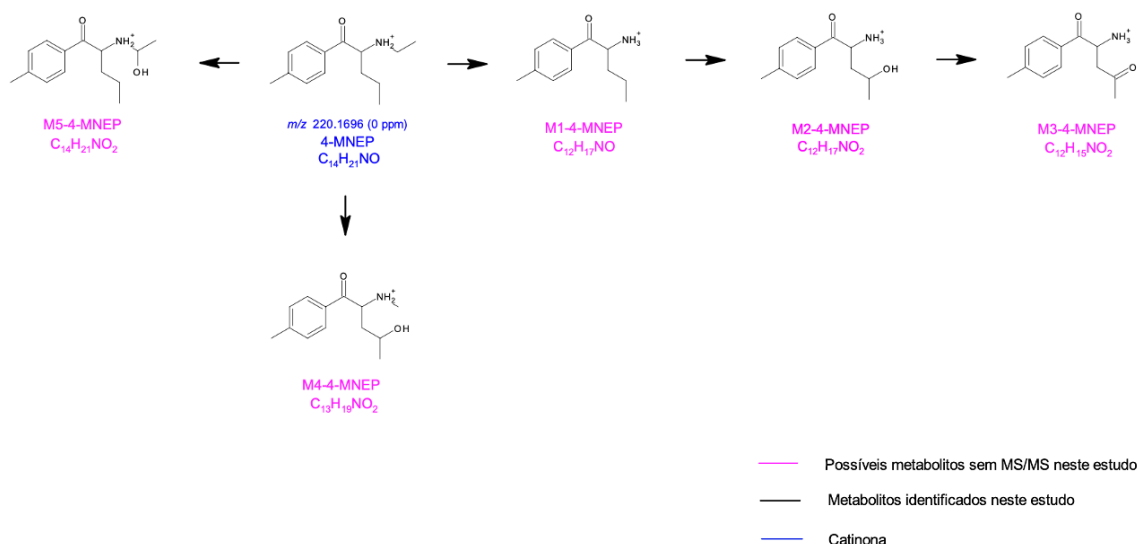


Esquema 21 - Esquema de fragmentação proposto para o metabolito M6-4-MDMB.

3.1.5. Identificação de metabolitos da catinona 4'-Metil-N-etilnorpentedrona (4-MNEP)

Tal como referido anteriormente a catinona 4-MNEP já foi reportada no Luxemburgo em 2014 e encontra-se à venda como padrão na *Cayman Chemical*, e já foram identificados três metabolitos de Fase I para esta catinona em estudo *in vitro* em HLM, sendo que dois destes metabolitos de Fase I foram identificados em urina humana [64, 72]. À semelhança do que foi efetuado para as restantes catinonas escolhidas para este estudo foi primeiro efetuado um esquema das possíveis vias metabólicas Fase I e Fase II da 4-MNEP, baseados em metabolitos reportados na literatura para outras catinonas (Anexo 6.1., Esquema 29).

O Esquema 22 apresenta um esquema dos metabolitos para os quais foram encontradas evidências da sua formação no espetro de *full scan*. Será de referir que destes metabolitos, o M1-4-MNEP já foi identificado na literatura num estudo *in vitro* em HLM e em urina humana, contudo neste estudo não foi possível comprovar a sua identificação por não se ter identificado um espetro de MS/MS compatível [64]. Este facto deve-se provavelmente à diferença entre as condições experimentais utilizados nas incubações, sendo que as principais diferenças residem na concentração de catinona utilizada nas incubações : no nosso estudo utilizou-se a catinona numa concentração de 10 μM , enquanto que Benedicte et al. [64] Utilizaram concentrações de 100 μM or 500 μM . Outro factor que poderá ter contribuído para a diferença de resultados poderá ser o facto de este autores terem utilizado HLM com o dobro da concentração (2 mg/mL) da por nós utilizada [64].



Esquema 22 - Esquema dos possíveis metabolitos gerados nas incubações de Fase I da catinona 4-MNEP.

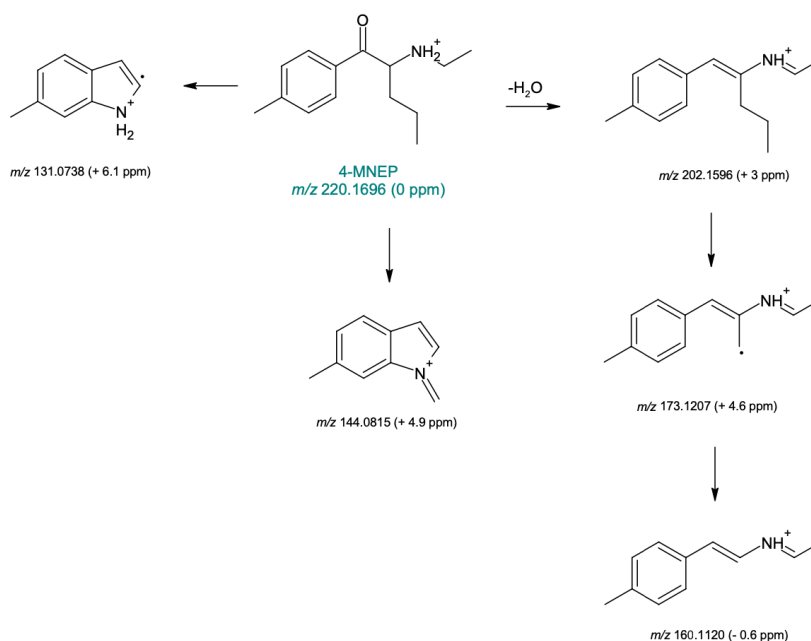
Tabela 11 - Tempo de retenção e valores m/z experimentais para a molécula protonada e para os iões fragmento característico (apresentados com o erro associado em ppm) para a catinona 4-MDMB e para os seus metabolitos identificados em incubações com HLM, RLM, S9H e S9R.

Nome do metabolito	t_R (min)	m/z exp. $[M+H]^+$ [\pm erro (ppm)]	Iões fragmento [\pm erro (ppm)]	Identificação
4-MNEP	8.6	220.1696 (0 ppm)	202.1596 (+ 3 ppm)	HLM
			173.1207 (+ 4.6 ppm)	RLM
			144.0815 (+ 4.9 ppm)	S9H
			131.0738 (+ 6.1 ppm)	S9R
			160.1120 (- 0.6 ppm)	

As incubações em HLM e RLM foram efetuadas segundo o método descrito na secção 2.3.1.1. e as incubações em S9H e S9R foram efetuadas segundo o procedimento descrito na secção 2.3.1.1.

Desta forma, apenas foi possível identificar por LC-HRMS a catinona inalterada com um tempo de retenção (t_R) igual a 8.6 minutos e apresenta no espectro de *full scan* um sinal m/z 220.1696 (0 ppm), correspondente à molécula protonada. Quanto à análise do espectro MS/MS da catinona 4-MNEP (Anexo 6.2., Figura 23), como podemos observar no Esquema 23, o ião fragmento maioritário identificado a m/z 202.1596 (+ 3 ppm) resulta da perda de uma molécula de água, característica encontra-se reportado na literatura [17, 64, 69]. A perda subsequente de radical etilo, a partir deste fragmento, leva à formação do ião a m/z 173.1204 (+ 4.6 ppm).

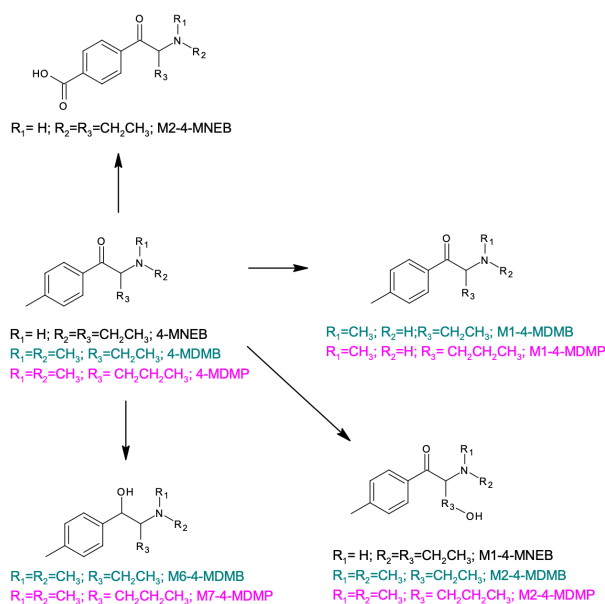
Foram identificados mais três iões fragmento para a catinona 4-MNEP: m/z 144.0815 (+ 4.9 ppm), m/z 131.0738 (+ 6.1 ppm) resultante do rearranjo com formação de um anel de indol e m/z 160.1120 (- 0.6 ppm) que resulta da perda da cadeia lateral na forma de propeno [17, 64, 68].



Esquema 23 - Esquema da fragmentação proposto para a catinona 4-MNEP.

É importante referir que dos sistemas *in vitro* utilizados os que conduziram à identificação de mais metabolitos foram o HLM e o S9R.

No Esquema 24 estão representadas as vias metabólicas identificadas para as catinonas selecionadas para este estudo. Uma via metabólica comum das duas catinonas com amins terciárias é a *N*-desalquilação e a redução do grupo funcional cetónico. A hidroxilação da cadeia alquílica é observada para três das catinonas selecionadas. Para a 4-MNEB também é observado o metabolito com a função de ácido carboxílico, que resulta da oxidação do substituinte metílico aromático.



Esquema 24 - Esquema geral dos metabolitos identificados neste estudo em incubações HLM, RLM, S9H e S9R.

4. Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo a identificação de metabolitos das catinonas 4-MNEB, 4-MDMP, 4-MDMB e 4-MNEP. Para a geração destes metabolitos foram utilizados vários sistemas *in vitro* metabolicamente competentes: RLM, HLM, S9H e S9R. As incubações foram realizadas na presença dos cofatores NADPH, no caso da Fase I, e UDPGA e NADPH, no caso da Fase II. Os metabolitos gerados foram analisados por Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução de tandem com ionização por *Electrospray* (LC-ESI-HRMS). A catinona α -PVP foi utilizada como controlo positivo, por já serem conhecidos alguns dos seus metabolitos. Verificou-se neste estudo a presença de metabolitos de Fase I já reportados na literatura para esta catinona, nomeadamente os metabolitos maioritários identificados em urina humana, o que viabiliza os métodos utilizados nas incubações e análise das mesmas. De notar que apenas foram identificados metabolitos de Fase I, uma vez que, nas condições de incubação de Fase II utilizadas neste estudo não se encontrou evidencias de formação de metabolitos, o que se poderá dever à perda de atividade enzimática dos sistemas utilizados.

Neste estudo foi possível a identificação, pela primeira vez, de dois metabolitos de Fase I da catinona 4-MNEB, três metabolitos de Fase I da catinona 4-MDMP e três metabolitos de Fase I da catinona 4-MDMB. A não identificação de metabolitos para a 4-MNEP deve-se provavelmente à baixa metabolização desta catinona, o que justifica a necessidade de utilização de uma concentração de catinona substancialmente mais elevada para a observação de metabolitos desta catinona em estudos anteriores. É importante referir que a via metabólica comum a todas as catinonas envolveu a hidroxilação da cadeia alquílica. Uma via metabólica comum das duas catinonas com aminas terciárias envolve a *N*-desalquilação e a redução do grupo funcional cetónico. Os sistemas *in vitro* que conduziram à identificação de um maior número de metabolitos foram os HLM e S9R.

A identificação dos metabolitos reportados pela primeira vez neste trabalho poderá ter um papel importante de auxílio às autoridades competentes para validar o consumo destas catinonas selecionadas, por análise de amostras de matrizes biológicas. Este é apenas o primeiro passo na identificação dos metabolitos destas catinonas. Seria importante que para futuro trabalho se pudessem analisar amostras de urina e sangue de pessoas que se encontram sob o efeito destas substâncias, para que se validem a presença destes metabolitos nestas amostras biológicas. Posteriormente, e caso se verifique a existência dos mesmos, estes poderiam ser sintetizados para que se pudesse avaliar posteriormente a sua toxicidade.

5. Referências

- [1] Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências, “Novas Substâncias Psicoativas” [Online]. Disponível em: <http://www.sicad.pt/PT/Cidadao/SubstanciasPsicoativas/Paginas/detalhe.aspx?itemId=19> [Acedido a abril de 2020].
- [2] Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, “Relatório Europeu sobre Drogas 2020: Tendências e evoluções”. Serviço das Publicações da União Europeia, Luxemburgo, 2020.
- [3] “Serviço de Química e Toxicologia Forense” [Online]. Disponível em: https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=129:servico-de-quimica-e-toxicologia-forenses&catid=37&Itemid=292 [Acedido a abril 2020].
- [4] “Exames Periciais – Informações – Polícia Judiciária” [Online]. Disponível em: <https://www.policiajudiciaria.pt/lpc-exames-periciais/> [Acedido a abril de 2020].
- [5] “Síntese e Avaliação Biológica de Catinonas Psicoativas” [Online]. Disponível em: <https://ciencias.ulisboa.pt/sites/default/files/fcul/dep/dqb/doc/t29.pdf> [Acedido a abril de 2020].
- [6] “Diretiva (UE) 2017/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de novembro de 2017” [Online]. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32017L2103> [Acedido a maio de 2020].
- [7] Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, “Relatório Europeu sobre Drogas 2019: Tendências e Evoluções”. Serviço das Publicações da União Europeia, Luxemburgo, 2019.
- [8] Bronze, S.R.S. (2016). *Síntese e avaliação biológica de catinonas psicoativas*. Tese de Mestrado em Química. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa.
- [9] Weaver, M.F.; Hopper, J.A.; Gunderson, E.W. – “Designer drugs 2015: assessment and management”. *Addiction science & clinical practice*, pp. 8, 2015.
- [10] Escola Europeia sobre Álcool e Drogas, “Relatório ESPAD 2019: Resultados do Projeto de Pesquisa Escolar Europeia sobre Álcool e Outras Drogas”.

- [11] “Decreto-lei nº54/2013, 17 de abril”. [Online]. Disponível em: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/260418/details/maximized> [Acedido a maio de 2020].
- [12] “Portaria nº154/2013, 17 de abril”. [Online]. Disponível em: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/260421/details/> [Acedido a maio de 2020].
- [13] “Regulamento da UE 2017/2101 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de novembro de 2017”. [Online]. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32017R2101> [Acedido a maio de 2020].
- [14] Prosser, J.M. e Nelson, L.S. – “The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones.” *Journal of Medical Toxicology*, pp. 33–42, 2012.
- [15] Rosenbaum, C.D., *et al.*, “Here Today, Gone Tomorrow. and Back Again? A Review of Herbal Marijuana Alternatives (K2, Spice), Synthetic Cathinones (Bath Salts), Kratom, Salvia divinorum, Methoxetamine, and Piperazines.” *Journal of Medical Toxicology*, pp. 15-32, 2012.
- [16] “Catinonas sintéticas (“Bath Salts”)”. [Online]. Disponível em: <https://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/synthetic-cathinones-bath-salts> [Acedido a maio de 2020].
- [17] Zawilska, J.B. (2018). *Synthetic cathinones – Novel Addictive and Stimulatory Psychoactive Substances*. 1ª Edição, Volume 12, Springer.
- [18] Kelly, J.P., “Cathinone derivatives: A review of their chemistry, pharmacology and toxicology.” *Drug Testing and Analysis.*, pp. 439-453, 2011.
- [19] Katz, D.P., *et al.*, “Synthetic cathinones: "a khat and mouse game"”. *Toxicology Letters*, 229, pp. 349-56, 2014.
- [20] Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, “Relatório Europeu Anual sobre Drogas 2006: Tendências e Evoluções”. Serviço das Publicações da União Europeia, Luxemburgo, 2006.
- [21] “Catinonas Sintéticas”. [Online]. Disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/26171915/catinonas-sinteticas> [Acedido a maio 2020].
- [22] Coppola, M. e Mondola, R.; “Synthetic cathinones: chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as "bath salts" or "plant food".” *Toxicology Letters*, 211, pp. 144-149, 2012.

- [23] Karila, L., *et al.*, "Synthetic cathinones: a new public health problem." *Current Neuropharmacology*, 13, pp. 12-20, 2015.
- [24] Spiller, H. A., *et al.*, "Clinical experience with and analytical confirmation of "bath salts" and "legal highs" (synthetic cathinones) in the United States." *Clinical Toxicology (Phila)*, 49, pp. 499-505, 2011.
- [25] Valente, M. J., *et al.*; "Khat and synthetic cathinones: a review." *Archives Toxicology*, 88, pp. 15-45, 2014.
- [26] Kersten, B. P. e Mclaughlin, M. E.; "Toxicology and management of novel psychoactive drugs." *Journal of Pharmacy Practice*, 28, pp. 50-65, 2015.
- [27] Lehner, K.R. e Baumann, M.H.; "Psychoactive "Bath Salts": Compounds, Mechanisms and Toxicities", *Neuropsychopharmacology*, 38(1), pp. 243-244, 2012.
- [28] Ellefsen, K. N., *et al.*, "Synthetic cathinone pharmacokinetics, analytical methods, and toxicological findings from human performance and postmortem cases". *Drug Metabolism Reviews*, vol. 48, no.2, pp. 237-265, 2016.
- [29] Musselman, M.E. e Hampton J.P.; "Not for human consumption: A review of emerging designer drugs." *Pharmacotherapy*, pp. 745–757, 2014.
- [30] Zawilska, J.B. e Andrzejczak, D.; "Next generation of novel psychoactive substances on the horizon - A complex problem to face." *Drug and Alcohol Dependence*, pp. 1-17, 2015.
- [31] German, C. L., *et al.*, "Bath salts and synthetic cathinones: An emerging designer drug phenomenon". *Life Sciences*, vol. 97, pp. 2-8, 2014.
- [32] Weinstein, A. M., *et al.*, "Synthetic Cathinone and Cannabinoid Designer Drugs Pose a Major Risk for Public Health." *Frontiers in psychiatry*, pp. 23, 2017.
- [33] McGraw, M. e McGraw, L.; "Bath Salts: Not as Harmless as They Sound." *Journal of Emergency Nursing*, pp. 582–588, 2012.
- [34] Ballabh, P., *et al.*, "The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications"; *Neurobiology of Disease*, pp. 1–13, 2004.
- [35] Golan, D. E., *et al.*, "Princípios de Farmacologia – A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia."; 2ª Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

- [36] Nóbrega, L. e Dinis-Oliveira R. J., "The synthetic cathinone α -pyrrolidinovalerophenone (α - PVP): pharmacokinetic and pharmacodynamic clinical and forensic aspects". *Drug Metabolism Reviews* vol. 50, pp. 125-139, 2018.
- [37] Simmler, L. D., *et al.*, "Pharmacological characterization of designer cathinones *in vitro*". *British Journal of Pharmacology*, vol. 168, pp. 458-470, 2013.
- [38] Barbosa, J., *et al.*, "Comparative metabolismo of tramadol and tapentadol: a toxicological perspective". *Drug Metabolism Reviews*, vol.48, pp. 577-592, 2016.
- [39] Dinis-Oliveira, R. J., "Metabolomics of methadone: clinical and forensic toxicological implications and variability of dose response". *Drug Metabolism Reviews*, vol. 48, pp. 568- 576, 2016.
- [40] Kamel, A. e Prakash, C., "High Performance Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization/Tandem Mass Spectrometry (HPLC/API/MS/MS) in Drug Metabolism and Toxicology". *Current Drug Metabolism* vol. 7, pp. 837-852, 2006.
- [41] Roskar, R. e Lusin T. T., "Analytical Methods for Quantification of Drug Metabolites in Biological Samples". *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*, 2012.
- [42] Foti, R. S. e Dalvie D. K., "Cytochrome P450 and non-Cytochrome P450 Oxidative Metabolism". *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 44, pp. 1229-1245, 2016.
- [43] Grillo, M. P., *et al.*, " Detecting reactive drug metabolites for reducing the potential for drug toxicity". *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, vol. 11, no. 8, pp. 1281- 1302, 2015.
- [44] Kalgutkar, A. S., *et al.*, "A Comprehensive Listing of Bioactivation Pathways of Organic Functional Groups". *Current Drug Metabolism*, vol. 6, pp. 161-225, 2005.
- [45] Meyer, M. R., *et al.*, "The *in vivo* and *in vitro* metabolism and the detectability in urine of 3',4'-methylenedioxy- α -pyrrolidinobutyrophenone (MDPBP), and a new pyrrolidinophenone type designer drug studied by GC-MS and LC-MSⁿ". *Drug Testing and Analysis*, vol. 6, pp. 746-756, 2014.
- [46] Meyer, M. R., *et al.*, "Studies on the metabolism of the α -pyrrolidinophenone designer drug methylenedioxy-pyrovalerone (MDPV) in rat and human urine and human liver microsomes using GC-MS and LC-high-resolution MS and its detectability in urine by GC-MS". *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 45, pp. 1426-1442, 2010.

- [47] Meyer, M. R., *et al.*, "Beta-keto amphetamines: studies on the metabolism of the designer drug mephedrone and toxicological detection of mephedrone, butylone, and methylone in urine using gas chromatography-mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 397, pp. 1225-1233, 2010.
- [48] Khreit, O. I., *et al.*, "Elucidation of the Phase I and Phase II metabolic pathway of (+/-)-4'-methyl-methacathinone (4-MMC) and (+/-)-4'-(trifluoromethyl)-methcathinone (4- TFMMC) in rat liver hepatocytes using LC-MS and LC-MS(2)". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 72, pp. 177-185, 2013.
- [49] Pedersen, A. J., *et al.*, "In vitro metabolism studies on mephedrone and analysis of forensic cases". *Drug Testing and Analysis*, vol. 5, pp. 430-438, 2013.
- [50] Pozo, O. J., *et al.*, "Mass spectrometric evaluation of mephedrone in vivo human metabolism: Identification of phase I and phase II metabolites, including a novel succinyl conjugate". *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 43, pp. 248-257, 2015.
- [51] Helfer, A. G., *et al.*, "Elucidation of the metabolites of the novel psychoactive substance 4-methyl-N-ethyl-cathinone (4-MEC) in human urine and pooled liver microsomes by GC-MS and LC-HR-MS/MS techniques and of its detectability by GC-MS or LC-MS(n) standard screening". *Drug Testing and Analysis*, vol. 7, pp. 368-375, 2015.
- [52] Mueller, D. M. e Rentsch, K. M., "Generation of metabolites by na automated online metabolism method using human liver microsomes with subsequeute identification by LC- MS(n), and metabolismo of 11 cathinones". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 402, pp. 2141-2151, 2012.
- [53] Sauer, C., *et al.*, "New designer drug α -pyrrolidinovalerophenone (PVP): studies on its metabolismo and toxicological detection in rat urine using gas chromatographic/mass spectrometric techniques". *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 44, pp. 952-964, 2009.
- [54] Tyrkkö, E., *et al.*, "In silico and *in vitro* metabolismo studies support identification of designer drugs in human urine by liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol.405, pp.6697-6709, 2013.
- [55] Springer, D., *et al.*, "Metabolism of the new designer drug α - pyrrolidinopropiophenone (PPP) and the toxicological detection of PPP and 4'-methyl- α - pyrrolidinopropiophenone (MPPP) studied in rat urine using gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography B*, vol. 796, pp. 253-266, 2003.

- [56] Shima, N., *et al.*, "Metabolism of the newly encountered designer drug α -pyrrolidinovalerophenone in humans: identification and quantification of urinary metabolites". *Forensic Toxicology*, vol. 32, pp. 59-67, 2014.
- [57] Strano-Rossi, S., *et al.*, "Toxicological determination and *in vitro* metabolism of the designer drug methylenedioxypropylvalerone (MDPV) by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol.24, pp. 2706-2714, 2010.
- [58] Negreira, N., *et al.*, "In vitro Phase I and Phase II metabolism of alpha PVP-pyrrolidinovalerophenone (alpha-PVP), methylenedioxypropylvalerone (MDPV) and methedrone by human liver microsomes and human liver cytosol". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 407, pp. 5803-5816, 2015.
- [59] Uralets, V., *et al.*, "Testing for designer stimulants: Metabolic profiles of 16 synthetic cathinones excreted free in human urine". *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 38, pp. 233- 241, 2014.
- [60] Fasinu, P., *et al.*, "Liver-Based *In Vitro* Technologies for Drug Biotransformation Studies – A Review". *Current Drug Metabolism*, vol. 13, pp. 215-224, 2012.
- [61] Meyer, M. R., *et al.*, "New cathinone-derived designer drugs 3-bromomethcathinone and 3-fluoromethcathinone: Studies on their metabolism in rat urine and human liver microsomes using GC-MS and LC-high-resolution MS and their detectability in urine". *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 47, pp. 253-262, 2012.
- [62] Brandon, E. F. A., *et al.*, "An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons". *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 189, no. 3, pp. 233-246, 2003.
- [63] Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, "Relatório Europeu sobre Drogas 2015: Tendências e evoluções". Serviço das Publicações da União Europeia, Luxemburgo, 2015.
- [64] Benedicte, L., *et al.*, "Case Report on two-cathinones abuse: MPHP and N-ethyl-4'methylnorpentedrone, with a fatal outcome.". *Forensic Toxicol*, 38, pp. 243–254, 2019.
- [65] "Site Cayman Chemical: 4-MDMB". [Online]. Disponível em: <https://www.caymanchem.com/search?q=4-MDMB> [Acedido em outubro 2020].
- [66] Júlio, S.M.D., (2019). *Identificação, Síntese e Quantificação de Novas Substâncias Psicoativas*. Tese de Mestrado em Química Forense. Universidade de Coimbra, Coimbra.

[67] Richardson, S.J., *et al.*, "Efficiency in Drug Discovery: Liver S9 Fraction Assay As a Screen for Metabolic Stability." *Drug Metabolism Letters* vol. 10, pp. 83-90, 2016.

[68] Wagmann, L., *et al.*, "Toxicokinetic studies of the four new psychoactive substances 4-chloroethcathinone, N-ethylnorpentylone, N-ethylhexedrone, and 4-fluoro-alpha-pyrrolidinohexiophenone." *Forensic Toxicology*, 38, pp. 59-69, 2019.

[69] Majchrzak, M., *et al.*, "The newest cathinone derivatives as designer drugs: an analytical and toxicological review." *Forensic Toxicology*, vol. 36, pp. 33-50, 2018.

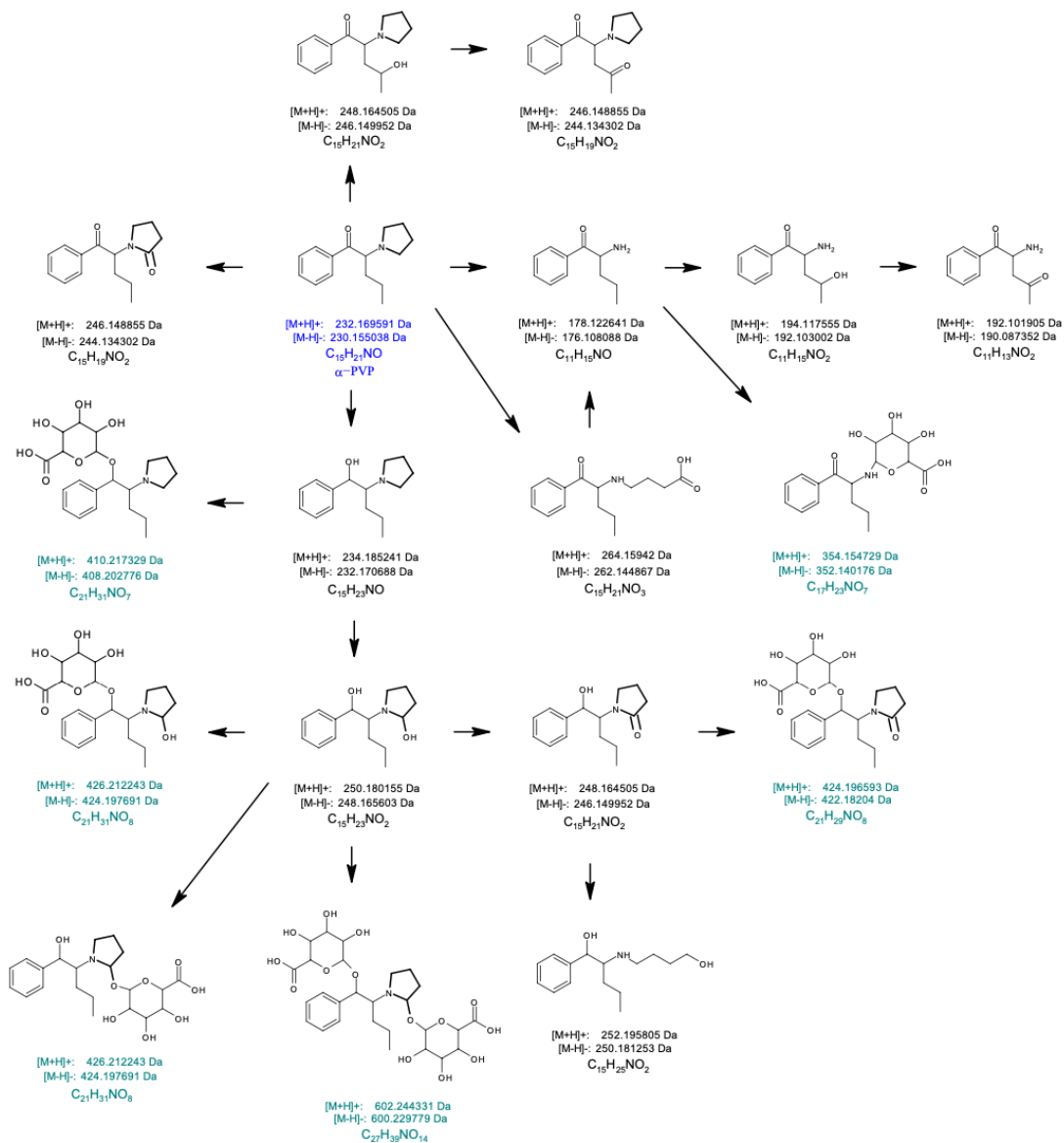
[70] Uchiyama, N., *et al.*, "Characterization of four new designer drugs, 5-chloro-NNEI, NNEI indazole analog, α -PHPP and α -POP, with 11 newly distributed designer drugs in illegal products.", *Science Direct*, vol. 243, pp. 1-13, 2014.

[71] Vijlder, T.De., *et al.*, "A tutorial in small molecule identification via electrospray ionization-mass spectrometry: The practical art of structural elucidation". *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 37, pp. 607-629, 2018.

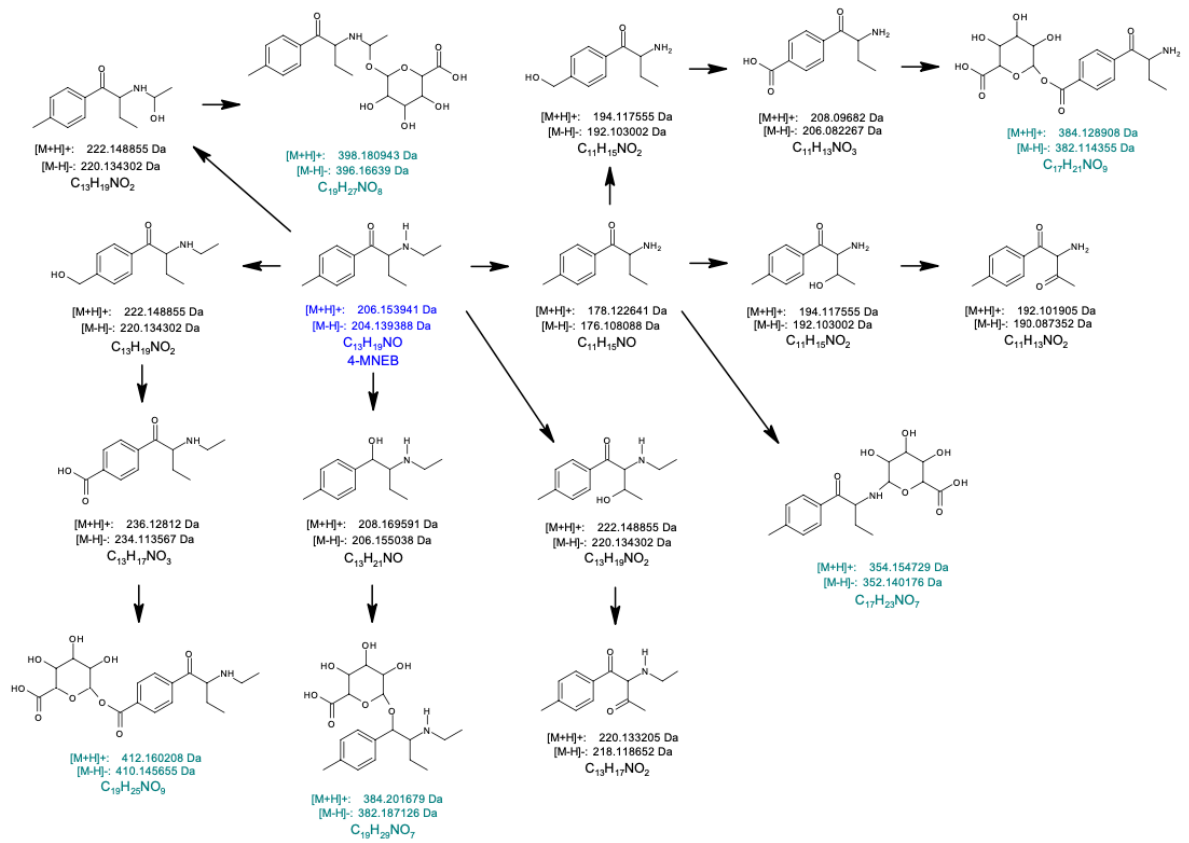
[72] "Site Cayman Chemical: 4-MNEP". [Online]. Disponível em: <https://www.caymanchem.com/search?q=4-MEAP> [Acedido em outubro 2020].

6. Anexos

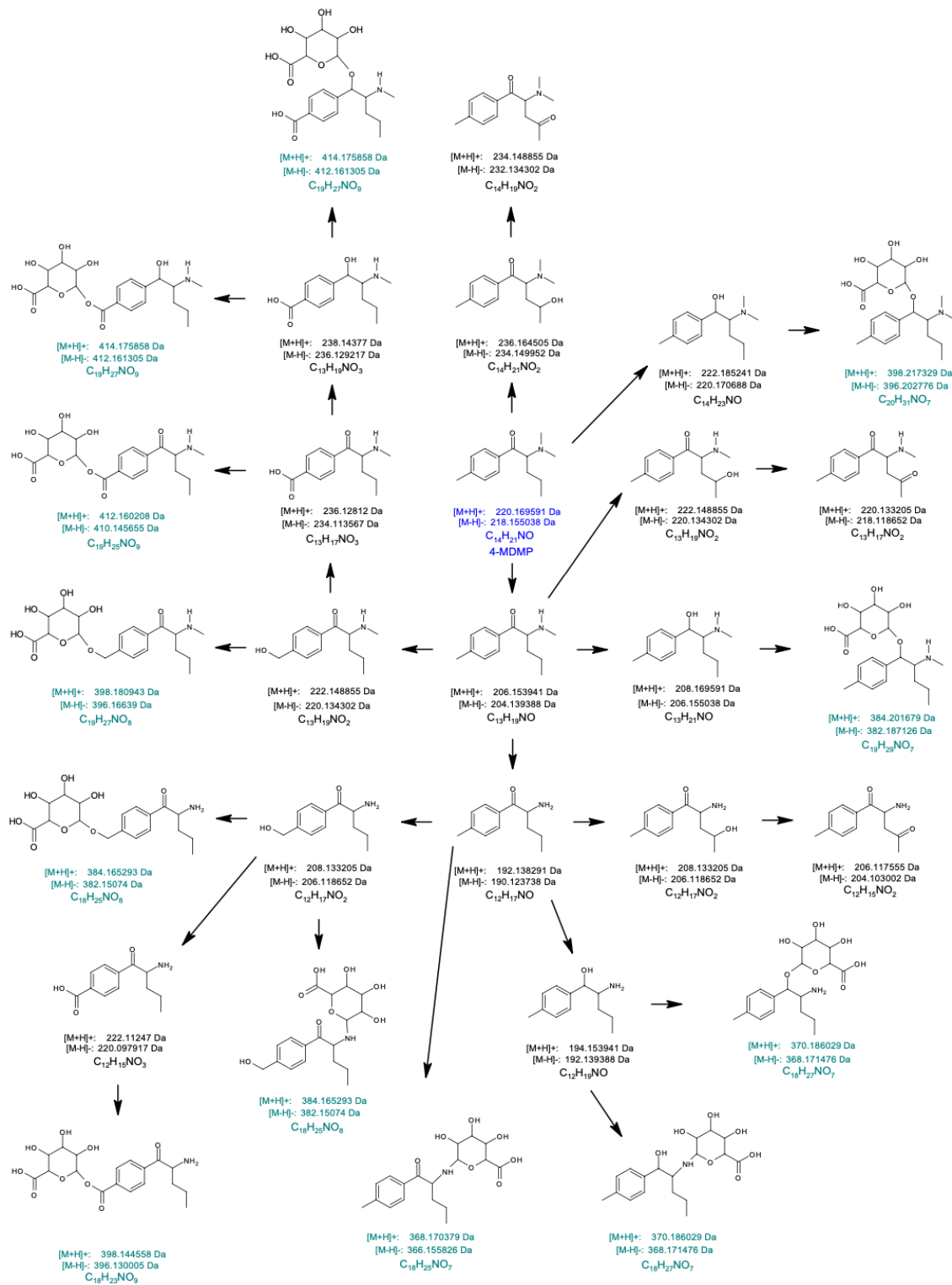
6.1. Anexo I – Vias metabólicas plausíveis de Fase I e Fase II (glucoronidação) das catinonas selecionadas para este estudo: α -PVP, 4-MNEB, 4-MDMP, 4-MDMB e 4-MNEP



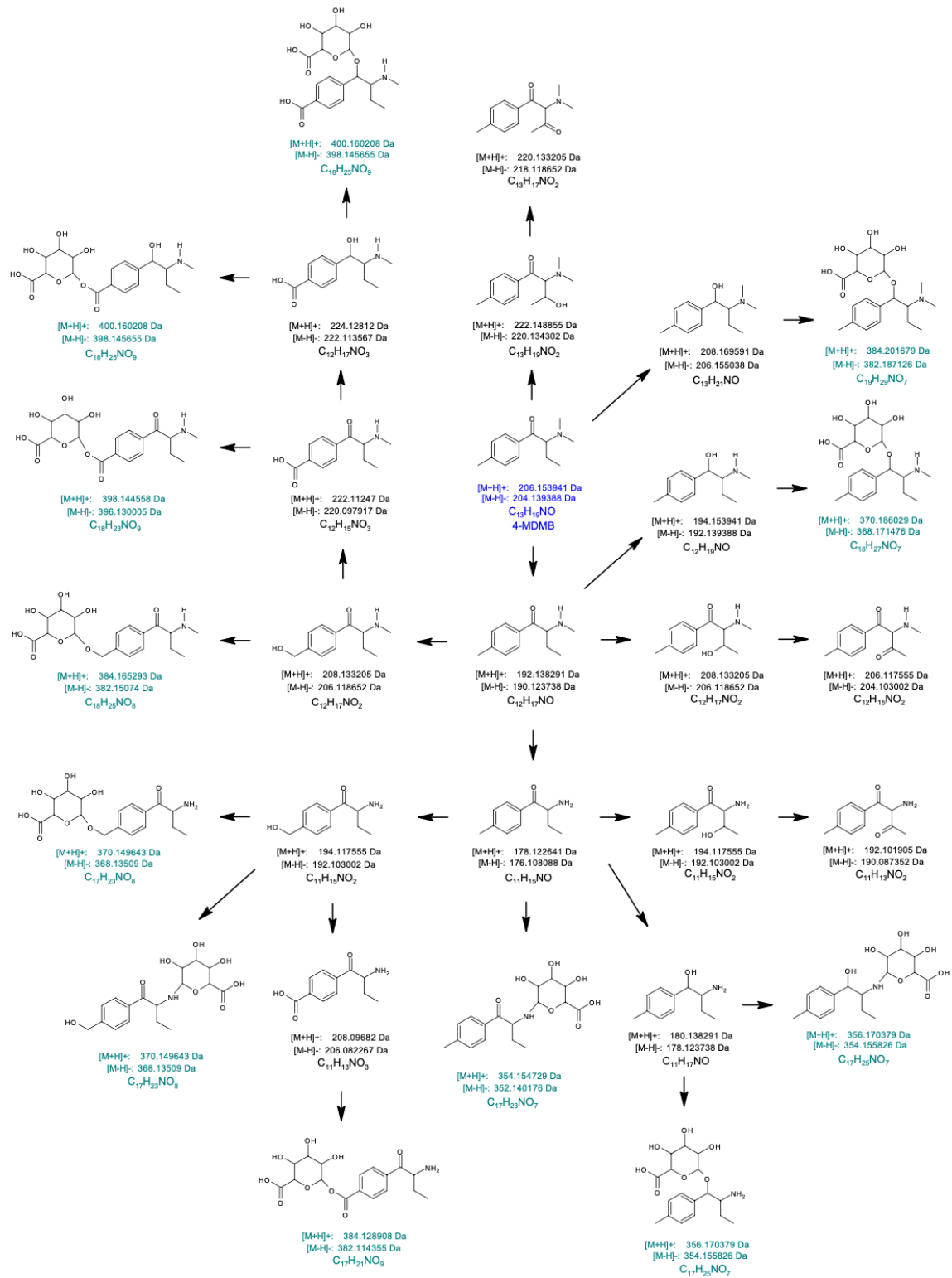
Esquema 25 - Metabolismos plausíveis de Fase I e Fase II (glucoronidação) para a catinona α -PVP.



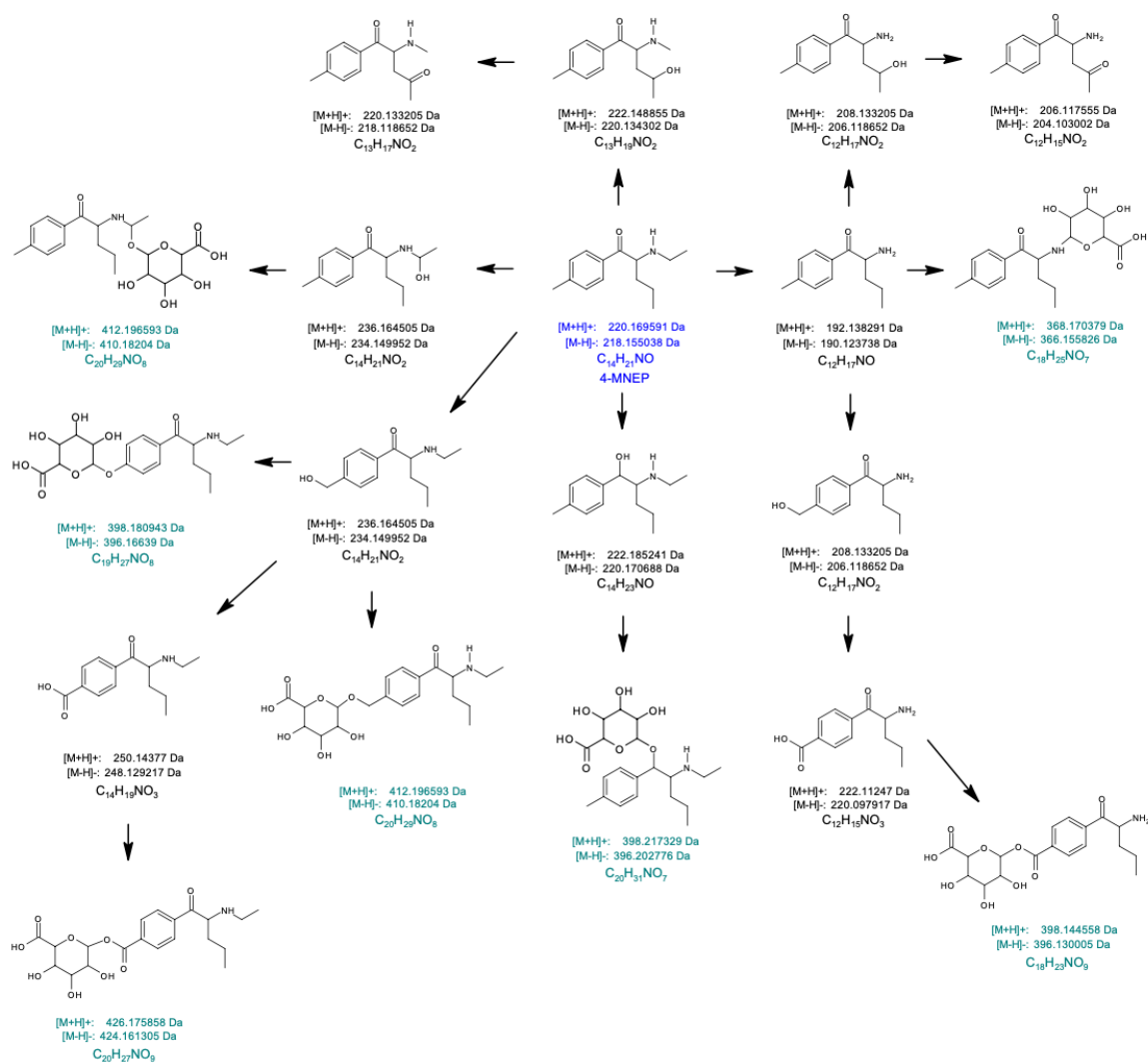
Esquema 26 - Metabolismos plausíveis de Fase I e Fase II (glucoronidação) para a catinona 4-MNEB.



Esquema 27 - Metabolismos plausíveis de Fase I e Fase II (glucoronidação) para a catinona 4-MDMP.



Esquema 28 - Metabolismos plausíveis de Fase I e Fase II (glucoronidação) para a catinona 4-MDMB.



Esquema 29 - Metabolismos plausíveis de Fase I e Fase II (glucoronidação) para a catinona 4-MNEP.

6.2. Anexo II – Espetros *full scan* e MS/MS das cationas α -PVP, 4-MNEB, 4-MDMP, 4-MDMB e 4-MNEP, e respetivos metabolitos identificados no presente estudo.

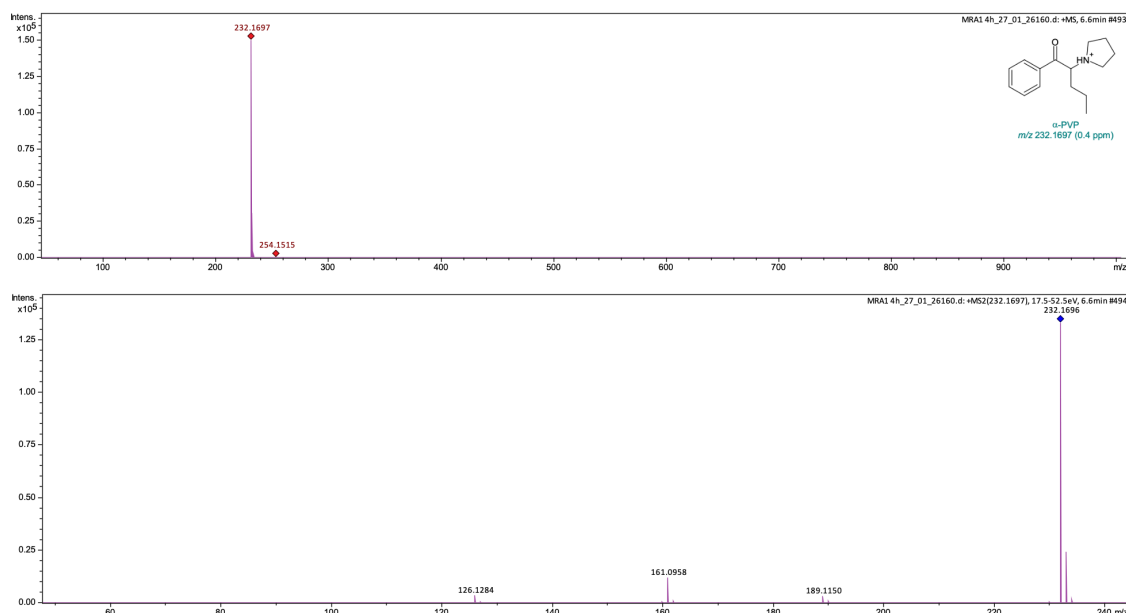


Figura 8 - Espetro *full scan* (em cima) e espetro MS/MS (em baixo) da cationona α -PVP.

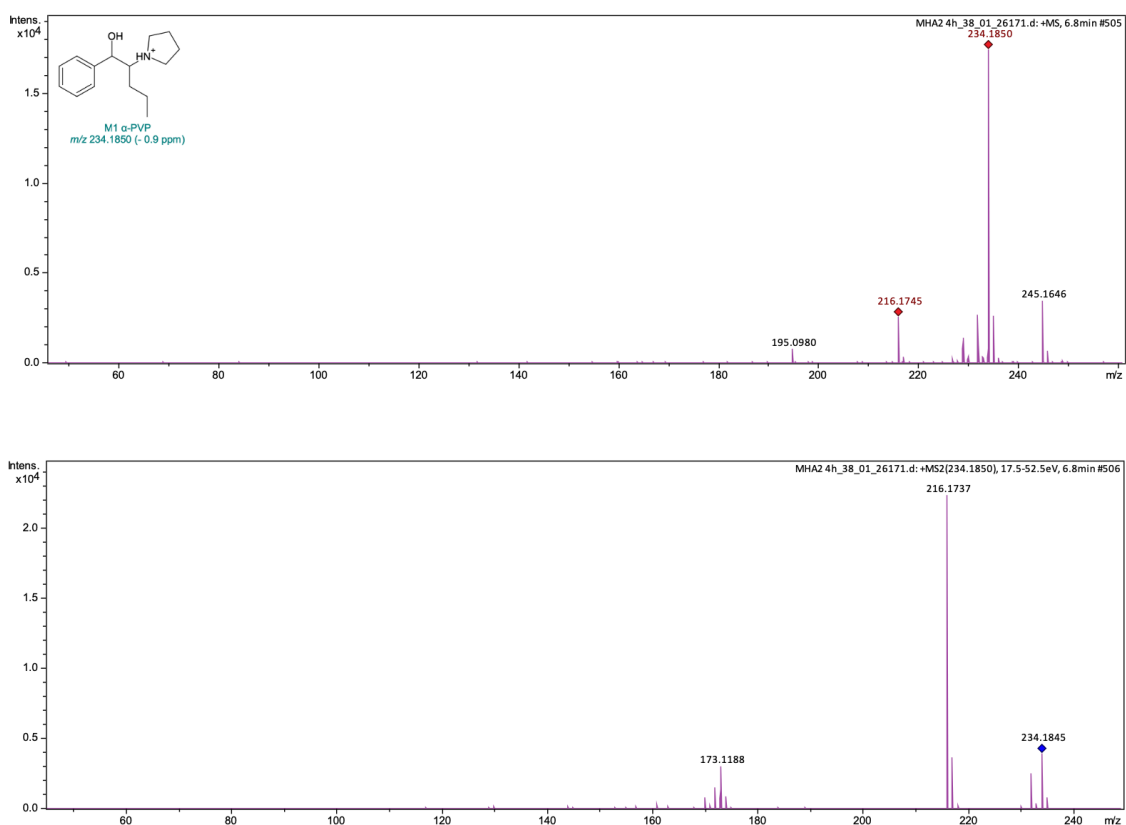


Figura 9 - Espetro *full scan* (em cima) e espetro MS/MS (em baixo) do metabolito M1- α -PVP.

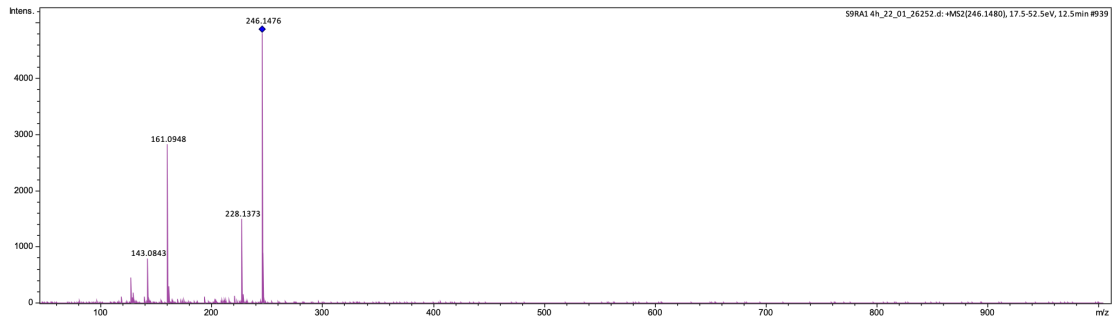
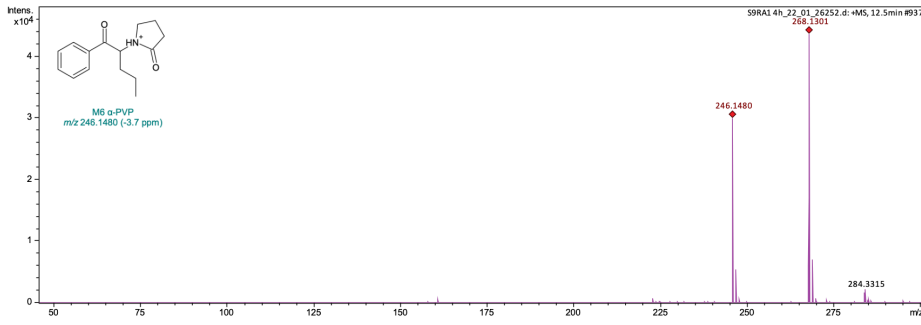


Figura 10 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M6-α-PVP.

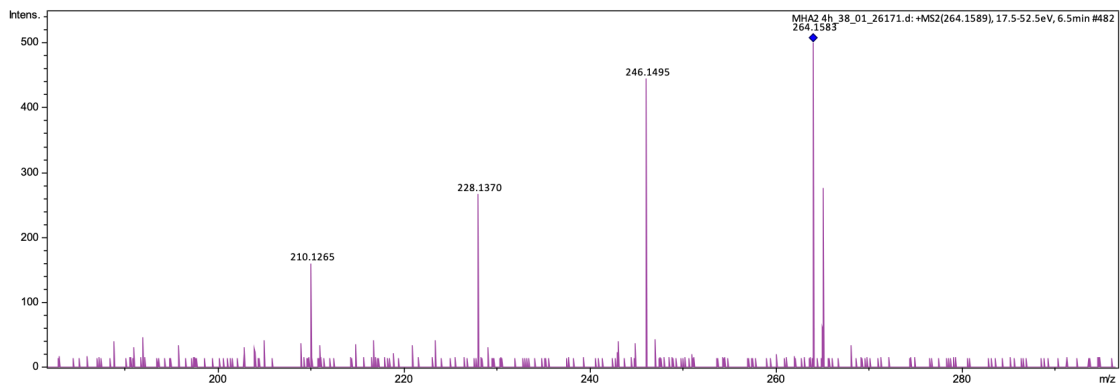
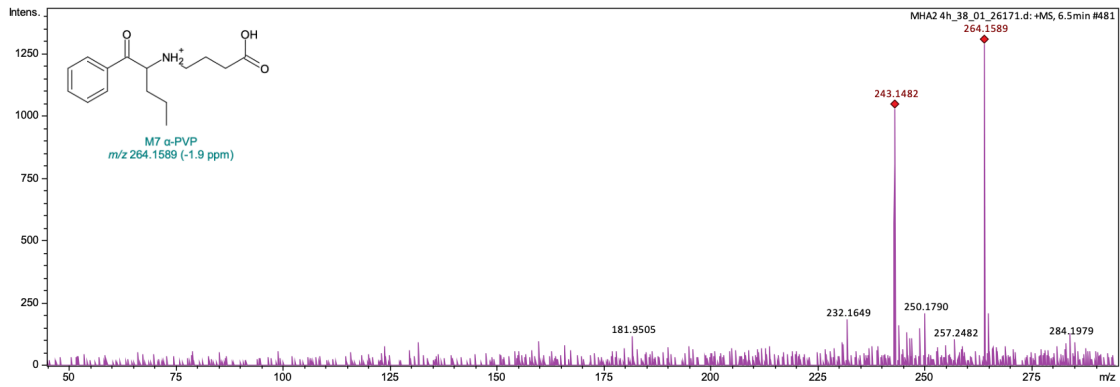


Figura 11 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M7-α-PVP.

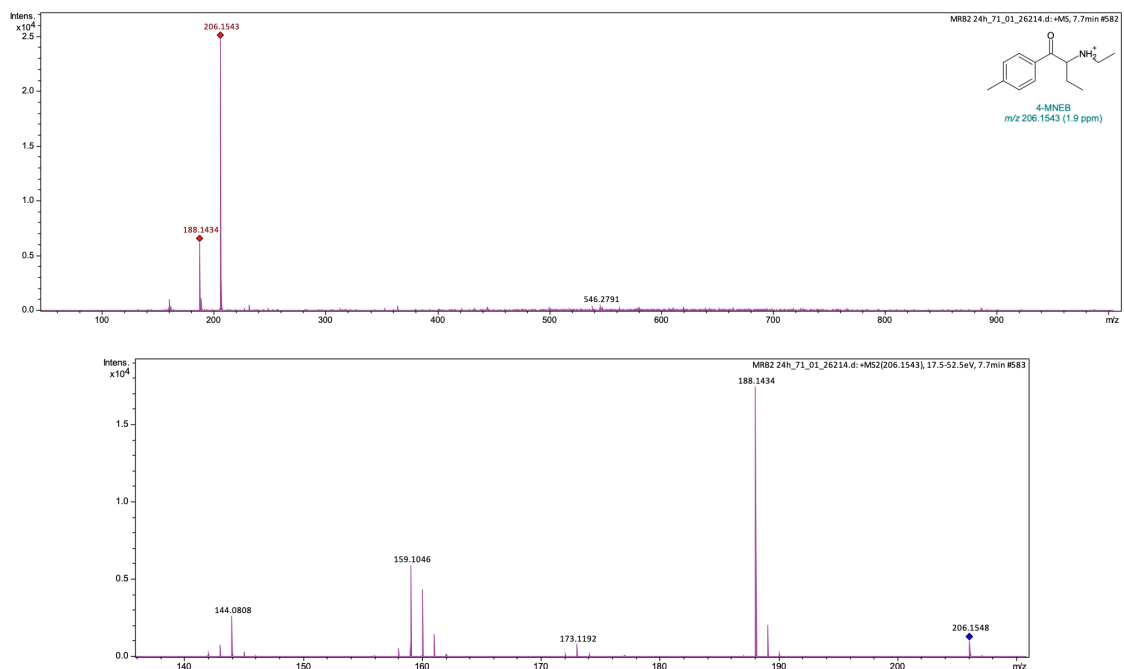


Figura 12 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) da catinona 4-MNEB.

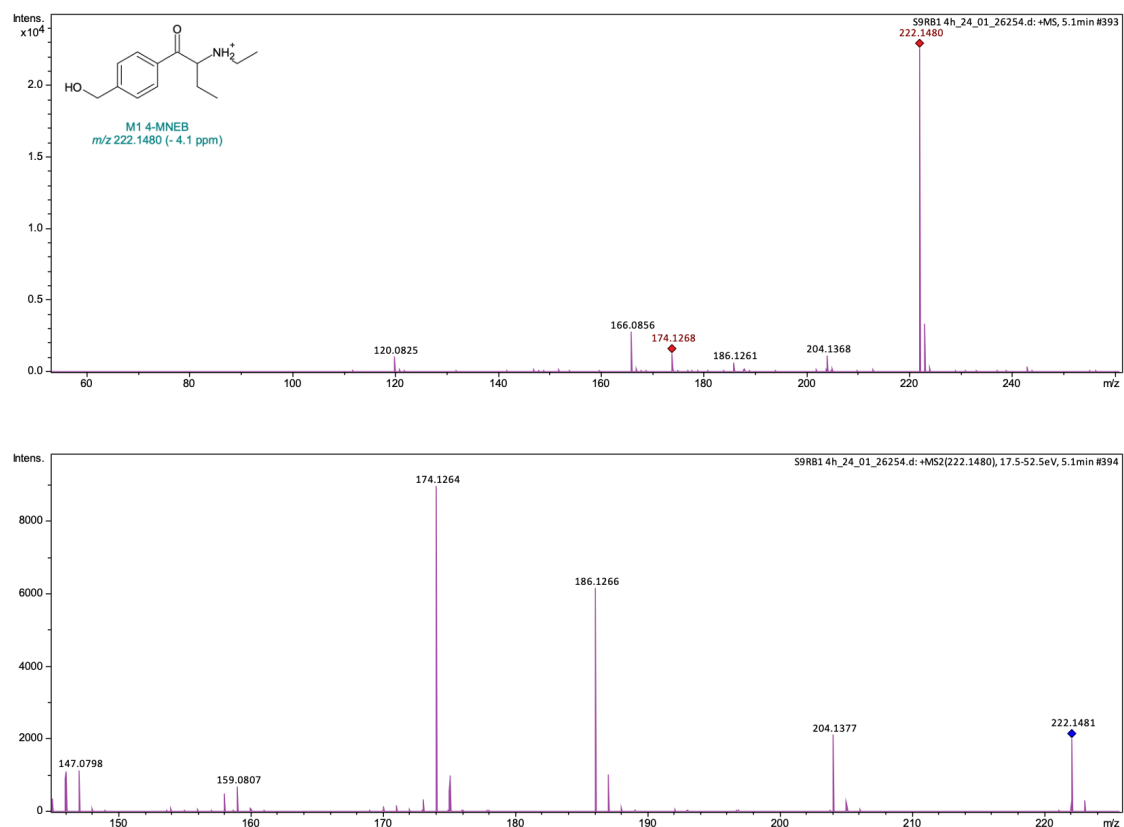


Figura 13 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M1-4-MNEB.

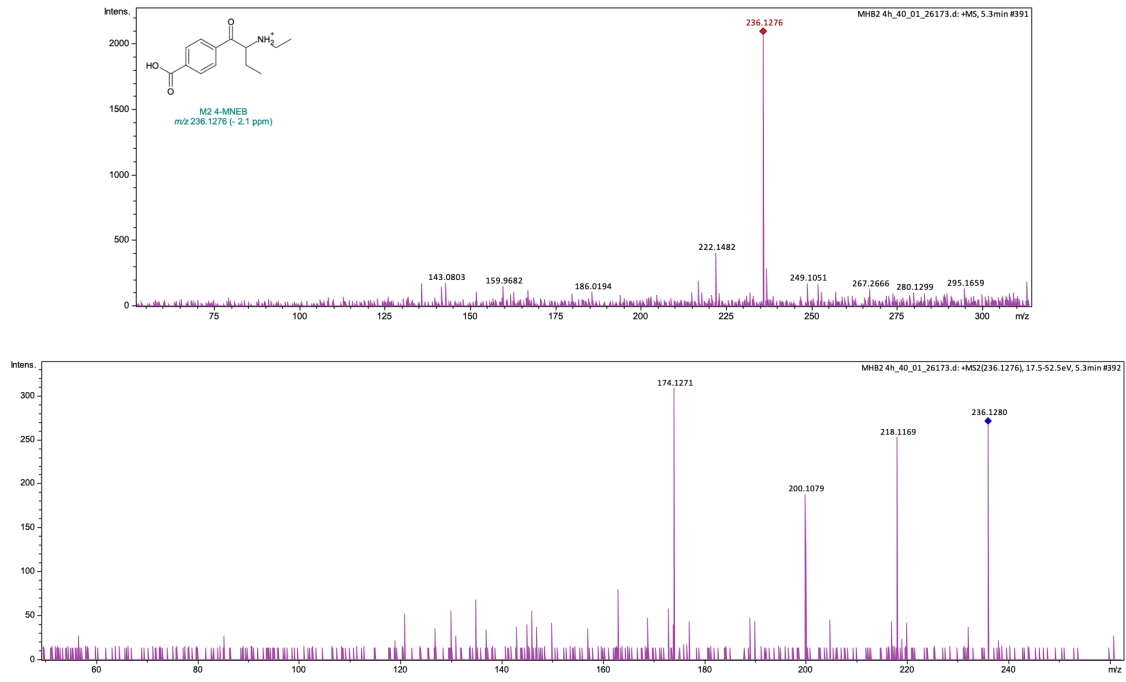


Figura 14 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M2-4-MNEB.

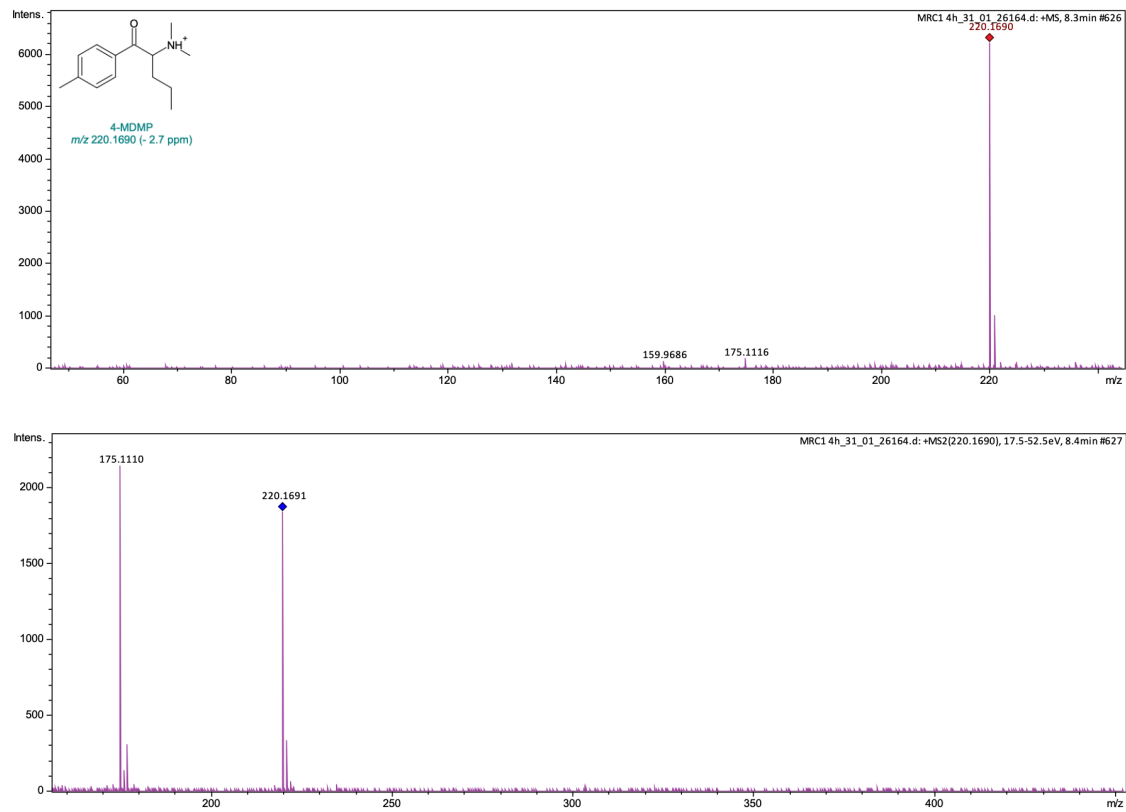


Figura 15 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) da catinona 4-MDMP.

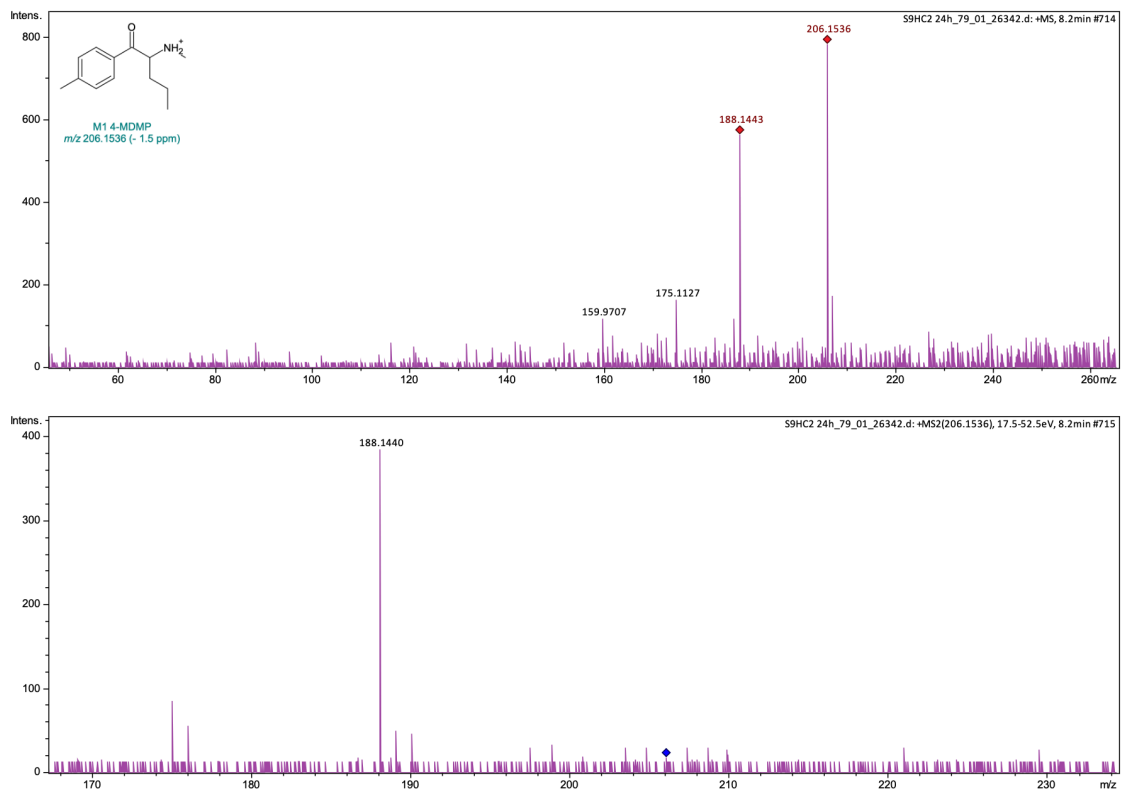


Figura 16 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M1-4-MDMP.

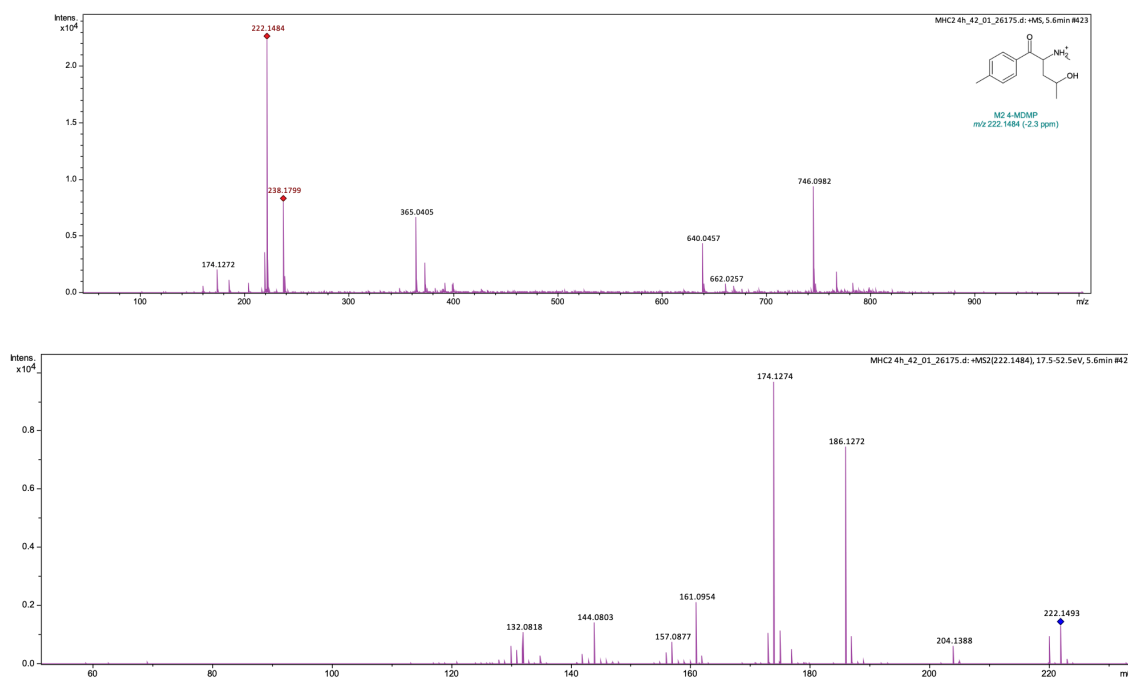


Figura 17 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M2-4-MDMP.

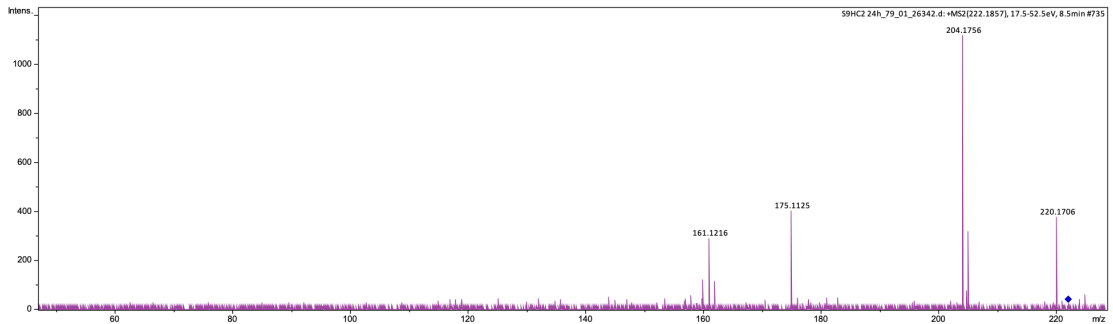
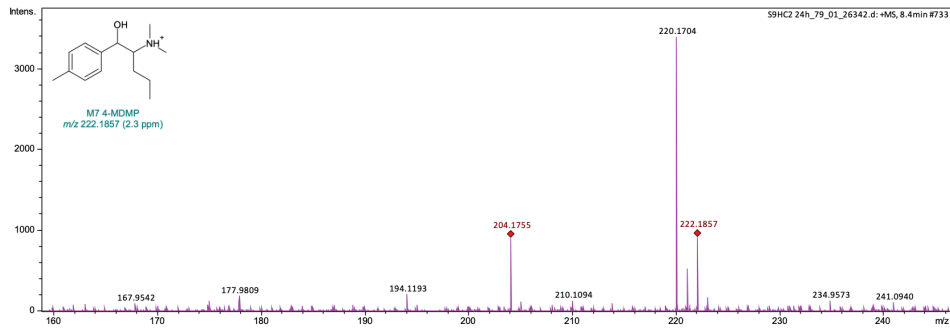


Figura 18 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M7-4-MDMP.

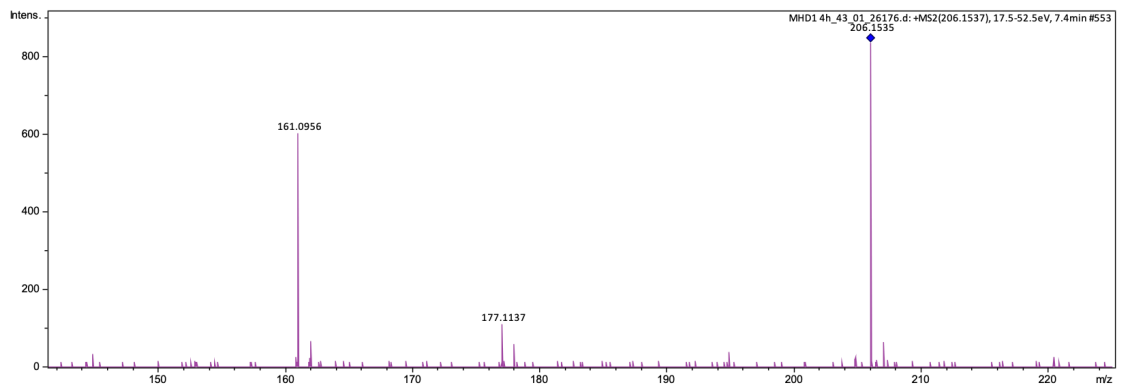
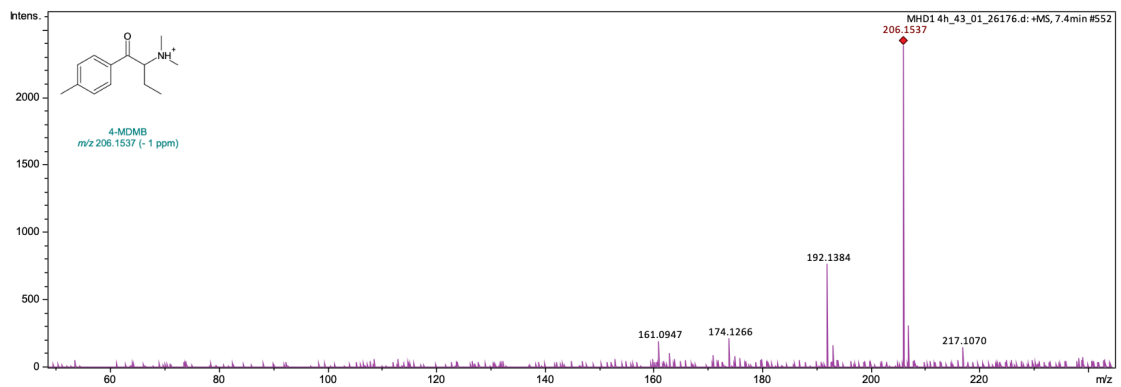


Figura 19 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) da catinona 4-MDMB.

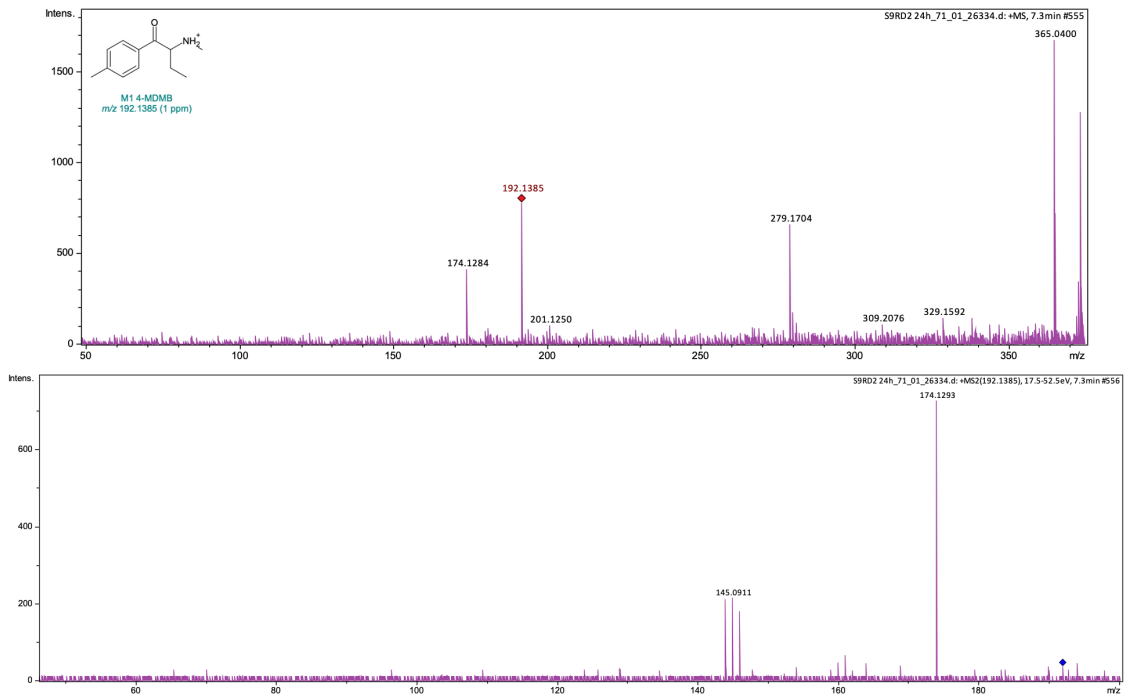


Figura 20 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M1-4-MDMB.

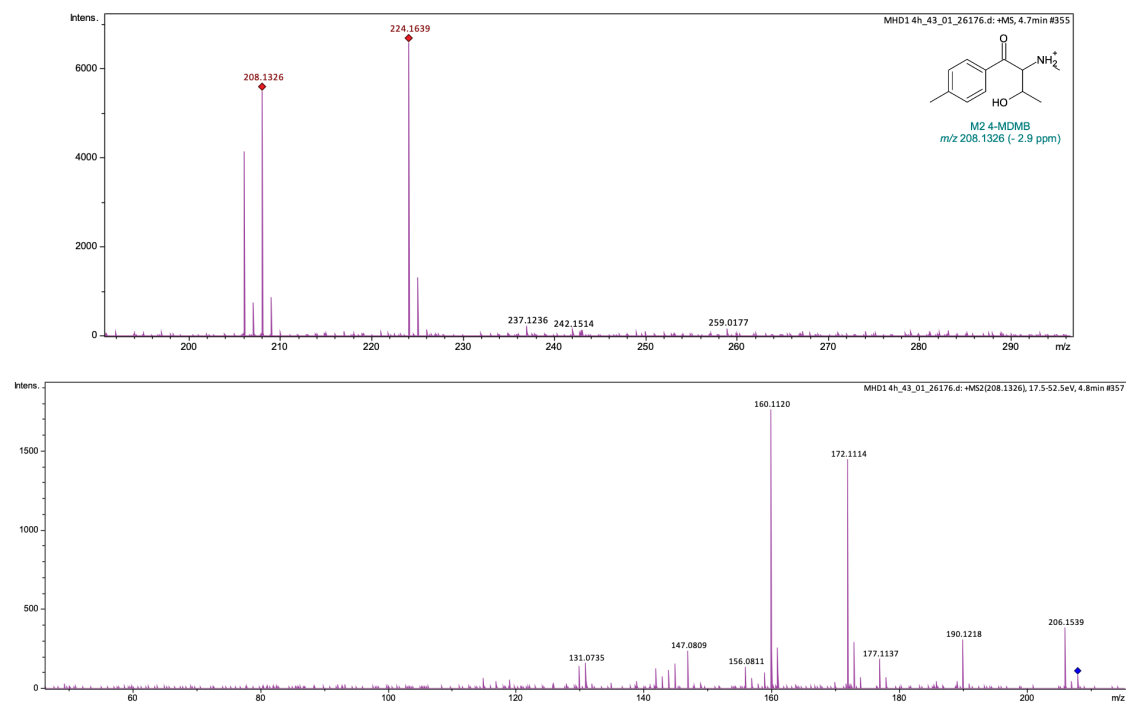


Figura 21 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M2-4-MDMB.

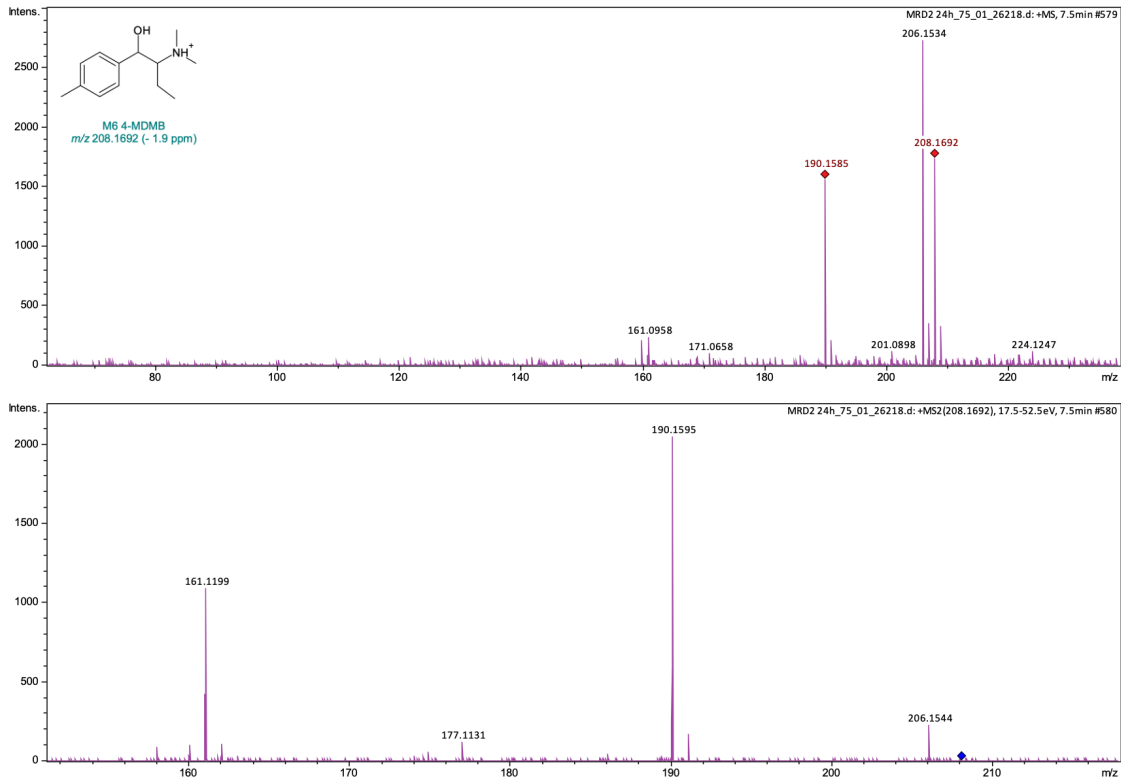


Figura 22 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) do metabolito M6-4-MDMB.

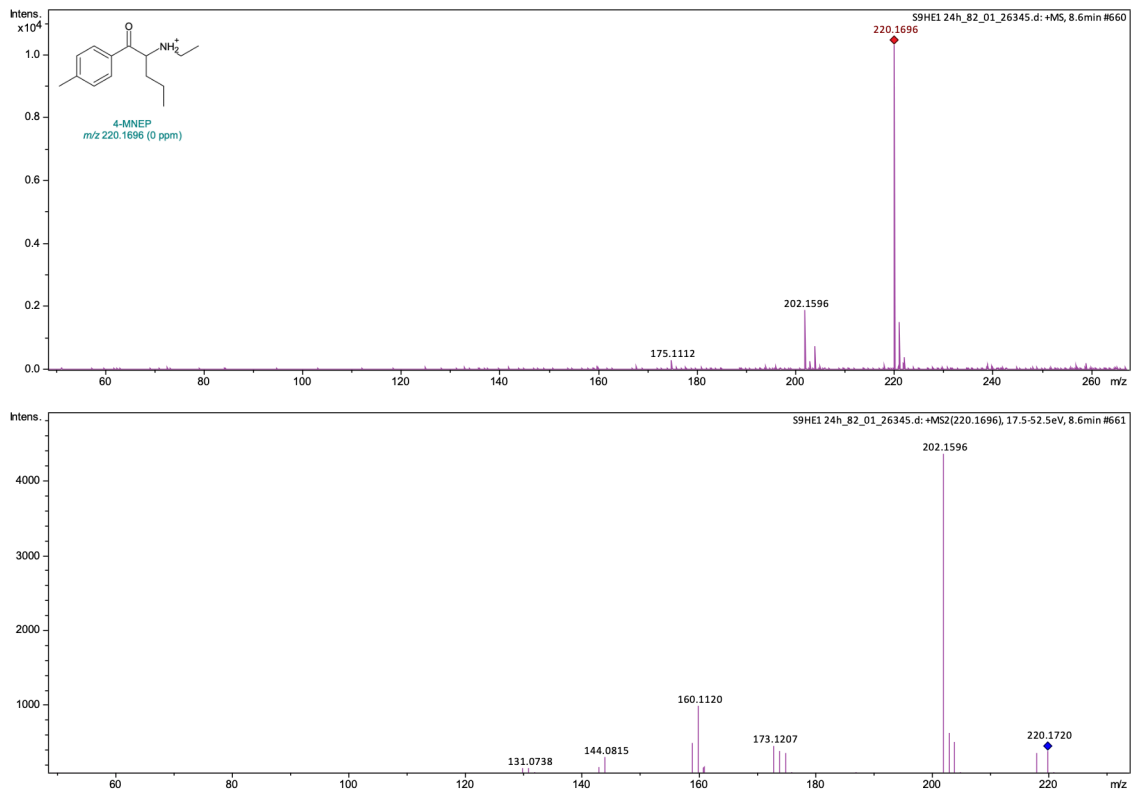


Figura 23 - Espectro full scan (em cima) e espectro MS/MS (em baixo) da catinona 4-MNEP.