



Análise de perfis metabólicos de cationas sintéticas por espetrometria de massa de alta resolução

Maria Inês Mantas Ferreira

Mestrado em Química
Especialização em Química, Saúde e Nutrição

Dissertação orientada por:
Helena Margarida Guerreiro Galla Gaspar
Alexandra Maria Moita Antunes

Agradecimentos

A realização do presente trabalho não seria possível sem as pessoas que, tanto a nível académico como pessoal, me apoiaram e incentivaram, e às quais quero expressar o meu agradecimento.

Em especial, agradeço à minha orientadora, a Doutora Helena Gaspar, que, para além de me ter acompanhado permanentemente, em todas as etapas, quer a nível laboratorial, quer a nível de redação do presente trabalho, possibilitou-me a escolha de um tema de interesse.

De igual forma, à minha coorientadora, a Doutora Alexandra Antunes, pelo aconselhamento e pela disponibilidade que sempre demonstrou para esclarecer qualquer dúvida colocada.

Aproveito para estender o meu agradecimento a todo o corpo docente das disciplinas que frequentei no Mestrado em Química, o qual sempre prezou pela qualidade de ensino e disponibilidade.

À minha amiga, Filipa Dionísio, por todo o companheirismo, apoio e suporte em todos os momentos, ao longo destes seis anos de partilha, que, certamente, atenuaram todos os percalços do meu percurso académico e pessoal.

Aos meus amigos de “casa”, Montemor-o-Novo, pelo companheirismo e pela amizade sentidos desde os primeiros anos da minha vida e que se prolongam até ao momento.

Por fim, e mais importante, um agradecimento especial a toda a minha família, em especial aos meus pais, a quem devo tudo, não sendo a entrada neste curso exceção.

Resumo

As catinonas sintéticas constituem o segundo grupo de novas substâncias psicoativas (NPS) mais monitorizado pelo Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (EMCDDA), dados os seus efeitos estimulantes e alucinogénicos, que se assemelham aos da cocaína, metanfetaminas e anfetaminas.

A rapidez com que surgem no mercado e a diversidade das estruturas químicas das catinonas sintéticas constituem um desafio para a sua identificação, sendo necessária a síntese de padrões. Para além disto, revela-se a necessidade de desenvolver estudos dos perfis metabólicos das catinonas, de forma a possibilitar a identificação de biomarcadores, em matrizes biológicas, destes consumos.

No presente trabalho, desenvolvido no âmbito do protocolo entre a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) e o Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC-PJ), no período de setembro de 2022 a junho de 2023, sintetizaram-se, na forma de cloridrato, duas catinonas sintéticas, que detêm o estatuto de droga, 3'-metilmetcatinona (3'-MMC), e 4'-metilmetcatinona (4'-MMC), sendo esta denominada de mefedrona. Sintetizaram-se, ainda, os respetivos metabolitos reduzidos, dihidro-3'-metilmetcatinona (3'-MMC-OH) e dihidro-4'-metilmetcatinona (4'-MMC-OH). Os quatro compostos referidos caracterizaram-se por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), tendo, ainda, sido identificada por RMN a catinona sintética alfa-pirrolidinoisohexanofenona (α -PHiP) numa amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Os tempos de meia vida das catinonas 3'-MMC e 4'-MMC apresentaram os valores de 40 min e de 106 min, respetivamente, o que demonstra a elevada metabolização e, conseqüentemente, a importância do estudo dos seus metabolismos, de forma a identificar biomarcadores destes consumos.

Da incubação *in vitro* das catinonas 3'-MMC e 4'-MMC identificaram-se, por espectrometria de massa de alta resolução (LC-ESI-HRMS): os metabolitos resultantes da respetiva hidroxilação no grupo metilo do anel aromático para ambas as catinonas, hidroxitolil-3'-metilmetcatinona (**M1-3'-MMC**) e hidroxitolil-4'-metilmetcatinona (**M1-4'-MMC**), o metabolito derivado da *N*-desmetilação da 4'-MMC, a nor-mefedrona (**M2-4'-MMC**), e o metabolito gerado através da redução do carbonilo da 3'-MMC (dihidro-3'-metilmetcatinona (**M2-3'-MMC**)). Estes resultados sugerem a semelhança entre as vias metabólicas das catinonas em estudo.

Palavras-chave: catinonas sintéticas; RMN; metabolismo; LC-ESI-HRMS

Abstract

Synthetic cathinones compose the second group of new psychoactive substances (NPS) most monitored by the European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), due to their stimulant and hallucinogenic effects, similar to cocaine, methamphetamines and amphetamines.

The speed of their emergence on the market and the diversity of the chemical structures of synthetic cathinones compose a challenge for their identification, requiring the synthesis of standards. Furthermore, arises a need to develop studies on their metabolic profiles, in order to enable the identification of biomarkers for these intakes, in biological matrices.

In this work, developed within the scope of the protocol between Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) and Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC-PJ), from september 2022 to june 2023, two synthetic cathinones were synthesized, in hydrochloride form, retaining the status of drug, 3'-methylmethcathinone (3'-MMC), and 4'-methylmethcathinone (4'-MMC), commonly designated by mephedrone. The correspondent reduced metabolites, dihydro-3'-methylmethcathinone (3'-MMC-OH) and dihydro-4'-methylmethcathinone (4'-MMC-OH), were also synthesized. These four compounds were characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), and the synthetic cathinone α -pyrrolidinoisohexanophenone (α -PHiP) was also identified by NMR in a sample provided by LPC-PJ.

The half-life times of cathinones 3'-MMC and 4'-MMC were 40 min and 106 min, respectively, which demonstrates the high level of metabolism they undergo and, therefore, the importance of studying their metabolisms, in order to identify biomarkers for these intakes.

From the in vitro incubation of cathinones 3'-MMC and 4'-MMC, and by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-HRMS), were identified: the metabolites resulting from the corresponding hydroxylation on the methyl group of the aromatic ring for both cathinones, hydroxytolyl-3'-methylmethcathinone (**M1-3'-MMC**) and hydroxytolyl-4'-methylmethcathinone (**M1-4'-MMC**), the metabolite derived from the N-demethylation of 4'-MMC, nor-mephedrone (**M2-4'-MMC**), and the metabolite generated through the reduction of the carbonyl of 3'-MMC (dihydro-3'-methylmethcathinone (**M2-3'-MMC**)). These results suggest the similarity between the metabolic pathways of the studied cathinones.

Keywords: synthetic cathinones; NMR; metabolism; LC-ESI-HRMS

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice	v
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
1.1. Novas Substâncias Psicoativas (NPS).....	2
1.2. Catinonas Sintéticas.....	5
1.2.1. Metabolismo	7
1.3. Catinonas Sintéticas Seleccionadas	10
1.4. Objetivo do trabalho	14
2. Resultados e Discussão	15
2.1. Síntese de catinonas.....	16
2.1.1. Síntese de α -bromocetonas	17
2.1.2. Síntese de catinonas.....	20
2.2. Síntese de metabolitos reduzidos	27
2.3. Identificação da amostra do LPC-PJ.....	35
2.4. Identificação de catinonas sintéticas <i>in vitro</i>	39
2.4.1. Identificação da catinona 4'-MMC.....	40
2.4.2. Identificação da catinona 3'-MMC.....	41
2.4.3. Determinação dos tempos de meia vida de catinonas sintéticas	42
2.5. Identificação de metabolitos de catinonas sintéticas <i>in vitro</i>	44
2.5.1. Identificação de metabolitos da catinona 4'-MMC	45

2.5.2. Identificação de metabolitos da catinona 3'-MMC	48
3. Parte experimental.....	52
3.1. Reagentes e Solventes.....	53
3.2. Soluções.....	54
3.3. Técnicas e Equipamentos.....	55
3.3.1. Equipamentos comuns	55
3.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	55
3.3.3. Cromatografia em camada fina (TLC).....	55
3.3.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS)	55
3.4. Síntese de catinonas.....	56
3.4.1. Síntese de α -bromocetonas	56
3.4.1.1. Caracterização de cetonas e de α -bromocetonas.....	57
3.4.2. Síntese de catinonas.....	57
3.4.2.1. Caracterização de catinonas.....	58
3.5. Síntese de metabolitos reduzidos	59
3.5.1. Caracterização de metabolitos reduzidos	60
3.6. Ensaios do metabolismo de Fase I <i>in vitro</i>	61
4. Conclusão	62
5. Referência Bibliográficas	64
6. Anexos.....	70
Anexo 6.1: Espectros de RMN das cetonas 3'-metilpropiofenona (1) e 4'- metilpropiofenona (2)	71
Anexo 6.2: Espectros de RMN das α -bromocetonas 3'-metil-2-bromopropiofenona (3) e 4'-metil-2- bromo-propiofenona (4).....	77
Anexo 6.3: Espectros de RMN das catinonas protonadas 3'-MMC (7) e 4'-MMC (8).....	84

Anexo 6.4: Espectros de RMN dos metabolitos reduzidos protonados 3'-MMC-OH (11) e 4'-MMC (12)	92
Anexo 6.5: Espectros de RMN da amostra do LPC-PJ	98
Anexo 6.6: Espectros de LC-ESI(+)-HRMS (QTOF) da 4'-MMC e dos seus metabolitos (gerados nas incubações)	102
Anexo 6.7: Espectros de LC-ESI(+)-HRMS (QTOF) da 3'-MMC e dos seus metabolitos (gerados nas incubações)	104

Índice de Figuras

Figura 1.1: Número de NPS notificadas pela primeira vez ao Sistema de Alerta Rápido da UE, por categoria, entre os anos de 2005 e 2022. Adaptado de [17].

Figura 1.2: Quantidade apreendida (em %), por substância, na União Europeia, em 2021. Adaptado de [17].

Figura 1.3: Estrutura química da (S)-catinona.

Figura 1.4: Estruturas químicas da (S)-catinona, (1S,2S)-catina, e (1R,2S)-norefedrina.

Figura 1.5: Estruturas químicas gerais das catinonas sintéticas e das feniletilaminas e estruturas químicas da anfetamina, da mentanfetamina e do MDMA.

Figura 1.6: Principais reações de Fase I responsáveis pelo metabolismo de catinonas sintéticas. Adaptado de [33]-[45].

Figura 1.7: Proposta de metabolismo, de Fase I, para a 4'-MMC, realizada com base na literatura presente na **Tabela 1.2**.

[R] redução; [O] oxidação; [D] N-desmetilação; [H] hidroxilação; [HA] hidroxilação aromática.

Figura 1.8: Metabolitos maioritários, de Fase I, da 4'-MMC.

Figura 1.9: Proposta de metabolismo, de Fase I, para a 3'-MMC, realizada com base na literatura presente na **Tabela 1.2**.

[R] redução; [O] oxidação; [D] N-desmetilação; [H] hidroxilação.

Figura 2.1: Esquema reacional geral da síntese das catinonas na forma de base livre e de cloridrato.

Figura 2.2: Mecanismo sintético de α -bromocetonas.

Figura 2.3: Espectros RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 3'-metil-2-bromopropiofenona (**3**) (cima) e da 3'-metilpropiofenona (**1**) (baixo).

Figura 2.4: Espectros RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 4'-metil-2-bromopropiofenona (**4**) (cima) e da 4'-metilpropiofenona (**2**) (baixo).

Figura 2.5: Mecanismo sintético das catinonas na forma de base livre e de cloridrato.

Figura 2.6: Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 3'-MMC (**7**) (cima) e da 3'-metil-2-bromopropiofenona (**3**) (baixo).

Figura 2.7: Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 4'-MMC (**8**) (cima) e da 4'-metil-2-bromopropiofenona (**4**) (baixo).

Figura 2.8: Correlações de COSY e de HMBC referentes à cadeia acíclica da 3'-MMC (**7**) e da 4'-MMC (**8**).

Figura 2.9: Correlações de COSY e de HMBC referentes à zona aromática da 3'-MMC (**7**) e da 4'-MMC (**8**).

Figura 2.10: Correlações de HMBC referentes ao grupo amino da 3'-MMC (**7**) e da 4'-MMC (**8**).

Figura 2.11: Esquema reacional geral da síntese de metabolitos reduzidos na forma de cloridrato.

Figura 2.12: Mecanismo sintético dos metabolitos reduzidos na forma de base livre e de cloridrato.

Figura 2.13: Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do metabolito 3'-MMC-OH (**11**) (cima) e da 3'-MMC (**7**) (baixo).

Figura 2.14: Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do metabolito 4'-MMC-OH (**12**) (cima) e da 4'-MMC (**8**) (baixo).

Figura 2.15: Correlações de COSY e de HMBC referentes à cadeia acíclica dos metabolitos 3'-MMC-OH (**11**) e 4'-MMC-OH (**12**).

Figura 2.16: Correlações de COSY e de HMBC referentes à zona aromática dos metabolitos 3'-MMC-OH (**11**) e 4'-MMC-OH (**12**).

Figura 2.17: Correlações de HMBC referentes ao grupo amino dos metabolitos 3'-MMC-OH (**11**) e 4'-MMC-OH (**12**).

Figura 2.18: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) da amostra fornecida pelo LPC-PJ (α -PHiP).

Figura 2.19: Correlações de COSY e de HMBC referentes à cadeia acíclica da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Figura 2.20: Correlações de COSY e de HMBC referentes à zona aromática da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Figura 2.21: Correlações de COSY referentes ao grupo amino da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Figura 2.22: Proposta de esquema de fragmentação para a catinona 4'-MMC, tendo em conta os iões fragmento identificados no espectro de MS/MS.

Figura 2.23: Proposta de esquema de fragmentação para a catinona 3'-MMC, tendo em conta os iões fragmento identificados no espectro de MS/MS.

Figura 2.24: Razão entre a média das áreas referentes à catinona 4'-MMC e as áreas associadas à reserpina, ao longo do tempo.

Figura 2.25: Razão entre a média das áreas referentes à catinona 3'-MMC e as áreas associadas à reserpina, ao longo do tempo.

Figura 2.26: Metabólitos de Fase I da catinona 4'-MMC identificados no presente trabalho.

Figura 2.27: Proporção relativa dos metabólitos M1-4'-MMC e M2-4'-MMC, em relação à reserpina, ao longo de 6h.

Figura 2.28: Proposta de esquema de fragmentação para o metabólito M1-4'-MMC, tendo em conta os iões fragmento identificados no espectro de MS/MS.

Figura 2.29: Proposta de esquema de fragmentação para o metabólito M2-4'-MMC, tendo em conta os iões fragmento identificados no espectro de MS/MS.

Figura 2.30: Metabólitos de Fase I da catinona 3'-MMC identificados no presente trabalho.

Figura 2.31: Proporção relativa dos metabólitos M1-3'-MMC e M2-3'-MMC, em relação à reserpina, ao longo de 6h.

Figura 2.32: Proposta de esquema de fragmentação para o metabólito M1-3'-MMC, tendo em conta os iões fragmento identificados no espectro de MS/MS.

Figura 2.33: Proposta de esquema de fragmentação para o metabólito M2-3'-MMC, tendo em conta os iões fragmento identificados no espectro de MS/MS.

Figura 3.1: Montagem para preparação de ácido clorídrico etéreo 3M.

Figura 6.1: Estrutura química da 3'-metilpropiofenona (1).

Figura 6.2: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da 3'-metilpropiofenona (1).

Figura 6.3: Espectro de RMN de ^{13}C , em CDCl_3 , da 3'-metilpropiofenona (1).

Figura 6.4: Espectro de COSY, em CDCl_3 , da 3'-metilpropiofenona (1).

Figura 6.5: Espectro de HSQC, em CDCl_3 , da 3'-metilpropiofenona (1).

Figura 6.6: Espectro de HMBC, em CDCl_3 , da 3'-metilpropiofenona (1).

Figura 6.7: Estrutura química da 4'-metilpropiofenona (2).

Figura 6.8: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da 4'-metilpropiofenona (2).

Figura 6.9: Espectro de RMN de ^{13}C , em CDCl_3 , da 4'-metilpropiofenona (2).

Figura 6.10: Espectro de COSY, em CDCl_3 , da 4'-metilpropiofenona (2).

Figura 6.11: Espectro de HSQC, em CDCl_3 , da 4'-metilpropiofenona (2).

Figura 6.12: Espectro de HMBC, em CDCl_3 , da 4'-metilpropiofenona (2).

Figura 6.13: Estrutura química da 3'-metil-2-bromo-propiofenona (3).

Figura 6.14: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da 3'-metil-2-bromo-propiofenona (3).

Figura 6.15: Espectro de RMN de ^{13}C , em CDCl_3 , da 3'-metil-2-bromo-propiofenona (3).

Figura 6.16: Espectro de COSY, em CDCl_3 , da 3'-metil-2-bromo-propiofenona (3).

Figura 6.17: Espectro de HSQC, em CDCl_3 , da 3'-metil-2-bromo-propiofenona (3).

Figura 6.18: Espectro de HMBC, em CDCl_3 , da 3'-metil-2-bromo-propiofenona (3).

Figura 6.19: Estrutura química da 4'-metil-2-bromo-propiofenona (4).

Figura 6.20: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da 4'-metil-2-bromo-propiofenona (4).

Figura 6.21: Espectro de RMN de ^{13}C , em CDCl_3 , da 4'-metil-2-bromo-propiofenona (4).

Figura 6.22: Espectro de COSY, em CDCl_3 , da 4'-metil-2-bromo-propiofenona (4).

Figura 6.23: Espectro de HSQC, em CDCl_3 , da 4'-metil-2-bromo-propiofenona (4).

Figura 6.24: Espectro de HMBC, em CDCl_3 , da 4'-metil-2-bromo-propiofenona (4).

Figura 6.25: Estrutura química da 3'-MMC (7).

Figura 6.26: Espectro de RM de ^1H , em CD_3OD , da 3'-MMC (7).

Figura 6.27: Espectro de RMN de ^{13}C , em CD_3OD , da 4'-metil-2-bromo-propiofenona (4).

Figura 6.28: Espectro de COSY, em CD_3OD , da 3'-MMC (7).

Figura 6.29: Espectro de HSQC, em CD_3OD , da 3'-MMC (7).

Figura 6.30: Espectro de HMBC, em CD_3OD , da 3'-MMC (7).

Figura 6.31: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da 3'-MMC (7).

Figura 6.32: Estrutura química da 4'-MMC (8).

Figura 6.33: Espectro de RMN de ^1H , em CD_3OD , da 4'-MMC (8).

Figura 6.34: Espectro de RMN de ^{13}C , em CD_3OD , da 4'-MMC (8).

Figura 6.35: Espectro de COSY, em CD_3OD , da 4'-MMC (8).

Figura 6.36: Espectro de HSQC, em CD_3OD , da 4'-MMC (8).

Figura 6.37: Espectro de HMBC, em CD_3OD , da 4'-MMC (8).

Figura 6.38: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da 4'-MMC (8).

Figura 6.39: Estrutura química do metabolito 3'-MMC-OH (11).

Figura 6.40: Espectro de RMN de ^1H , em CD_3OD , do metabolito 3'-MMC-OH (11).

Figura 6.41: Espectro de RMN de ^{13}C , em CD_3OD , do metabolito 3'-MMC-OH (11).

Figura 6.42: Espectro de COSY, em CD_3OD , do metabolito 3'-MMC-OH (11).

Figura 6.43: Espectro de HSQC, em CD_3OD , do metabolito 3'-MMC-OH (11).

Figura 6.44: Espectro de HMBC, em CD_3OD , do metabolito 3'-MMC-OH (11).

Figura 6.45: Estrutura química do metabolito 4'-MMC-OH (12).

Figura 6.46: Espectro de RMN de ^1H , em CD_3OD , do metabolito 4'-MMC-OH (12).

Figura 6.47: Espectro de RMN de ^{13}C , em CD_3OD , do metabolito 4'-MMC-OH (12).

Figura 6.48: Espectro de COSY, em CD_3OD , do metabolito 4'-MMC-OH (12).

Figura 6.49: Espectro de HSQC, em CD_3OD , do metabolito 4'-MMC-OH (12).

Figura 6.50: Espectro de HMBC, em CD_3OD , do metabolito 4'-MMC-OH (12).

Figura 6.51: Estrutura química do α -PHiP protonado.

Figura 6.52: Espectro de RMN de ^1H , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, do α -PHiP.

Figura 6.53: Espectro de RMN de ^{13}C , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, do α -PHiP.

Figura 6.54: Espectro de COSY, em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, do α -PHiP.

Figura 6.55: Espectro de HSQC, em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, do α -PHiP.

Figura 6.56: Espectro de HMBC, em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, do α -PHiP.

Figura 6.57: Espectro MS/MS da catinona 4'-MMC.

Figura 6.58: Espectro MS/MS do metabolito M1-4'-MMC (hidroxitolil-4'-metilmetcatinona) gerado na incubação.

Figura 6.59: Espectro MS/MS do metabolito M2-4'-MMC (nor-mefedrona) gerado na incubação.

Figura 6.60: Espectro MS/MS da catinona 3'-MMC.

Figura 6.61: Espectro MS/MS do metabolito M1-3'-MMC (hidroxitolil-3'-metilmetcatinona) gerado na incubação.

Figura 6.62: Espectro MS/MS do metabolito M2-3'-MMC (dihidro-3'-metilmetcatinona) gerado na incubação.

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Estruturas químicas e dados relativos às catinonas sintéticas em estudo no presente trabalho.

Tabela 1.2: Compilação do tipo de estudo e de matriz, e das técnicas analíticas utilizadas na identificação de metabolitos provenientes de reações de Fase I e de Fase II, em catinonas sintéticas, já reportadas na literatura.

Tabela 2.1: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CDCl_3 , da 3'-metilpropiofenona (1) e 3'-metil-2-bromopropiofenona (3).

Tabela 2.2: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CDCl_3 , da 4'-metilpropiofenona (2) e 4'-metil-2-bromopropiofenona (4).

Tabela 2.3: Dados de RMN de ^1H , em CDCl_3 , referentes à 3'-metil-2-bromopropiofenona (3) e à 3'-MMC (7).

Tabela 2.4: Dados de RMN de ^1H , em CDCl_3 , referentes à 4'-metil-2-bromopropiofenona (4) e à 4'-MMC (8).

Tabela 2.5: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CD_3OD , referentes à cadeia acíclica da 3'-MMC (7) e da 4'-MMC

(8). **Tabela 2.6:** Dados de RMN de ^1H , em CD_3OD , referentes à zona aromática da 3'-MMC (7) e da 4'-MMC (8).

Tabela 2.7: Dados de RMN de ^{13}C , em CD_3OD , referentes à zona aromática da 3'-MMC (7) e da 4'-MMC (8).

Tabela 2.8: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CD_3OD , referentes ao grupo amino da 3'-MMC (7) e da 4'-MMC (8).

Tabela 2.9: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CD_3OD , referentes à cadeia acíclica das catinonas 3'-MMC (7) e 4'-MMC (8) e respectivos metabolitos reduzidos, 3'-MMC-OH (11) e 4'-MMC-OH (12).

Tabela 2.10: Dados de RMN ^1H , em CD_3OD , referentes à zona aromática das catinonas 3'-MMC (7) e 4'-MMC (8) e respectivos metabolitos reduzidos, 3'-MMC-OH (11) e 4'-MMC-OH (12).

Tabela 2.11: Dados de RMN de ^{13}C , em CD_3OD , referentes à zona aromática das catinonas 3'-MMC (7) e 4'-MMC (8) e respectivos metabolitos reduzidos, 3'-MMC-OH (11) e 4'-MMC-OH (12).

Tabela 2.12: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CD_3OD , referentes à zona aromática das catinonas 3'-MMC (7) e 4'-MMC (8) e respectivos metabolitos reduzidos, 3'-MMC-OH (11) e 4'-MMC-OH (12).

Tabela 2.13: Compilação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CD_3OD , das catinonas (7) e (8) e dos metabolitos reduzidos (11) e (12).

Tabela 2.14: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, referentes à cadeia acíclica da amostra fornecida pelo LPC-

PJ. **Tabela 2.15:** Dados de RMN de ^1H , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, referentes à zona aromática da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Tabela 2.16: Dados de RMN de ^{13}C , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, referentes à zona aromática da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Tabela 2.17: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, referentes ao grupo amino da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Tabela 2.18: Compilação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Tabela 2.19: Dados referentes à identificação, in vitro, da catinona 4'-MMC (8) por LC-ESI(+)-HRMS.

Tabela 2.20: Dados referentes à identificação, in vitro, da catinona 3'-MMC (7) por LC-ESI(+)-HRMS.

Tabela 2.21: Tempo de meia vida, em min, obtido no presente trabalho para as catinonas sintetizadas.

Tabela 2.22: Dados referentes aos metabolitos da 4'-MMC identificados em LC-ESI(+)-HRMS.

Tabela 2.23: Dados referentes aos metabolitos da 3'-MMC identificados em LC-ESI(+)-HRMS.

Tabela 3.1: Dados referentes aos reagentes e solventes usados no presente trabalho.

Tabela 3.2: Resumo das quantidades de reagentes utilizados e de produtos obtidos, do tempo de cada reação e respectivos rendimentos, no que respeita à síntese das α -bromocetonas.

Tabela 3.3: Resumo das quantidades de reagentes utilizados e de produtos obtidos, do tempo de cada reação e respectivos rendimentos, no que respeita à síntese das catinonas.

Tabela 3.4: Resumo das quantidades de reagentes utilizados e de produtos obtidos, do tempo de cada reação e respectivos rendimentos, no que respeita à síntese dos metabolitos reduzidos.

Tabela 3.5: Dados referentes às concentrações e volumes usados, de cada solução/reagente, nos ensaios de metabolismo de Fase I *in vitro* das catinonas (7) e (8).

Lista de Abreviaturas

RMN ^{13}C	Experiência de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	Dimetilsulfóxido deuterado
3'-CMC	3'-clorometilcatinona
4'-CMC	4'-clorometilcatinona
COSY	Espectroscopia de Correlação Homonuclear (do inglês, <i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>)
CYP	Citocromo P450
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DCM	Diclorometano
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EMCDDA	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (do inglês, <i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>)
EWA	Sistema de Alerta Rápido (do inglês, <i>Early Warning Advisory</i>)
EWS	Sistema de Alerta Rápido da União Europeia (do inglês, <i>Early Warning System</i>)
FCUL	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
HMBC	Espectroscopia de Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações (do inglês, <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)
RMN ^1H	Experiência de Ressonância Magnética Nuclear de Protão
HSQC	Espectroscopia de Correlação Heteronuclear a Uma Ligação (do inglês, <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>)
J	Constante de acoplamento
k_{el}	Constante de eliminação
LC-ESI(+)-HRMS (QTOF)	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa de Alta Resolução utilizando um analisador híbrido de quadrupolo/tempo de voo com ionização por Electrospray no modo positivo (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (Quadrupole/Time Of Flight) with ElectroSpray Ionization in the positive mode</i>)
LPC-PJ	Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária
m	Multipleto
MDMA	<i>N</i> -metil-1-(3,4-metilenodioxifenil)propan-2-amina
3'-MMC	3'-metilmetcatinona
4'-MMC	4'-metilmetcatinona
m/z	Razão massa/carga

NADPH	Fosfato do dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida
NPS	Novas Substâncias Psicoativas, do inglês (do inglês, <i>New Psychoactive Substances</i>)
NRS	Sistema regenerador (do inglês, <i>Vivid Regeneration System</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
α -PHiP	Alfa-pirrolidinoisohexanofenona (do inglês, <i>Alpha-pyrrolidinoisohexanophenone</i>)
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
QTOF	Analizador híbrido Quadrupolo-Tempo de Voo (do inglês, <i>Quadrupole/Time Of Flight</i>)
RLM	Microsomas de fígado de rato (do inglês, <i>Rat Liver Microsome</i>)
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
s	Singuleto
SICAD	Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências
SNC	Sistema Nervoso Central
t	Tripleto
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia em Camada Fina (do inglês, <i>Thin Layer Chromatography</i>)
t_R	Tempo de retenção absoluto
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
UNODC	Gabinete das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (do inglês, <i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>)
η	Rendimento

1

Introdução

1.1. Novas Substâncias Psicoativas (NPS)

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma substância psicoativa é definida como “uma substância que, quando ingerida, afeta processos mentais, como cognição ou afeto”, não havendo obrigatoriedade na produção de dependência.^[1] Tendo por base a sua origem, estas substâncias são agrupadas em naturais (ocorrência natural em plantas), em semissintéticas (quimicamente derivadas de substâncias naturais) ou em sintéticas (desenvolvidas na íntegra pelo ser humano).^[2] Devido aos efeitos decorrentes do uso das substâncias psicoativas, o seu consumo e distribuição tornou-se ilícito, a nível internacional, segundo a Convenção Única das Nações Unidas sobre Estupefacientes de 1961 (modificada pelo Protocolo de 1972), a Convenção das Nações Unidas sobre Substâncias Psicotrópicas de 1971 e a Convenção das Nações Unidas contra o Tráfico Ilícito de Estupefacientes e de Substâncias Psicotrópicas de 1988.^[3] Em Portugal, a transposição destas convenções consta na Lei do Combate à Droga – Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro.^[4]

Consequentemente, surgiu no mercado, em meados dos anos 2000, uma panóplia de novas substâncias psicoativas sintéticas, posteriormente denominadas de Novas Substâncias Psicoativas (NPS), que visam mimetizar os efeitos das drogas ilícitas e, através de pequenas alterações na sua estrutura química, fornecer uma alternativa legal, contornando a legislação em vigor. A comercialização destas substâncias, vulgarmente designadas de *legal highs*, ocorre sob inúmeras formas - como pó, comprimido, cristal, líquido – ocorre maioritariamente pela internet, transparecendo uma falsa sensação de legalidade e de segurança no seu consumo.^[5-7]

Segundo a Diretiva (EU, União Europeia) 2017/2103 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de novembro de 2017, uma NPS define-se como “um novo estupefaciente ou psicotrópico, na forma pura ou em preparação, que não é controlada pela Convenção Única das Nações Unidas sobre Estupefacientes de 1961 (modificada pelo Protocolo de 1972), nem pela Convenção das Nações Unidas sobre Substâncias Psicotrópicas de 1971, mas que pode representar uma ameaça à saúde pública comparável àquela apresentada por substâncias listadas nas convenções”. É de referir que, caso uma NPS conste no anexo desta diretiva (Diretiva (UE) 2017/2103 do Parlamento Europeu e do Conselho), essa substância é intitulada simultaneamente de “droga” e de “NPS”, mesmo não constando nas Convenções de 1961 e de 1971.^[8-10]

Apesar da denominação “novo” na sigla NPS, a síntese da maioria destas substâncias ocorreu na década de 1970, visando o desenvolvimento de novos compostos que pudessem apresentar utilidade enquanto recurso terapêutico. Todavia, devido à ausência do efeito farmacológico requerido, ou à observação de efeitos secundários prejudiciais, tal não teve o desfecho esperado. Assim, como já referido, no início dos anos 2000, estes compostos ressurgiram, mas numa vertente recreativa, como alternativa legal (até serem integrados na legislação) às drogas ilícitas, desprezando a sintomatologia e efeitos anteriormente relatados.^{[11],[12]}

Em Portugal, o Decreto-Lei n.º 54/2013, de 17 de abril, legisla a situação referente às NPS, fornecendo uma definição do termo e regulando o regime jurídico de prevenção e proteção contra a sua publicidade e comércio. O anterior deu origem à Portaria n.º 154/2013, onde se encontram listadas as NPS ilícitas em território nacional. O Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro, já acima referido, abrange todas as drogas controladas em Portugal.^{[4],[10],[13]}

Com o intuito de combater esta tendência crescente de consumo, as NPS começaram a ser monitorizadas, sendo-o até à atualidade. A nível internacional, este controlo é conseguido pelo Gabinete das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC), por meio do Sistema de Alerta Rápido (EWA) e, na União Europeia, pelo Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (EMCDDA), recorrendo ao Sistema de Alerta Rápido da União Europeia (EWS). Ambos os sistemas referidos visam permitir a troca rápida de informação aquando da deteção de uma nova NPS, fornecendo dados sobre a mesma e diretrizes sobre as medidas a tomar.^{[14],[15]}

Em Portugal, a comunicação com o EWS efetua-se através do Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD), este organismo é responsável por informar acerca das substâncias monitorizadas em território nacional e “tem por missão promover a redução do consumo de substâncias psicoativas, a prevenção dos comportamentos aditivos e a diminuição das dependências”.^[16]

A nível europeu, o EMCDDA monitorizava, até ao final de dezembro de 2022, 930 NPS, sendo que 41 foram reportadas pela primeira vez, na Europa, nesse mesmo ano. Ainda a respeito das 41 NPS, estas correspondem maioritariamente a canabinóides sintéticos, num total de 24 compostos diferentes; e a catinonas sintéticas, que representam 5 das NPS identificadas em 2022. Com base na **Figura 1.1**, verifica-se que, apesar da tendência decrescente nos últimos anos, os canabinóides sintéticos continuam a representar o maior grupo de substâncias notificadas, sendo sucedidos pelas catinonas sintéticas.^[17]

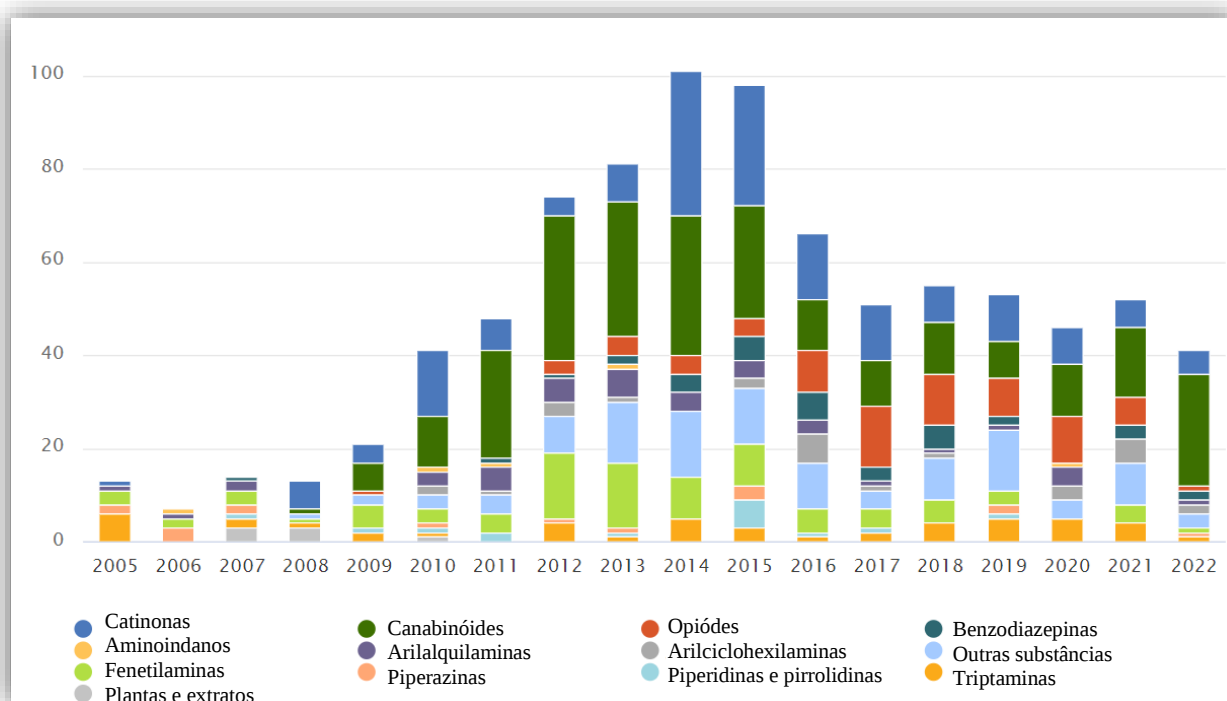


Figura 1.1: Número de NPS notificadas pela primeira vez ao Sistema de Alerta Rápido da UE, por categoria, entre os anos de 2005 e 2022. Adaptado de [17].

Regressando ao ano de 2021, apenas 5 substâncias representaram mais de 80% da quantidade total de NPS apreendidas na União Europeia, sendo estas: 3 catinonas, 3-cloro-metcatona (3-CMC), 3-MMC (designada neste trabalho como 3'-MMC) e 4-cloro-metcatona (4-CMC) (perfazendo 4,0 toneladas), cetamina (num total de 0,9 toneladas) e gama-butirolactona (GBL) (completando 2,0 toneladas) – **Figura 1.2.**

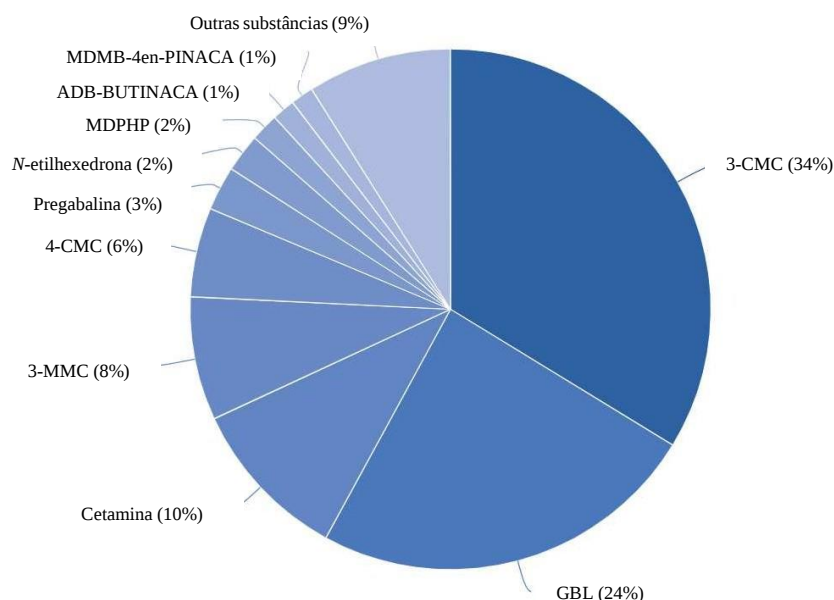


Figura 1.2: Quantidade apreendida (em %), por substância, na União Europeia, em 2021. Adaptado de [17].

No entanto, em 2022, assistiu-se à continuidade das apreensões, em larga escala, das catinonas sintéticas, 3'-MMC e 3'-CMC, que são estruturalmente semelhantes às drogas controladas, internacionalmente, 4'-MMC e 4'-CMC, respetivamente. Para além do referido, detetou-se uma forma quimicamente não controlada (*N*-acetil-3'-MMC), a ser traficada da Índia para a Europa, visando, posteriormente, a sua conversão para 3'-MMC no destino, demonstrando, assim, um aprimoramento que evite a deteção destas substâncias monitorizadas.^[17]

1.2. Catinonas Sintéticas

As catinonas sintéticas, o segundo grupo de NPS mais reportado ao EMCDDA, consistem em análogos de uma substância natural designada de (S)-catinona (**Figura 1.3**), um alcaloide presente nas folhas frescas da planta, vulgarmente, conhecida como khat (espécie *Catha edulis*).^{[6],[17]-[20]}

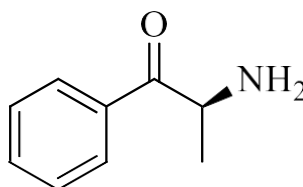


Figura 1.3: Estrutura química da (S)-catinona.

Demonstrou-se que, de entre os compostos psicoativos que compõem as folhas de khat, os efeitos estimulantes e alucinogénicos - semelhantes aos de drogas clássicas como cocaína, anfetamina, metanfetamina e MDMA – resultam, maioritariamente, da presença de (S)-catinona. Apesar deste composto ser o principal composto psicoativo dessa matriz, verificou-se que este é quimicamente instável e que, por isso, é, ao longo do tempo, reduzido enzimaticamente, formando as outras substâncias menos ativas: catina e norefedrina, que apresentam um novo centro estereogénico (**Figura 1.4**). Assim, para experienciar os efeitos psicoestimulantes desejados, as folhas de khat devem ser mastigadas após a colheita, uma vez que, neste momento, o teor em (S)-catinona ainda se encontra elevado, dada a não ocorrência da reação espontânea de redução.^{[18],[20]-[23]}

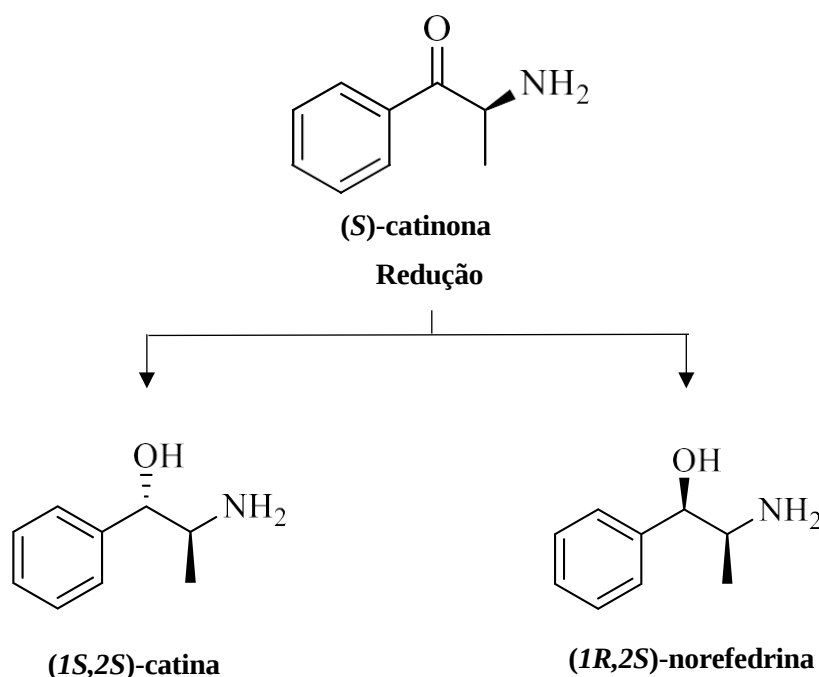


Figura 1.4: Redução espontânea da (S)-catinona em (1S,2S)-catina e em (1R,2S)-norefedrina.

Dada a similaridade das estruturas químicas, as catinonas sintéticas integram a extensa família das feniletilaminas, estas que se assemelham, estruturalmente, às anfetaminas clássicas (anfetamina, metanfetamina e metilenodioximetanfetamina (MDMA)). A principal diferença estrutural consiste na presença, na estrutura química das catinonas sintéticas, de um grupo carbonilo em posição β , relativamente ao átomo de azoto da cadeia lateral aminoalquílica, justificando a similitude dos efeitos, ao nível do SNC, decorrentes do consumo das substâncias apresentadas na **Figura 1.5**. Os efeitos sistematicamente mais observados incluem tonturas, paranoia ou convulsões. No entanto, a presença do grupo carbonilo no carbono β , tem como consequência o aumento da polaridade do composto e, por sua vez, a menor capacidade deste para atravessar a barreira hematoencefálica, o que culmina numa menor atividade das catinonas sintéticas comparativamente à das restantes substâncias.^{[19]-[24]}

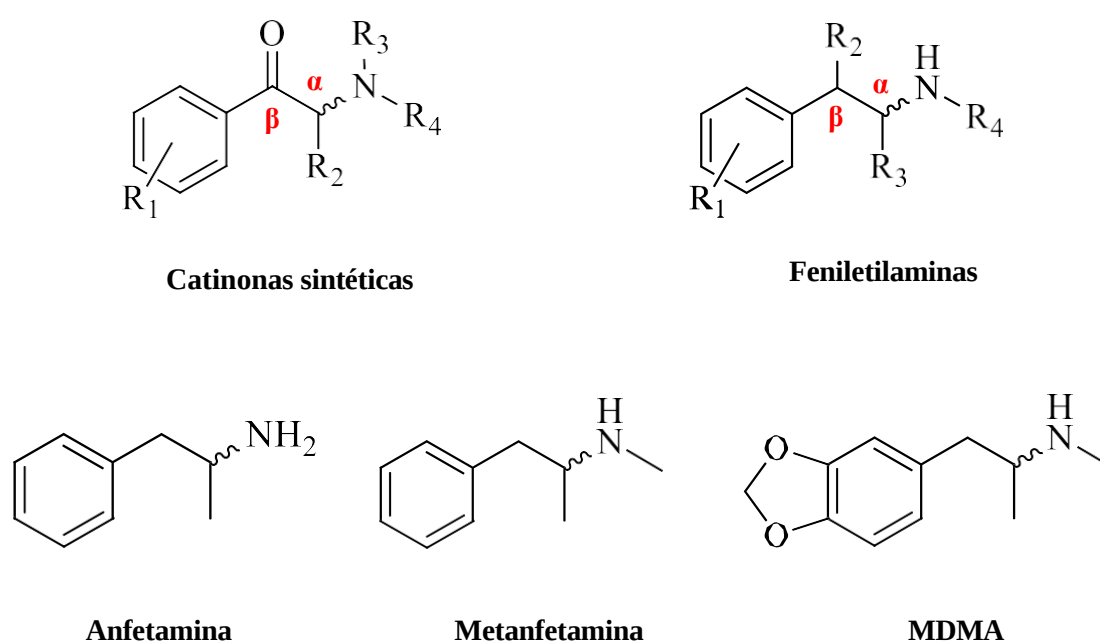


Figura 1.5: Estruturas químicas gerais das catinonas sintéticas e das feniletilaminas e estruturas químicas da anfetamina, da metanfetamina e do MDMA.

Como é possível observar através da estrutura química geral das catinonas sintéticas (**Figura 1.5**), as modificações na estrutura principal da catinona podem ocorrer em quatro posições distintas (**R₁** a **R₄**), o que resulta numa enormíssima variedade estrutural. Os grupos substituintes mais comuns consistem em: no **anel aromático** (**R₁**), um ou mais substituintes, dos quais, halogénios, metoxilo, metilo ou metilenodioxilo; no **grupo alquílo** da cadeia principal (**R₂**), cadeias alifáticas, metoxilo ou fenilo; no **grupo amino** (**R₃** e **R₄**), aminas secundárias ou terciárias com cadeias alquílicas, anéis (pirrolidina e piperidina), ciclo-hexilo ou benzilo.^{[20]-[24]}

Refere-se que, enquanto a catinona surge naturalmente na forma enantiomérica *S*, as catinonas sintéticas tendem ocorrer na forma de mistura racémica, uma vez que, em laboratórios clandestinos, não se recorrem a métodos estereosseletivos para a sua síntese. Para além do mencionado, as substâncias em estudo encontram-se, geralmente, na forma de pó ou cristais, sendo compostos solúveis em água, pois são, trivialmente, produzidas na forma de sais de cloridrato.^{[18],[20],[21]}

A ingestão e inalação assumem-se como as vias de administração preferenciais das catinonas sintéticas no organismo, estas que, em seguida, sofrem metabolização, maioritariamente, no fígado. Devido à ocorrência destas reações de biotransformação na catinona mãe, o seu consumo tem por base a identificação, nas matrizes biológicas, dos seus metabolitos maioritários, sendo, por isso, relevante o estudo dos perfis metabólicos destes compostos.^{[23]-[25]}

1.2.1. **Metabolismo**

No que respeita ao metabolismo, o referido visa modificar quimicamente qualquer xenobiótico (isto é, substâncias cuja génese seja extrínseca ao organismo), de forma a inativar a sua atividade biológica e a favorecer a sua eliminação. Assim, os metabolitos resultantes tendem a ser mais hidrossolúveis comparativamente com a respetiva droga de partida, para consequente excreção através da urina.^{[26]-[28]}

As transformações que ocorrem no processo de metabolização dividem-se em reações de Fase I e em reações de Fase II (conjugação) e são maioritariamente induzidas por enzimas hepáticas, dada a enorme heterogeneidade de enzimas presentes no fígado. Ressalva-se que apesar da denominação, não se verifica uma ordem para a realização das reações, nem necessariamente a ocorrência de ambas as fases.^{[27]-[30]}

O metabolismo de Fase I remete, essencialmente, para reações de oxidação, redução, clivagem (desmetilação, desalquilação) e hidroxilação de grupos funcionais, catalisadas pelo complexo enzimático Citocromo P450. Apesar de, tendencialmente, destas reações resultarem metabolitos menos reativos que o composto inicial, as mesmas podem originar metabolitos reativos aptos a reagir com DNA e proteínas, culminando com a formação de adutos covalentes, capazes de despoletar eventos tóxicos.^{[26], [28]-[30]}

Relativamente às reações de Fase II, estas, que não serão alvo de estudo no presente trabalho, consistem na formação de uma ligação covalente entre o xenobiótico, ou um dos seus metabolitos de Fase I, com moléculas endógenas como, a título exemplificativo, ácido glucurónico, sulfonato, acetato, glutatona (GSH) e aminoácidos.^{[26], [28]-[30]}

Um conceito relevante aquando do estudo do metabolismo, é o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) do xenobiótico, este que consiste no tempo necessário até que a concentração da substância, no sangue, seja metade da sua concentração inicial. A eliminação da maioria das substâncias ocorre segundo uma cinética de primeira ordem, sendo definidos parâmetros de eliminação em função de $t_{1/2}$, traduzidos por meio da **Equação 1.1**:^{[28],[31],[32]}

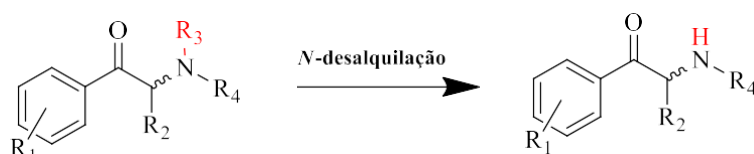
(Equação 1.1)

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{el}}$$

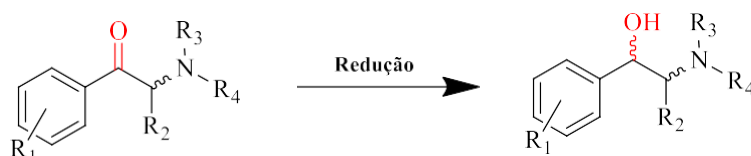
Na qual, k_{el} se refere à constante de eliminação, ou seja, consiste numa quantidade constante de xenobiótico que é eliminada por unidade de tempo, e engloba a totalidade das suas formas de eliminação, isto é, tanto por processos metabólicos, como por excreção. Assim, a sua concentração decrescerá de forma linear, numa escala logarítmica de concentração versus tempo, em função da constante de eliminação. A constante de eliminação consiste no declive da reta obtida a partir da área logarítmica do xenobiótico/padrão interno ao longo do tempo de incubação.^{[31],[32]}

A respeito das transformações metabólicas que se encontram, usualmente, na base da formação dos metabolitos maioritários das catinonas sintéticas, estas são: **a)** *N*-desalquilação, obtendo-se a amina correspondente; **b)** redução do grupo β -carbonilo a álcool secundário; **c)** hidroxilação no substituinte do anel aromático, formando-se um álcool primário e, conseqüente, oxidação deste para o ácido carboxílico correspondente. Refere-se que estas, e outras reações de Fase I, encontram-se elucidadas na **Figura 1.6**.

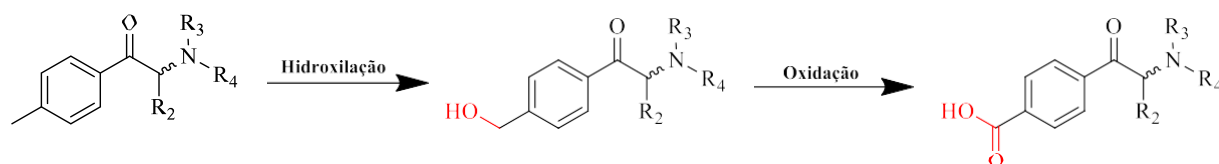
a) Remoção de um grupo alquilo R_3 e/ou R_4



b) Redução de uma β -cetona a álcool secundário



c) Formação de um ácido carboxílico a partir do grupo metilo do anel aromático



d) Formação de γ -lactama a partir do grupo pirrolidilo

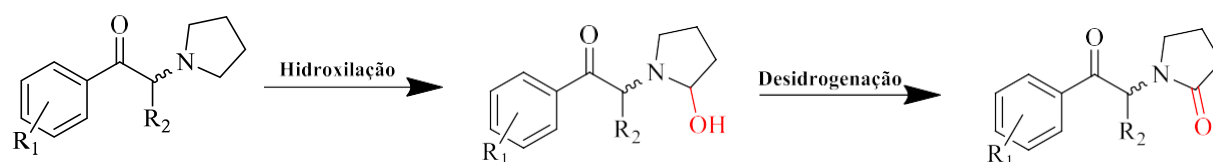
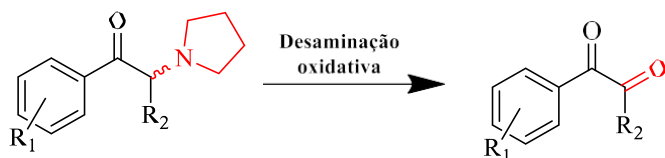


Figura 1.6: Principais reações de Fase I responsáveis pelo metabolismo de catinonas sintéticas. Adaptado de [33]-[45].

(continuação)

e) Desaminação oxidativa



f) Abertura do anel do grupo pirrolidilo

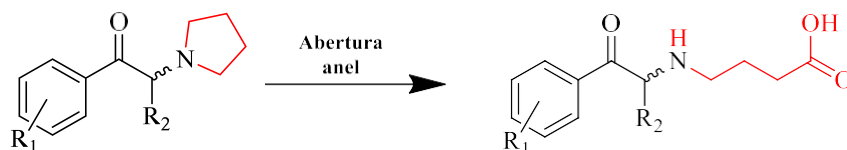


Figura 1.6: Principais reações de Fase I responsáveis pelo metabolismo de catinonas sintéticas. Adaptado de [33]-[45].

A pertinência do estudo do metabolismo das catinonas sintéticas assenta no facto de que, o entendimento das suas vias metabólicas permite, consequentemente, inferir a toxicidade associada ao consumo destas substâncias e, por sua vez, orientar a terapêutica em caso de intoxicação. Para além do referido, traçar os seus perfis metabólicos possibilita, ainda, o desenvolvimento de metodologias analíticas de identificação e de quantificação destes compostos, em matrizes biológicas, de forma a detetar os biomarcadores específicos associados ao consumo, o que assume um papel imprescindível em contexto forense ou clínico.^{[46]-[49]}

Transpondo o referido anteriormente numa abordagem mais prática, salienta-se que, para catinonas altamente metabolizadas (tempo de meia vida reduzido), o rastreio do seu consumo, terá como foco a deteção, na urina, dos seus metabolitos maioritários, uma vez que a catinona mãe tenderá a estar presente, nesta matriz, em quantidades residuais.

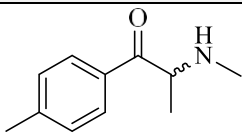
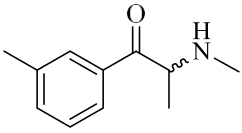
O estudo dos perfis metabólicos de catinonas sintéticas pode ser desenvolvido *in vivo* ou *in vitro*. No que respeita aos testes *in vivo*, estes tendem a realizar-se em ratos e apresentam maior evidência científica, uma vez que descrevem vias metabólicas mais fidedignas, dada a maior proximidade com a realidade. Todavia, as experiências *in vitro* comportam menos questões éticas e os resultados obtidos têm-se relevado promissores na identificação de metabolitos dos compostos em estudo. Assim, uma das formas de proceder aos ensaios *in vitro* consiste em usar a fração S9 de fígado humano ou de rato, que contém frações microsomiais e citosólicas e, consequentemente, uma enorme diversidade de enzimas responsáveis por reações de biotransformação de Fase I e Fase II. Focando nas enzimas que integram o citocromo P450, estas induzem reações de Fase I e necessitam da adição do cofator NADPH, e de um sistema regenerador (NRS), para que apresentem atividade contínua aquando do estudo do metabolismo com recurso à fração S9.^{[28],[50]}

Assim, à medida que vão sendo reportadas novas catinonas sintéticas, torna-se relevante proceder ao estudo do seu metabolismo, encontrando-se descrito, até ao presente momento, o perfil metabólico, em diversas matrizes biológicas, de mais de 30 catinonas sintéticas, nos quais se inclui o da mefedrona (4-MMC).^[34]

1.3. Catinonas sintéticas selecionadas

As duas catinonas sintéticas selecionadas para o estudo do metabolismo, no presente trabalho, denominam-se de 4'-MMC (4'-metilmetcatinona ou mefedrona) e de 3'-MMC (3'-metilmetcatinona, usualmente designada por 3-MMC) (**Tabela 1.1**). A escolha da 3'-MMC teve por base os critérios, em seguida, referidos, nomeadamente, estatuto legal; casos de intoxicação relatados; ausência de estudo do perfil metabólico, em condições controladas; representatividade nas apreensões; e sobretudo, o facto de ser um isómero de posição da catinona sintética mais reportada em casos de intoxicação ou morte, a 4'-MMC.^[51]

Tabela 1.1: Estruturas químicas e dados relativos às catinonas sintéticas em estudo no presente trabalho.

Estrutura química	Composto Nome IUPAC	Fórmula química	Massa molar (g/mol)
	4'-MMC (<i>R,S</i>)-2-metillamino-1-(4'-metilfenil)propan-1-ona	C ₁₁ H ₁₅ NO	117,24
	3'-MMC (<i>R,S</i>)-2-metillamino-1-(3'-metilfenil)propan-1-ona		

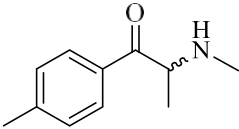
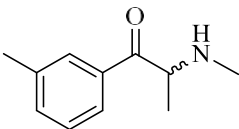
No que respeita à 4'-MMC, esta detém o estatuto legal de droga, uma vez que se encontra listada na Tabela II da Convenção das Nações Unidas sobre Substâncias Psicotrópicas de 1971, desde março de 2015.^[52] A inclusão da mefedrona na lista de substâncias controladas em Portugal foi realizada através da Lei n.º 13/2012, de 26 de março, que alterou o Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro.^[53] Uma vez que a lei mencionada estende esse controlo aos isómeros das substâncias nesta listadas, a 3'-MMC, sendo um isómero de posição da 4'-MMC, encontra-se também abrangida. Refere-se ainda que, a 3'-MMC foi incluída na Convenção das Nações Unidas sobre Substâncias Psicotrópicas em novembro de 2023.^{[54],[55]} Assim, a 3'-MMC foi aditada à tabela II-A anexa do Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro (modificado pela Lei n.º 55/2023 de 8 de setembro).^[56]

Relativamente à 4'-MMC, existem inúmeros casos de intoxicação reportados, tanto fatais como não fatais, verificando-se, em muitos destes, um policonsumo de substâncias controladas, não tendo sido, por isso, possível atribuir a causa de morte exclusivamente ao consumo de mefedrona. Todavia, referem-se nove casos fatais em que, apesar de terem sido identificadas outras drogas e os seus metabolitos, na urina e no sangue, o óbito resultou da intoxicação por 4'-MMC, dada a elevada concentração desta substância quando comparada com a das restantes drogas.^{[57]-[63]} A título exemplificativo, descreve-se um caso que culminou na morte devido ao uso 4'-MMC, tendo sido detetadas, no sangue: uma concentração de 22 mg/L de mefedrona, concentrações inferiores a 0,1 mg/L de diazepam e nordiazepam (metabolito ativo de diazepam), e 0,34 mg/L de anfetamina.^[58]

No que respeita à 3'-MMC, relataram-se, para além dos demais casos de policonsumo, dois episódios mortais, nos quais a única droga identificada, no sangue, consistiu na 3'-MMC.^[64] As concentrações desta substância apresentaram valores de 4,4 µg/mL e de 0,2 µg/mL.^{[64]-[66]} Apesar dos dados acerca desta catinona serem, ainda, muito limitados, espera-se que a sua toxicidade seja semelhante à da 4'-MMC (dada a similaridade estrutural) e à de outras drogas psicoestimulantes.^[64]

Refere-se que se encontram reportados, na literatura, diversos estudos do metabolismo da 4'-MMC, desenvolvidos *in vitro* e *in vivo*, e apenas 2 estudos da 3'-MMC, estando estes compilados na **Tabela 1.2**. Desta forma, e tendo por base os metabolitos identificados nestes estudos, procedeu-se à elaboração de uma proposta de metabolismo da 4'-MMC, incluindo todos os metabolitos de Fase I relatados, até ao momento, na literatura que se apresenta na **Figura 1.7**.

Tabela 1.2: Compilação do tipo de estudo e de matriz, e das técnicas analíticas utilizadas na identificação de metabolitos provenientes de reações de Fase I e de Fase II, da 4'-MMC e 3'-MMC, já reportados na literatura.

Denominação catinona	Estrutura química	Tipo de estudo	Tipo de matriz	Técnica de identificação	Referência bibliográfica
4-MMC		<i>In vivo</i>	Urina (humano)	UHPLC-ESI-HRMS (QTOF)	[43]
				GC-MS	[34]
				GC-MS	[44]
				LC-MS/MS	[67]
			Urina (rato)	GC-MS	[44]
				LC-MS	[68]
		<i>In vitro</i>	Sangue (humano)	UHPLC-ESI-HRMS (QTOF)	[45]
				LC-MS/MS	[67]
3-MMC		<i>In vivo</i>	Pelo púbico	LC-ESI-HRMS (Orbitrap)	[70]
			Sangue (humano)	GC-EI-MS/MS	[65]

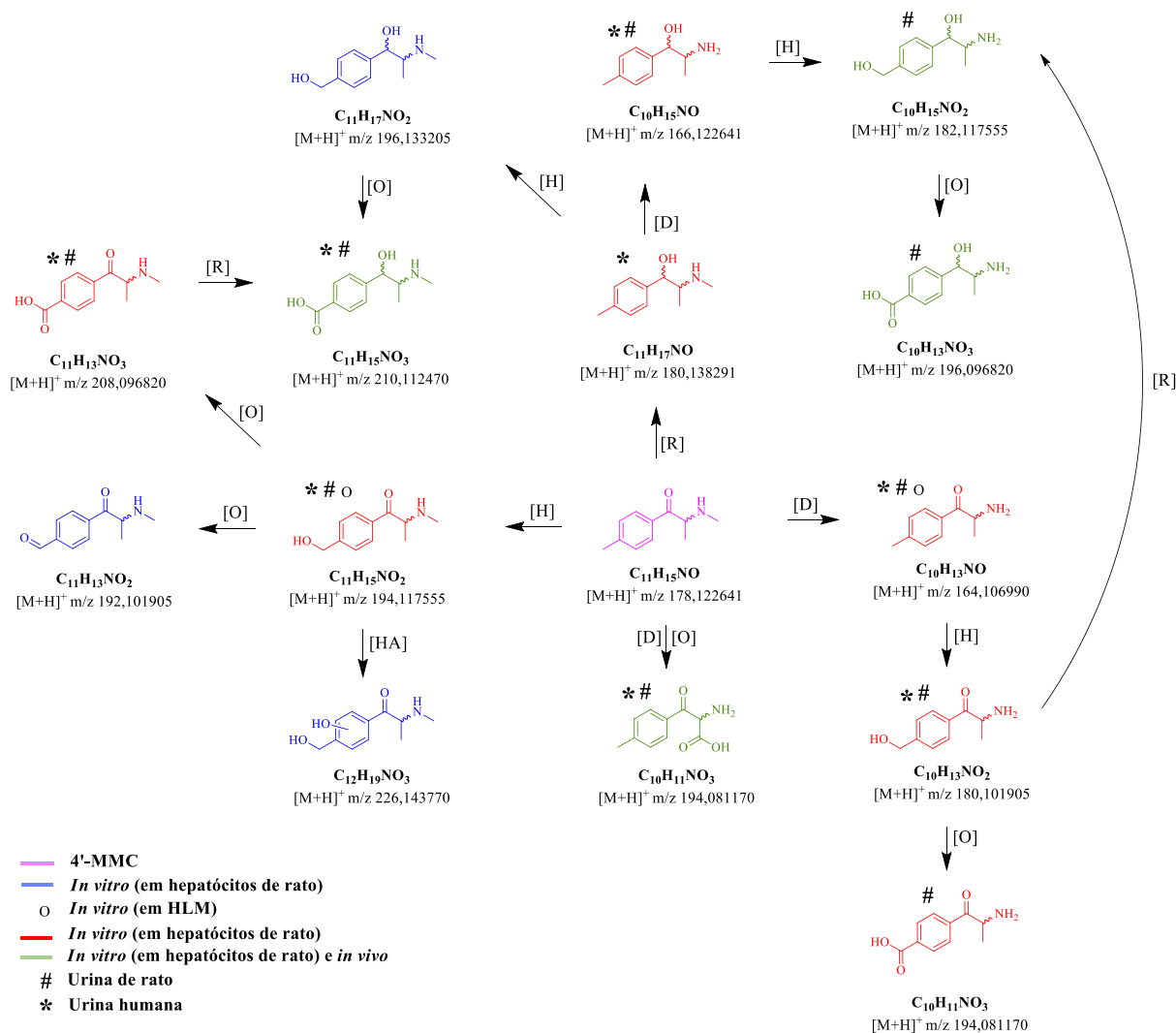


Figura 1.7: Proposta de metabolismo, de Fase I, para a 4'-MMC, realizada com base na literatura presente na **Tabela 1.2**. [R] redução; [O] oxidação; [D] N-desmetilação; [H] hidroxilação; [HA] hidroxilação aromática.

Tendo por base a literatura presente na **Tabela 1.2**, os metabolitos maioritários, de Fase I, da 4'-MMC são: dihidro-4'-MMC, nor-4'-MMC, dihidro-nor-4'-MMC, hidroxitolil-4'-MMC e 4-carboxi-4'-MMC (**Figura 1.8**). Sabe-se, ainda, que, em urina humana, o metabolito nor-4'-MMC apresentou um tempo de meia vida muito curto, o que dificultará a sua detecção nessa matriz.^[34]

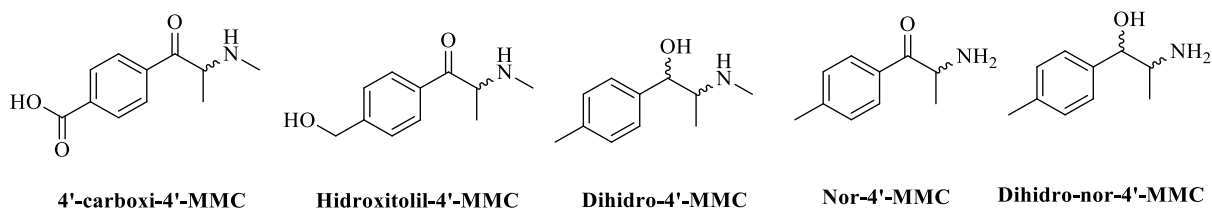


Figura 1.8: Metabolitos maioritários, de Fase I, da 4'-MMC.

Relativamente à 3'-MMC, constam, até ao momento, na literatura, apenas dois estudos, sendo estes *in vivo*, alusivos ao seu metabolismo (**Tabela 1.2.**) em consumidores, nos quais se identificaram alguns metabolitos que sugerem provir desta catinona (metabolitos resultantes de redução do grupo carbonilo, hidroxilação no metilo do anel aromático, seguida de oxidação para o ácido carboxílico correspondente, e/ou *N*-desmetilação - **Figura 1.9.**)^[55]

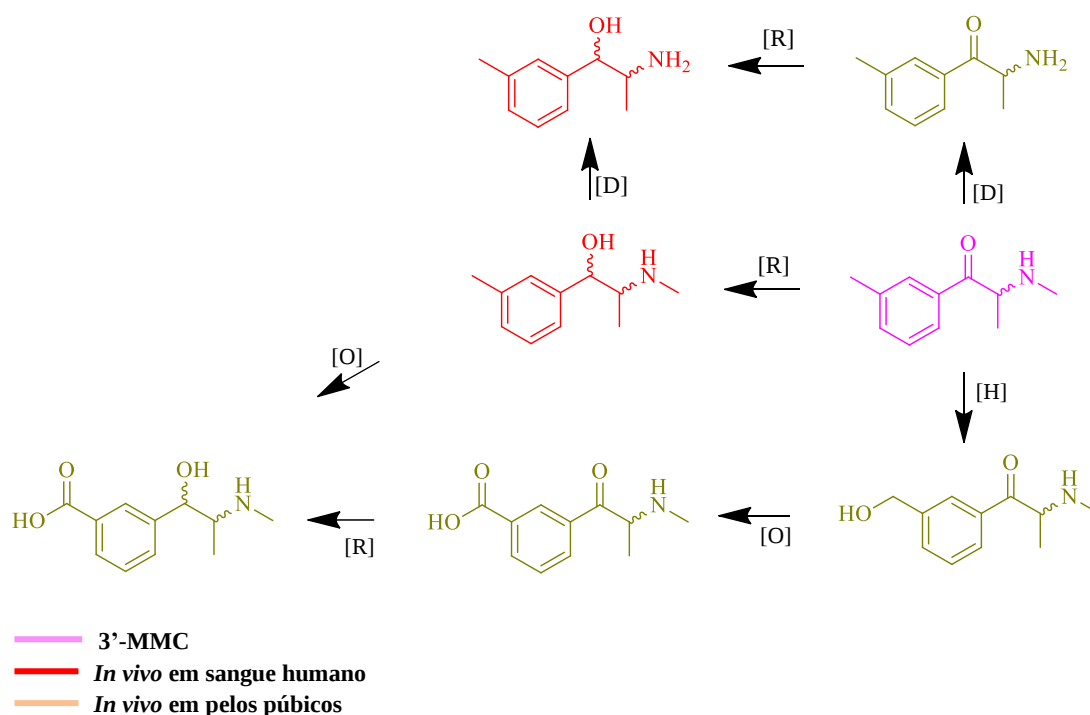


Figura 1.9: Proposta de metabolismo, de Fase I, para a 3'-MMC, realizada com base na literatura presente na **Tabela 1.2.**

[R] redução; [O] oxidação; [D] *N*-desmetilação; [H] hidroxilação.

Apesar de ter sido identificada a 3'-MMC numa matriz biológica (pelos púbicos) envolvida nesses estudos, através da comparação com um padrão desta catinona, esclarece-se que é plausível afirmar que os metabolitos detetados possivelmente resultaram da metabolização da 3'-MMC. Contudo, estes estudos sugerem uma hipótese de formação dos possíveis metabolitos, assente nas mesmas vias metabólicas que aquelas relatadas para a 4'-MMC como se apresenta na **Figura 1.9.** No entanto, uma vez que não se verificaram condições controladas do consumo da 3'-MMC, justifica-se fazer o estudo do metabolismo desta catinona, usando como referência a 4'-MMC.

Para além da ausência do estudo do seu metabolismo, a 3'-MMC tem vindo a ganhar alguma notoriedade nos últimos anos, apresentando-se como a segunda catinona sintética mais apreendida no ano de 2021 (**Figura 1.2.**), tendência que se manteve em 2022, o que a torna numa catinona de interesse para investigação.^[17]

1.4. Objetivo do trabalho

As catinonas sintéticas representam a segunda maior classe de novas substâncias psicoativas (NPS), reportadas em todo o mundo, e constituem um sério risco à saúde pública. Desta forma, o aumento do número de intoxicações agudas e mortes, associadas ao consumo destas NPS, resultou na sua inclusão contínua na Convenção sobre as Substâncias Psicotrópicas, com base na sua avaliação de risco.^[8] No entanto, verificam-se vários desafios criados, tanto pela rápida disseminação das catinonas, no mercado de drogas ilícitas, como pela diversidade das suas estruturas químicas, sendo estes:

- i) escassez de padrões de catinonas sintéticas que permitam a sua identificação, em contextos forenses (para permitir o enquadramento legal).
- ii) ausência de informação acerca dos biomarcadores seletivos que corroboram o consumo de catinonas sintéticas, em matrizes biológicas, no panorama forense e clínico (a descoberta destes biomarcadores assenta na realização do estudo do perfil metabólico da catinonas);
- iii) falta de informações sobre as propriedades físico-químicas, psicoativas e toxicológicas das catinonas e dos seus metabolitos, de forma a orientar a terapêutica, em caso de intoxicação.

Assim, com o objetivo final de contribuir para uma resposta proativa na resolução dos problemas criados pelas NPS, e no âmbito de um protocolo estabelecido entre o Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária e a Universidade de Lisboa (Faculdade de Ciências e Instituto Superior Técnico), neste projeto pretende-se:

- a) sintetizar e caracterizar, por RMN, as catinonas sintéticas denominadas de 4'-MMC e de 3'-MMC;
- b) determinar, por espectrometria de massa de alta resolução (LC-ESI-HRMS), o perfil metabólico (resultante de incubações *in vitro*, com recurso à fração S9 de fígado de rato) das catinonas sintetizadas e, conseqüente, análise comparativa;
- c) sintetizar um dos principais metabolitos das catinonas que, no caso da 4'-MMC e da 3'-MMC, corresponde aos respetivos metabolitos reduzidos (a serem usados para avaliação da sua toxicidade em trabalhos futuros).

2

Resultados e Discussão

No presente trabalho sintetizaram-se e caracterizaram-se, por RMN, duas catinonas sintéticas, 4'-MMC e 3'-MMC (isômeros que diferem na posição do grupo metilo no anel aromático), e os seus metabolitos reduzidos, 4'-MMC-OH e 3'-MMC-OH, respetivamente. Procedeu-se, ainda, a um estudo do metabolismo das duas catinonas referidas.

Nesta seção são apresentados e discutidos os dados referentes à **1)** síntese e caracterização das catinonas e dos respetivos metabolitos reduzidos por RMN; **2)** identificação, por LC-ESI(+)-HRMS, dos metabolitos resultantes das incubações das catinonas 4'-MMC e 3'-MMC, na fração S9 de fígado de rato; **3)** identificação por RMN de uma NPS presente numa amostra fornecida pelo LPC-PJ.

2.1. Síntese de catinonas

A síntese das catinonas pretendidas baseou-se num procedimento que contempla três passos reacionais ordenados, sendo estes: **i)** formação das α -bromocetonas, a partir da respetiva cetona; **ii)** formação das catinonas, primeiramente na forma de base livre e **iii)** na forma de sal (cloridrato). Os passos previamente referidos foram conseguidos sem qualquer purificação e encontram-se esquematizados na **Figura 2.1**.

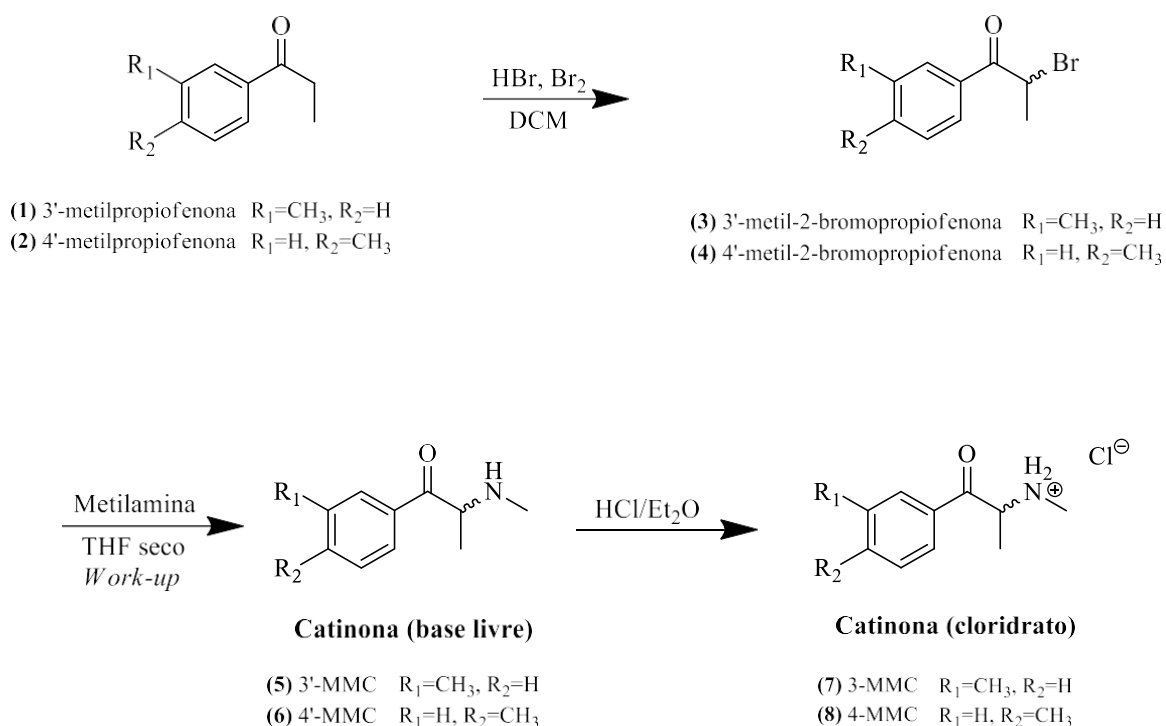


Figura 2.1: Esquema reacional geral da síntese das catinonas na forma de base livre e de cloridrato.

2.1.1. Síntese de α -bromocetonas

O mecanismo sintético das α -bromocetonas (3) e (4) encontra-se esquematizado na **Figura 2.2**, e teve por base uma reação de halogenação no carbono α (relativamente ao grupo carbonilo) das cetonas (1) ou (2), respetivamente. A referida ocorre em meio ácido, através da adição de uma gota de ácido bromídrico, o que, ao favorecer a protonação do oxigénio do grupo carbonilo, conduz à formação de um enol, dada a perda de um hidrogénio α . Em seguida, é adicionado, à mistura reacional, bromo molecular, este irá funcionar como eletrófilo e sofrer um ataque nucleofílico por parte do enol, ligando-se ao carbono α . Obteve-se, assim, uma mistura racémica pois, o ataque pode dar-se por ambos os lados do plano da ligação dupla do enol. Por fim, após o bromo carregado negativamente, que se encontra no meio, desprotonar o carbonilo, o catalisador é regenerado e obtém-se a respetiva α -bromocetona.^{[72]-[74]}

Ambas as α -bromocetonas se apresentaram na forma de óleo alaranjado, tendo sido obtidas com um rendimento de 99%.

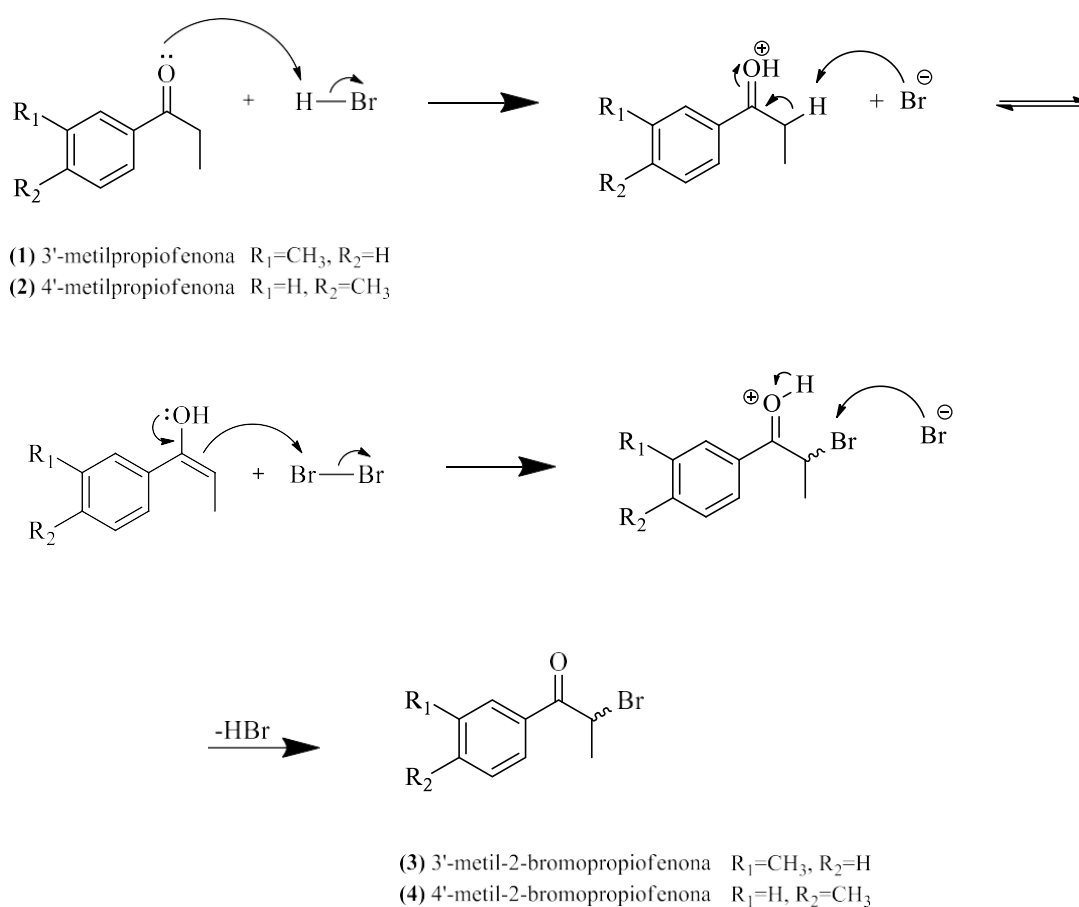


Figura 2.2: Mecanismo sintético de α -bromocetonas.

De forma a verificar-se a formação das α -bromocetonas, procedeu-se à comparação do espectro de RMN de ^1H de cada α -bromocetona com o da respetiva cetona, em CDCl_3 (**Figura 2.3** e na **Figura 2.4**).

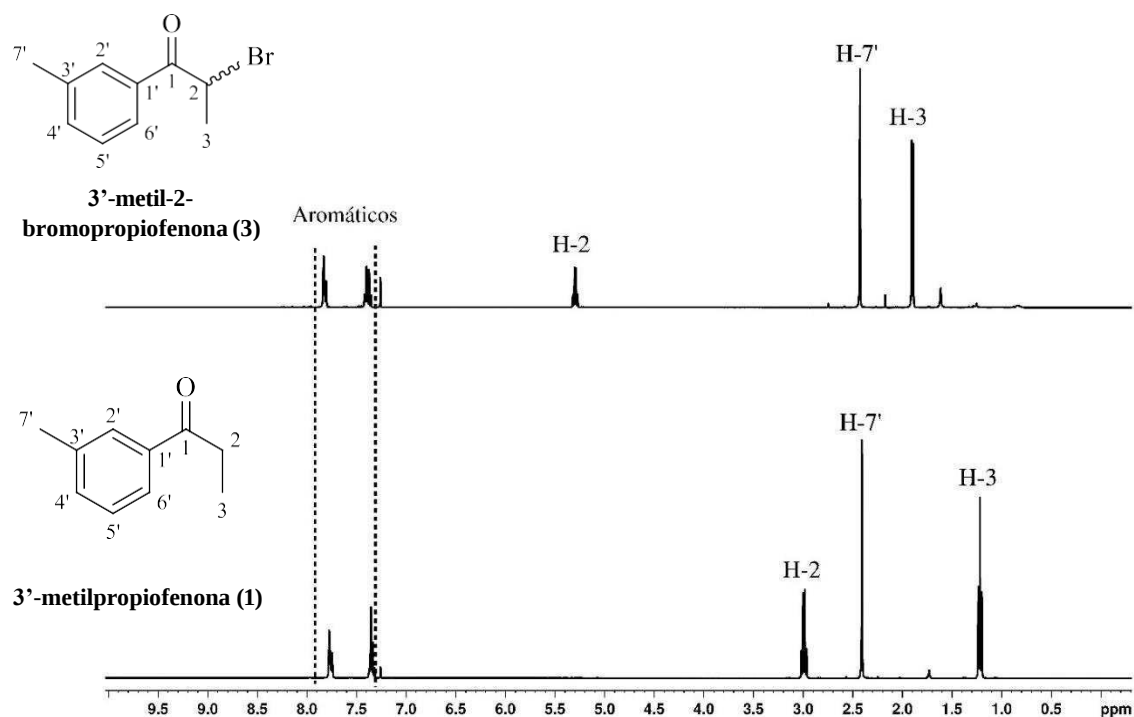


Figura 2.3: Espectros RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 3'-metil-2-bromopropiofenona (3) (cima) e da 3'-metilpropiofenona (1) (baixo).

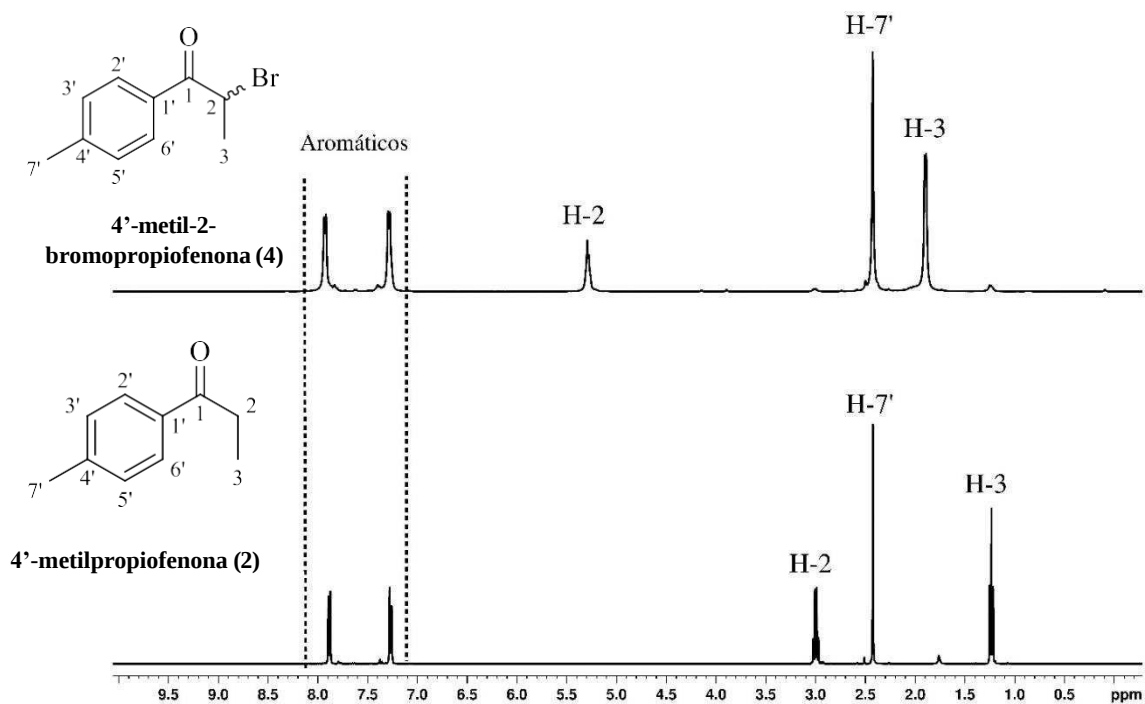


Figura 2.4: Espectros RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 4'-metil-2-bromopropiofenona (4) (cima) e da 4'-metilpropiofenona (2) (baixo).

Tal como é possível observar na **Figura 2.3** e na **Figura 2.4**, verifica-se o aumento, face aos das cetonas **(1)** e **(2)**, dos desvios químicos dos prótons H-2 e H-3 das α -bromocetonas **(3)** e **(4)**. No que respeita aos prótons H-2, estes apresentam o maior aumento de desvio químico, surgindo a 3,00 ppm para a cetona **(1)** e a 5,30 ppm para a α -bromocetona **(3)**; e a 3,00 ppm para a cetona **(2)** e a 5,29 ppm para a α -bromocetona **(4)**, uma vez que consistem nos prótons α (prótons ligados ao carbono onde ocorre a α -bromação e, portanto, mais afetados pelo efeito desblindante do átomo de bromo introduzido). Para além dos valores de desvio químico, observou-se a multiplicidade destes sinais, tendo-se concluído que os prótons H-3 nas cetonas aparecem na forma de triplete, enquanto que, nas α -bromocetonas surgem como duplete, o que indica a perda de um próton no C-2 (carbono α) das α -bromocetonas. Esta informação é corroborada com a integração do sinal referente a H-2, este que integra para dois nas cetonas e para um nas α -bromocetonas. Estes dados apresentam-se, também, na **Tabela 2.1** e na **Tabela 2.2**, onde constam os valores de desvios químicos dos sinais dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da cetona **(1)** e respetiva α -bromocetona **(3)**, e da cetona **(2)** e respetiva α -bromocetona **(4)**, respetivamente. A atribuição dos desvios químicos correspondentes aos sinais de ^1H e de ^{13}C , em CDCl_3 , das cetonas **(1)** e **(2)** e das α -bromocetonas **(3)** e **(4)** foi possível através da análise dos seus espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC, estes que se encontram no **Anexo 6.1** e no **Anexo 6.2**, respetivamente.

Tabela 2.1: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CDCl_3 , da 3'-metilpropiofenona **(1)** e 3'-metil-2-bromopropiofenona **(3)**.

Posição	3'-metilpropiofenona (1)		3'-metil-2-bromopropiofenona (3)	
	δ ^1H ; m; J (Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H ; m; J (Hz)	δ ^{13}C
1	-	201,31	-	193,76
2	3,00; 2H; q; 7,3	32,02	5,30; 1H; q; 6,7	41,75
3	1,22; 3H; t; 7,2	8,49	1,90; 3H; d; 6,7	20,35
1'	-	137,13	-	134,22
2'	7,78; 1H; sl	128,69	7,83; 1H; sl	129,60
3'	-	138,50	-	138,83
4'	7,37; 1H; m	133,82	7,41; 1H; m	134,70
5'	7,34; 1H; m	128,61	7,37; 1H; m	128,79
6'	7,75; 1H; dl; 8,7	125,39	7,81; 1H; dl; 8,3	126,26
7'	2,41; 3H; s	21,56	2,43; 3H; s	21,58

Tabela 2.2: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CDCl_3 , da 4'-metilpropiofenona **(2)** e 4'-metil-2-bromopropiofenona **(4)**.

Posição	4'-metilpropiofenona (2)		4'-metil-2-bromopropiofenona (4)	
	δ ^1H ; m; J (Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H ; m; J (Hz)	δ ^{13}C
1	-	200,77	-	193,20
2	3,00; 2H; q; 7,2	31,85	5,29; 1H; q; 6,4	41,71
3	1,23; 3H; t; 7,2	8,53	1,90; 3H; d; 6,0	20,40
1'	-	134,61	-	131,58
2'/6'	7,89; 2H; d; 8,1	128,29	7,93; 2H; d; 7,4	129,23
3'/5'	7,27; 2H; d; 8,0	129,41	7,29; 2H; d; 7,4	129,64
4'	-	143,78	-	144,84
7'	2,42; 3H; s	21,82	2,43; 3H; s	21,92

2.1.2. Síntese de catinonas

O mecanismo sintético da formação das catinonas **(7)** e **(8)** encontra-se esquematizada na **Figura 2.5**, e teve por base uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) entre o carbono α da respectiva α -bromocetona **(3)** ou **(4)** (eletrófilo) e a amina pretendida que, em ambas as catinonas sintetizadas, consiste na metilamina (nucleófilo). Dado que se trata de uma reação S_N2 , tal ocorre em apenas um passo pois, o ataque do nucleófilo e a saída do grupo rejeitado (Br^-) realiza-se em simultâneo. Para além do anterior e, tratando-se de uma reação S_N2 , verifica-se uma inversão de configuração no carbono onde ocorreu a substituição (centro estereogénico), dado que o ataque nucleofílico se efetua pelo lado contrário àquele pelo qual sai o grupo rejeitado. No entanto, obteve-se uma mistura racémica da respectiva catinona (em base livre), uma vez que o material de partida para esta reação consistia, também este, numa mistura racémica. Como último passo do processo sintético, precipitou-se a catinona **(5)** ou **(6)**, com recurso a ácido clorídrico etéreo, obtendo-se, respetivamente, a catinona **(7)** ou **(8)**, na forma de sal, mais especificamente de cloridrato (forma sob a qual o seu consumo tende a ocorrer).^{[72]-[79]}

Os cloridratos de catinonas apresentaram-se na forma de pó branco, tendo-se verificado rendimentos de 24% e de 23% para as catinonas **(7)** e **(8)**, respetivamente.

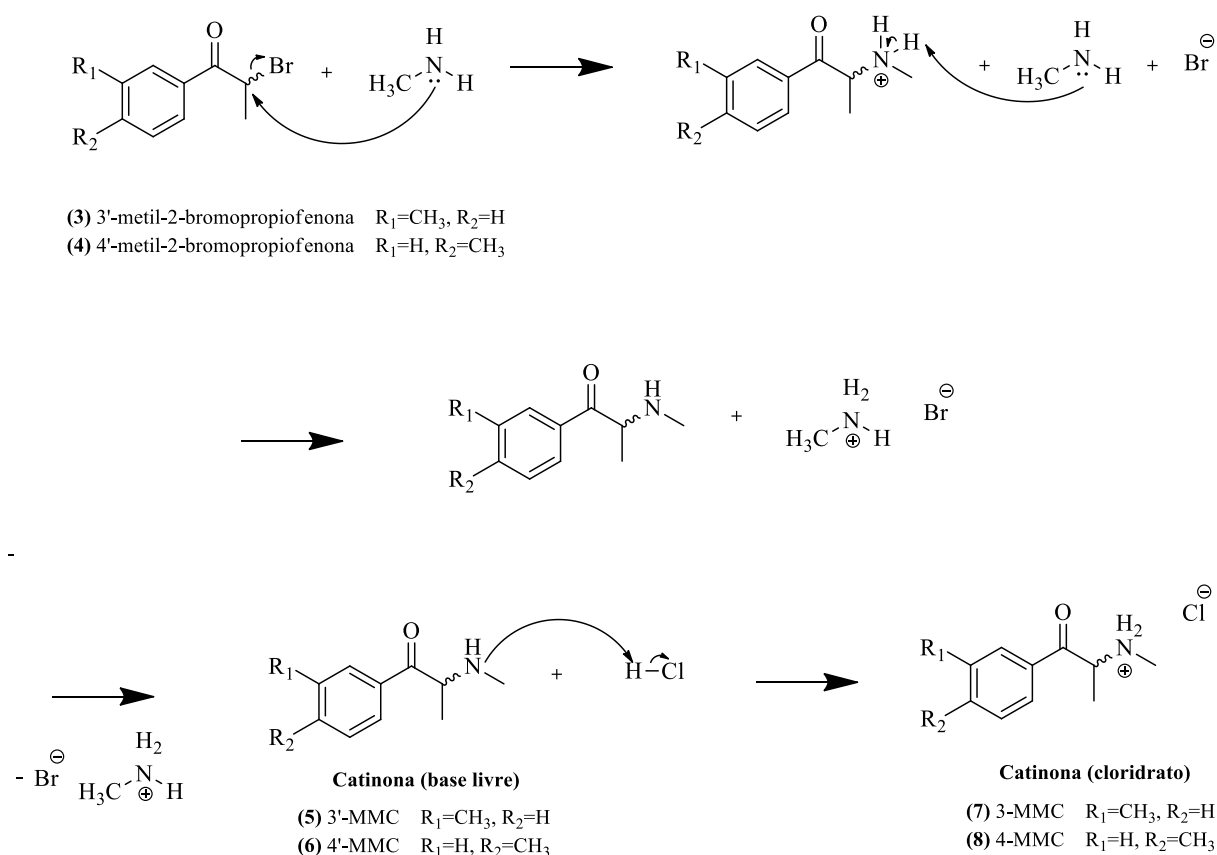


Figura 2.5: Mecanismo sintético das catinonas na forma de base livre e de cloridrato.

De forma a verificar-se a formação das catinonas na forma de cloridrato (**7**) e (**8**), procedeu-se à comparação do espectro de RMN de ^1H de cada catinona com o da respetiva α -bromocetona, em CDCl_3 (**Figura 2.6** e **Figura 2.7**).

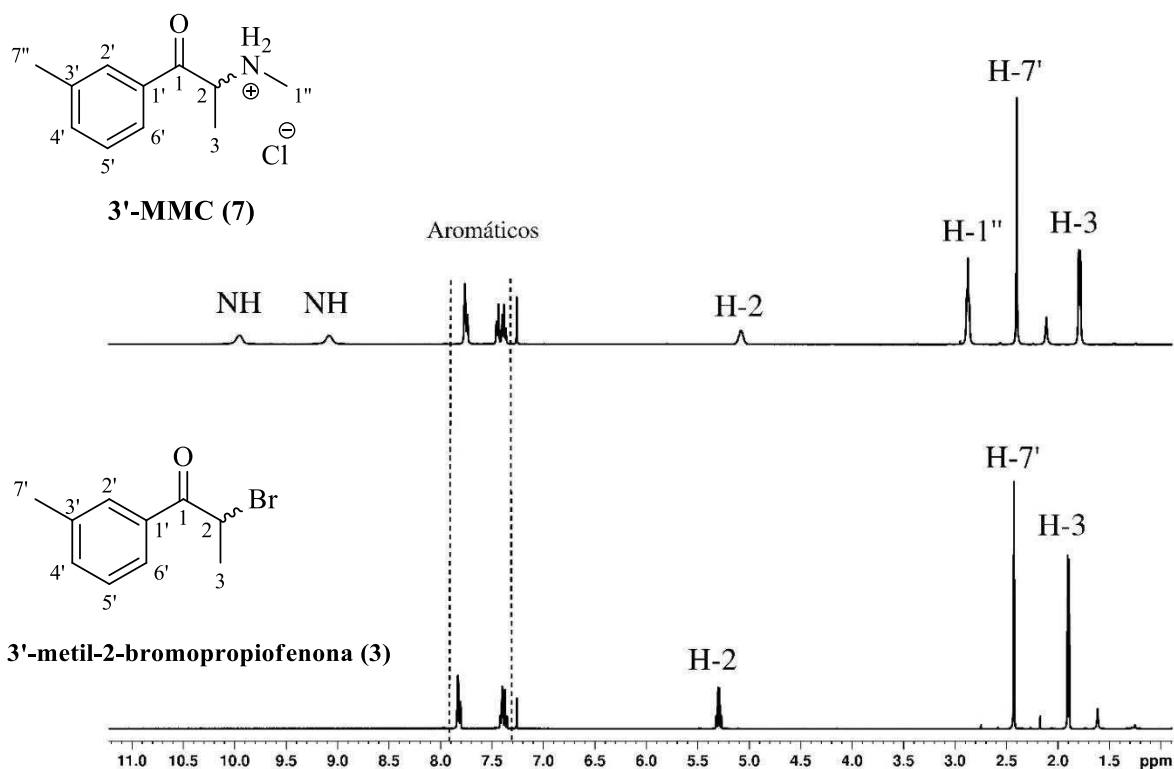


Figura 2.6: Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 3'-MMC (**7**) (cima) e da 3'-metil-2-bromopropiofenona (**3**) (baixo).

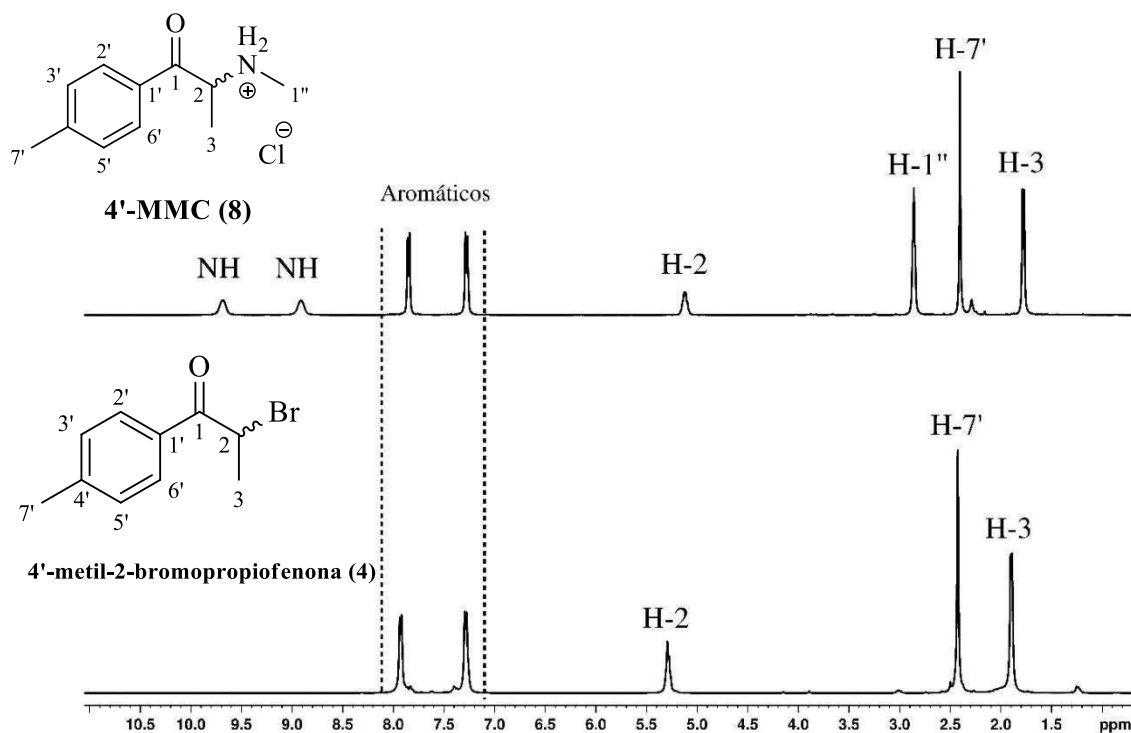


Figura 2.7: Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 4'-MMC (**8**) (cima) e da 4'-metil-2-bromopropiofenona (**4**) (baixo).

Tal como é possível observar na **Figura 2.6** e na **Figura 2.7**, verifica-se o aparecimento de três novos sinais nos espectros das catinonas **(7)** e **(8)** correspondentes aos prótons do grupo metilamino protonado. A título exemplificativo, estes apresentam, para a catinona **(7)**, os valores de 9,96 ppm e de 9,08 ppm, para cada um dos dois prótons ligados ao átomo de nitrogénio; e de 2,87 ppm, para os três prótons do grupo metilamino (H-1'').

Os dados acima mencionados apresentam-se, também, na **Tabela 2.3** e na **Tabela 2.4**, onde constam os valores de desvio químico referentes aos espectros de ^1H da α -bromocetona **(3)** e respetiva catinona protonada **(7)**, e da α -bromocetona **(4)** e respetiva catinona protonada **(8)**, respetivamente. A atribuição dos sinais de ^1H , em CDCl_3 , das catinonas protonadas **(7)** e **(8)** foi possível através da análise dos seus espectros de ^1H , estes que se encontram, de forma mais detalhada, no **Anexo 6.3**.

Tabela 2.3: Dados de RMN de ^1H , em CDCl_3 , referentes à 3'-metil-2-bromopropiofenona **(3)** e à 3'-MMC **(7)**.

Posição	3'-metil-2-bromopropiofenona (3)	3'-MMC (7)
	δ ^1H ; m; J (Hz)	δ ^1H ; m; J (Hz)
1	-	-
2	5,30; 1H; q; 6,7	5,08; 1H; q; 6,8
3	1,90; 3H; d; 6,7	1,79; 3H; d; 6,8
1'	-	-
2'	7,83; 1H; sl	7,76; 1H; sl
3'	-	-
4'	7,41; 1H; m	7,45; 1H; d; 7,5
5'	7,37; 1H; m	7,38; 1H; t; 7,5
6'	7,81; 1H; dl; 8,3	7,74; 1H; dl; 8,2
7'	2,43; 3H; s	2,40; 3H; s
1''	-	2,87; 3H; s
NH	-	9,96; 1H; s 9,08; 1H; s

Tabela 2.4: Dados de RMN de ^1H , em CDCl_3 , referentes à 4'-metil-2-bromopropiofenona **(4)** e à 4'-MMC **(8)**.

Posição	4'-metil-2-bromopropiofenona (4)	4'-MMC (8)
	δ ^1H ; m; J (Hz)	δ ^1H ; m; J (Hz)
1	-	-
2	5,29; 1H; q; 6,4	5,10; 1H; q; 6,3
3	1,90; 3H; d; 6,1	1,76; 3H; d; 6,3
1'	-	-
2'/6'	7,93; 2H; d; 7,4	7,83; 2H; d; 7,2
3'/5'	7,29; 2H; d; 7,5	7,26; 2H; d; 7,2
4'	-	-
7'	2,43; 3H; s	2,38; 3H; s
1''	-	2,84; 3H; s
NH	-	9,66; 1H; s 8,89; 1H; s

Apesar da confirmação da síntese das catinonas, na forma de cloridrato, ter sido conseguida através da comparação com as respectivas α -bromocetonas, em CDCl_3 , a caracterização completa das catinonas, 3'-MMC (7) e 4'-MMC (8), realizou-se em CD_3OD , de forma a facilitar a futura comparação destas com os respetivos metabolitos reduzidos, cuja dissolução não ocorre em CDCl_3 .

A atribuição dos sinais de ^1H e de ^{13}C , em CD_3OD , das catinonas protonadas (7) e (8) foi possível através da análise dos seus espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC (**Anexo 6.3**), e encontra-se dividida nas diferentes porções constituintes de uma catinona sintética: cadeia acíclica, zona aromática e grupo amino.

Assim, os valores dos desvios químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C , referentes à cadeia acíclica das catinonas (7) e (8) constam na **Tabela 2.5**.

Tabela 2.5: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CD_3OD , referentes à cadeia acíclica da 3'-MMC (7) e da 4'-MMC (8).

Composto	1	2		3	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$; m; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$; m; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
3'-MMC (7)	195,82	5,14; 1H; q; 6,8	59,25	1,59; 3H; d; 6,8	14,83
4'-MMC (8)	196,57	5,14; 1H; q; 6,3	60,54	1,60; 3H; d; 6,3	16,33

A primeira atribuição consistiu no sinal de ^{13}C com maior desvio químico, este que corresponde, em ambas as catinonas, ao carbono do grupo carbonilo (C-1), uma vez que este carbono se encontra duplamente ligado a um átomo eletronegativo que o desblinda.

Por sua vez, o protão H-2, de ambas as catinonas, é facilmente identificável, pois integra para um e, através da correlação verificada no COSY (**Figura 2.8**) entre este protão (H-2) e um sinal a 1,59 ou 1,60 ppm, é possível atribuir tal sinal aos três protões H-3 da catinona (7) ou (8), respetivamente.

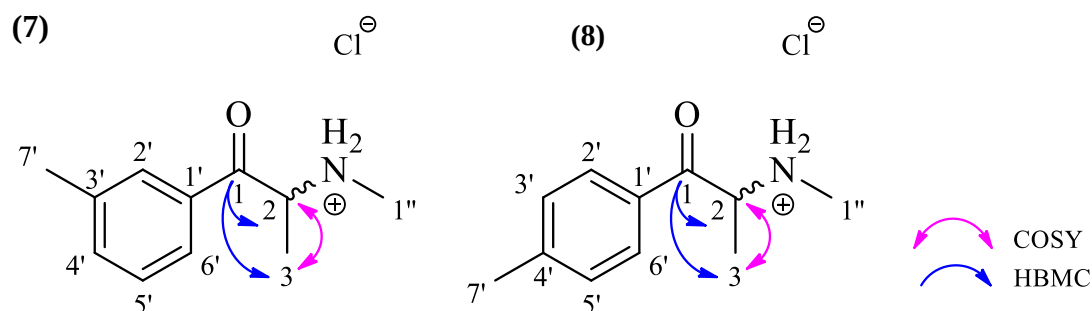


Figura 2.8: Correlações de COSY e de HMBC referentes ao radical acilo da 3'-MMC (7) e da 4'-MMC (8).

Relativamente à zona aromática da catinona 4'-MMC (8) (Figura 2.9), os prótons H-2'/6' são rapidamente atribuídos através da correlação de HMBC existente entre estes e o C-1. Por sua vez, o sinal de ^1H referente aos prótons H-3'/5' é conseguido, por exemplo, através da correlação de COSY entre estes e os prótons H-2'/6'. Em seguida, é possível distinguir os dois carbonos quaternários do anel aromático, C-1' e C-4', através das correlações de HMBC: C-4' com H-2'/6'; C-4' com H-7'; e, C-1' com H-3'/5'.

Relativamente à zona aromática da catinona 3'-MMC (7) (Figura 2.9), os prótons H-2' e H-6' são rapidamente atribuídos através da correlação de HMBC existente entre estes e o C-1. A distinção entre ambos é possível através da multiplicidade dos sinais (Tabela 2.6), pois o sinal de ^1H do próton H-2' é um singuleto (próton ligado a carbono entre dois carbonos quaternários), enquanto que, o sinal de ^1H do próton H-6' consiste num duplete. De forma equivalente à anterior, a atribuição dos sinais de ^1H referente aos prótons H-4' e H-5' teve também por base a observação da sua multiplicidade, surgindo os sinais associados aos prótons H-4' e H-5' na forma de duplete e de triplete, respetivamente. A correlação de COSY entre o próton H-6' e o próton H-5', e entre o próton H-5' e o próton 4', corrobora esta atribuição. Em seguida, é possível distinguir os dois carbonos quaternários do anel aromático, C-1' e C-3', através da correlação de HMBC: C-3' com H-7'.

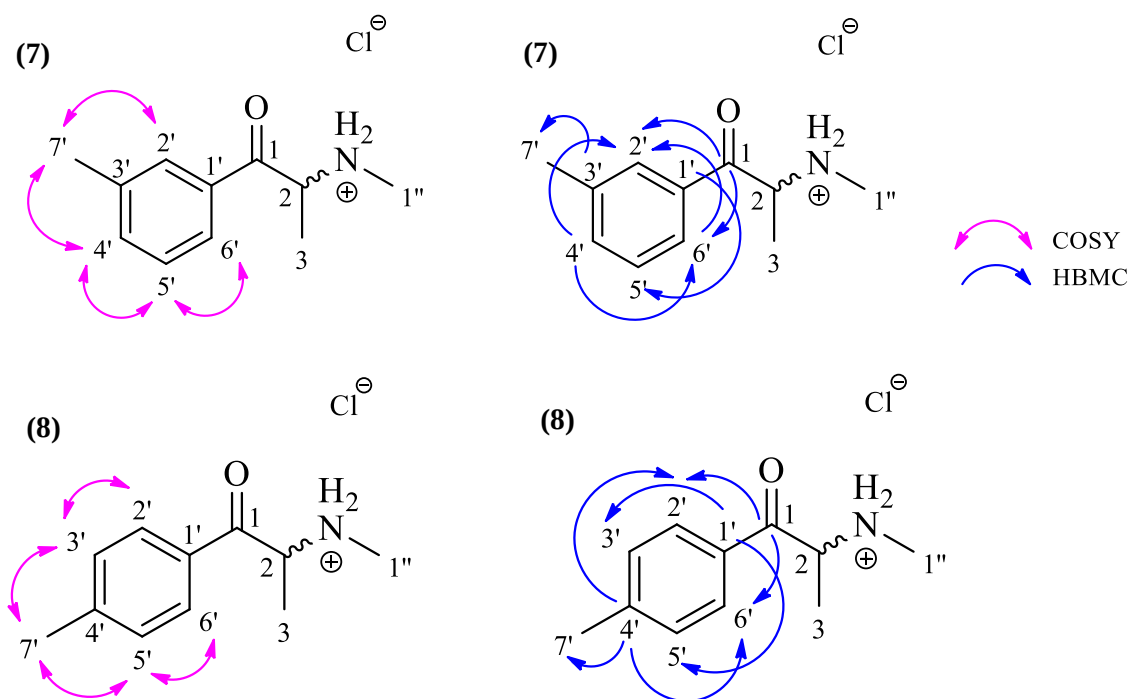


Figura 2.9: Correlações de COSY e de HMBC referentes à zona aromática da 3'-MMC (7) e da 4'-MMC (8).

Ainda relativamente à zona aromática, dado que a catinona 4'-MMC (8), bem como a respetiva cetona (2), se trata de um composto que apresenta um grupo metilo na posição *para* do anel aromático, verifica-se um eixo de simetria e, portanto, observam-se dois sinais que integram, cada um, para dois prótons: um sinal referente aos prótons H-2'/6', com um desvio químico de 7,98 ppm; e um outro, associado aos prótons H-3'/5', que surge a 7,44 ppm (**Tabela 2.6**).

No que respeita à catinona 3'-MMC (7), e cetona correspondente (1), esperar-se-iam quatro sinais distintos, uma vez que o grupo metilo se encontra na posição *meta* do anel aromático e, portanto, não existe qualquer eixo de simetria. No entanto, verificou-se uma sobreposição de dois sinais, no espectro de ^1H , nomeadamente do singuleto referente ao próton H-2' (7,91 ppm) com o duplete associado ao próton H-6' (7,87 ppm) (**Tabela 2.6**). A ampliação da zona aromática do espectro de ^1H , em CD_3OD , encontra-se no **Anexo 6.3 – Figura 6.26**.

Tabela 2.6: Dados de RMN de ^1H , em CD_3OD , referentes à zona aromática da 3'-MMC (7) e da 4'-MMC (8).

Composto	2'	4'	5'	6'	7'
	δ ^1H ; m; J (Hz)				
3'-MMC (7)	7,91; 1H; sl	7,59; 1H; dl; 7,5	7,50; 1H; t; 7,5	7,87; 1H; dl; 8,2	2,47; 3H; s
Composto	2'/6'	3'/5'	7'		
	δ ^1H ; m; J (Hz)				
4'-MMC (8)	7,98; 2H; d; 7,2	7,44; 2H; d; 7,2	2,47; 3H; s		

Na **Tabela 2.7** constam os valores dos desvios químicos referentes aos espectros de ^{13}C das catinonas (7) e (8), sendo que a atribuição entre os carbonos e os prótons a estes ligados teve por base a interpretação dos espectros de HSQC. No caso dos carbonos quaternários, C-1' e C-4', para a 4'-MMC e, C-1' e C-3', para a 3'-MMC, a distinção entre estes derivou de correlações de HMBC, como referido anteriormente.

Tabela 2.7: Dados de RMN de ^{13}C , em CD_3OD , referentes à zona aromática da 3'-MMC (7) e da 4'-MMC (8).

Composto	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'
	δ ^{13}C						
3'-MMC (7)	132,84	128,91	139,26	135,36	128,87	125,83	19,88
Composto	1'	2'/6'	4'	3'/5'	7'		
	δ ^{13}C						
4'-MMC (8)	131,65	130,15	147,63	130,98	21,77		

Por fim, os valores dos desvios químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C referentes ao grupo metilo do grupo amino das catinonas **(7)** e **(8)** constam na **Tabela 2.8**. Estas atribuições basearam-se nas correlações de HMBC (**Figura 2.10**), entre o C-1'' e o próton H-2, bem como na multiplicidade dos sinais (singletos) e na integração (3 prótons), para ambas as catinonas.

Tabela 2.8: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CD_3OD , referentes ao grupo amino da 3'-MMC **(7)** e da 4'-MMC **(8)**.

Composto	1''	
	$\delta\ ^1\text{H}$; m; <i>J</i> (Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$
3'-MMC (7)	2,80; 3H; s	30,30
4'-MMC (8)	2,80; 3H; s	31,71

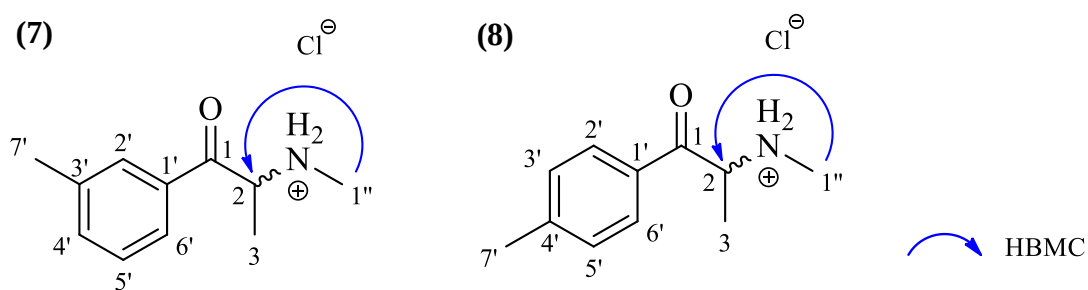


Figura 2.10: Correlações de HMBC referentes ao grupo amino da 3'-MMC **(7)** e da 4'-MMC **(8)**.

2.2. Síntese de metabolitos reduzidos

O esquema geral da síntese dos metabolitos reduzidos **(11)** e **(12)** e o mecanismo sintético associado encontram-se na **Figura 2.11** e na **Figura 2.12**, respectivamente. Os metabolitos referidos formam-se através de uma reação de redução do grupo carbonilo da catinona **(5)** ou **(6)**, com recurso a NaBH_4 , obtendo-se o respetivo álcool. O borohidreto (nucleófilo) ataca o carbonilo da catinona (eletrófilo), o que culmina com a quebra da ligação π e, conseqüentemente, com uma carga negativa no oxigénio, que é, posteriormente, anulada através da transferência de um protão do meio.^[81] O processo sintético seguido foi descrito por *Pozo et al.*, através do qual se obtêm, maioritariamente, os metabolitos reduzidos *syn* **(9)** ou **(10)**, sendo estes precipitados com ácido clorídrico etéreo, formando-se, respetivamente, os metabolitos reduzidos *syn* **(11)** ou **(12)**, na forma de cloridrato.

Os metabolitos reduzidos, na forma de sal, apresentaram-se na forma de pó branco, tendo-se verificado rendimentos de 15% e de 17% para os metabolitos **(11)** e **(12)**, respetivamente.

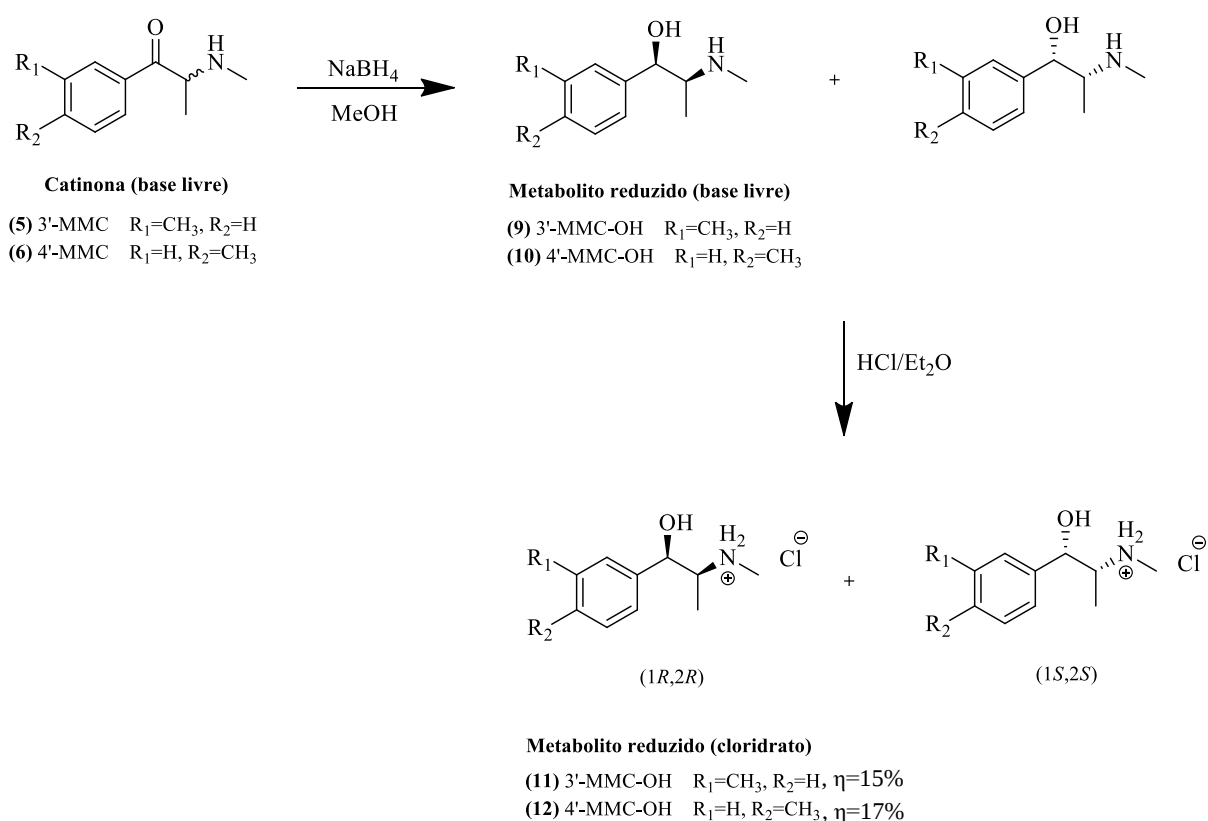


Figura 2.11: Esquema reacional geral da síntese de metabolitos reduzidos na forma de cloridrato.

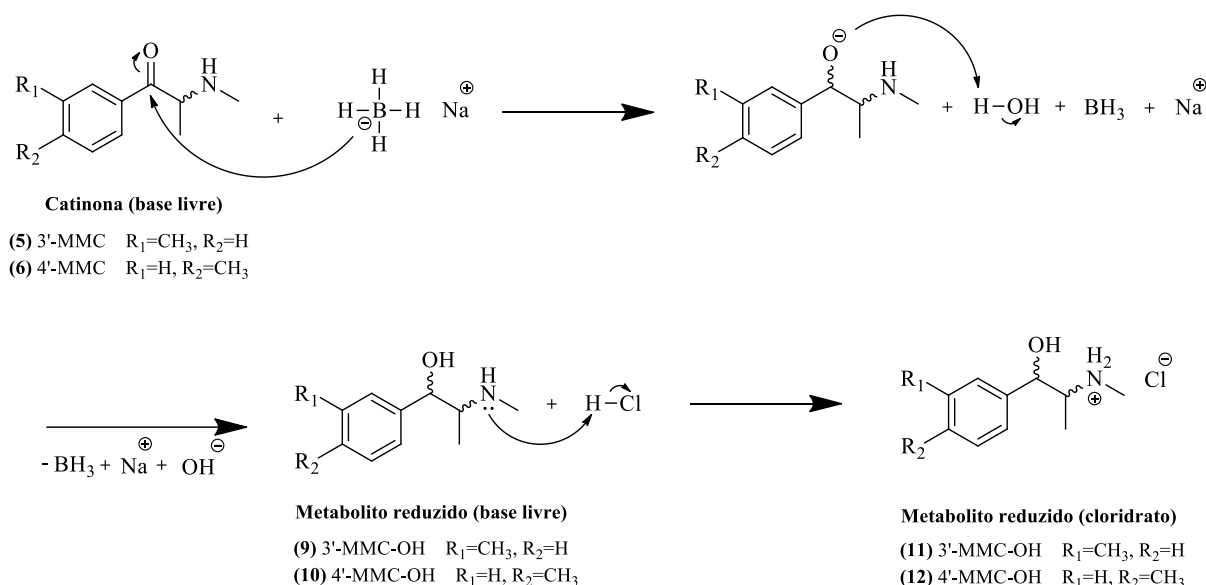


Figura 2.12: Mecanismo sintético dos metabolitos reduzidos na forma de base livre e de cloridrato.

De forma a verificar-se a formação dos metabolitos reduzidos na forma de cloridrato **(11)** e **(12)**, procedeu-se à comparação do espectro de RMN de 1H de cada metabolito reduzido com o da respetiva catinona **(7)** ou **(8)**, em CD_3OD , tais que se encontram na **Figura 2.13** e na **Figura 2.14**, respetivamente. Assim, observou-se um novo sinal nos espectros dos metabolitos reduzidos, sendo este referente ao protão H-1, que surge nestes metabolitos, dada a redução do grupo carbonilo da respetiva catinona. Para além do referido, constataram-se diminuições significativas dos desvios químicos do protão H-2 de ambas as catinonas para os respetivos metabolitos reduzidos.

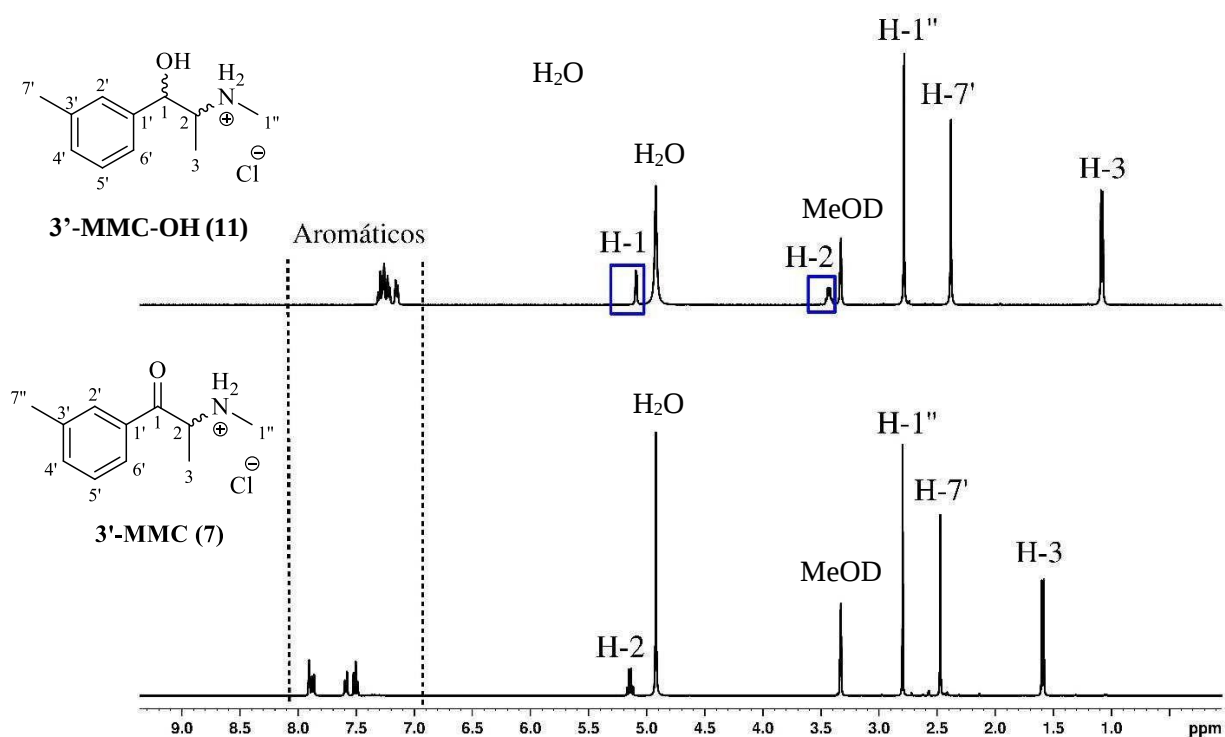


Figura 2.13: Espectros de RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD) do metabolito 3'-MMC-OH **(11)** (cima) e da 3'-MMC **(7)** (baixo).

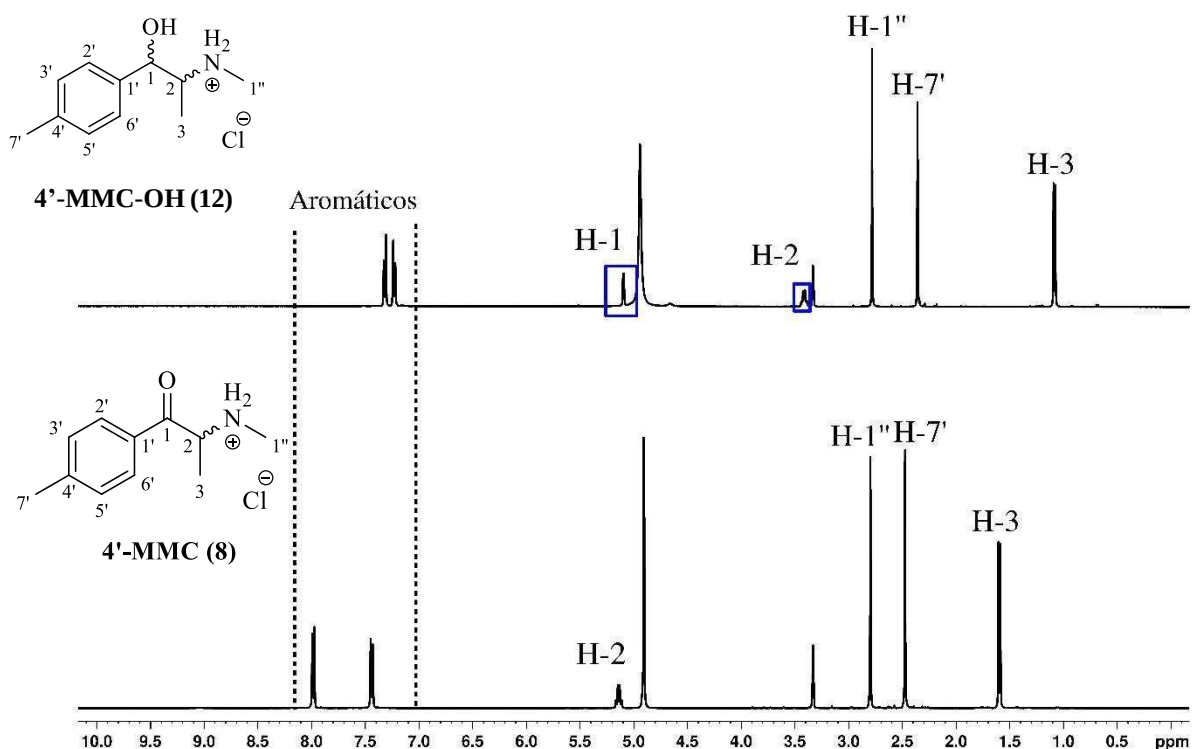


Figura 2.14: Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do metabolito 4'-MMC-OH (12) (cima) e da 4'-MMC (8) (baixo).

A atribuição dos sinais de ^1H e de ^{13}C , em CD_3OD , dos metabolitos reduzidos (11) e (12) foi possível através da análise dos seus espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC (**Anexo 6.4**), e encontra-se dividida nas diferentes porções constituintes de uma catinona sintética: cadeia acíclica, zona aromática e grupo amino.

Assim, os valores dos desvios químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C , referentes à cadeia acíclica das catinonas protonadas (7) e (8), e respetivos metabolitos reduzidos (11) e (12), constam na **Tabela 2.9**.

Tabela 2.9: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CD_3OD , referentes à cadeia acíclica das catinonas 3'-MMC (7) e 4'-MMC (8) e respetivos metabolitos reduzidos, 3'-MMC-OH (11) e 4'-MMC-OH (12).

Composto	1		2		3	
	$\delta\ ^1\text{H}$; m; J (Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$	$\delta\ ^1\text{H}$; m; J (Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$	$\delta\ ^1\text{H}$; m; J (Hz)	$\delta\ ^{13}\text{C}$
3'-MMC (7)	-	195,82	5,14; 1H; q; 6,8	59,25	1,59; 3H; d; 6,8	14,83
3'-MMC-OH (11)	5,10; 1H; d; 3,0	71,83	3,43; 1H; qd; 6,7 e 3,1	61,52	1,08; 3H; d; 6,7	10,14
4'-MMC (8)	-	196,57	5,14; 1H; q; 6,3	60,54	1,60; 3H; d; 6,3	16,33
4'-MMC-OH (12)	5,09; 1H; d; 2,8	71,76	3,41; 1H; qd; 6,7 e 3,0 Hz	61,51	1,08; 3H; d; 6,3	10,06

Tal como anteriormente referido, verifica-se, nesta tabela, o valor do desvio químico do novo sinal que surge nos espectros dos metabolitos reduzidos **(11)** e **(12)** e remete para o protão H-1. Estes sinais apresentam os valores de 5,10 ppm, para o metabolito **(11)**, e de 5,09, para o metabolito **(12)**, e surgem na forma de duplete, integrando, cada um, para um protão. Para além do anterior, verificou-se, dada a perda da dupla ligação C=O, uma diminuição do desvio químico (blindagem) referente ao protão H-2 de ambos os metabolitos reduzidos, passando de um desvio químico de 5,14 ppm, na catinona **(7)**, para 3,43 ppm, no metabolito reduzido **(11)**, ocorrendo o semelhante no metabolito reduzido **(12)**. Verifica-se, ainda, uma alteração na multiplicidade do sinal do protão H-2, uma vez que, nas catinonas, aparece como um quarteto, e nos respetivos metabolitos reduzidos como um quarteto duplo. O desdobramento deste quarteto como uma constante de acoplamento de 3 Hz, correspondente ao acoplamento dos protões H-1/H-2, corrobora a obtenção dos diastereoisómeros *syn*. Os sinais referentes aos protões H-3 dos metabolitos sofrem, também, uma diminuição dos valores dos desvios químicos, porém, menos notória quando comparada com a diminuição assistida nos protões H-2. Relativamente às correlações de COSY para os metabolitos reduzidos (**Figura 2.15**), verifica-se, agora, para além da correlação entre os protões H-2 e H-3, a correlação do protão H-2 com o protão H-1.

Tendo, ainda, por base a **Tabela 2.9**, verificou-se uma enorme diminuição dos valores dos desvios químicos de ^{13}C do C-1 dos metabolitos reduzidos, quando comparados com o correspondente na catinona, passando de um desvio químico de 195,82 ppm, na catinona **(7)**, para 71,83 ppm, no metabolito reduzido **(11)**, ocorrendo o semelhante no metabolito reduzido **(12)**. O anterior justifica-se, novamente, pelo aumento do efeito de blindagem, dada a perda de uma ligação ao átomo de oxigénio, este que é eletronegativo.

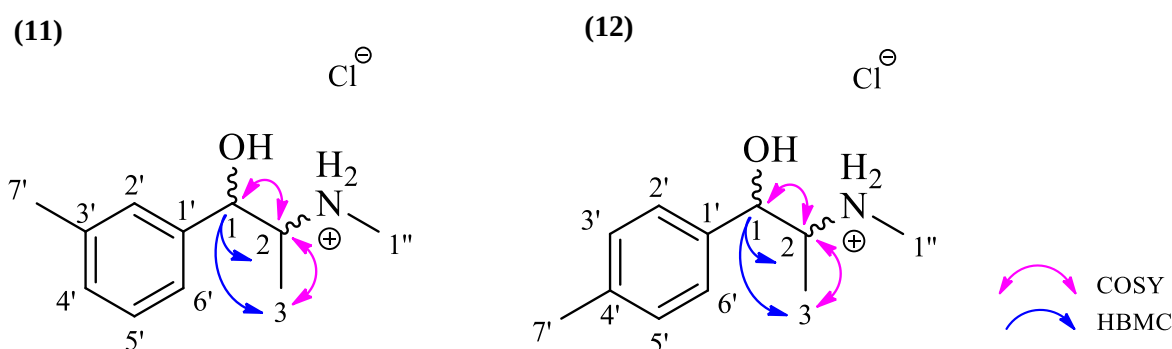


Figura 2.15: Correlações de COSY e de HMBC referentes à cadeia acíclica dos metabolitos 3'-MMC-OH **(11)** e 4'-MMC-OH **(12)**.

Relativamente à zona aromática do metabolito reduzido 4'-MMC-OH **(12)** os protões H-2'/6' são rapidamente atribuídos através da correlação de HMBC existente entre o C-2'/6' e o protão H-1 (**Figura 2.16**). Por sua vez, o sinal de ^1H referente aos protões H-3'/5' é conseguido, por exemplo, através da correlação de COSY entres estes e os protões H-2'/6'. Em seguida, é possível distinguir os dois carbonos quaternários do anel aromático, C-1' e C-4', através das correlações de HMBC: C-4' com H-2'/6'; C-4' com H-7'; e, C-1' com H-3'/5'.

Relativamente à zona aromática no espetro de protão do metabolito reduzido 3'-MMC-OH **(11)**, cuja ampliação se encontra no **ANEXO 6.4 – Figura 6.40**, o protão H-2' atribuiu-se rapidamente através da correlação de HMBC existente entre o C-2' e o protão H-1. A distinção entre os protões H-4' e H-6' é efetuada pela existência de uma correlação no HMBC entre o sinal do grupo metilo H-7', a 2,38 ppm, e o sinal de carbono a 129,62 ppm correspondente por HSQC ao duplete a 7,15 ppm, o que significa que este sinal será do protão H-4 e, conseqüentemente, o duplete a 7,22 atribui-se ao protão H-6' e o único triplete observado ao protão H-5'.

Em seguida, distinguiram-se os dois carbonos quaternários do anel aromático, C-1' e C-3', através das correlações de HMBC: C-3' com H-7' e C-1' com H-1. As correlações de COSY e HMBC observadas na zona aromática encontra-se esquematizadas na **Figura 2.16** e as respectivas atribuições dos desvios químicos na **Tabela 2.10** e na **Tabela 2.11**.

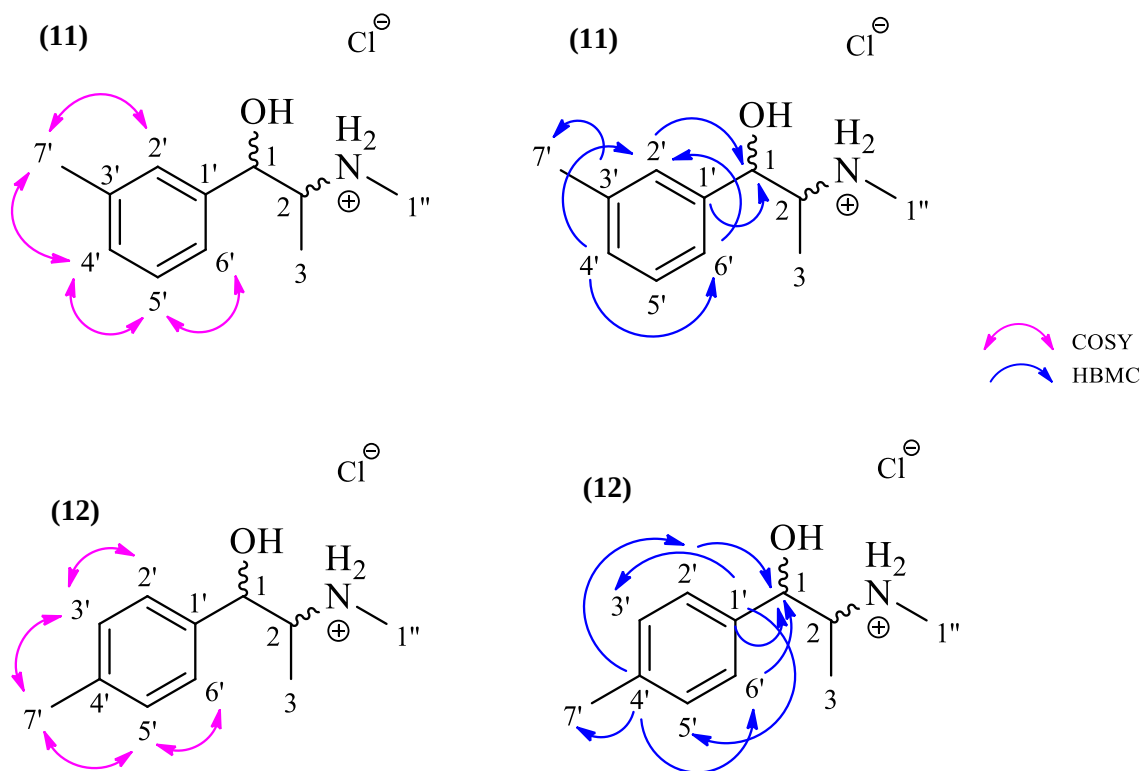


Figura 2.16: Correlações de COSY e de HMBC referentes à zona aromática dos metabolitos 3'-MMC-OH (11) e 4'-MMC-OH (12).

Tabela 2.10: Dados de RMN de ¹H, em CD₃OD, referentes à zona aromática das catinonas 3'-MMC (7) e 4'-MMC (8) e respectivos metabolitos reduzidos, 3'-MMC-OH (11) e 4'-MMC-OH (12).

Composto	2'	4'	5'	6'	7'
	δ ¹ H; m; J (Hz)				
3'-MMC (7)	7,91; 1H; sl	7,59; 1H; dl; 7,5	7,50; 1H; t; 7,5	7,87; 1H; dl; 8,2	2,47; 3H; s
3'-MMC-OH (11)	7,26; 1H; sl	7,15; 1H; dl; 7,6	7,29; 1H; t; 7,5	7,22; 1H; dl; 8,1	2,38; 3H; s
Composto	2'/6'	3'/5'	7'		
	δ ¹ H; m; J (Hz)				
4'-MMC (8)	7,98; 2H; d; 7,2	7,44; 2H; d; 7,2	2,47; 3H; s		
4'-MMC-OH (12)	7,32; 2H; d; 7,2	7,23; 2H; d; 7,3	2,36; 3H; s		

No que respeita à zona aromática do metabolito reduzido **(12)** e, dado que este se trata de um composto que apresenta um grupo metilo na posição *para* do anel aromático, verifica-se um eixo de simetria e, portanto, observam-se dois sinais que integram, cada um, para dois prótons: um sinal referente aos prótons H-2'/6', com um desvio químico de 7,32 ppm; e um outro, associado aos prótons H-3'/5', que surge a 7,23 ppm (**Tabela 2.10**).

Na **Tabela 2.11** constam os valores dos desvios químicos referentes aos espectros de ^{13}C da zona aromática dos metabolitos reduzidos **(11)** e **(12)**. A atribuição entre os carbonos e os prótons a estes ligados teve por base a interpretação dos espectros de HSQC. No caso dos carbonos quaternários, C-1' e C-4', para a 4'-MMC e, C-1' e C-3', para a 3'-MMC, a distinção entre estes derivou de correlações de HMBC, como referido anteriormente.

Tabela 2.11: Dados de RMN de ^{13}C , em CD_3OD , referentes à zona aromática das catinonas 3'-MMC **(7)** e 4'-MMC **(8)** e respetivos metabolitos reduzidos, 3'-MMC-OH **(11)** e 4'-MMC-OH **(12)**.

Composto	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'
	$\delta^{13}\text{C}$						
3'-MMC (7)	132,84	128,91	139,26	135,36	128,87	125,83	19,88
3'-MMC-OH (11)	141,31	127,54	139,39	129,62	129,48	124,09	21,50
Composto	1'	2'/6'	4'	3'/5'	7'		
	$\delta^{13}\text{C}$						
4'-MMC (8)	131,65	130,15	147,63	130,98	21,77		
4'-MMC-OH (12)	138,30	126,94	138,80	130,14	21,13		

Por fim, os valores dos desvios químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C referentes ao grupo metilo do grupo amino dos metabolitos reduzidos **(11)** e **(12)** constam na **Tabela 2.12**. Estas atribuições basearam-se nas correlações de HMBC (**Figura 2.17**), entre o C-1'' e o próton H-2, bem como na multiplicidade dos sinais (singletos) e na integração (3 prótons), para ambos os metabolitos reduzidos.

Tabela 2.12: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CD_3OD , referentes à zona aromática das catinonas 3'-MMC **(7)** e 4'-MMC **(8)** e respetivos metabolitos reduzidos, 3'-MMC-OH **(11)** e 4'-MMC-OH **(12)**.

Composto	1''	
	$\delta^1\text{H}$; m; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
3'-MMC (7)	2,80; 3H; s	30,30
3'-MMC-OH (11)	2,79; 3H; s	31,52
4'-MMC (8)	2,80; 3H; s	31,71
4'-MMC-OH (12)	2,78; 3H; s	31,52

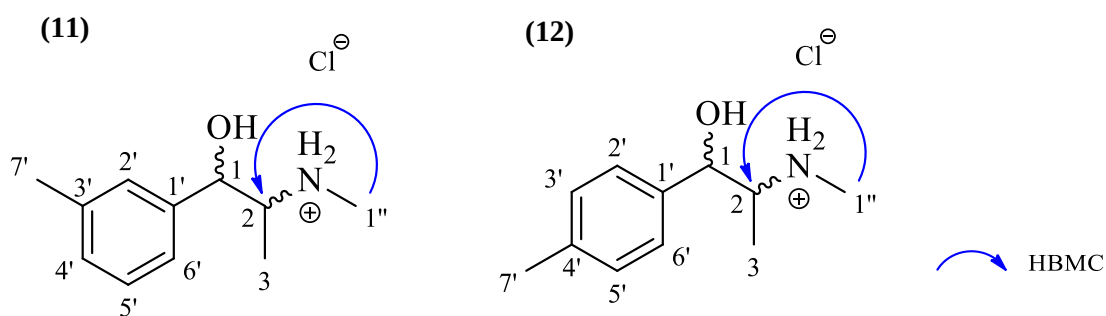


Figura 2.17: Correlações de HMBC referentes ao grupo amino dos metabolitos 3'-MMC-OH (11) e 4'-MMC-OH (12).

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C dos compostos encontram-se compilados na **Tabela 2.13**.

Tabela 2.13: Compilação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CD_3OD , das catinonas (7) e (8) e dos metabolitos reduzidos (11) e (12).

3'-MMC (7)			3'-MMC-OH (11)		
Posição	$\delta^1\text{H}$; m; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	Posição	$\delta^1\text{H}$; m; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	195,82	1	5,10; 1H; d; 3,0	71,83
2	5,14; 1H; q; 6,8	59,25	2	3,43; 1H; qd; 6,7 e 3,1	61,52
3	1,59; 3H; d; 6,8	14,83	3	1,08; 3H; d; 6,7	10,14
1'	-	132,84	1'	-	141,31
2'	7,91; 1H; sl	128,91	2	7,26; 1H; sl	127,54
3'	-	139,26	3	-	139,39
4'	7,59; 1H; dl; 7,5	135,36	4'	7,15; 1H; dl; 7,6	129,62
5'	7,50; 1H; t; 7,5	128,87	5'	7,29; 1H; t; 7,5	129,48
6'	7,87; 1H; dl; 8,2	125,83	6'	7,22; 1H; dl; 8,1	124,09
7'	2,47; 3H; s	19,88	7'	2,38; 3H; s	21,50
1''	2,80; 3H; s	30,30	1''	2,79; 3H; s	31,52
4'-MMC (8)			4'-MMC-OH (12)		
Posição	$\delta^1\text{H}$; m; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	Posição	$\delta^1\text{H}$; m; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	196,57	1	5,09; 1H; d; 2,8	71,76
2	5,14; 1H; q; 6,3	60,54	2	3,41; 1H; qd; 6,7 e 3,0	61,51
3	1,60; 3H; d; 6,3	16,33	3	1,08; 3H; d; 6,3	10,06
1'	-	131,65	1'	-	138,30
2'/6'	7,98; 2H; d; 7,2	130,15	2'/6'	7,32; 2H; d; 7,2	126,94
3'/5'	7,44; 2H; d; 7,2	130,98	3'/5'	7,23; 2H; d; 7,3	130,14
4'	-	147,63	4'	-	138,80
7'	2,47; 3H; s	21,77	7'	2,36; 3H; s	21,13
1''	2,80; 3H; s	31,71	1''	2,78; 3H; s	31,52

Por fim, refere-se, ainda que, já se encontram reportados, na literatura, os dados provenientes dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , em CD_3OD , da catinona **(8)** e do respetivo metabolito reduzido **(12)**, sendo os resultados obtidos no presente trabalho semelhantes com os mesmos.^[45]

2.3. Identificação da amostra do LPC-PJ

No que respeita à amostra fornecida pelo LPC-PJ, tal caracterizou-se, em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, através das experiências RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC, de forma a obter a elucidação estrutural do composto.

Na **Figura 2.18** consta o seu espectro de ^1H , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, e a atribuição dos prótons, tal que teve por base os espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC (**Anexo 6.5**), e encontra-se dividida nas diferentes porções constituintes de uma catinona sintética: cadeia acíclica, zona aromática e grupo amino.

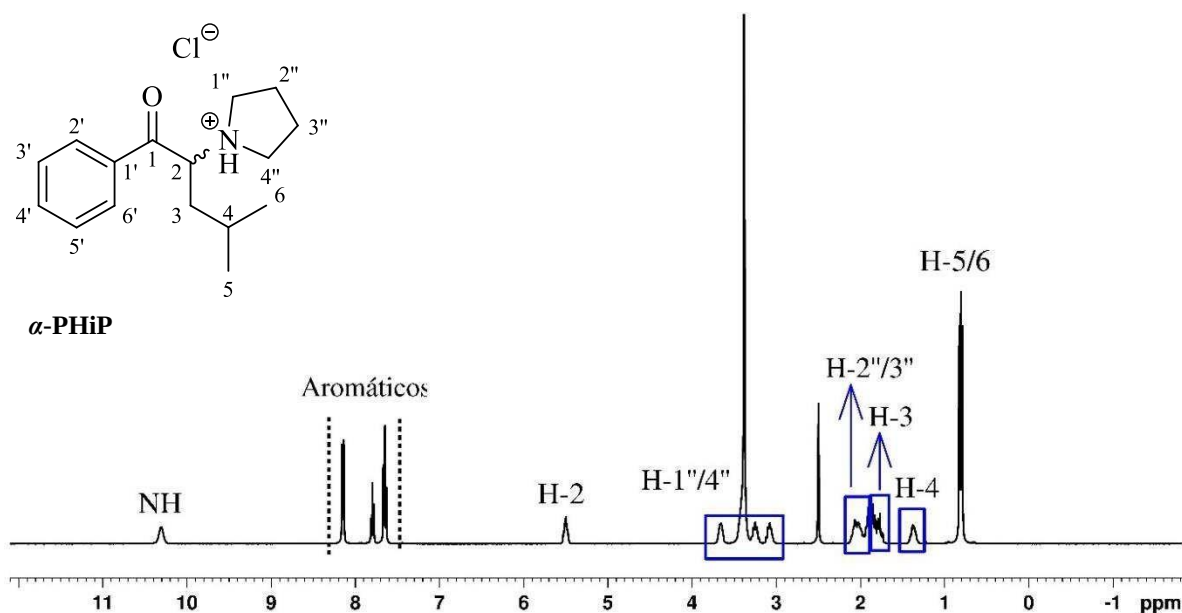


Figura 2.18: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) da amostra fornecida pelo LPC-PJ (α -PHiP).

Assim, os valores dos desvios químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C , referentes à cadeia acíclica da amostra fornecida pelo LPC-PJ constam na **Tabela 2.14**. Nesta observa-se que, o sinal de ^{13}C com maior desvio químico, 198,45 ppm, se assemelha ao valor verificado para o carbono do grupo carbonilo nas catinonas sintetizadas, tendo sido, assim, realizada a sua atribuição ao C-1.

Tabela 2.14: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, referentes à cadeia acíclica da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Posição	$\delta \text{ } ^1\text{H}$; m; J (Hz)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$
1	-	198,45
2	5,50; 1H; m	65,62
3	2,04; 2H; m	39,85
4	1,37; 1H; m	24,63
5	0,81; 3H ^a ; d; 6,4	23,81
6	0,80; 3H ^a ; d; 6,4	21,96

a: sinais sobrepostos no espectro de RMN de ^1H

Ainda relativamente à cadeia acíclica desta amostra, verificam-se, no espectro de RMN de ^1H , dois multipletos que integram, cada um, para um protão, não sendo possível distingui-los, tendo por base a multiplicidade ou integração desses sinais. Desta forma, a atribuição do protão H-2 deveu-se ao facto deste protão ter uma única correlação no COSY (**Figura 2.19**), sendo esta com um sinal a 2,04 ppm e que integra para dois protões, sendo tal atribuído aos dois protões H-3 da cadeia acíclica. Já o protão H-4' apresenta três correlações de COSY, sendo as mesmas: H-4 com o H-3 anteriormente atribuído; e, ainda, H-4 com dois dupletos, a 0,80 e 0,81 ppm, que integram, cada um, para três e que, portanto, se referem aos protões dos dois grupos metilos da cadeia acíclica. As informações retiradas do espectro de HMBC corroboram as conclusões referidas.

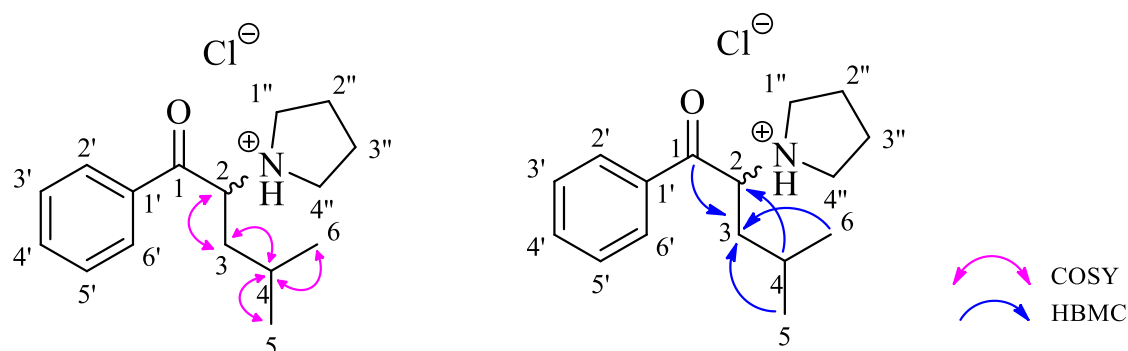


Figura 2.19: Correlações de COSY e de HMBC referentes à cadeia acíclica da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Relativamente à zona aromática desta amostra (**Figura 2.20**), os protões H-2'/6' são rapidamente atribuídos através da correlação de HMBC existente entre estes e o C-1. Por sua vez, o sinal de ^1H referente aos protões H-3'/5' é conseguido, por exemplo, através da correlação de COSY entres estes e os protões H-2'/6'.

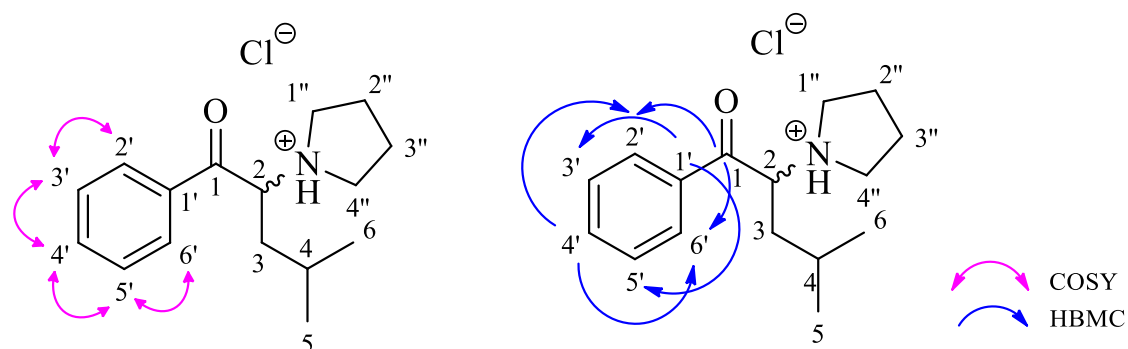


Figura 2.20: Correlações de COSY e de HMBC referentes à zona aromática da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Refere-se que, uma vez que o anel aromático não se encontra substituído, observam-se três sinais distintos: um duplete a 8,15 ppm que integra para dois prótons e corresponde aos prótons H-2'/6'; um tripleto a 7,80 ppm que integra para um próton e se associa ao próton H-4; e, um outro tripleto a 7,65 ppm que integra para dois prótons e se refere aos prótons H-3'/5' (**Tabela 2.15**). A ampliação da zona aromática deste espectro de ^1H encontra-se no **Anexo 6.5 – Figura 6.52**.

Tabela 2.15: Dados de RMN de ^1H , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, referentes à zona aromática da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Posição	2'/6'	4'	3'/5'
	δ ^1H ; m; J (Hz)		
Sinais	8,15; 2H; d; 7,3	7,80; 1H; t; 7,3	7,65; 2H; t; 7,2

Na **Tabela 2.16** constam os valores dos desvios químicos referentes ao espectro de ^{13}C da amostra em análise, sendo que a atribuição entre os carbonos e os prótons a estes ligados teve por base a interpretação dos espectros de HSQC. Existindo, apenas, um carbono quaternário no anel aromático, a atribuição do C-1' teve por base o valor de desvio químico referente a um sinal na base negativa deste espectro sem qualquer correlação no HSQC, e excluindo o sinal já atribuído ao C-1.

Tabela 2.16: Dados de RMN de ^{13}C , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, referentes à zona aromática da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Posição	1'	2'/6'	3'/5'	4'
	δ ^{13}C			
Valor de desvio químico (ppm)	135,52	129,41	129,84	135,73

Por fim, os valores dos desvios químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C referentes aos prótons do grupo amino da amostra constam na **Tabela 2.17**.

Tabela 2.17: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, referentes ao grupo amino da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Posição	1''/4''		2''/3''		NH
	δ ^1H ; m; J (Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H ; m; J (Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H ; m; J (Hz)
Sinais	3,65/3,26; 2H; m 3,38 ^a /3,08; 2H; m	52,72 53,86	1,82; 4H ^b ; m;	23,23	10,30; 1H; s

a: sinal sobreposto ao sinal da água do $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

b: sinais sobrepostos no espectro de RMN ^1H

Tendo em conta os dados obtidos verificou-se que a cadeia alquílica do grupo amino consistia num grupo pirrolidilo e a distinção entre os protões H-1''/4'' e os protões H-2''/3'' baseou-se na correlação entre os protões H-1''/4'' e o protão de NH (**Figura 2.21**). Refere-se que não é possível distinguir entre os protões H-1'' e os protões H-4'', nem entre os protões H-2'' e os protões H-3'', uma vez que as correlações de COSY são as mesmas, para cada um dos pares referidos. No entanto, é possível verificar dois multipletos distintos, um para os dois protões H-1'' e outro para os dois protões H-4'', sendo que o sinal de qualquer um desses protões, a cerca de 3,38 ppm, se encontra sobreposto com o sinal da água. Já relativamente aos dois protões H-2'' e aos dois protões H-3'', os sinais a estes referentes encontram-se sobrepostos, integrando para quatro protões. Para além disso, o sinal anteriormente referido apresenta-se no mesmo sinal associado aos dois protões H-3 da cadeia acíclica, sendo, no entanto, perceptível, através do HSQC, a divisão entre os mesmos.

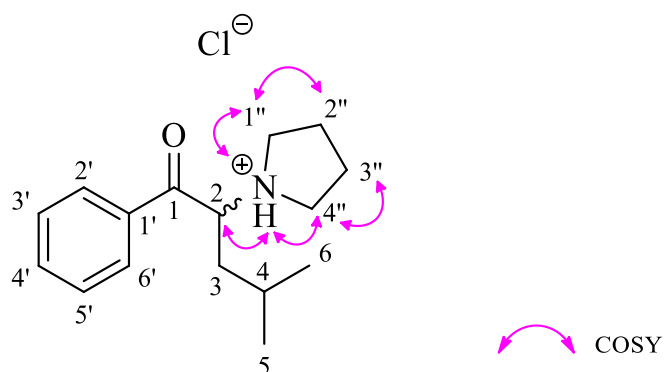


Figura 2.21: Correlações de COSY referentes ao grupo amino da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Assim, a amostra proveniente do LPC-PJ consistia numa catinona sintética denominada de α -PHiP, encontrando-se a mesma na forma de sal, dadas as correlações de COSY do protão de NH com o protão H-2, bem como com os protões H-1''/4''.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C deste composto encontram-se compilados na **Tabela 2.18**.

Tabela 2.18: Compilação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, da amostra fornecida pelo LPC-PJ.

Posição	δ ^1H ; m; J (Hz)	δ ^{13}C
1	-	198,45
2	5,50; 1H; m	65,62
3	2,04; 2H; m	39,85
4	1,37; 1H; m	24,63
5	0,81; 3H; d; 6,4	23,81
6	0,80; 3H; d; 6,4	21,96
1'	-	135,52
2'/6'	8,15; 2H; d; 7,3	129,41
3'/5'	7,65; 2H; t; 7,2	129,84
4'	7,80; 1H; t; 7,3	135,73
1''/4''	3,65/3,26; 2H; m	52,72
	3,38/3,08; 2H; m	53,86
2''/3''	1,82; 4H; m	23,23
NH	10,30; 1H; s	-

Por fim, refere-se, ainda que, já se encontram reportados, na literatura, os dados provenientes dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, do α -PHiP, sendo os resultados obtidos no presente trabalho semelhantes com os mesmos, o que corrobora a identificação deste composto no produto apreendido em Portugal.^[83]

2.4. Identificação de catinonas sintéticas *in vitro*

Procedeu-se às incubações isoladas das catinonas sintetizadas 3'-MMC (**7**) e 4'-MMC (**8**), na fração S9 de fígado de rato, às quais se adicionou NADPH (cofator de reações de Fase I). Após concluídos os diversos tempos de incubação estabelecidos (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180, e 360 min), adicionou-se reserpina (padrão interno) às alíquotas, tendo-se seguido a injeção destas no LC-ESI(+)-HRMS.

Refere-se que, das incubações, obtiveram-se duas informações distintas, relativas ao estudo dos metabolismos das catinonas referidas, nomeadamente o tempo de meia vida das mesmas e, ainda, os respetivos metabolitos de Fase I.

A interpretação dos resultados derivados das incubações das catinonas em estudo realizou-se a partir do *software Compass DataAnalysis Version 4.4*, no qual se adicionaram os valores de m/z associados às catinonas 3'-MMC (**7**) e 4'-MMC (**8**), e, em seguida, se pesquisaram, manualmente, esses mesmos valores de m/z , ao longo do respetivo cromatograma *full scan*. Caso se verificasse, no espectro *full scan*, um valor de m/z compatível com a molécula protonada associado a um erro inferior a 5 ppm, seguia-se a observação do espectro MS/MS referente a esse valor de m/z . No espectro MS/MS verificou-se se os iões fragmento aí presentes são compatíveis com a fragmentação esperada para as catinonas, sendo o critério de aceitação um erro inferior a 10 ppm.

2.4.1. Identificação da catinona 4'-MMC

No que respeita à catinona 4'-MMC (**8**), esta foi identificada no tempo de incubação 0 min (que corresponde ao padrão deste composto), na sua forma protonada, a 6,2 min e com valor de m/z de 178,1226 (0,0 ppm), no espectro *full scan*. Relativamente ao respetivo espectro MS/MS (**Figura 6.57 – Anexo 6.6**), identificaram-se sete iões fragmento, estes que podem ser atribuídos aos fragmentos da **Figura 2.22**, compatíveis com o padrão de fragmentação já reportado para a 4'-MMC. ^{[43],[44]} Esses mesmos iões fragmento foram pesquisados nos restantes tempos de incubação, tendo-se verificado a sua presença nos mesmos logo, a presença da catinona.

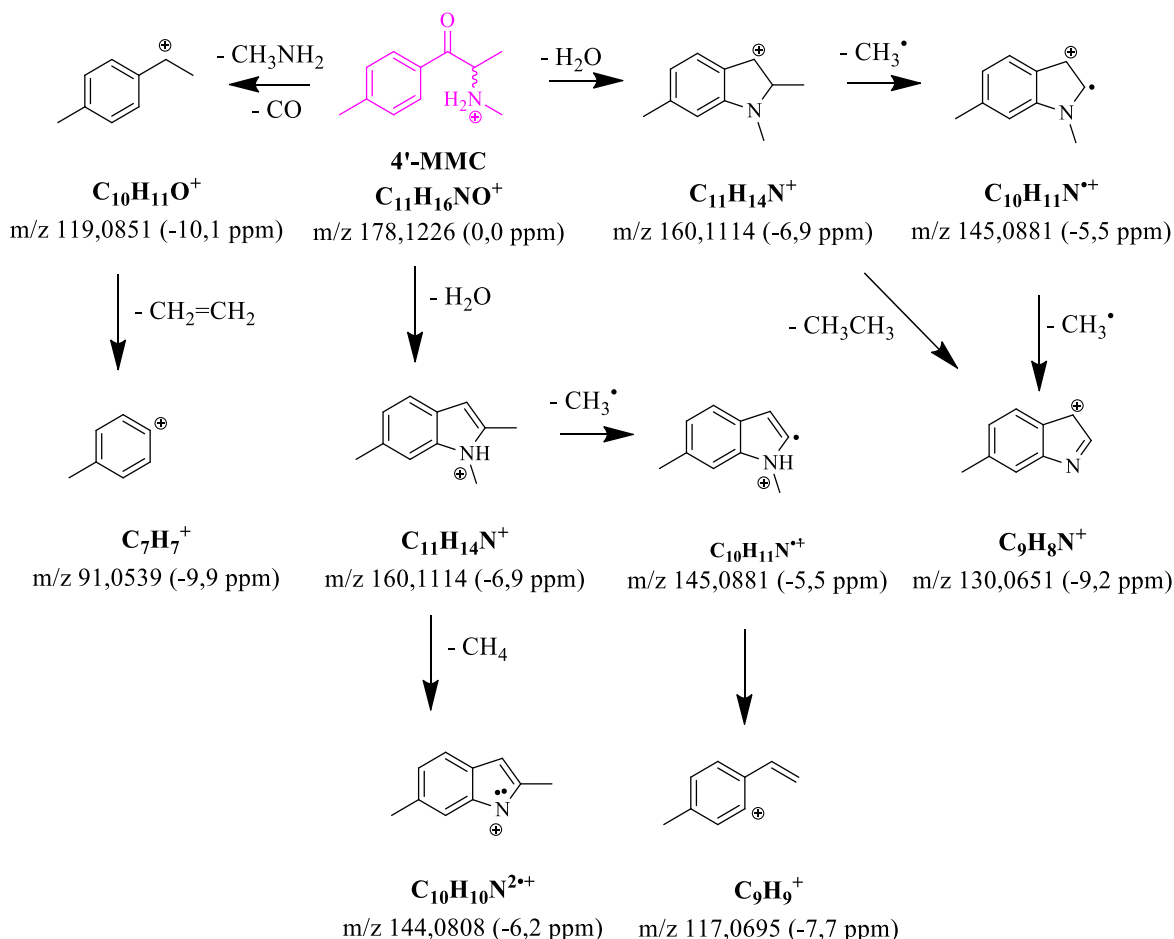


Figura 2.22: Proposta de esquema de fragmentação para a catinona 4'-MMC, tendo em conta os iões fragmento identificados no espectro de MS/MS.

Os dados anteriormente referidos encontram-se reunidos na **Tabela 2.19**.

Tabela 2.19: Dados referentes à identificação, *in vitro*, da catinona 4'-MMC (**8**) por LC-ESI(+)-HRMS.

Nome do metabolito	m/z obs [M+H] ⁺ [± erro (ppm)]	Iões fragmento m/z obs [M+H] ⁺ [± erro (ppm)]	t _R (min)
4'-MMC	178,1226 (0,0)	160,1114 (-6,9)	6,2
		145,0881 (-5,5)	
		144,0808 (-6,2)	
		130,0651 (-9,2)	
		119,0851 (-10,1)	
		117,0695 (-7,7)	
		91,0539 (-9,9)	

2.4.2. Identificação da catinona 3'-MMC

No que respeita à catinona 3'-MMC (**8**), esta foi identificada no tempo de incubação 0 min (que corresponde ao padrão deste composto), na sua forma protonada, a 6,2 min, e com valor de m/z de 178,1226 (0,0 ppm), no espectro *full scan*. Relativamente ao respetivo espectro MS/MS (**Figura 6.60 – Anexo 6.7**), identificaram-se sete iões fragmento que podem ser atribuídos aos fragmentos da **Figura 2.23**, sendo estes os correspondentes dos iões obtidos para a 4'-MMC. Esses mesmos iões fragmento foram pesquisados nos restantes tempos de incubação, tendo-se verificado a sua presença nos mesmos logo, a presença da catinona.

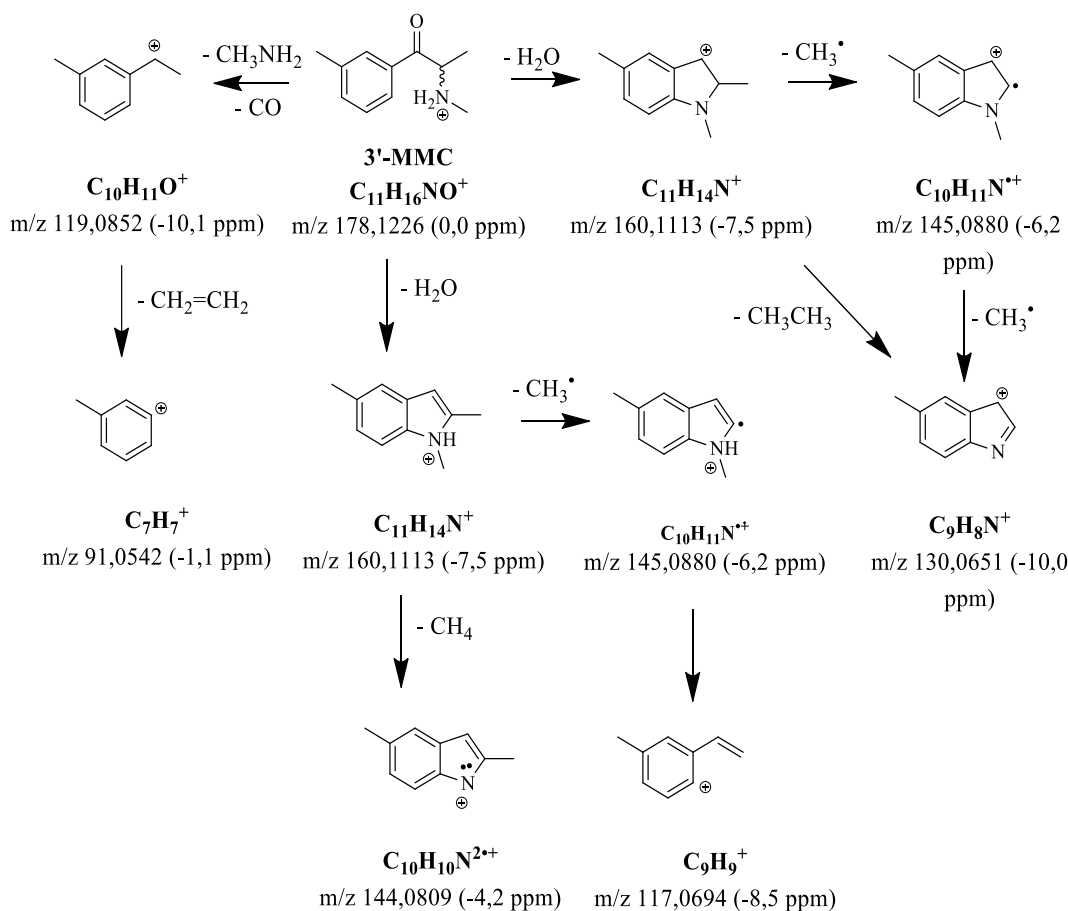


Figura 2.23: Proposta de esquema de fragmentação para a catinona 3'-MMC, tendo em conta os iões fragmento identificados no espectro de MS/MS.

Os dados anteriormente referidos encontram-se reunidos na **Tabela 2.20**.

Tabela 2.20: Dados referentes à identificação, *in vitro*, da catinona 3'-MMC (7) por LC-ESI(+)-HRMS.

Nome do metabolito	m/z obs [M+H] ⁺ [± erro (ppm)]	Iões fragmento m/z obs [M+H] ⁺ [± erro (ppm)]	t _R (min)
3'-MMC	178,1226 (0,0)	160,1113 (-7,5)	6,2
		145,0880 (-6,2)	
		144,0809 (-4,2)	
		130,0651 (-10,0)	
		119,0852 (-10,1)	
		117,0694 (-8,5)	
		91,0542 (-1,1)	

Uma vez que se usou padrão interno, reserpina, aquando da injeção das incubações das catinonas no LC-ESI(+)-HRMS, tornou-se possível verificar a variação das áreas correspondentes às catinonas sintetizadas 3'-MMC (7) e 4'-MMC (8), ao longo do tempo das respetivas incubações, sendo tal conseguido através da razão destas com as áreas associadas à reserpina. Assim, procedeu-se à determinação do tempo de meia vida de ambas as catinonas, apresentando-se tal no tópico seguinte.

2.4.3. Determinação dos tempos de meia vida de catinonas sintéticas

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) consiste num importante parâmetro a conhecer, pois refere-se ao tempo necessário para que a concentração inicial, de um qualquer xenobiótico, no sangue, diminua para metade da concentração inicial (tempo 0). Desta forma, a partir do tempo de meia vida é possível perceber se determinado xenobiótico apresenta uma maior ou menor metabolização e, consequentemente, quais os biomarcadores (catinona mãe ou metabolitos derivados), a ser procurados em amostras biológicas, que melhor detetam o consumo, neste caso, de determinada catinona sintética.

Para o efeito, procedeu-se, como anteriormente referido, à incubação, na fração S9 de fígado de rato, das catinonas sintetizadas 3'-MMC (7) e 4'-MMC (8), o que permitiu observar a variação das áreas dos sinais cromatográficos referentes ao valor de m/z de cada catinona, no respetivo tempo de retenção, através razão dos valores destas áreas com as áreas dos sinais referentes à reserpina, a cada tempo de incubação. Através da transposição destes dados, elaboraram-se dois gráficos, para a 4'-MMC e para a 3'-MMC, estes que constam na **Figura 2.24** (à esquerda) e na **Figura 2.25** (à esquerda), respetivamente, nos quais se verifica que o decréscimo de ambas as catinonas segue uma cinética de primeira ordem. Por sua vez, e recorrendo-se à logaritmação dos valores que constam na porção linear dos gráficos referidos, obteve-se a respetiva reta (**Figura 2.24** (à direita), para a 4'-MMC e, **Figura 2.25** (à direita), para a 3'-MMC), cujo módulo do declive consiste no valor da constante de eliminação (k_{el}) para essas catinonas.

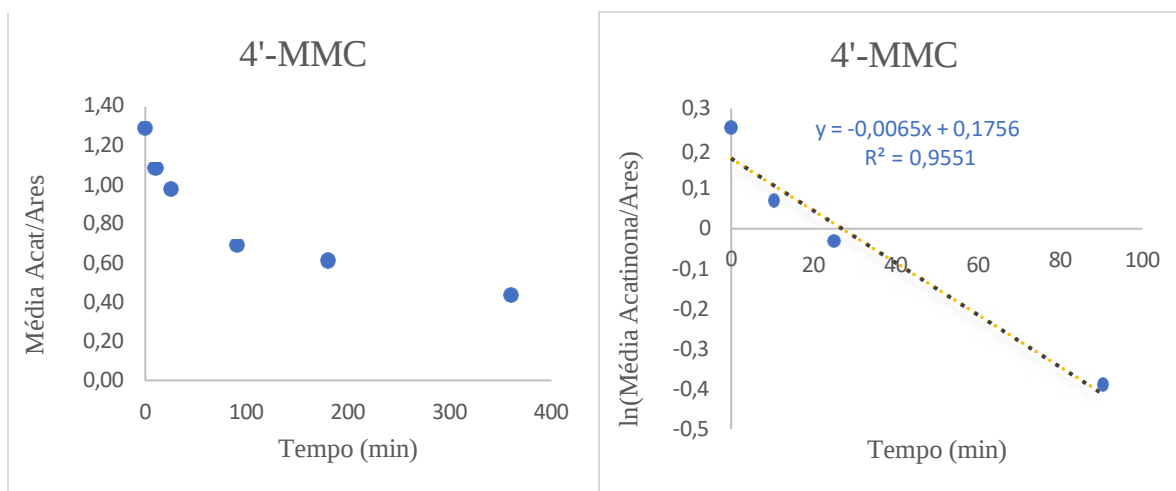


Figura 2.24: Razão entre a média das áreas referentes à catinona 4'-MMC e as áreas associadas à reserpina, ao longo do tempo.

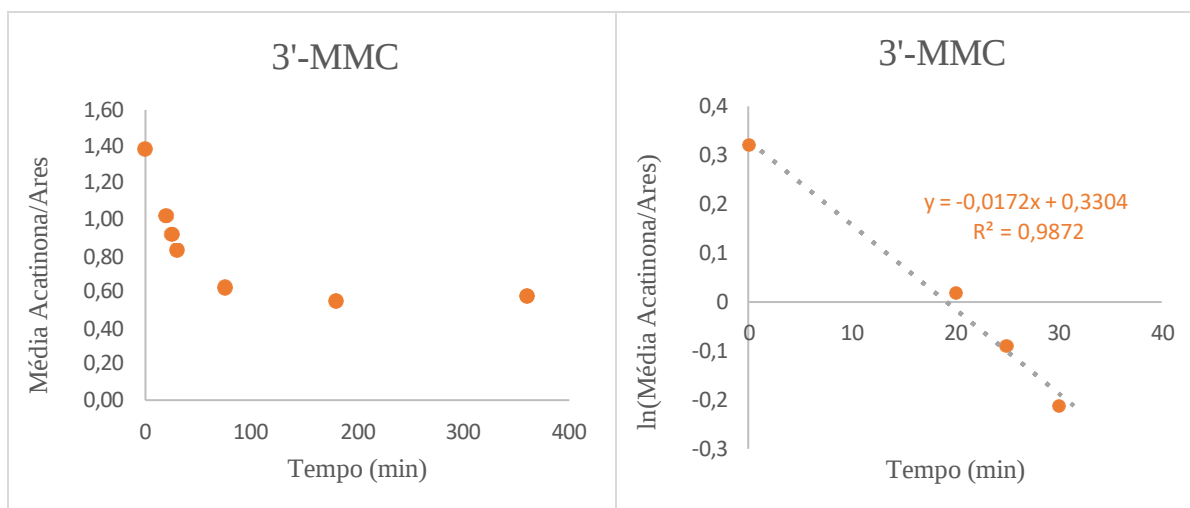


Figura 2.25: Razão entre a média das áreas referentes à catinona 3'-MMC e as áreas associadas à reserpina, ao longo do tempo.

Por último, recorreu-se à **Equação 1.1** para calcular o tempo de meia vida de cada catinona, sendo que os valores dos mesmos constam na **Tabela 2.21**, verificando-se que o tempo de meia vida da 4'-MMC, 106 min, é superior ao dobro do tempo de meia vida do seu isómero de posição, 3'-MMC, este que apresenta um valor de 40 min. No entanto, apesar da 3'-MMC sofrer uma metabolização mais rápida do que aquela que ocorre para a 4'-MMC, ambas as catinonas são extensamente metabolizadas, o que demonstra que, o uso da catinona mãe como biomarcador do seu consumo considera-se menos viável, dada a prevista baixa concentração desta, nas diversas vias de eliminação, quando comparada com as concentrações dos metabolitos daí derivados.^[67]

Tabela 2.21: Tempo de meia vida, em min, obtido no presente trabalho para as catinonas sintetizadas.

Catinona	Tempo de meia vida (min)
4'-MMC	106
3'-MMC	40

Refere-se ainda que, os tempos de meia vida obtidos no presente trabalho, 0,7 h, para a 3'-MMC, e 1,8 h, para a 4'-MMC, se aproximam dos anteriormente reportados na literatura, sendo 0,8 h (*in vivo* em porcos) e 2,2 h (*in vivo* em humanos), respetivamente.^{[64],[67]}

Tendo em conta o decréscimo de ambas as catinonas no decorrer das respetivas incubações que indica que as catinonas sofreram metabolização, pesquisaram-se possíveis metabolitos gerados a partir destas.

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

Dada a acelerada disseminação e diversidade de NPS, no mercado, bem como os casos de intoxicação a estas associados, considera-se essencial a rápida ação das autoridades judiciais competentes e de laboratórios de investigação, de forma a deter este problema de saúde pública. No que respeita aos laboratórios de investigação, estes devem desenvolver estudos acerca dos perfis metabólicos destas substâncias uma vez que, destes resulta uma compreensão acerca das vias metabólicas inerentes e, conseqüentemente, a determinação de biomarcadores do seu consumo e, ainda, o desenvolvimento de metodologias para identificação e quantificação dos mesmos em matrizes biológicas, o que permite orientar a terapêutica, em caso de intoxicação, e fornecer enquadramento legal, por exemplo, em casos de *doping*.

De forma a facilitar a identificação dos metabolitos de Fase I gerados, elaborou-se um esquema onde constam os metabolitos da 4'-MMC (**8**), previamente reportados na bibliografia, e os valores de *m/z* associados (**Figura 1.7**). No que respeita à 3'-MMC (**7**), procuraram-se os metabolitos correspondentes, uma vez que se trata de um isómero de posição da 4'-MMC.

O conteúdo resultante das incubações analisou-se, como referido anteriormente, por meio de cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa de alta resolução, utilizando um analisador híbrido quadrupolo/tempo de voo com ionização por *Electrospray*, no modo positivo (LC-ESI(+)-HRMS). Por conseguinte, a identificação dos metabolitos cuja presença se pretendia aferir realizou-se à semelhança da identificação das catinonas.

2.5.1. Identificação de metabolitos da catinona 4'-MMC

Como anteriormente mencionado, o metabolismo da catinona 4'-MMC (**8**) já se encontra amplamente estudado na literatura, tal como consta na **Tabela 1.2**, desempenhando, assim, o papel de catinona de referência. No presente trabalho e, após a pesquisa dos metabolitos, na forma protonada, apresentados na **Figura 1.7**, refere-se que apenas se identificaram dois metabolitos, estes que constam, a vermelho, na **Figura 2.26**, sendo: os metabolitos **M1-4'-MMC**, que corresponde ao hidroxitolil-4'-metilmetcatinona, e o **M2-4'-MMC**, que corresponde à nor-mefedrona.

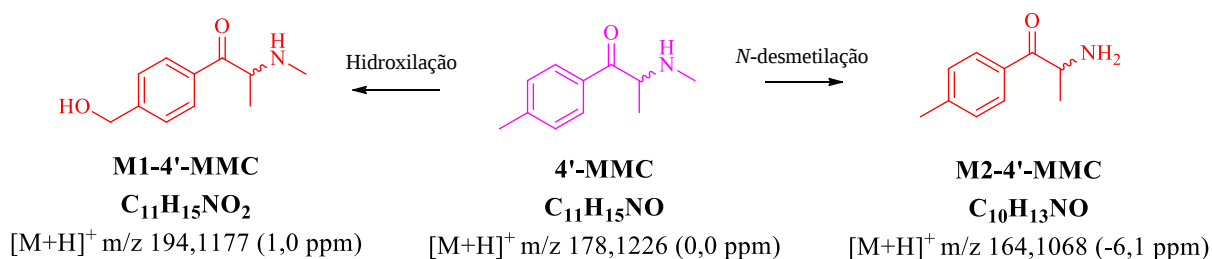


Figura 2.26: Metabolitos de Fase I da catinona 4'-MMC identificados no presente trabalho.

Uma vez que se usou padrão interno, reserpina, aquando da injeção das incubações no LC-ESI(+)-HRMS, tornou-se possível elaborar um gráfico onde constam as razões entre as médias (dos duplicados) das áreas do metabolito e as áreas da reserpina, ao longo dos 360 min em que as amostras permaneceram em incubação (**Figura 2.27**). Verificou-se que ambos os metabolitos foram identificados em, apenas, dois dos tempos de incubação, aos 90 min e 180 min, para o **M1-4'-MMC** (a azul); e aos 120 min e 180 min, para o **M2-4'-MMC** (a laranja), tendo sido o M1-4'-MMC o metabolito maioritário.

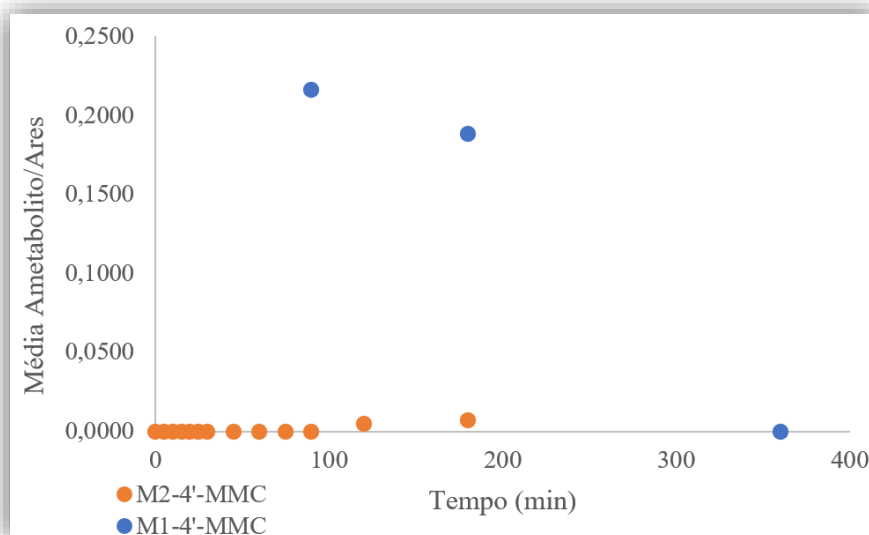


Figura 2.27: Proporção relativa dos metabolitos M1-4'-MMC e M2-4'-MMC, em relação à reserpina, ao longo de 6h.

Relativamente ao metabolito **M1-4'-MMC** (**Figura 2.26**), tal resulta da hidroxilação do grupo metilo em posição *para* no anel aromático da 4'-MMC, e surgiu a 1,9 min, na sua forma protonada, apresentando um valor de *m/z* de 194,1177 (1,0 ppm), no espectro *full scan*. Relativamente ao respetivo espectro MS/MS (**Figura 6.58 – Anexo 6.6**) identificaram-se quatro iões fragmento que podem ser atribuídos aos fragmentos da **Figura 2.28**, compatíveis com o padrão de fragmentação já reportado para o M1-4'-MMC.^{[43],[44]}

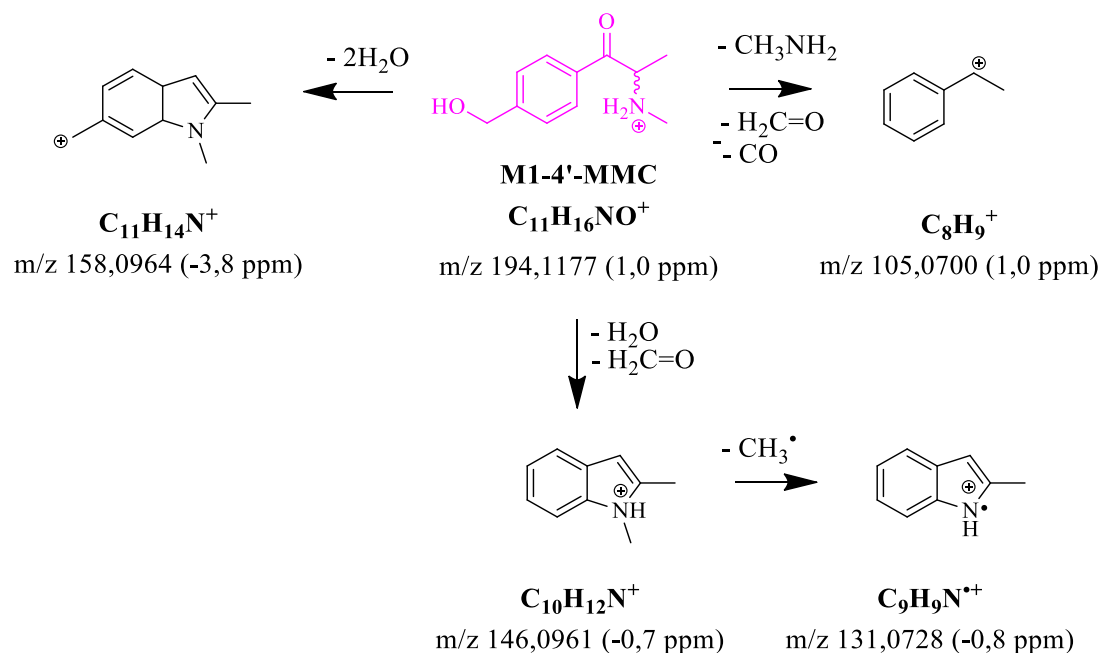


Figura 2.28: Proposta de esquema de fragmentação para o metabolito M1-4'-MMC, tendo em conta os iões fragmento identificados no espectro de MS/MS.

Referente ao metabolito **M2-4'-MMC** (**Figura 2.26**), tal resulta da *N*-desmetilação da 4'-MMC, obtendo-se a respetiva amina primária, e surgiu a 6,1 min, na sua forma protonada, apresentando um valor de *m/z* de 164,1068 (-6,1 ppm), no espectro *full scan*. Relativamente ao respetivo espectro MS/MS (**Figura 6.59 - Anexo 6.5**) identificaram-se seis iões fragmento que podem ser atribuídos aos fragmentos da **Figura 2.29**, compatíveis com o padrão de fragmentação já reportado para o M2-4'-MMC.^{[43],[44]}

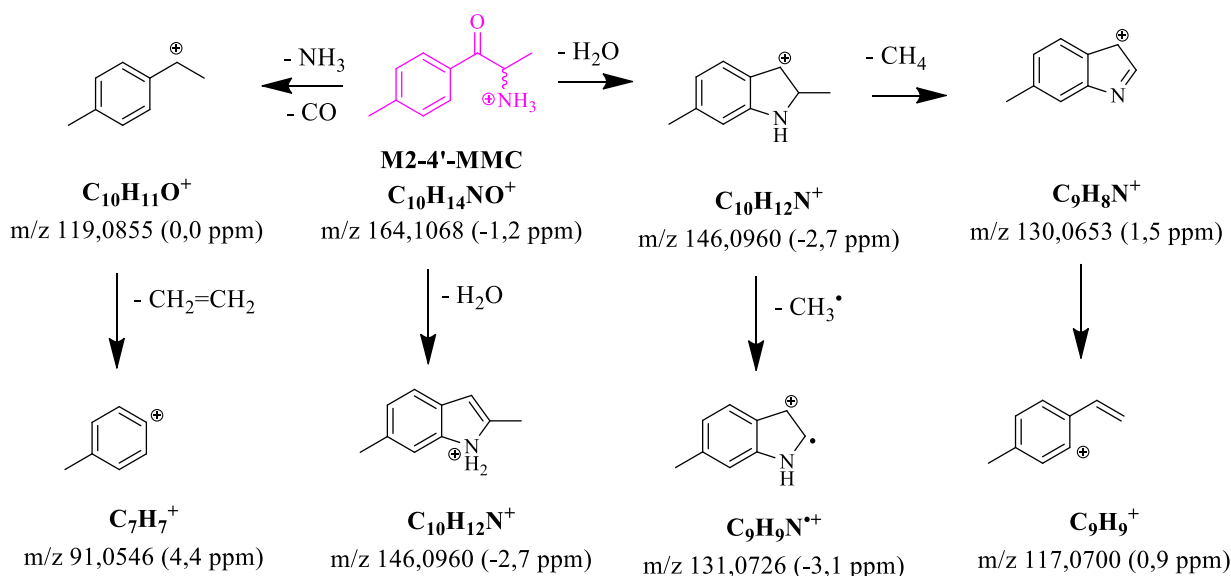


Figura 2.29: Proposta de esquema de fragmentação para o metabolito M2-4'-MMC, tendo em conta os iões fragmento identificados no espectro de MS/MS.

Os dados anteriormente referidos encontram-se reunidos na **Tabela 2.22**.

Tabela 2.22: Dados referentes aos metabolitos da 4'-MMC identificados em LC-ESI(+)-HRMS.

Nome do metabolito	<i>m/z</i> obs [M+H] ⁺ [± erro (ppm)]	Iões fragmento <i>m/z</i> obs [M+H] ⁺ [± erro (ppm)]	<i>t_R</i> (min)
M1-4'-MMC	194,1177 (1,0)	158,0964 (-3,8)	1,9
		146,0961 (-0,7)	
		131,0728 (-1,5)	
		105,0700 (1,0)	
M2-4'-MMC	164,1068 (-1,2)	146,0960 (-2,7)	6,1
		131,0726 (-3,1)	
		130,0653 (1,5)	
		119,0855 (0,0)	
		117,0700 (0,9)	
		91,0546 (4,4)	

2.5.2. Identificação de metabolitos da catinona 3'-MMC

Como anteriormente referido, constam, até ao momento, na literatura, apenas dois estudos, ambos *in vivo*, (**Tabela 1.2**) alusivos ao metabolismo da 3'-MMC (**7**), nos quais se identificaram alguns metabolitos que sugerem provir desta catinona (metabolitos resultantes de redução do grupo carbonilo, hidroxilação no metilo do anel aromático e/ou *N*-desmetilação - **Figura 1.9**). No entanto, esclarece-se, novamente, que não é possível afirmar que os metabolitos detetados resultam garantidamente da metabolização da 3'-MMC, uma vez que não se verificaram condições controladas na administração deste composto. Por conseguinte, no presente trabalho procedeu-se ao estudo do metabolismo da 3'-MMC, através da incubação isolada dessa catinona - previamente sintetizada e caracterizada por RMN, de forma a garantir que se tratava do composto requerido.

Uma vez que a 3'-MMC consiste num isómero de posição da 4'-MMC (**8**), espera-se que a sua metabolização ocorra segundo as mesmas vias metabólicas para esta verificadas. Assim, no presente trabalho, pesquisaram-se os metabolitos correspondentes para a 3'-MMC, na forma protonada, estes que apresentam os mesmos valores de *m/z* que os metabolitos procurados para a 4'-MMC (**Figura 1.7**). Refere-se que, apenas, se identificaram dois metabolitos, estes que constam, a vermelho, na **Figura 2.30**, sendo: os metabolitos **M1-3'-MMC**, que corresponde ao hidroxitolil-3'-metilmetcatinona, e **M2-3'-MMC**, que corresponde ao dihidro-3'-metilmetcatinona.

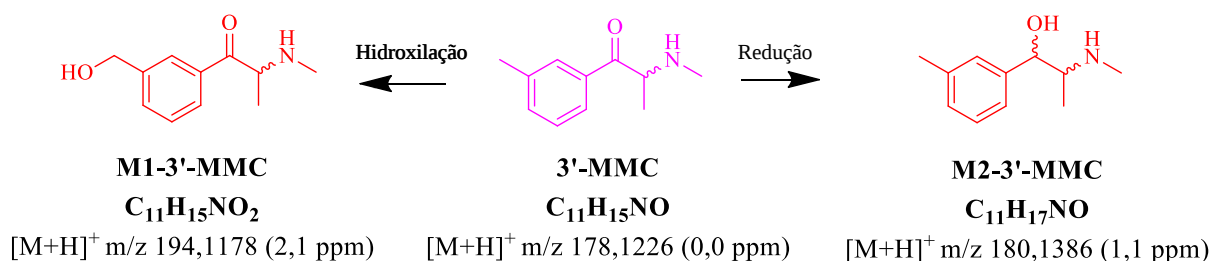


Figura 2.30: Metabolitos de Fase I da catinona 3'-MMC identificados no presente trabalho.

Uma vez que se usou padrão interno, reserpina, aquando da injeção das incubações no LC-ESI(+)-HRMS, tornou-se possível elaborar um gráfico onde constam as razões entre as médias (dos duplicados) das áreas do metabolito e as áreas da reserpina, ao longo dos 360 min em que as amostras permaneceram em incubação (**Figura 2.31**). Verificou-se que o metabolito **M1-3'-MMC** (a laranja) foi identificado dos 10 aos 20 min e dos 45 min aos 120 min, sem que se verifique qualquer tendência consistente, crescente ou decrescente, ao longo do tempo.

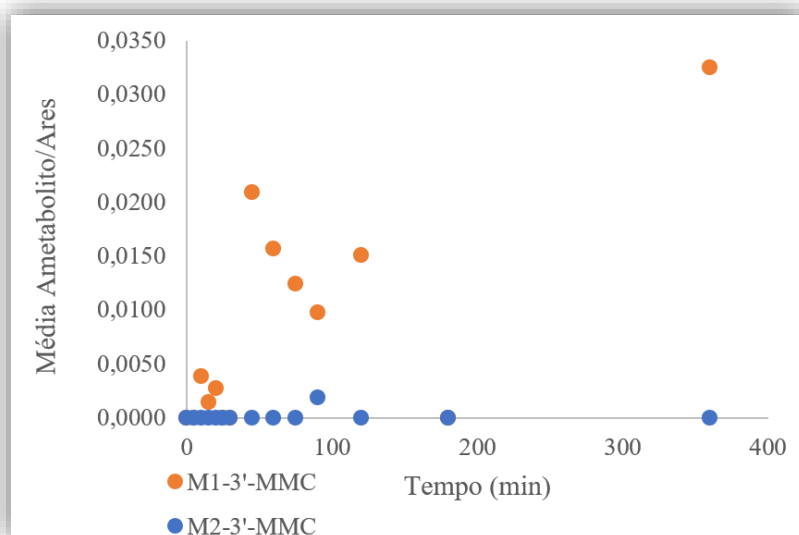


Figura 2.31: Proporção relativa dos metabolitos M1-3'-MMC e M2-3'-MMC, em relação à reserpina, ao longo de 6h.

Relativamente ao metabolito **M1-3'-MMC** (**Figura 2.30**), tal resulta da hidroxilação do grupo metilo em posição *meta* no anel aromático da 3'-MMC, sendo o metabolito correspondente ao da hidroxilação verificada para a 4'-MMC. Este metabolito surgiu a 2,7 min, na sua forma protonada, apresentando um valor de m/z de 194,1178 (2,1 ppm), no espectro *full scan*. Relativamente ao respetivo espectro MS/MS (**Figura 6.61 – Anexo 6.7**) identificaram-se quatro iões fragmento que podem ser atribuídos aos fragmentos da **Figura 2.32**, tendo estes a mesma m/z dos correspondentes ião fragmentos obtidos para o metabolito M1-4'-MMC (**Figura 2.28**).

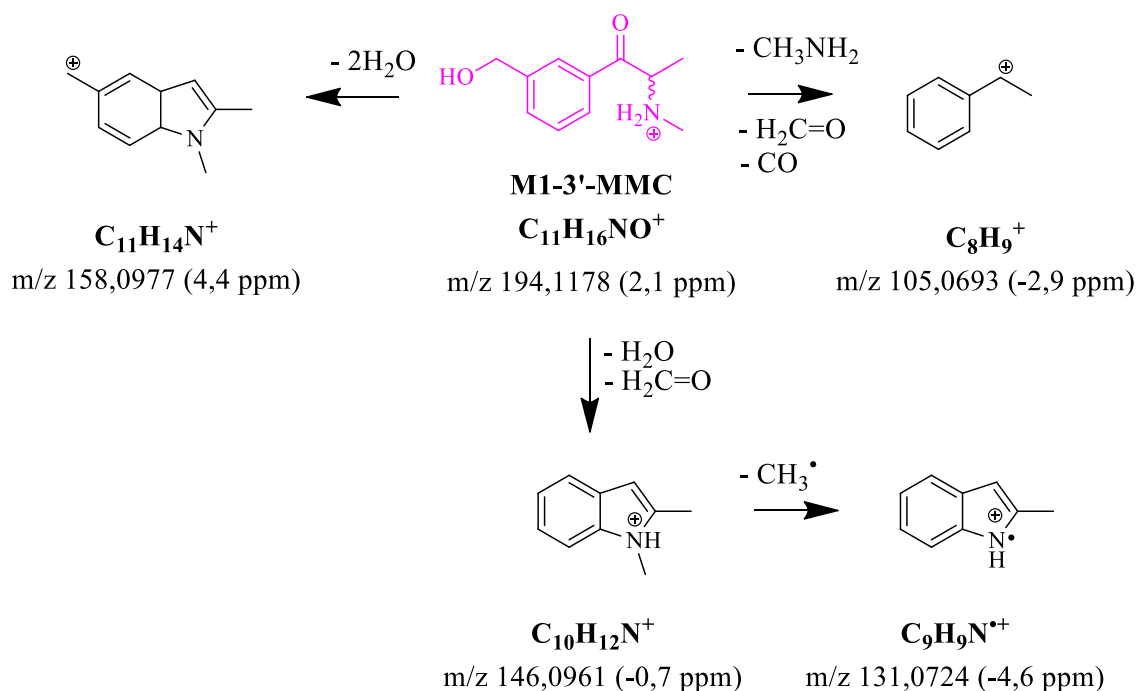


Figura 2.32: Proposta de esquema de fragmentação para o metabolito M1-3'-MMC, tendo em conta os iões fragmento identificados no espectro de MS/MS.

Relativamente ao metabolito **M2-3'-MMC** (**Figura 2.30**), que resulta da redução do grupo carbonilo da 3'-MMC, obtendo-se o respetivo álcool secundário. Este metabolito surgiu a 6,2 min, na sua forma protonada, apresentando um valor de m/z de 180,1386 (1,1 ppm), no espectro *full scan*. Relativamente ao respetivo espectro MS/MS (**Figura 6.62 – Anexo 6.7**) identificaram-se cinco iões fragmento que podem ser atribuídos aos fragmentos da **Figura 2.33**, tendo estes a mesma m/z dos correspondentes ião fragmentos obtidos para para a fragmentação, já reportada, do metabolito reduzido da 4'-MMC. ^{[43],[44]}

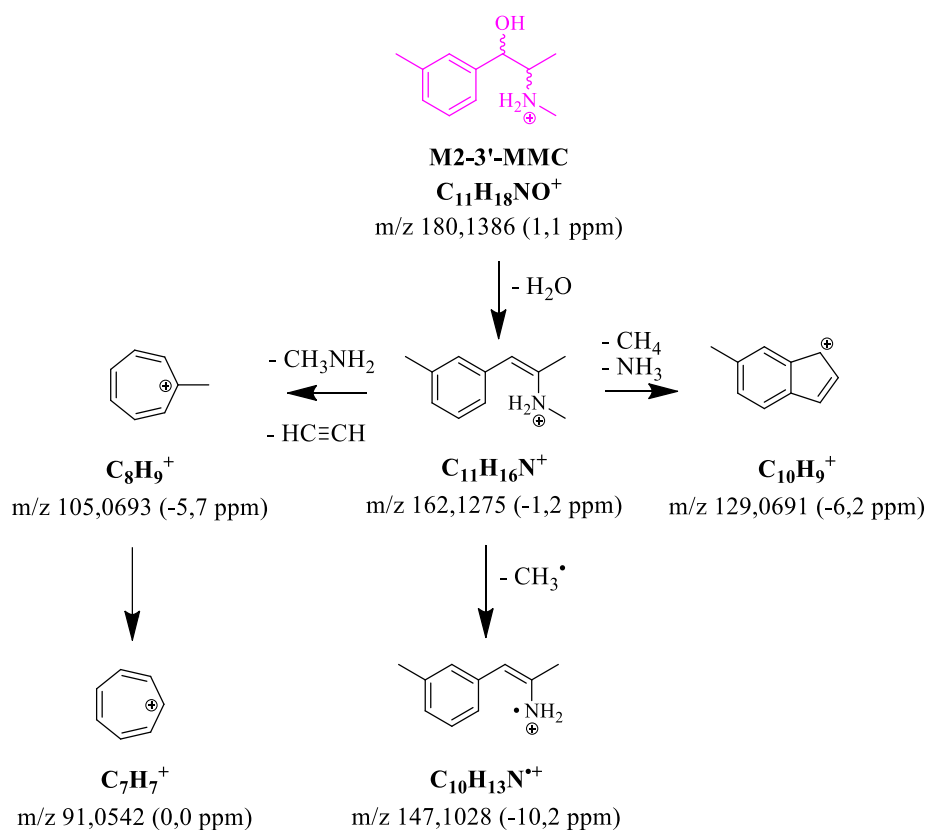


Figura 2.33: Proposta de esquema de fragmentação para o metabolito M2-3'-MMC, tendo em conta os iões fragmento identificados no espectro de MS/MS.

Os dados anteriormente referidos encontram-se reunidos na **Tabela 2.23**.

Tabela 2.23: Dados referentes à catinona 3'-MMC e aos seus metabolitos identificados em LC-ESI(+)-HRMS.

Nome do metabolito	m/z obs [M+H] ⁺ [± erro (ppm)]	Iões fragmento m/z obs [M+H] ⁺ [± erro (ppm)]	t _R (min)
M1-3'-MMC	194,1178 (2,1)	158,0977 (4,4)	2,7
		146,0961 (-0,7)	
		131,0724 (-4,6)	
		105,0693 (-2,9)	
M2-3'-MMC	180,1386 (1,1)	162,1275 (-1,2)	6,2
		147,1028 (-10,2)	
		129,0691 (-6,2)	
		105,0693 (-5,7)	
		91,0542 (0,0)	

Com base nos dados anteriormente referidos, relativos aos metabolitos identificados para ambas as catinonas e padrões de fragmentação associados, verificou-se que as vias metabólicas inerentes à formação desses metabolitos consistiram na hidroxilação do grupo metilo do anel aromático, *N*-desmetilação e redução do grupo carbonilo, corroborando a informação mencionada na literatura acerca do metabolismo da 4'-MMC, que aponta estas três vias como as principais. Assim, tal sugere que a metabolização da catinona 3'-MMC ocorre segundo as mesmas vias que a da 4'-MMC, tendo-se até verificado a formação de um metabolito correspondente, resultado da *N*-desalquilação da respetiva catinona. Para além disto, as fragmentações da 4'-MMC e dos seus metabolitos formados coincidem com as fragmentações já descritas para os mesmos, sendo que as fragmentações da 3'-MMC, e dos seus metabolitos gerados, ocorreu dessa mesma forma.

3

Parte experimental

3.1. Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes necessários para as sínteses e para os estudos de metabolismo, que constam no presente trabalho, foram adquiridos comercialmente (**Tabela 3.1**), tendo-se procedido, apenas, à purificação prévia de THF (destilado com recurso a sódio e benzofenona) para a síntese das cationas 3'-MMC (7) e 4'-MMC (8).^[71]

Tabela 3.1: Dados referentes aos reagentes e solventes usados no presente trabalho.

Reagente/Solvente	Característica/Pureza	Marca
3'-metilpropiofenona	98%	BLD Pharmatech Ltd.
4'-metilpropiofenona	94%	Alfa Aesar
Acetato de etilo	≥ 99,5%	Honeywell Riedel-de Haën
Acetona	≥ 99,8%	Carlo Erba
Acetonitrilo	≥ 99,9%	Sigma-Aldrich
Ácido bromídrico	48%	Sigma-Aldrich
Ácido clorídrico	1M	Fisher Scientific
Ácido sulfúrico	95 – 97%	Honeywell Fluka
Água desionizada	Resistividade: 18,2 MΩ/cm; T = 25 °C	Milli-Q® - Merck Millipore (Modelo Simplicity)
Benzeno	≥ 99,5%	Merck
Borohidreto de sódio	99%	Merck
Bromo molecular	Para síntese	Sigma-Aldrich
Cloreto de Sódio	≥ 99%	Honeywell Fluka
Clorofórmio deuterado (CDCl ₃)	99,8% de deutério	Aldrich
Diclorometano	≥ 99,9%	Honeywell Riedel-de Haën
Dimetilsulfóxido deuterado ((CD ₃) ₂ SO)	99,9% de deutério	Aldrich
Éter dietílico	≥ 99,8%	Honeywell Riedel-de Haën
Fração S9 de fígado de rato	Sprague-Dawley c = 20 mg/mL	GIBCO
<i>n</i> -hexano	≥ 98,5% 98%	Carlo Erba VWR Chemicals
Metanol	≥ 99,9%	Carlo Erba
Metilamina	2.0 M em THF	Alfa Aesar
NADPH	-	Sigma-Aldrich
Placas sílica gel 60	F254 em alumínio 20 × 20 cm	Merck
Peneiras moleculares	Diâmetro 4 Å	Sigma-Aldrich
Reserpina	-	Sigma-Aldrich
Sulfato de Magnésio anidro	≥ 99,5%	Alfa Aesar
Tetrahidrofurano (THF)	≥ 99,9%	Carlo Erba
Vivid Regeneration System	x 100	Life Technologies

As soluções usadas para ajuste de pH na síntese das catinonas, isto é, as soluções aquosas de HCl 6 mol.dm⁻³ e de NaOH 5 mol.dm⁻³ já se encontravam previamente preparadas.

Para a síntese das catinonas, na forma de cloridrato (7) e (8), recorreu-se a ácido clorídrico etéreo. Este preparou-se através da adição, gota-a-gota, de H₂SO₄ 95–97% (20,82 mL; 375 mmol) a NaCl (43,83 g; 750 mmol), primeiramente seco durante 12 h na estufa. O início da formação do ácido clorídrico etéreo pode ser notado através de um borbulhar aquando da adição das gotas de H₂SO₄ ao NaCl. Refere-se que, o ácido formado permanece, por algumas horas, a borbulhar em 250 mL de éter etílico, sobre gelo, na montagem elucidada na **Figura 3.1**.



Figura 3.1: Montagem para preparação de ácido clorídrico etéreo 3M.

3.2. Soluções

Refere-se que a presente secção diz respeito às soluções usadas para os estudos de metabolismo das catinonas sintetizadas (7) e (8).

Relativamente às soluções mãe das catinonas, tais prepararam-se através da adição de 1,2 mg da respetiva catinona em 1 mL de água destilada, de forma a obter-se uma solução com a concentração de 5 mM.

Recorreu-se a tampão de bicarbonato de amónio (ABIC) cuja preparação consistiu, primeiramente, em dissolver 0,1976 g de bicarbonato de amónio em 50 mL de água destilada e, em seguida, ajustou-se, com ácido fórmico, o pH até o mesmo atingir o valor de 7,4.

No que respeita às soluções de reserpina em acetonitrilo, procedeu-se à preparação de duas soluções. Numa primeira instância, pretendia-se uma solução mãe com uma concentração de 1 mM, tendo-se obtido através da adição de 0,0030 g de reserpina para 5 mL de acetonitrilo. Posteriormente, a partir desta solução, preparou-se outra solução de concentração de 2,5 µM, tendo-se retirado 0,0751 g da solução mãe e perfeito, até um volume total de 30 mL, com acetonitrilo.

Por fim, a solução de NADPH resultou da dissolução de 0,0167 g de NADPH em 1 mL de tampão ABIC.

3.3. Técnicas e Equipamentos

3.3.1. Equipamentos comuns

Referente aos equipamentos comuns recorreu-se a: balança Precisa 205 A SCS (máx 205 g, $\pm 0,001$ g); placa de agitação P SELECTA de modelo AGIMATIC-N; e, evaporador rotativo Büchi R- 200, com banho térmico Büchi Heating Bath B-490 e bomba de pressão Büchi Vac® V-500.

3.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A preparação das amostras analisadas no RMN consistiu em dissolver 10 mg do respetivo composto em 450 μ L do solvente pretendido.

A elucidação estrutural das catinonas e respetivos metabolitos reduzidos teve por base a interpretação dos espectros, analisados no *software* Topspin, de RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC, estes que se obtiveram, a temperatura ambiente, através de um espectrómetro Bruker Avance 400 e a uma frequência de 400,13 MHz, para os espectros de RMN de ^1H , e de 100, 61 MHz, para os espectros de RMN de ^{13}C . A calibração dos espectros referidos realizou-se através de sinais com valores conhecidos como o pico de solvente usado (CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7,26$ ppm; $\delta_{\text{C}} = 77,16$); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ($\delta_{\text{H}} = 2,50$; $\delta_{\text{C}} = 39,52$) e CD_3OD ($\delta_{\text{H}} = 3,33$; $\delta_{\text{C}} = 49,00$)).

3.3.3. Cromatografia em camada fina (TLC)

De forma a verificar o término das sínteses desenvolvidas recorreu-se a placas de cromatografia em camada fina (TLC), da Merck, em sílica gel 60 F254 em alumínio 20x20 cm, estas que se visualizaram, num aparelho CAMAG série 29010, sob luz ultravioleta de 254 nm.

3.3.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS)

De forma a identificar os metabolitos resultantes das incubações das catinonas (7) e (8), procedeu-se às suas injeções em Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa de Alta Resolução (LC-ESI-HRMS), num sistema UPLC Elute (Bruker, Bremen, Alemanha) acoplado a um espectrómetro de massa com analisador quadrupolo *time-of-flight* (QTOF) IM-PACT II (Bruker Daltoniks, Bremen, Alemanha), com ionização por *electrospray* (Bruker Daltoniks, Bremen, Alemanha).

A separação das amostras ocorreu em colunas Luna (Phenomenex) 3 μ L Polar C18(2) 100 A (150*2 mm). Programou-se um fluxo de 170 μ L/min, na fase móvel, tendo-se programado as seguintes variações: 95% do eluente A (0,1% de ácido fórmico em água) durante 1,5 min; seguido de um gradiente linear até 100% do eluente B (acetonitrilo) durante 6,20 min, tendo-se mantido, por 1,80 min, as condições verificadas nesse momento; gradiente linear até à obtenção das condições iniciais (por 0,5 min) e, por último, tais condições permaneceram pelo período de 1 min.

A calibração interna teve por base acetato/formato de sódio e recolheram-se dados, de valores de *m/z* compreendidos entre 50 e 1000, no modo scan auto MS/MS. Os espectros *full scan* e MS/MS gerados analisaram-se manualmente no *software* Compass Data Analysis Version 4.1.

3.4. Síntese de catinonas

Como referido na [Seção 2 – Resultados e Discussão](#), a síntese das catinonas pretendidas baseou-se num procedimento que contempla três passos reacionais ordenados, sendo estes: **1)** formação das α -bromocetonas, a partir da respetiva cetona; **2)** formação das catinonas, primeiramente na forma de base livre e **3)** na forma de sal (cloridrato). Os passos previamente referidos foram conseguidos sem qualquer purificação e encontram-se esquematizados na [Figura 2.1](#).

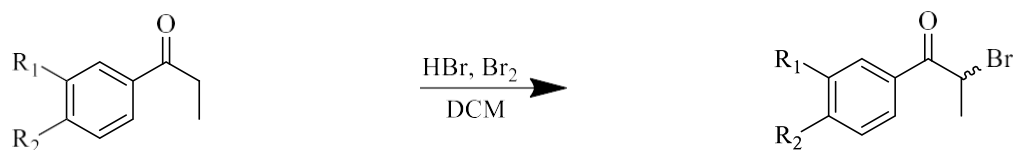
3.4.1. Síntese de α -bromocetonas

As α -bromocetonas (**3**) e (**4**) foram sintetizadas através de uma reação de halogenação, em meio ácido, das respetivas cetonas, adquiridas comercialmente, segundo uma proporção de 100 mmol de cetona para 100 mmol de Br₂.^[82]

Primeiramente, dissolveu-se a cetona desejada em DCM, tendo por base uma proporção de 0,6 mL de DCM por cada 0,001 mL de cetona, e colocou-se o volume teórico de Br₂ numa ampola isobárica. À solução de cetona em DCM adicionaram-se, sob agitação, uma gota de HBr e, em seguida, uma gota de Br₂. A adição de Br₂ confere à mistura reacional uma tonalidade alaranjada, tendo-se aguardado que a mistura voltasse à sua cor inicial para adicionar nova gota de Br₂, e assim sucessivamente, até se ter adicionado o volume de Br₂ necessário para reagir com a totalidade de cetona. De forma a conhecer o momento de término da reação, tal foi acompanhada por TLC, tendo-se recorrido ao eluente 90/10 *n*-hexano/benzeno. Posteriormente, evaporou-se a mistura reacional até à secura, pelo que se obteve um óleo alaranjado para ambas as α -bromocetonas (**3**) e (**4**). Os rendimentos das sínteses das bromocetonas foi de 99%, dada a presença indesejada de dibromocetona (o que não comprometeu as reações seguintes). A obtenção do composto requerido teve por base o respetivo espectro de RMN ¹H, em CDCl₃. Por fim, procedeu-se, ainda, à caracterização de cada bromocetona, recorrendo a RMN ¹³C APT, COSY, HSQC e HMBC, em CDCl₃.

Na [Tabela 3.2](#), referente à síntese das bromocetonas, constam as quantidades de reagentes utilizadas e de produtos obtidas, tempo de cada reação e respetivos rendimentos.

Tabela 3.2: Resumo das quantidades de reagentes utilizados e de produtos obtidos, do tempo de cada reação e respetivos rendimentos, no que respeita à síntese das α -bromocetonas.



(1) 3'-metilpropiofenona R₁=CH₃, R₂=H

(2) 4'-metilpropiofenona R₁=H, R₂=CH₃

(3) 3'-metil-2-bromopropiofenona R₁=CH₃, R₂=H

(4) 4'-metil-2-bromopropiofenona R₁=H, R₂=CH₃

Cetona (g; mmol)	Br ₂ (mL; mmol)	α -bromocetona (g; mmol)	Tempo de reação (h)	η (%)
3'-metilpropiofenona (1) (3,0022; 20,3)	1,2; 23,4	3'-metil-2-bromopropiofenona (3) (3,2551; 14,3)	96	99
4'-metilpropiofenona (2) (4,0344; 27,2)	1,4; 27,2	4'-metil-2-bromopropiofenona (4) (6,1823; 27,2)	96	99

3.4.1.1. Caracterização das cetonas e das α -bromocetonas

3'-metilpropiofenona (**1**): Líquido transparente. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), δ (ppm): 7,78 (1H; sd; H-2'); 7,75 (1H; sd; $J = 3,7$ Hz; H-6'); 7,37 (1H; dt; $J = 3,7$ Hz; H-4'); 7,34 (1H; dt; $J = 3,7$ Hz; H-5'); 3,00 (2H; q; $J = 3,6$ Hz; H-2); 2,41 (3H; s; H-7'); 1,22 (3H; t; $J = 3,6$ Hz; H-3); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ (ppm): 201,31 (C-1); 138,50 (C-3'); 137,13 (C-1'); 133,82 (C-4'); 128,69 (C-2'); 128,61 (C-5'); 125,39 (C-6'); 32,02 (C-2); 21,56 (C-7'); 8,49 (C-3).

4'-metilpropiofenona (**2**): Líquido transparente. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), δ (ppm): 7,89 (2H; d; $J = 4,1$ Hz; H-2'/H-6'); 7,27 (2H; d; $J = 3,9$ Hz; H-3'/H-5'); 3,00 (2H; q; $J = 3,7$ Hz; H-2); 2,42 (3H; s; H-7'); 1,23 (3H; t; $J = 3,6$ Hz; H-3). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ (ppm): 200,77 (C-1); 143,78 (C-4'); 134,61 (C-1'); 129,41 (C-3'/C-5'); 128,29 (C-2'/C-6'); 31,85 (C-2); 21,82 (C-7); 8,53 (C-3).

3'-metil-2-bromopropiofenona (**3**): Óleo alaranjado. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), δ (ppm): 7,83 (1H; sd; H-2'); 7,81 (1H; sd; $J = 3,7$ Hz; H-6'); 7,41 (1H; dt; $J = 3,7$ Hz; H-4'); 7,37 (1H; dt; $J = 3,7$ Hz; H-5'); 5,30 (1H; q; $J = 3,3$ Hz; H-2); 2,43 (3H; s; H-7'); 1,90 (3H; d; $J = 3,3$ Hz; H-3); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ (ppm): 193,76 (C-1); 138,83 (C-3'); 134,70 (C-4'); 134,22 (C-1'); 129,60 (C-2'); 128,79 (C-5'); 126,26 (C-6'); 41,75 (C-2); 21,58 (C-7'); 20,35 (C-3).

4'-metil-2-bromopropiofenona (**4**): Óleo alaranjado. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), δ (ppm): 7,93 (2H; d; $J = 3,6$ Hz; H-2'/H-6'); 7,29 (2H; d; $J = 3,6$ Hz; H-3'/H-5'); 5,29 (1H; q; $J = 3,1$ Hz; H-2); 2,43 (3H; s; H-7'); 1,90 (3H; d; $J = 3,1$ Hz; H-3). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ (ppm): 193,20 (C-1); 144,84 (C-4'); 131,58 (C-1'); 129,64 (C-3'/C-5'); 129,23 (C-2'/C-6'); 41,71 (C-2); 21,92 (C-7); 20,40 (C-3).

3.4.2. Síntese de catinonas

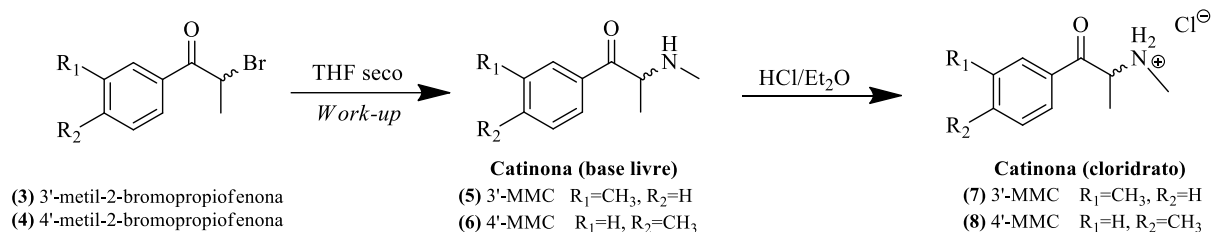
As catinonas (**7**) e (**8**) foram sintetizadas segundo uma proporção de 3,4 mmol das α -bromocetonas (**3**) e (**4**), respetivamente, para 14 mmol de uma solução de metilamina 2M em THF.^[80]

Primeiramente, dissolveu-se a respetiva α -bromocetona em THF, previamente seco, segundo a proporção 1 g de α -bromocetona para 4 mL de THF seco. Antes da adição da metilamina à bromocetona, colocou-se esta, bem como a bromocetona, em banho de gelo. Quando as referidas se encontravam arrefecidas, procedeu-se, mantendo a bromocetona em banho de gelo, à adição, gota a gota, da solução de metilamina. Terminada a adição de todo o volume de metilamina, a mistura reacional permaneceu à temperatura ambiente e recorreu-se a placas de TLC, eluente 95/5 n-hexano/acetato de etilo, para garantir o momento de término da reação. Posteriormente, evaporou-se a mistura reacional até à secura, e dissolveu-se o óleo obtido em DCM. Os passos seguintes incluem o *workup* do óleo e consistiram em: adicionar, gota a gota, HCl 6M até pH=1, retirando a Fase Orgânica 1; lavar a Fase Aquosa com 3x50 mL de DCM e recolher a Fase Orgânica 2; adicionar, à Fase Aquosa, NaOH 5M, gota a gota, até pH=10 e, em seguida, lavar essa fase com 3x50 mL de DCM, retirando a Fase Orgânica 3. Procedeu-se à secagem, com sulfato de magnésio anidro, filtração e evaporação, até à secura, das três fases orgânicas, obtendo-se as catinonas na forma de base livre (**5**) e (**6**).^[82]

De forma a sintetizar as catinonas na forma de cloridrato (**7**) e (**8**), adicionou-se, às catinonas na forma de base livre (**5**) e (**6**), a solução etérea de HCl 5M, previamente preparada, até se obter um precipitado, tendo este sido filtrado e lavado com éter dietílico e acetona gelados, até se obter um pó o mais branco possível, que foi seco a vácuo.^[75] Os rendimentos das sínteses das catinonas na forma de cloridrato (**7**) e (**8**) foram de 24% e de 23%, respetivamente. A obtenção do composto requerido teve por base o respetivo espectro de RMN ^1H , em CDCl_3 . Por fim, procedeu-se, ainda, à caracterização de cada catinona, recorrendo a RMN ^1H , ^{13}C APT, COSY, HSQC e HMBC, em CD_3OD .

Na **Tabela 3.3**, referente à síntese das cationonas, constam as quantidades de reagentes utilizadas e de produtos obtidas, tempo de cada reação e respectivos rendimentos.

Tabela 3.3: Resumo das quantidades de reagentes utilizados e de produtos obtidos, do tempo de cada reação e respectivos rendimentos, no que respeita à síntese das cationonas.



α -bromocetona (g; mmol)	Amina (mL; mmol)	Cationona (g; mmol)	Tempo de reação (h)	η (%)
3'-metil-2-bromopropiofenona (3,2551; 14,3)	Metilamina (29,5; 817,8)	3-MMC (0,7403; 3,5)	70	24
4'-metil-2-bromopropiofenona (6,1823; 27,2)	Metilamina (36,6; 1014,6)	4-MMC (0,4002; 1,9)	69	23

3.4.2.1. Caracterização das cationonas

3'-MMC [Cloridrato de (R,S)- 2-(metilamino)-1-(3-metilfenil)propan-1-ona] (**7**): RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz), δ (ppm): 7,91 (1H; sd; H-2'); 7,87 (1H; sd; $J=3,8$ Hz; H-6'); 7,59 (1H; d; $J=3,8$ Hz; H-4'); 7,50 (1H; t; $J=3,8$ Hz; H-5'); 5,14 (1H; q; $J=3,6$ Hz; H-2); 2,84 (3H; s; H-1''); 2,47 (3H; s; H-7'); 1,59 (3H; d; $J=3,6$ Hz; H-3); RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz), δ (ppm): 195,82 (C-1); 139,26 (C-3'); 135,36 (C-4'); 132,84 (C-1'); 128,91 (C-2'); 128,87 (C-5'); 59,25 (C-2); 30,30 (C-1''); 19,88 (C-7'); 14,83 (C-3).

4'-MMC [Cloridrato de (R,S)- 2-(metilamino)-1-(4-metilfenil)propan-1-ona] (**8**): RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz), δ (ppm): 7,98 (2H; d; $J=4,1$ Hz; H-2'/H-6'); 7,44 (2H; d; $J=4,1$ Hz; H-3'/H-5'); 5,14 (1H; q; $J=3,6$ Hz; H-2); 2,84 (3H; s; H-1''); 2,47 (3H; s; H-7'); 1,60 (3H; d; $J=3,6$ Hz; H-3); RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz), δ (ppm): 196,57 (C-1); 147,63 (C-4'); 131,65 (C-1'); 130,98 (C-3'/C-5'); 130,15 (C-2'/C-6'); 60,54 (C-2); 31,71 (C-1''); 21,77 (C-7'); 16,33 (C-3).

3.5. Síntese de metabolitos reduzidos

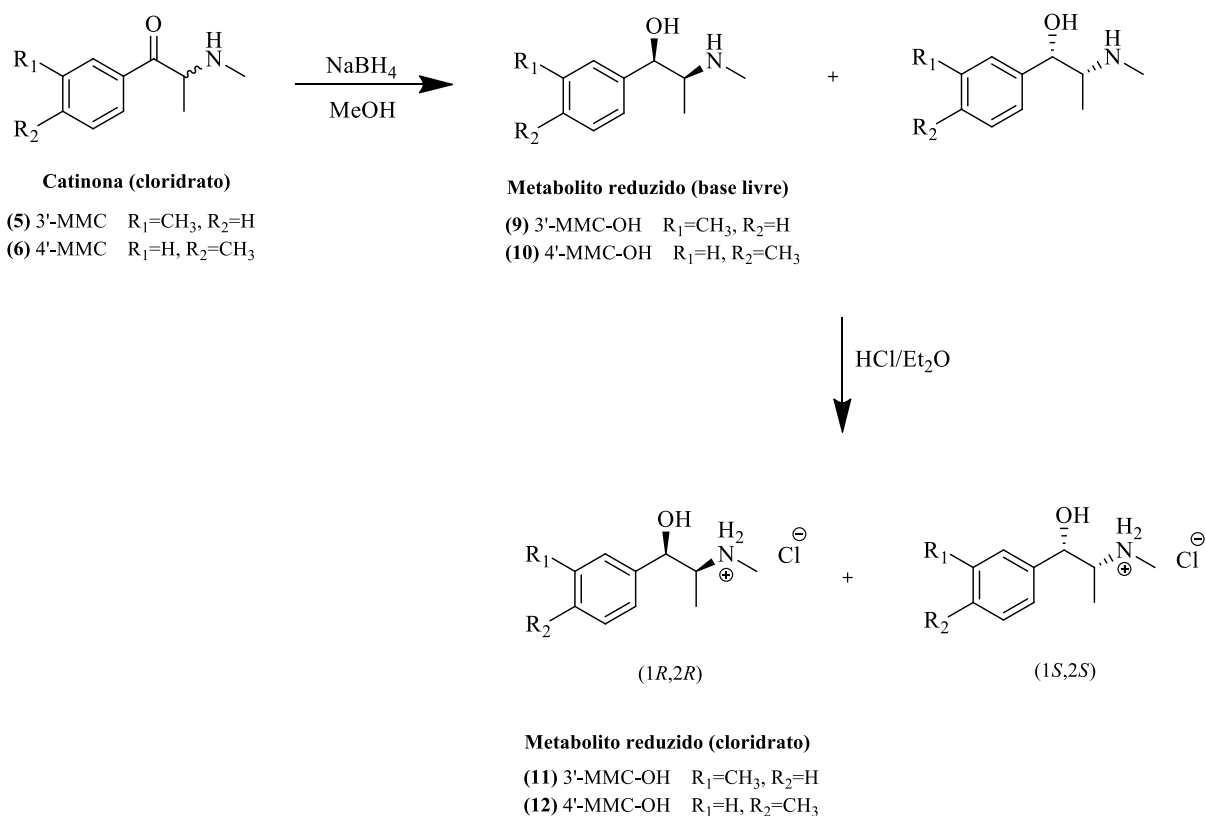
Os metabolitos reduzidos **(11)** e **(12)** foram sintetizadas segundo uma proporção de 1 mmol das catinonas **(7)** ou **(8)**, respetivamente, para 4 mmol de NaBH₄.^[43]

Primeiramente, dissolveu-se a respetiva catinona em DCM e colocou-se em agitação, de forma a adicionar, lentamente, a massa de NaBH₄ calculada. Terminada a adição de NaBH₄, recorreu-se a placas de TLC, sendo o eluente metanol, para garantir o momento de término da reação. Posteriormente, evaporou-se a mistura reacional até à secura, dissolveu-se o óleo obtido em metanol e adicionaram-se umas gotas de acetato de etilo, o que resultou na precipitação de um sólido que foi filtrado. Realizou-se uma experiência de RMN ¹H, em CD₃OD, das águas mãe dessa filtração e verificou-se que o produto de interesse se encontrava aí. O *workup* consistiu em dissolver as águas mãe em acetato de etilo e proceder à sua lavagem, com 3x50 mL de água desionizada, retirando, em cada uma das lavagens, a sua Fase Orgânica. Procedeu-se à sua secagem, com sulfato de magnésio anidro, filtração e evaporação, até à secura, tendo-se obtido os metabolitos reduzidos *syn* na forma de base livre **(9)** e **(10)**.

De forma a sintetizar os metabolitos reduzidos na forma de cloridrato **(11)** e **(12)**, adicionou-se, aos metabolitos reduzidos na forma de base livre **(9)** e **(10)**, a solução etérea de HCl 5M, previamente preparada, até se obter um precipitado, tendo este sido filtrado e seco a vácuo.^[75] Os rendimentos das sínteses dos metabolitos na forma de cloridrato **(11)** e **(12)** foram de 17% e de 15%, respetivamente. A obtenção do composto requerido teve por base o respetivo espectro de RMN ¹H, em CD₃OD. Por fim, procedeu-se, ainda, à caracterização de cada metabolito reduzido, recorrendo a RMN ¹³C APT, COSY, HSQC e HMBC, em CD₃OD.

Na **Tabela 3.4**, referente à síntese dos metabolitos reduzidos, constam as quantidades de reagentes utilizadas e de produtos obtidas, tempo de cada reação e respetivos rendimentos.

Tabela 3.4: Resumo das quantidades de reagentes utilizados e de produtos obtidos, do tempo de cada reação e respectivos rendimentos, no que respeita à síntese dos metabolitos reduzidos.



Catinona (g; mmol)	NaBH ₄ (g; mmol)	Metabolito reduzido (g; mmol)	Tempo de reação (h)	η (%)
3-MMC (0,1001; 0,4684)	0,0720; 1,9034	3-MMC-OH (0,0155; 0,0718)	24	15
4-MMC (0,1422; 0,6654)	0,1031; 2,7254	4-MMC-OH (0,0243; 0,1113)	20	17

3.5.1. Caracterização dos metabolitos reduzidos

3'-MMC-OH [Cloridrato de 2-Metilamino-1-(3-metilfenil)-propan-1-ol] (**11**): Sólido branco. RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz), δ (ppm): 7,29 (1H; sdt; J=3,8 Hz; H-5'); 7,26 (1H; sdt; H-2'); 7,22 (1H; sdt; J=3,8 Hz; H-6'); 7,15 (1H; d; J=3,8 Hz; H-4'); 5,10 (1H; d; J=1,5 Hz; H-1); 3,43 (1H, m, J=1,8 Hz; H-2); 2,79 (3H; s; H-1''); 2,38 (3H; s; H-7'); 1,08 (3H; d; J= 3,4 Hz; H-3); RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz), δ (ppm): 141,31 (C-1'); 139,39 (C-3'); 129,62 (C-4'); 129,48 (C-5'); 127,54 (C-2'); 71,83 (C-1); 61,52 (C-2); 31,52 (C-1''); 21,50 (C-7'); 10,14 (C-3).

4'-MMC-OH [Cloridrato de 2-Metilamino-1-(4-metilfenil)-propan-1-ol] (**12**): Sólido branco. RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz), δ (ppm): 7,32 (2H; d; J=4,0 Hz; H-2'/H-6'); 7,23 (2H; d; J=4,0 Hz; H-3'/H-5'); 5,09 (1H; d; J=1,4 Hz; H-1); 3,41 (1H; m; J=1,8 Hz; H-2); 2,78 (3H; s; H-1''); 2,36 (3H; s; H-7'); 1,08 (3H; d; J= 3,4 Hz; H-3); RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz), δ (ppm): 138,80 (C-4'); 138,30 (C-1'); 130,14 (C-3'/C-5'); 126,94 (C-2'/C-6'); 71,76 (C-1); 61,51 (C-2); 31,52 (C-1''); 21,13 (C-7'); 10,06 (C-3).

3.6. Ensaios do metabolismo de Fase I *in vitro*

De forma a proceder aos estudos de metabolismo, de Fase I, das catinonas **(7)** e **(8)**, procedeu-se à preparação dos *eppendorfs*, em duplicado, para cada um dos compostos. O volume final de cada um destes é de 1000 μL , aos quais se adicionou: 2 μL de catinona (5 mM, para uma concentração final de 10 μM); 100 μL de fração S9 de fígado de rato (20 mg/mL, para uma concentração final de 2 mg/mL), previamente descongelados; 10 μL de Vivid Regeneration System; a quantidade necessária de tampão ABIC (50 mM) para perfazer o volume final; e, de forma a iniciar as reações de metabolização de Fase I, adicionou-se, num último passo, 25 μL de NADPH (20 mM, para uma concentração final de 1 mM).

As incubações ocorreram a uma temperatura de 37 °C e recolheram-se alíquotas de 25 μL a 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 e 360 min, sendo que se adicionou, a cada uma destas, 25 μL da solução de reserpina (padrão interno) em acetonitrilo 2,5 μM . As amostras recolhidas foram centrifugadas a 14 000 rpm por 15min, tendo-se recolhido, em seguida, o sobrenadante, este que foi injetado em LC-ESI-HRMS.

Para além do anterior, procedeu-se, ainda, à incubação de três controlos, com volume final de 250 μL , sendo estes: controlo sem catinona, controlo sem NADPH, controlo com microsomas desnaturados (não funcionais).

O resumo do anteriormente referido consta na **Tabela 3.5**.

Tabela 3.5: Dados referentes às concentrações e volumes usados, de cada solução/reagente, nos ensaios de metabolismo de Fase I *in vitro* das catinonas **(7)** e **(8)**.

Soluções e Reagentes	Concentrações de soluções padrão	Concentrações de incubação	V _{Fase I} (µL)	V _{CC} (µL)	V _{CNADPH} (µL)	V _{CD} (µL)
Fração S9 de fígado de rato	20 mg/mL	2 mg/mL	100,0	25,0	25,0	25,0
Catinona	5 mM	10 µM	2,0	0,0	0,5	0,5
NADPH	20 mM	1 mM	50,0	12,5	2,5	12,5
Tampão ABIC (pH 7,4)	50 mM		838,0	209,5	222,0	209,5
NRS	100x		10,0	2,5	2,5	2,5
Água desionizada	-		0,0	0,5	0,0	0,0
V _{Total}			1000,0	250,0	250,0	250,0
Reserpina em acetonitrilo (após incubação)	-	2,5 µM	25,0	25,0	25,0	25,0

4

Conclusão

Dada a acelerada disseminação e diversidade de NPS, no mercado, bem como os casos de intoxicação a estas associados, considera-se essencial desenvolver estudos acerca dos perfis metabólicos destas substâncias uma vez que, destes resulta uma compreensão acerca das vias metabólicas inerentes e, conseqüentemente, a determinação de biomarcadores do seu consumo e, ainda, o desenvolvimento de metodologias para identificação e quantificação dos mesmos em matrizes biológicas, o que permite orientar a terapêutica, em caso de intoxicação, e fornecer enquadramento legal, por exemplo, em casos de *doping*.

Numa fase inicial do presente trabalho sintetizaram-se, e caracterizam-se por RMN, duas catinonas sintéticas, na sua forma protonada, 3'-MMC (**7**) e 4'-MMC (**8**), tendo-se obtido rendimentos de 24% e de 23%, respetivamente. Ambas as referidas dispõem do estatuto de droga, uma vez que, a 4'-MMC (**8**) consta, desde 2015, na Convenção das Nações Unidas sobre Substâncias Psicotrópicas de 1971, e a 3'-MMC (**7**) foi, em 2022, incluída no Anexo da Decisão-Quadro 2004/757/JAI. A 4'-MMC, vulgarmente denominada de mefedrona, consiste na catinona sintética responsável pela maioria dos casos de morte ou de intoxicação reportados para esta classe de substâncias. No que respeita à 3'-MMC (**7**), para além de se ter vindo a verificar o crescimento, nos últimos dois anos, das suas apreensões na União Europeia, tal representa um isómero de posição da 4'-MMC.

Dada a metabolização destes compostos no organismo humano, a averiguação do seu consumo tem por base a identificação, nas diversas vias de eliminação, dos metabolitos daí derivados, uma vez que estes se encontrarão em concentrações superiores àquela verificada para a droga mãe. Assim, sintetizaram-se, na sua forma protonada, os respetivos metabolitos reduzidos das catinonas (**7**) e (**8**), 3'-MMC-OH (**11**) e 4'-MMC-OH (**12**), respetivamente, de forma a fornecer padrões que facilitem a identificação do consumo destas catinonas, quer para orientar a terapêutica em contexto hospital, quer para enquadrar legal (nomeadamente em situações de *doping*). A confirmação da síntese dos referidos metabolitos concretizou-se com recurso a RMN e obtiveram-se valores de rendimento de 15%, para (**11**), e de 17%, para (**12**).

Através das incubações das catinonas 3'-MMC (**7**) e 4'-MMC (**8**), na fração S9 de fígado de rato, calcularam-se os seus tempos de meia vida, tendo-se obtidos os valores de 40 min e de 106 min, respetivamente, o que demonstra a elevada metabolização sofrida pelas mesmas e, conseqüentemente, a importância do estudo dos seus metabolismos, de forma a identificar biomarcadores do consumo destas catinonas.

Para além do anterior, identificaram-se, ainda, por meios das referidas incubações, dois metabolitos para cada uma das catinonas. Assim, detetaram-se, para ambas as catinonas, o metabolito resultante da respetiva hidroxilação no grupo metilo do anel aromático (**M1-3'-MMC**, que corresponde ao hidroxitolil-3'-metilmetcatinona, e **M1-4'-MMC**, que corresponde ao hidroxitolil-4'-metilmetcatinona), o metabolito derivado da *N*-desmetilação da 4'-MMC (**M2-4'-MMC**, que corresponde à nor-mefedrona) e, ainda, o metabolito gerado através da redução do carbonilo da 3'-MMC (**M2-3'-MMC**, que corresponde ao dihidro-3'-metilmetcatinona). Desta forma, os resultados mencionados sugerem que a metabolização da catinona 3'-MMC ocorre segundo as mesmas vias que as verificadas para a 4'-MMC, tendo-se verificado metabolitos anteriormente reportados, na literatura, para a 4'-MMC.

Para trabalho futuro considera-se relevante a avaliação da toxicidade dos metabolitos da 3'-MMC identificados, uma vez que, até ao momento, não constam, na literatura, dados sobre o assunto.

5

Referências Bibliográficas

- [1] Babor, T., Campbell, R., Room, R. & Saunders, J. (1994). *Lexicon of Alcohol and Drug Terms*. World Health Organization.
- [2] Houck, M. M. & Siegel, J. A. (2015). *Fundamentals of Forensic Science*. 3^o ed. Oxford/California: Academic Press. pp 305-340.
- [3] *The International Drug Control Conventions*. (2013).
https://www.unodc.org/documents/commissions/CND/Int_Drug_Control_Conventions/Ebook/The_International_Drug_Control_Conventions_E.pdf
- [4] Decreto-Lei 15/93, 1993-01-22-DRE
<https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/585178/details/normal?l=1> (consultado a 26 de julho de 2023).
- [5] German, C. L., Fleckenstein, A. E., Hanson, G. R. (2014) Bath salts and synthetic cathinones: An emerging designer drug phenomenon. *Life Sciences*. pp 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.07.023>.
- [6] Gaspar, H., Bronze, S., Ciriaco, S., Queirós, C. R., Matias, A., Rodrigues, J., Oliveira, C., Cordeiro, C., Santos, S. (2015). 4F-PBP (4'-fluoro- α -pyrrolidinobutyrophenone), a new substance of abuse: Structural characterization and purity NMR profiling. *Forensic Sci. Int.* pp 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.05.003>.
- [7] Guillou, C., Reniero, F., Vicente, J. L., Holland, M., Kolar, K., Chassaing, H., Tirendi, S., Schepers, H. (2018) Collaboration of the Joint Research Centre and European Customs Laboratories for the Identification of New Psychoactive Substances. *Curr. Pharm. Biotechnol.* Vol. 19(2), pp 91–98. <https://doi.org/10.2174/1389201019666180523122717>.
- [8] Diretiva (UE) 2017/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de novembro de 2017 <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32017L2103> (consultado a 26 de julho de 2023).
- [9] What are NPS? <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS> (consultado a 26 de julho de 2023).
- [10] Decreto-Lei n.º 54/2013 | DRE <https://dre.pt/dre/detalhe/decreto-lei/54-2013-260418> (consultado a 26 de julho de 2023).
- [11] King, L. A., Kicman, A. T. (2011). A brief history of “new psychoactive substances”. *Drug testing and analysis*. Vol 3, pp. 401-403.
- [12] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), *The challenge of new psychoactive substance*. Global SMART Programme, 2013.
- [13] Portaria n.º 154/2013, de 17 de Abril
https://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?nid=1904&tabela=leis&ficha=1&pagina=1 (consultado a 29 de julho de 2023).
- [14] UNODC Early Warning Advisory (EWA) on New Psychoactive Substances (NPS) <https://www.unodc.org/LSS/Home/NPS> (consultado a 29 de julho de 2023).
- [15] The EU Early Warning System on new psychoactive substances (NPS) www.emcdda.europa.eu
<https://www.emcdda.europa.eu/publications/topic-overviews/eu-early-warning-system> (consultado a 29 de julho de 2023).
- [16] SICAD <https://www.sicad.pt/pt/Paginas/default.aspx> (consultado a 29 de julho de 2023).
- [17] Novas substâncias psicoativas – a situação atual na Europa (European Drug Report 2023) https://www.emcdda.europa.eu/publications/european-drug-report/2023/new-psychoactive-substances_en (consultado a 30 de julho de 2023).
- [18] Pieprzyca, E., Skowronek, R., Niżnanský, L., Czekaj, P. (2020) Synthetic cathinones – From natural plant stimulant to new drug of abuse. *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173012>.
- [19] Gonçalves, J. L., Alves, V. L., Aguiar, J., Teixeira, H. M., Câmara, J. S. (2019). Synthetic cathinones: an evolving class of new psychoactive substances. *Critical Reviews in Toxicology*. pp 549-566. <https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1679087>.

- [20] Alremeithi, R. H., Meetani, M. A., Khalil, S. A. (2016). A validated gas chromatography mass spectrometry method for simultaneous determination of cathinone related drug enantiomers in urine and plasma. *RSC Adv.* Vol. 6 (84), pp 80576–80584. <https://doi.org/10.1039/c6ra10583a>.
- [21] Matsuta, S., Shima, N., Kakehashi, H., Ishikawa, A., Asai, R., Nitta, A., Wada, M., Nakano, S., Kamata, H., Nishiyama, Y., Nagatani, H., Imura, H., Katagi, M. (2020). Dehydration-fragmentation mechanism of cathinones and their metabolites in ESI-CID. *J. Mass Spectrom.* <https://doi.org/10.1002/jms.4538>.
- [22] Adamowicz, P., Malczyk, A. (2019) Stability of synthetic cathinones in blood and urine. *Forensic Sci. Int.* 295, pp 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.12.001>.
- [23] Rojkiewicz, M., Kuś, P., Kusz, J., Książek, M. (2018). Spectroscopic and crystallographic characterization of two cathinone derivatives: 1-(4-fluorophenyl)-2-(methylamino)pentan-1-one (4-FPD) hydrochloride and 1-(4-methylphenyl)-2-(ethylamino)pentan-1-one (4-MEAP) hydrochloride. *Forensic Toxicol.* Vol. 36 (1), pp 141-150. <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0393-6>.
- [24] Feng, L. Y., Battulga, A., Han, E., Chung, H., Li, J.H. (2017). New psychoactive substances of natural origin: A brief review. *Journal of Food and Drug Analysis.* Elsevier Taiwan LLC. pp 461-471.
- [25] Foley, K. F., DeSanty, K.P., Kast, R. (2014). Bupropion: pharmacology and therapeutic applications. *Expert Reviews of Neurotherapeutics.* Taylor and Francis. Vol. 6(9), pp 1249-1265.
- [26] Foti, R. S., Dalvie, D. K. (2016). “Cytochrome P450 and non-Cytochrome P450 Oxidative Metabolism”. *Drug Metabolism and Disposition.* Vol. 44, pp 1229-1245.
- [27] Grillo, M. P. (2015). 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.
- [28] Roskar, R., Lusin, T. T. (2012). Analytical Methods for Quantification of Drug Metabolites in Biological Samples. *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis.*
- [29] Kalgutkar, A.S., Gardner, I., Obach, R.S., Shaffer, C.L., Callegari, E., Henne, K.R., Mutlib, A.E., Dalvie, D.K., Lee, J.S., Nakai, Y., O'Donnell, J.P., Boer, J. & Harriman, S.P. (2005). A Comprehensive Listing of Bioactivation Pathways of Organic Functional Groups”. *Current Drug Metabolism.* Vol. 6, pp 161-225.
- [30] Tyrkko, E., Andersson, M., Kronstrand, R. (2015). The toxicology of new psychoactive substances: Synthetic cathinones and phenylethylamines. *Ther Drug Monit.* Vol. 38, pp 190–216.
- [31] Golan, D. E., et al. (2009). Princípios de Farmacologia – A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia. 2ª Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Vol 2, pp 187-194.
- [32] Richardson, S. J., Bai, A., Kulkarni, A. A., et al. (2016). Efficiency in Drug Discovery: Liver S9 Fraction Assay As a Screen for Metabolic Stability. *Drug Metabolism Letters.* Vol. 10, pp 83-90.
- [33] Kelly, J. P. (2011). Cathinone derivatives: A review of their chemistry, pharmacology and toxicology. *Drug Test. Analysis.* Vol. 3, pp 439-453.
- [34] Uralets, V., Rana, S., Morgan, S., Ross, W. (2014). Testing for designer stimulants: metabolic profiles of 16 synthetic cathinones excreted free in human urine. *Journal of Analytical Toxicology.* Vol. 6, pp. 746-756.
- [35] Meyer, M. R., Du, P., Schuster, F., Maurer, H. H. (2010). Studies on the metabolism of the 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 Mass Spectrom.* Vol 45, pp 1426–1442.
- [36] Negreira, N., Erratico, C., Kosjek, T., van Nuijs, A. L. N., Heath, E., Neels, H., Covaci, A. (2015). In vitro phase i and phase ii metabolism of pyrrolidinovalerophenone (PVP), methylenedioxy-pyrovalerone (MDPV) and methedrone by human liver microsomes and human liver cytosol. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* Vol 407, pp 5803-5816.
- [37] Strano-Rossi, S., Cadwallader, A. B., de la Torre, X., Botre, F. (2010). Toxicological determination and in vitro metabolism of the designer drug methylenedioxy-pyrovalerone (MDPV) by gas

chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* Vol 24, pp 2706-2714.

[38] Springer, D., Fritschi, G., Maurer, H. H. (2003). Metabolism of the new designer drug alphapyrrolidinopropiophenone (PPP) and the toxicological detection of ppp and 4'-methyl-alphapyrrolidinopropiophenone (MPPP) studied in rat urine using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 796(2), pp 253-266.

[39] Shima, N., Katagi, M. (2014). Metabolism of the newly encountered designer drug - pyrrolidinovalerophenone in humans: identification and quantification of urinary metabolites. *Forensic Toxicology.* Vol 32, pp 59-67.

[40] Tyrkko, E., Pelander, A., Ketola, R. A., Ojanper, I. (2013). In silico and in vitro metabolism studies support identification of designer drugs in human urine by liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 405(21), pp 6697-709.

[41] Helfer, A. G., Turcant, A., Boels, D., Ferec, S. (2015). 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 standard screening approaches. *Drug Testing and Analysis.* 7(5), pp 368-375.

[42] Mueller, D. M., Rentsch, K. M. (2012). Generation of metabolites by an automated online metabolism method using human liver microsomes with subsequent identification by LC-MS and metabolism of 11 cathinones. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 402(6), pp 2141-2151.

[43] Pozo, O. J., Ibáñez, M., Sancho, J.V. M., Lahoz-Beneytez, J. (2015). Mass Spectrometric Evaluation of Mephedrone In Vivo Human Metabolism: Identification of Phase I and Phase II Metabolites, Including a Novel Succinyl Conjugate. *Drug testing and analysis.* Vol. 43, pp. 248-257.

[44] Meyer, M. R., Wilhelm, J., Peters, F. T., Maurer, H. H. (2010). 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. 45, pp 1426-1442.

[45] Pedersen, A., Reitzel, L., Johansen, S., Linnet, K. (2012). In vitro metabolism studies on mephedrone and analysis of forensic cases. *Drug Testing and Analysis.* Vol. 5, pp. 430-438.

[46] Wojcieszak, J., Kuczyńska, K., Zawilska, J.B. (2020). Four Synthetic Cathinones: 3-Chloromethcathinone, 4-Chloromethcathinone, 4-Fluoro- α -Pyrrolidinopentiophenone, and 4-Methoxy- α -Pyrrolidinopentiophenone Produce Changes in the Spontaneous Locomotor Activity and Motor Performance in Mice with Varied Profiles. *Neurotoxicity Research.* Springer. Vol. 38, pp 536-551.

[47] Shima, N., Katagi, M., Kamata, H., Matsuta, S., Sasaki, K., Kamata, T., Nishioka, H., Miki, A., Tatsuno, M., Zaitu, K., Ishii, A., Sato, T., Tsuchihashi, H., Suzuki, K. (2014). Metabolism of the newly encountered designer drug α -pyrrolidinovalerophenone in humans: identification and quantitation of urinary metabolites. *Forensic Toxicology.* Springer. Vol. 32, 59-67.

[48] Papaseit, E., Pérez-Maña, C., Mateus, J-A., Pujadas, M., Fonseca, F., Torrens, M., Olesti, E., de la Torre, R., Farré, M. (2016). Human Pharmacology of Mephedrone in Comparison with MDMA. *Neuropsychopharmacology.* Vol. 41, pp 2704-2713.

[49] Lopes, B.T., Caldeira, M.J., Gaspar, H. & Antunes, A.M.M. (2021). Metabolic Profile of Four Selected Cathinones in Microsome Incubations: Identification of Phase I and II Metabolites by Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry. *Frontiers in Chemistry.*

[50] Brandon, E. F., Raap, C. D., Meijerman, I., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. (2003). An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Elsevier Science.*

[51] Jamey, C., Kíntz, P., Martrille, L., Raul, J.S. (2016). Fatal Combination with 3-Methylmethcathinone (3-MMC) and Gamma-Hydroxybutyric Acid (GHB). *Journal of Analytical Toxicology.* Vol. 40, Issue 7, pp 546-552.

- [52] Decision 58/1 Inclusion of mephedrone (4-methylmethcathinone) in Schedule II of the Convention on Psychotropic Substances of 1971.
https://www.unodc.org/documents/commissions/CND/CND_Sessions/CND_58/2015_Desicions/Decision_58_1.pdf (consultado a 28 de julho de 2023).
- [53] Lei nº. 25/2021 - DRE <https://dre.pt/web/guest/home/-/dre/163092604/details/maximized> (consultado a 28 de julho de 2023).
- [54] Diretiva Delegada (UE) 2022/1326, da Comissão, de 18 de março de 2022.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022L1326&from=EN>
- [55] 3-MMC: Report on the risk assessment of 2-(methylamino)-1-(3-methylphenyl)propan-1-one (3-methylmethcathinone, 3-MMC) in accordance with Article 5c of Regulation (EC) No 1920/2006 (as amended). EMCDDA, 2022. <https://forensiclibrary.org/archives/14005>
- [56] Lei n.º 9/2023, de 03 de Março
https://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?artigo_id=3621A0001&nid=3621&tabela=leis&pagina=1&ficha=1&so_miolo=&nversao=
- [57] Busardò, F.P, Kyriakou, C., Napoletano, S., Marinelli, E., Zaami, S. (2015). Mephedrone related fatalities: a review. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. Vol. 19, pp 3777-3790. <https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/3777-3790.pdf>
- [58] Torrance, H., Cooper, G. (2010). The detection of mephedrone (4-methylmethcathinone) in 4 fatalities in Scotland. *Forensic Sci*. Vol. 202: e62-63.
- [59] Maskell, P.D., de Paoli, G., Seneviratne, C., Pounder, D.J. (2011). Mephedrone (4-methylmethcathinone)-related deaths. *J Anal Toxicol*. Vol. 35, pp 188-191.
- [60] Gerace, E., Petrarulo, M., Bison, F., Salomone, A., Vincenti, M. (2014). Toxicological findings in a fatal multidrug intoxication involving mephedrone. *Forensic Sci Int*. Vol. 243, pp 68-73.
- [61] Wikstrom, M., Thelander, G., Nystrom, I., Kronstrand, R. (2010). Two fatal intoxications with the new designer drug methedrone (4-methoxymethcathinone). *J Anal Toxicol*. Vol. 34, pp 594-598.
- [62] Cosbey, S.H., Peters, K.L., Quinn, A., Bentley, A. (2013). Mephedrone (methylmethcathinone) in toxicology casework: a Northern Ireland perspective. *J Anal Toxicol*. Vol. 37, pp 74-82.
- [63] Adamowicz, P., Tokarczyk, B., Stanaszek, R., Slopianka, M. (2013). Fatal mephedrone intoxication-a case report. *J Anal Toxicol*. Vol. 37, pp 37-42.
- [64] Critical review report: 3-Methylmethcathinone (3-MMC). Expert Committee on Drug Dependence. World Health Organization. 2022.
- [65] Rojek et al. citado em Jamey, C., Kintz, P., Raul, J-S., Martrille, L. (2016) Fatal combination with 3-methylmethcathinone (3-MMC) and gamma-hydroxybutyric acid (GHB). *J Anal Toxicol*. 40(7), pp 546-52. doi: 10.1093/jat/bkw058.
- [66] Bottinelli C, Gaillard Y, Fanton L, Bévalot F (2016) À propos de deux décès par intoxication impliquant la 3-MMC. *Toxicologie Analytique et Clinique* 28(2):S25.
- [67] Olesti, E., Farre, M., Papaseit, E., Krotonoulas, A., Pujadas, M., de la Torre, R., Pozo, O. J. (2017). Pharmacokinetics of mephedrone and its metabolites in human by LC-MS/MS. *The AAPS Journal*.
- [68] Linhart, I., Himla, M., Židkováb, M., Balíkováb, M., Lhotkovác, E., Páleníček, T. (2016). Metabolic profile of mephedrone: Identification of nor-mephedrone conjugates with dicarboxylic acids as a new type of xenobiotic phase II metabolites. *Toxicology Letters*. Vol. 240, pp 114-121.
- [69] Khreit, O. I., Grant, M. H., Zhanga, T., Hendersonb C., Watsona, D. G., Sutcliffe, O. B. (2013). 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. *J. Pharm. Biomed. Anal*. Vol. 72, pp 177-185.

- [70] Frison, G., Frasson, S., Zancanaro, F., Tedeschi, G., Zamengo, L. (2016) Detection of 3-methylmethcathinone and its metabolites 3-methylephedrine and 3-methylnorephedrine in pubic hair samples by liquid chromatography-high resolution/high accuracy Orbitrap mass spectrometry. *Forensic Science International*. Vol. 265, 131–137.
- [71] Armarego, W. L. F., Chai, C. (2009). *Purification of Laboratory Chemicals*; Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-26589-5>.
- [72] Clayden, J. (2012). *Organic chemistry*. 2ª edição. Oxford: Oxford University Press.
- [73] Júlio, S. Identificação, Síntese e Quantificação de Novas Substâncias Psicoativas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. 2019.
- [74] Oliveira, C. Síntese de Catinonas Psicoativas e Avaliação da sua Hepatotoxicidade. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 2017.
- [75] Meltzer, P. C.; Butler, D.; Deschamps, J. R.; Madras, B. K. (2006). 1-(4-Methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (pyrovalerone) analogues: A promising class of monoamine uptake inhibitors. *J. Med. Chem.* 49 (4), 1420–1432. <https://doi.org/10.1021/jm050797a>.
- [76] Bruice, P. (2017). *Organic Chemistry*. 8ª edição. Upper Saddle River, NJ, EUA: Pearson Education.
- [77] Smith, M.; March, J. (2007). *March's Advanced Organic Chemistry*. Hoboken, NJ, EUA: John Wiley & Sons, Inc..
- [78] Santos, P. (2014). *Química Orgânica - Volume 1*. 2ª edição. Instituto Superior Técnico: IST 91 Press.
- [79] Sequeira, M.. Identificação e Quantificação de Novas Substâncias Psicoativas em Material Apreendido em Portugal. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 2018.
- [80] McDermott, S. D.; Power, J. D.; Kavanagh, P.; O'Brien, J. The analysis of substituted cathinones. Part 2: An investigation into the phenylacetone based isomers of 4-methylmethcathinone and Nethylcathinone. *Forensic Sci. Int.* 2011, 212 (1–3), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.06.030>.
- [81] Pozo, O.J., Marcos, J., Mtabosch, X., Ventura, R., Segura, J. (2012). Using complementary mass spectrometric approaches for the determination of methylprednisolone metabolites in human urine. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 26, pp 541-553.
- [82] Santali, E. Y., Cadogan, A. K., Daeid, N. N., Savage, K. A., Sutcliffe, O. B. (2011). Synthesis, full chemical characterisation and development of validated methods for the quantification of (±)-4'-methylmethcathinone (mephedrone): A new «legal high». *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2), 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.05.022>
- [83] Cuimei, L., Wei, J., Tao, L., Zhendong, H., Zhenhua, Qian. Identification and analytical characterization of nine synthetic cathinone derivatives N-ethylhexedrone, 4-Cl-pentadron, 4-Cl- α -EAPP, propylone, N-ethylnorpentylone, 6-MeO-bk-MDMA, α -PiHP, 4-Cl- α -PHP, and 4-F- α -PHP. doi.org/10.1002/dta.2136

6

Anexos

Anexo 6.1: Espectros de RMN das cetonas: 3'-metilpropiofenona (1) e 4'-metilpropiofenona (2)

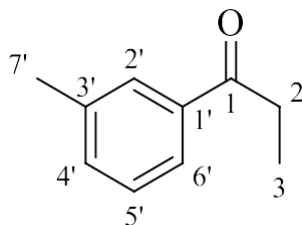


Figura 6.1: Estrutura química da 3'-metilpropiofenona (1)

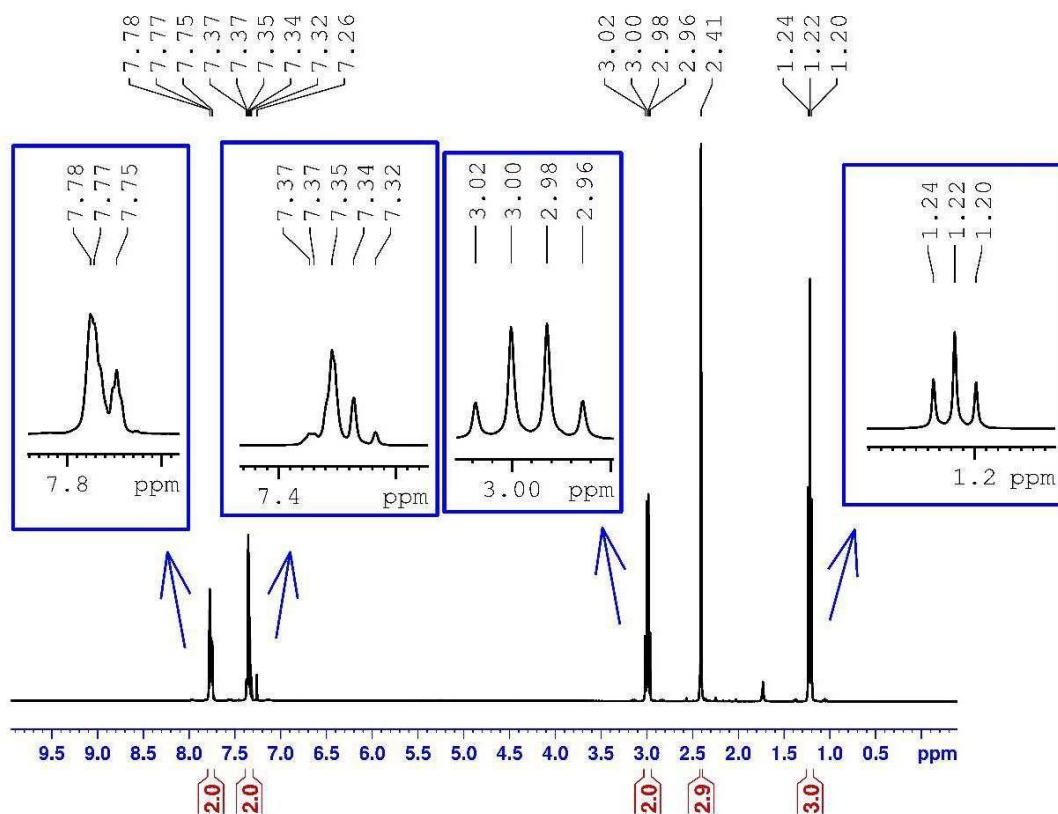


Figura 6.2: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da 3'-metilpropiofenona (1).

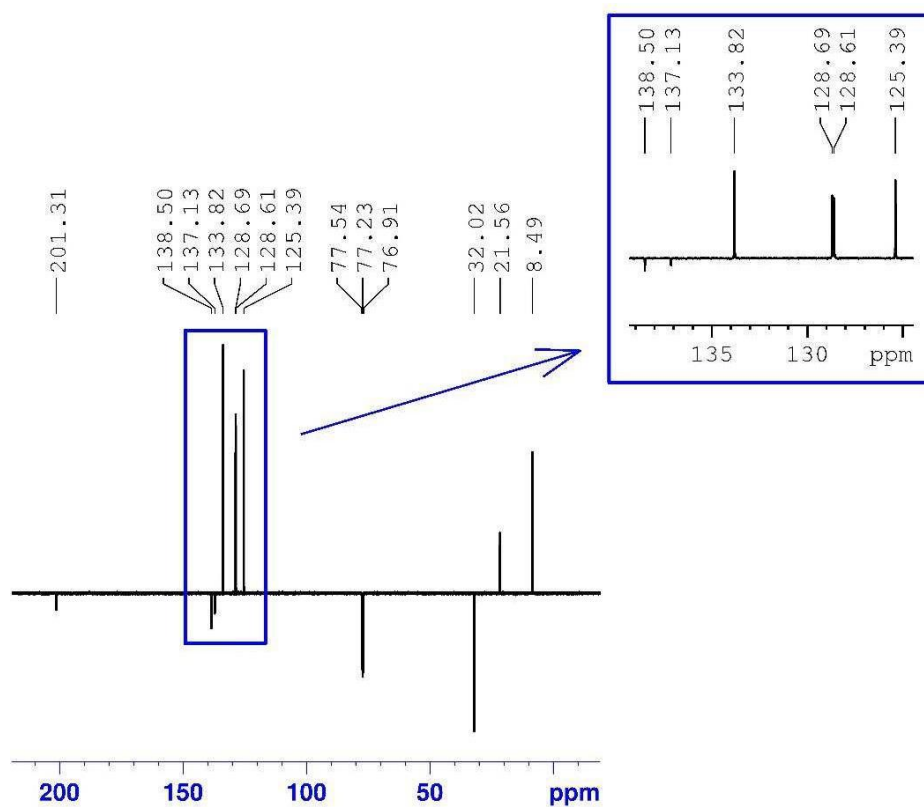


Figura 6.3: Espectro de RMN de ^{13}C , em CDCl_3 , da 3'-metilpropiofenona (**1**).

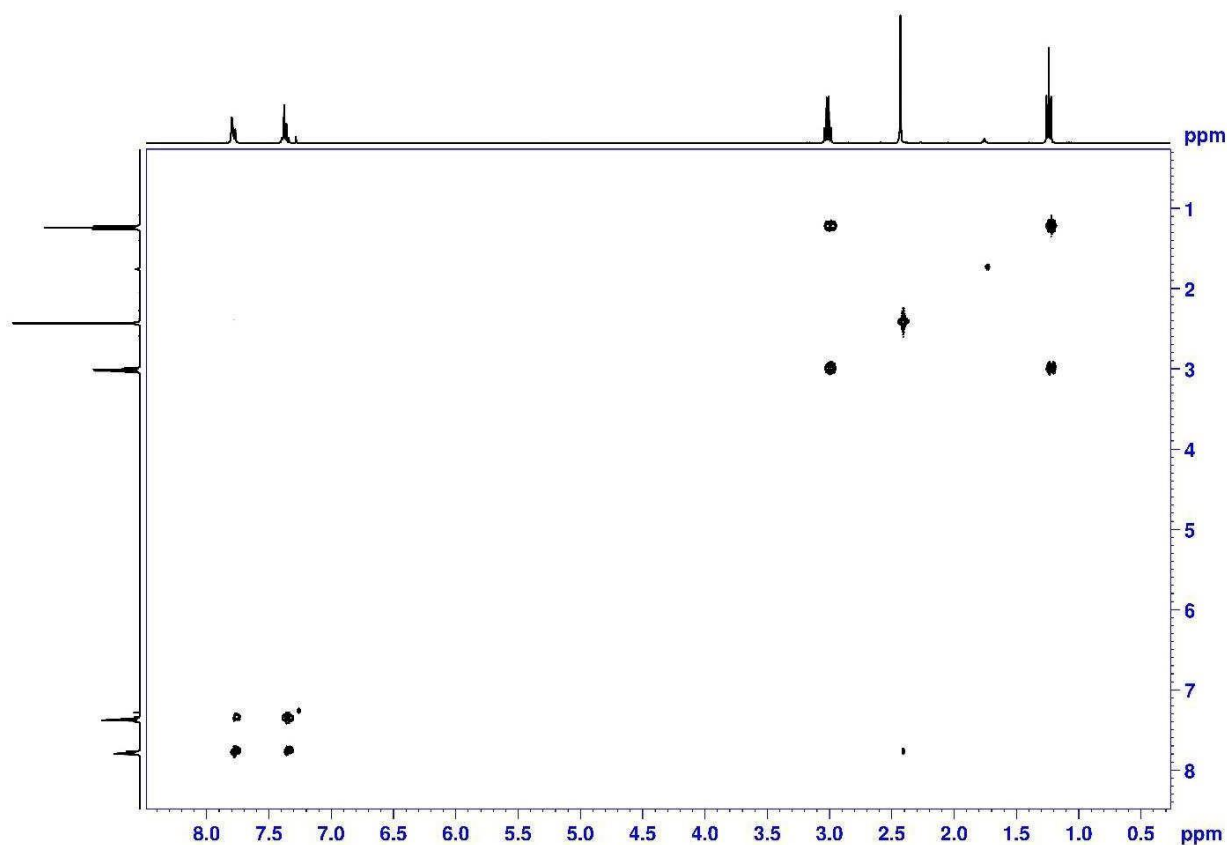


Figura 6.4: Espectro de COSY, em CDCl_3 , da 3'-metilpropiofenona (**1**).

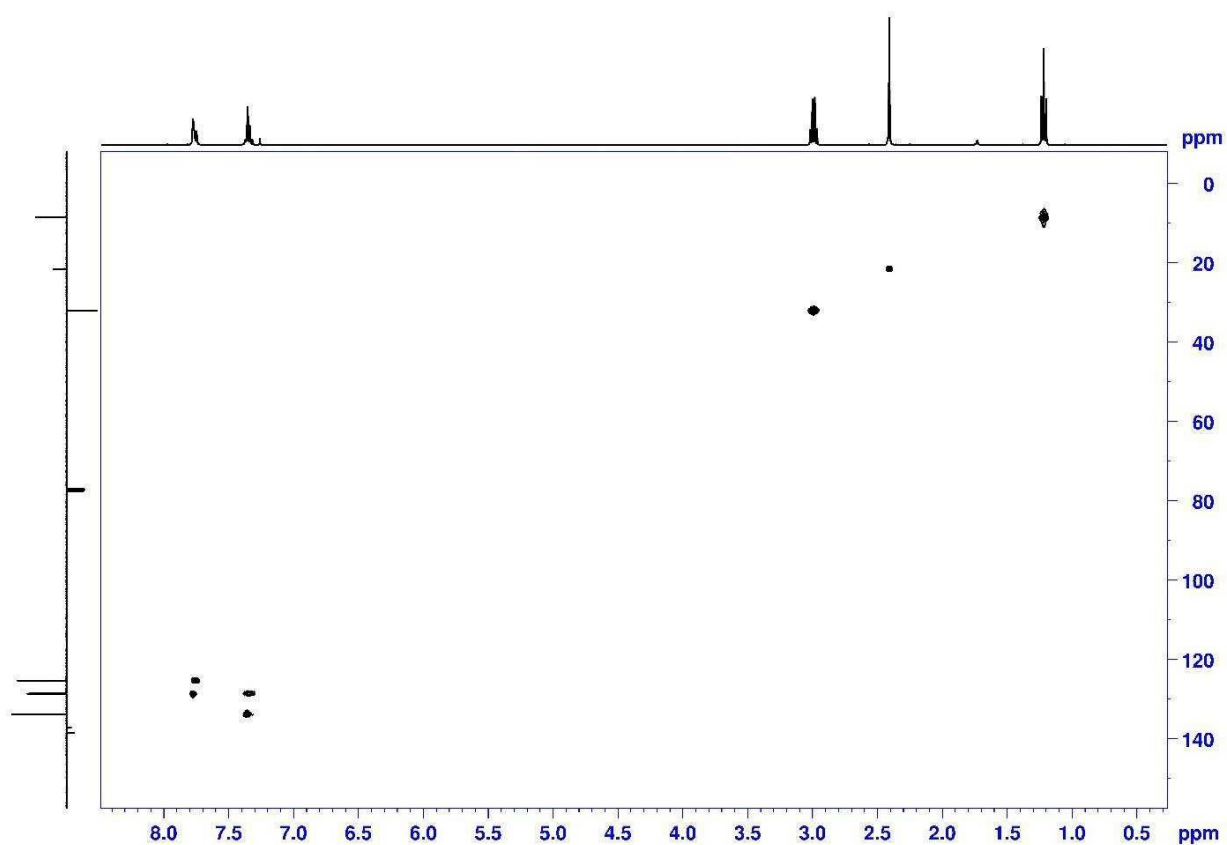


Figura 6.5: Espectro de HSQC, em CDCl_3 , da 3'-metilpropiofenona (**1**).

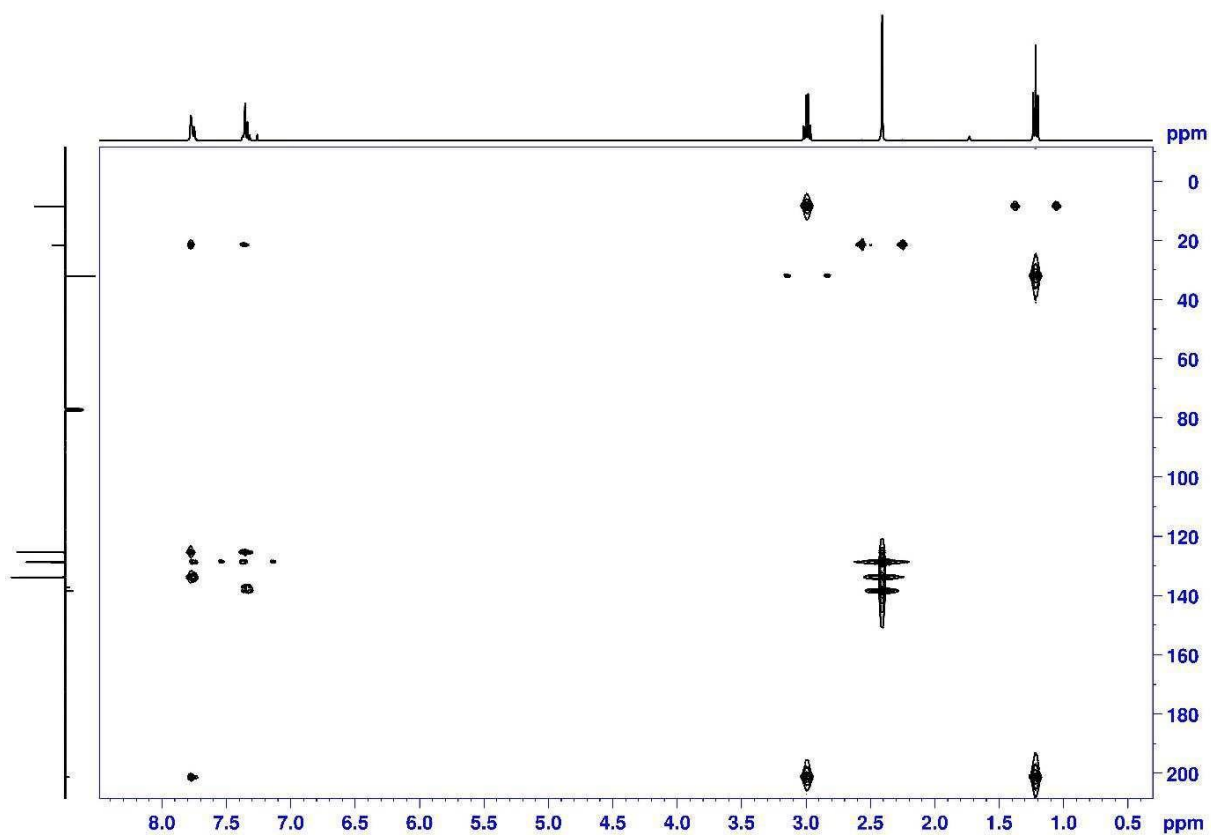


Figura 6.6: Espectro de HMBC, em CDCl_3 , da 3'-metilpropiofenona (**1**).

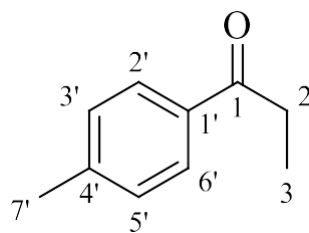


Figura 6.7: Estrutura química da 4'-metilpropiofenona (2)

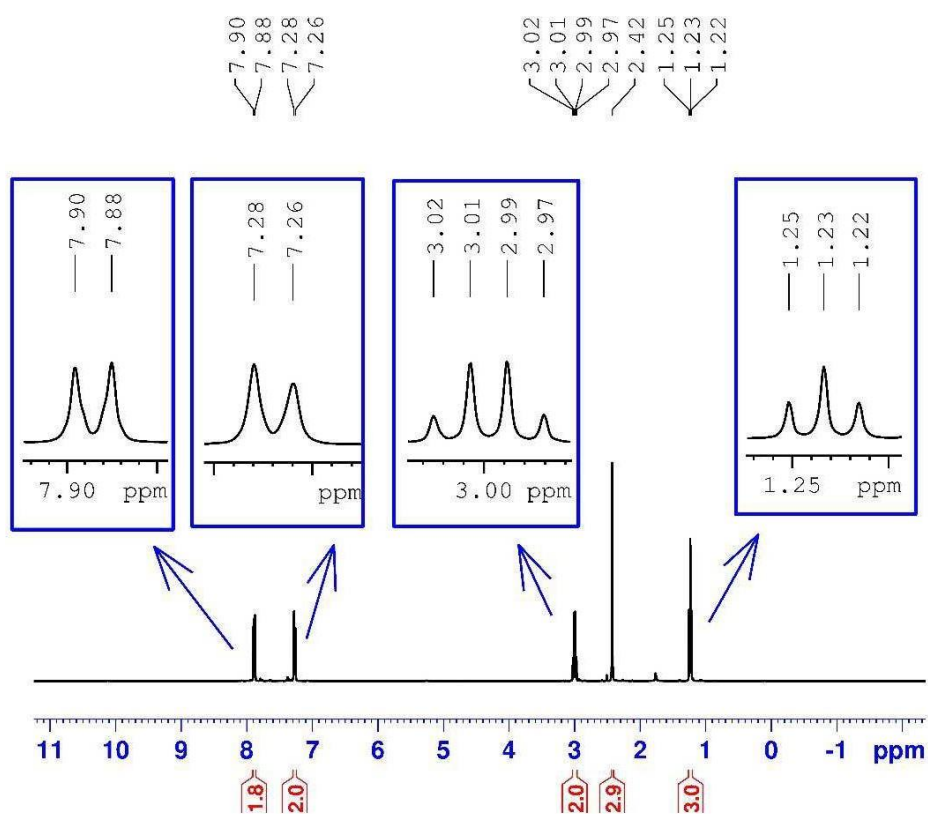


Figura 6.8: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da 4'-metilpropiofenona (2).

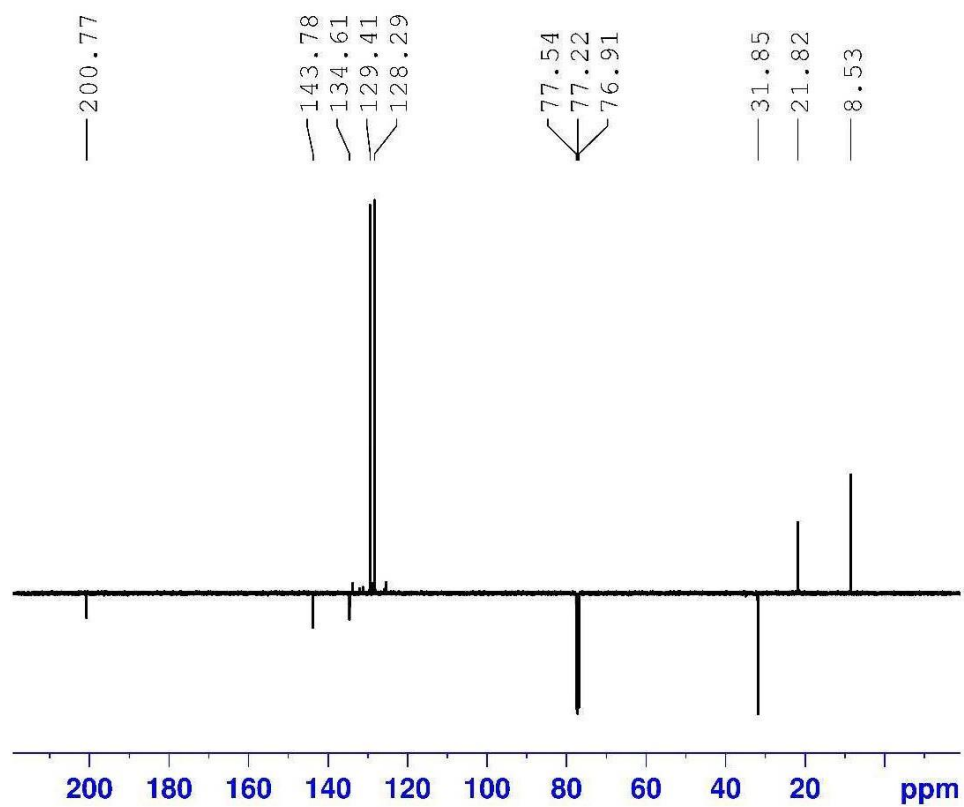


Figura 6.9: Espectro de RMN de ^{13}C , em CDCl_3 , da 4'-metilpropiofenona (2).

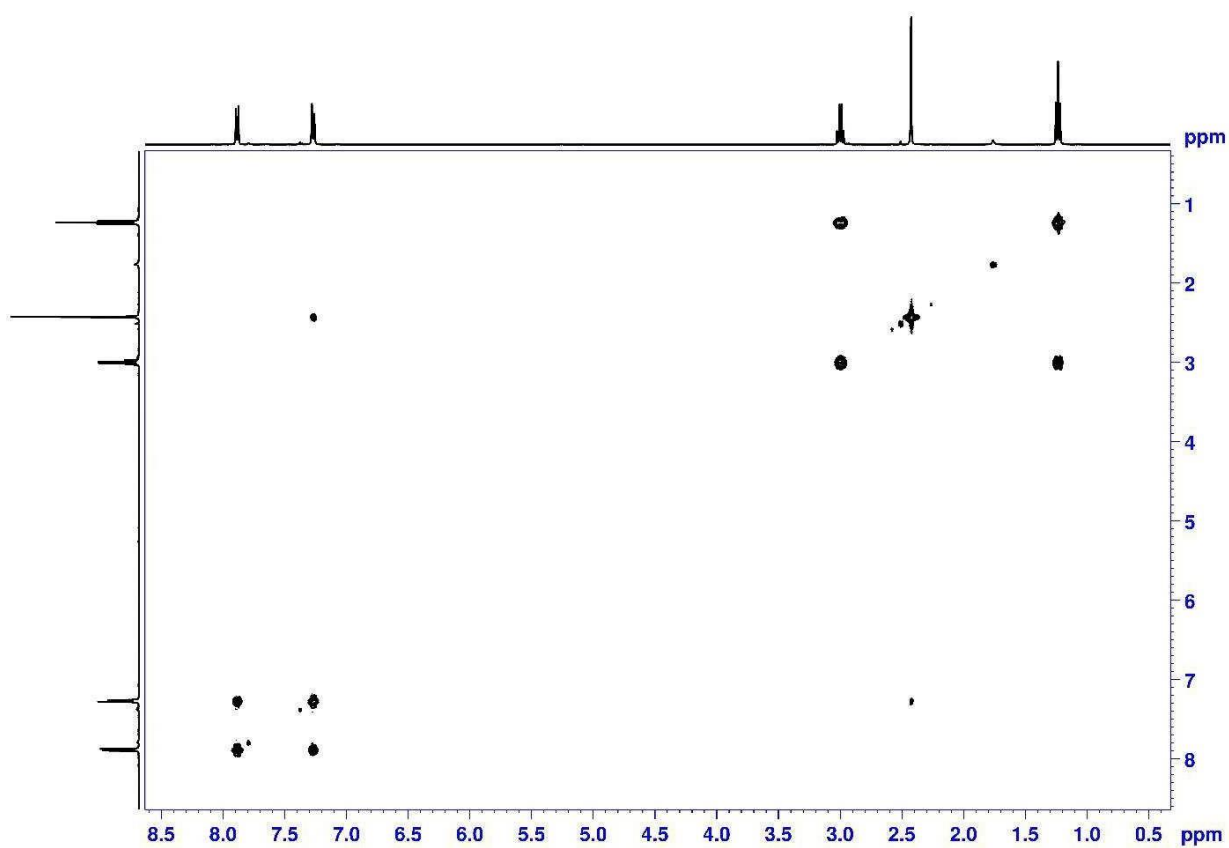


Figura 6.10: Espectro de COSY, em CDCl_3 , da 4'-metilpropiofenona (2).

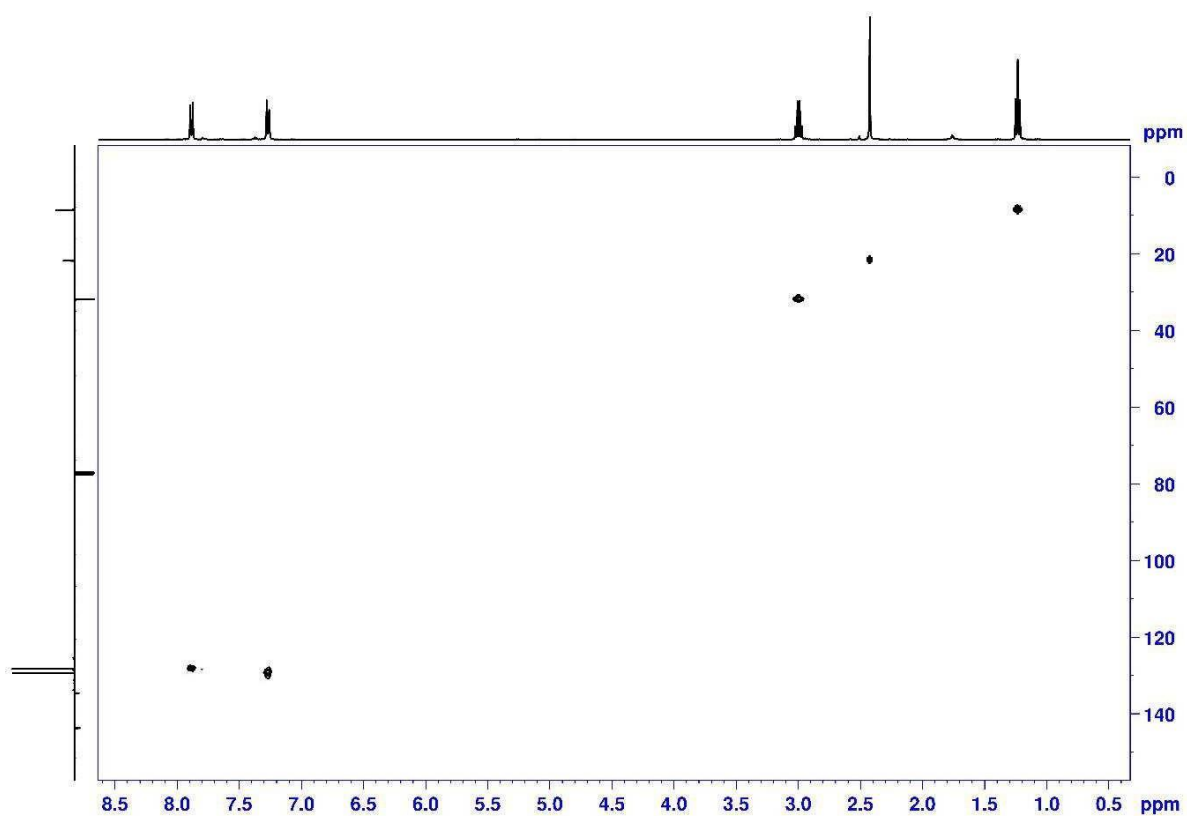


Figura 6.11: Espectro de HSQC, em CDCl_3 , da 4'-metilpropiofenona (2).

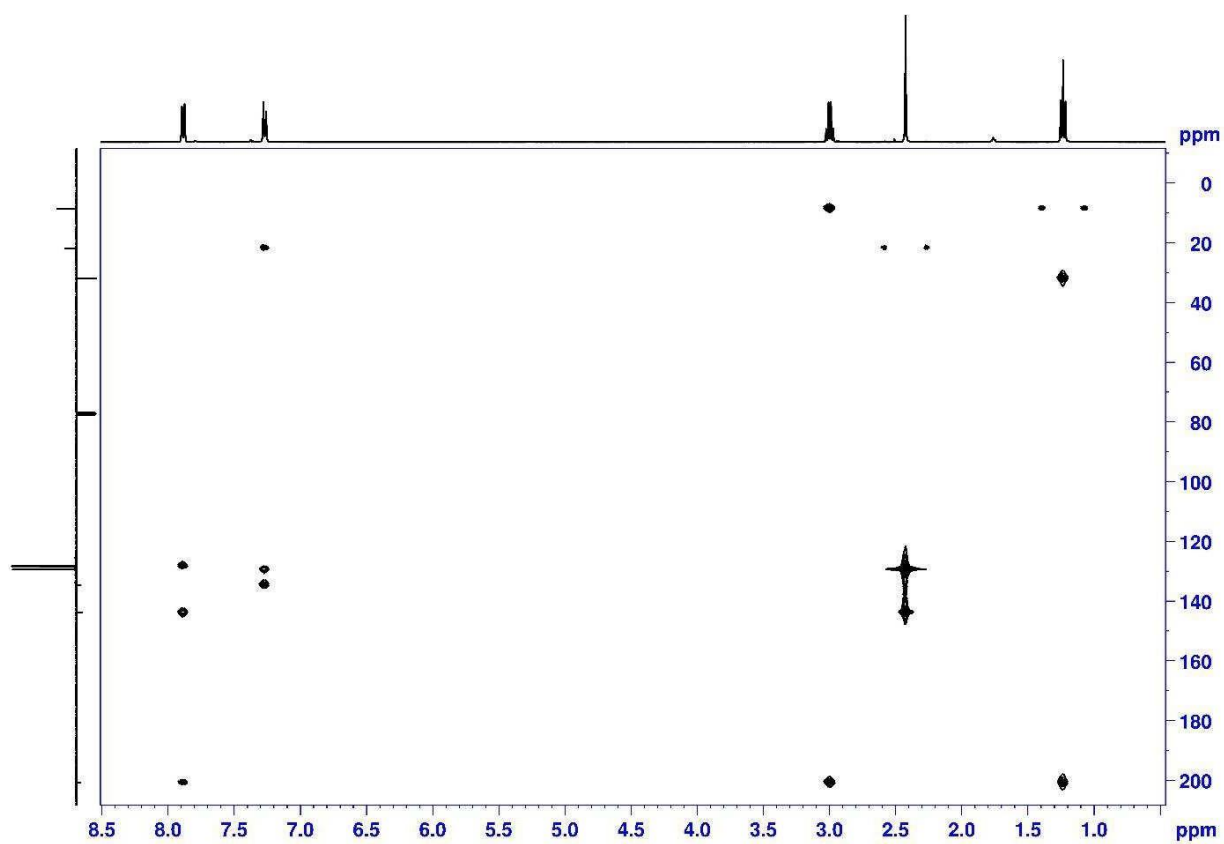


Figura 6.12: Espectro de HMBC, em CDCl_3 , da 4'-metilpropiofenona (2).

Anexo 6.2: Espectros de RMN das α -bromocetonas 3'-metil-2-bromo-propiofenona (3) e 4'-metil-2-bromopropiofenona (4)

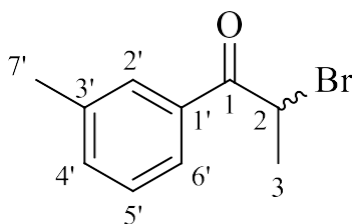


Figura 6.13: Estrutura química da 3'-metil-2-bromo-propiofenona (3).

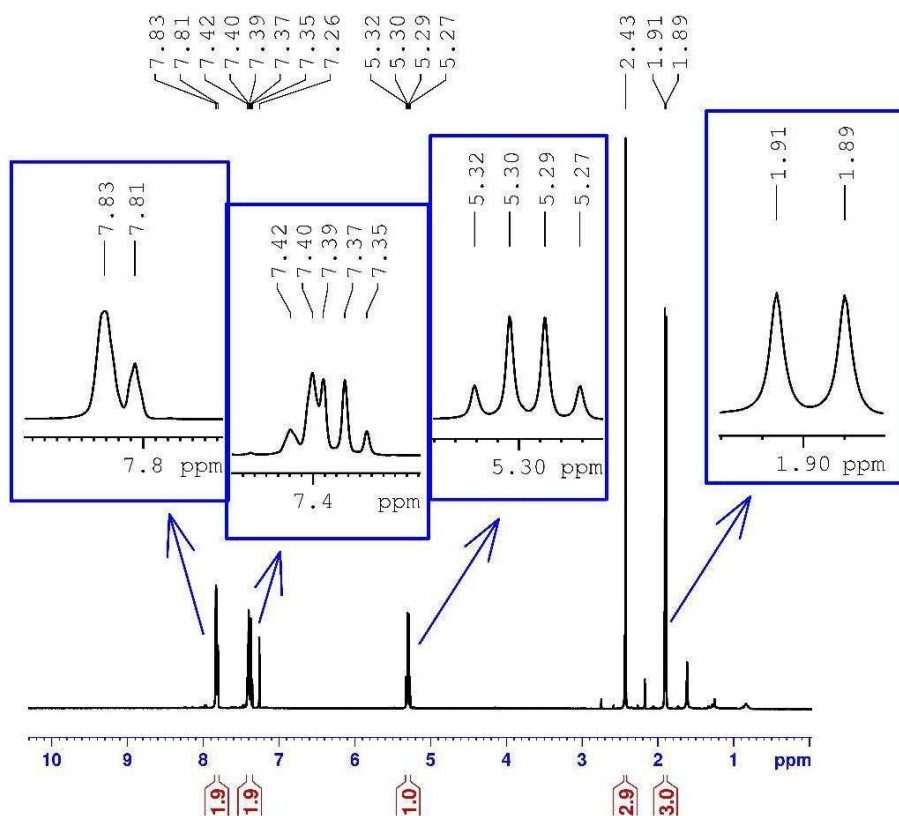


Figura 6.14: Espectro de RMN de ¹H, em CDCl₃, da 3'-metil-2-bromo-propiofenona (3).

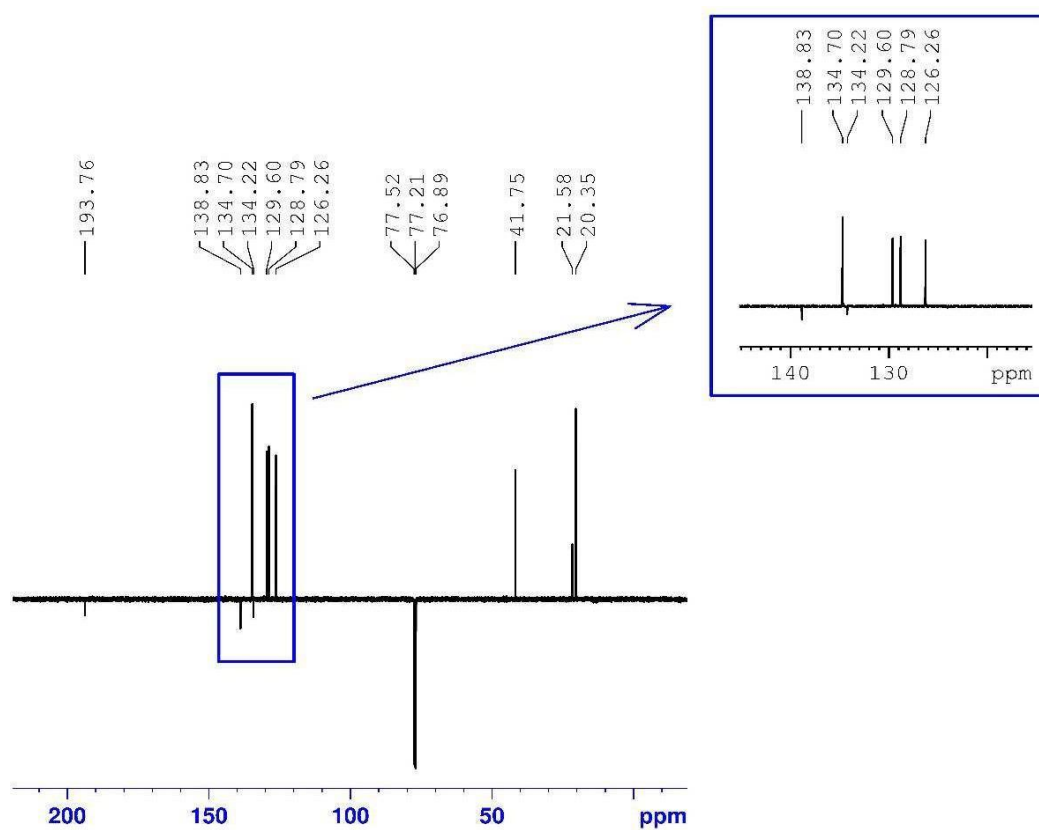


Figura 6.15: Espectro de RMN de ^{13}C , em CDCl_3 , da 3'-metil-2-bromo-propiofenona (**3**).

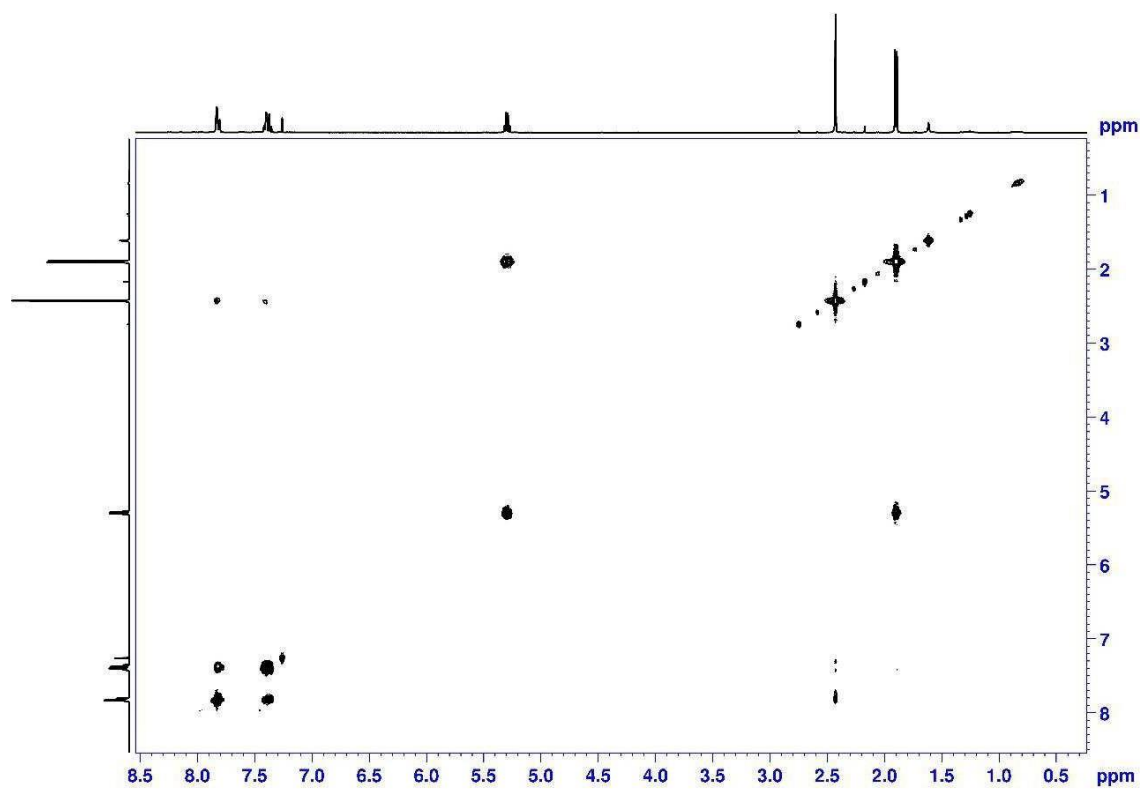


Figura 6.16: Espectro de COSY, em CDCl_3 , da 3'-metil-2-bromo-propiofenona (**3**).

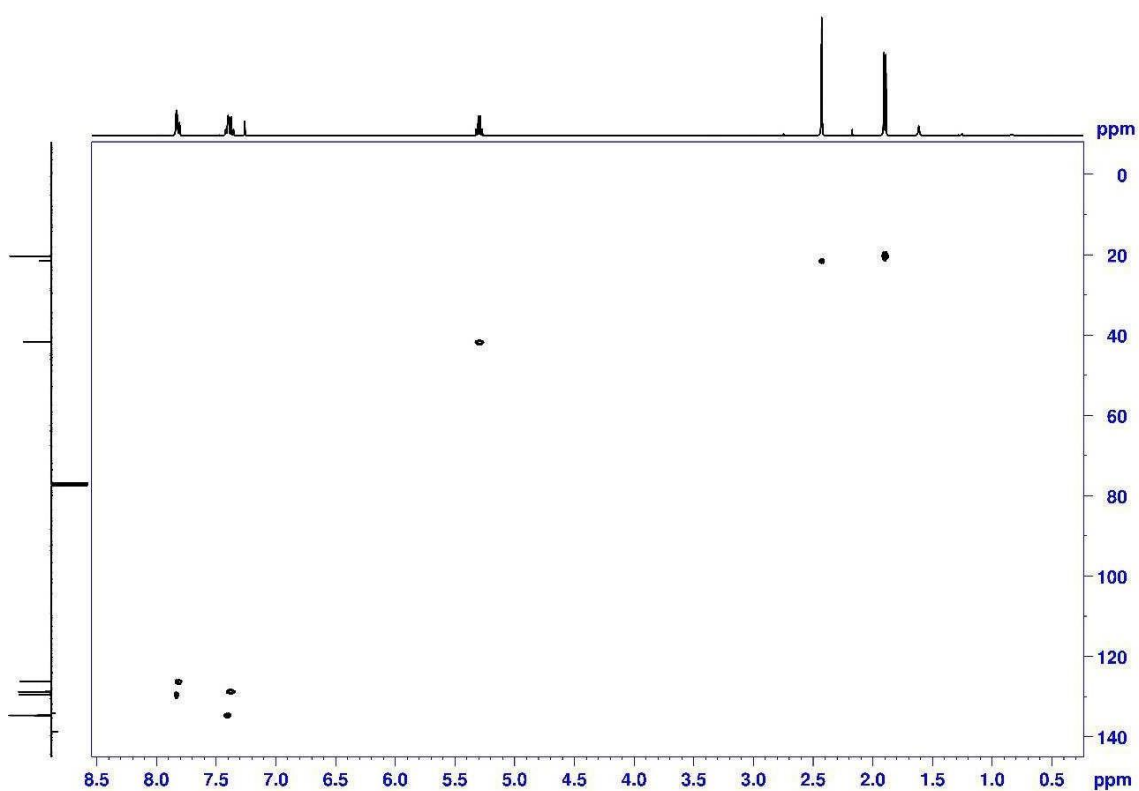


Figura 6.17: Espectro de HSQC, em CDCl_3 , da 3'-metil-2-bromo-propiofenona (3).

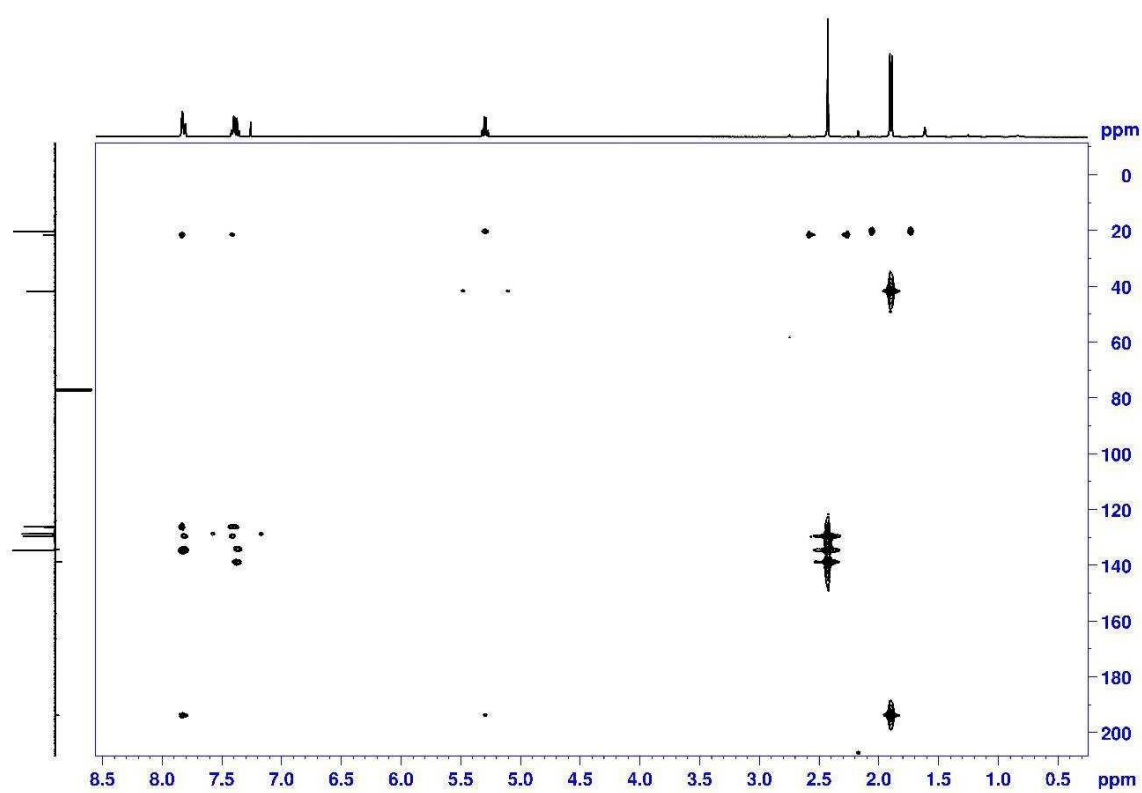


Figura 6.18: Espectro de HMBC, em CDCl_3 , da 3'-metil-2-bromo-propiofenona (3).

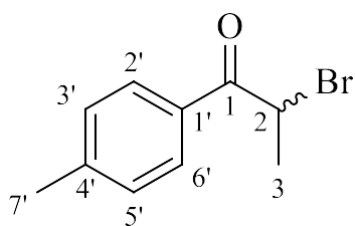


Figura 6.19: Estrutura química da 4'-metil-2-bromo-propiofenona (4).

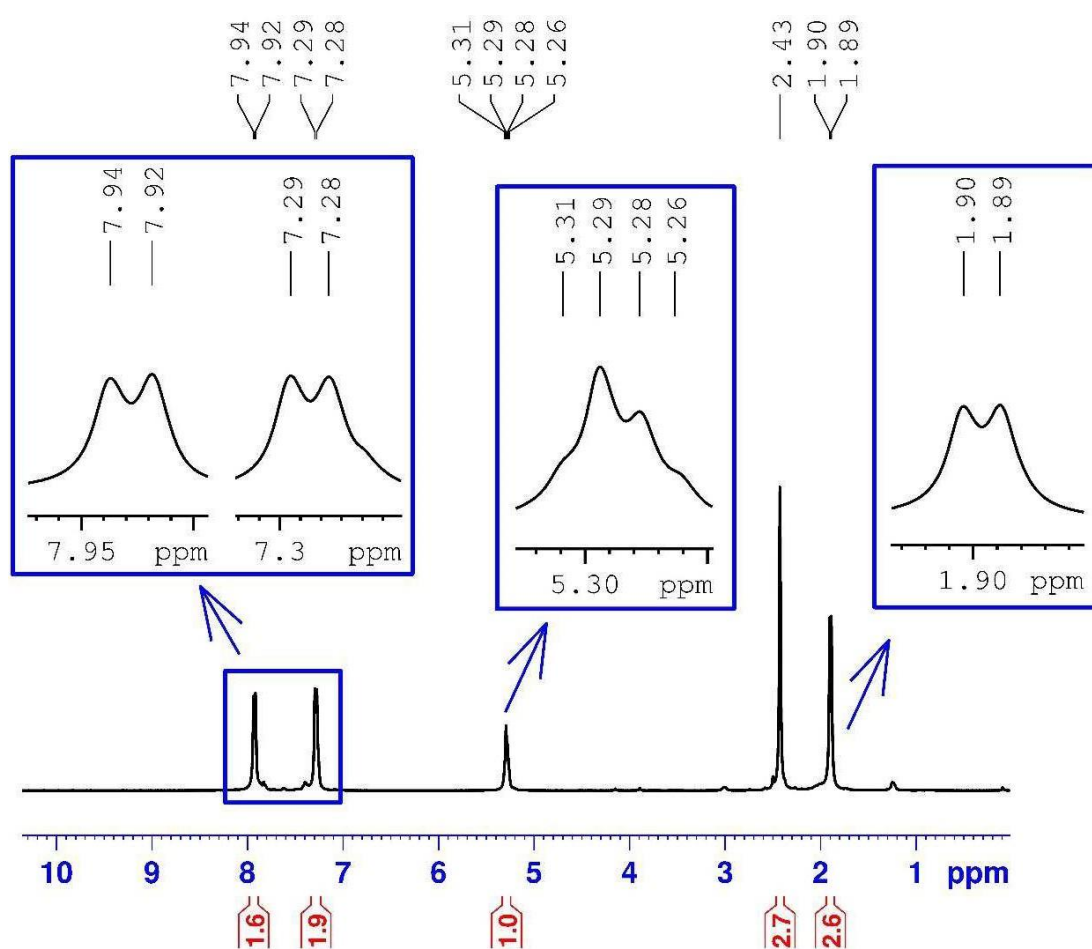


Figura 6.20: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da 4'-metil-2-bromo-propiofenona (4).

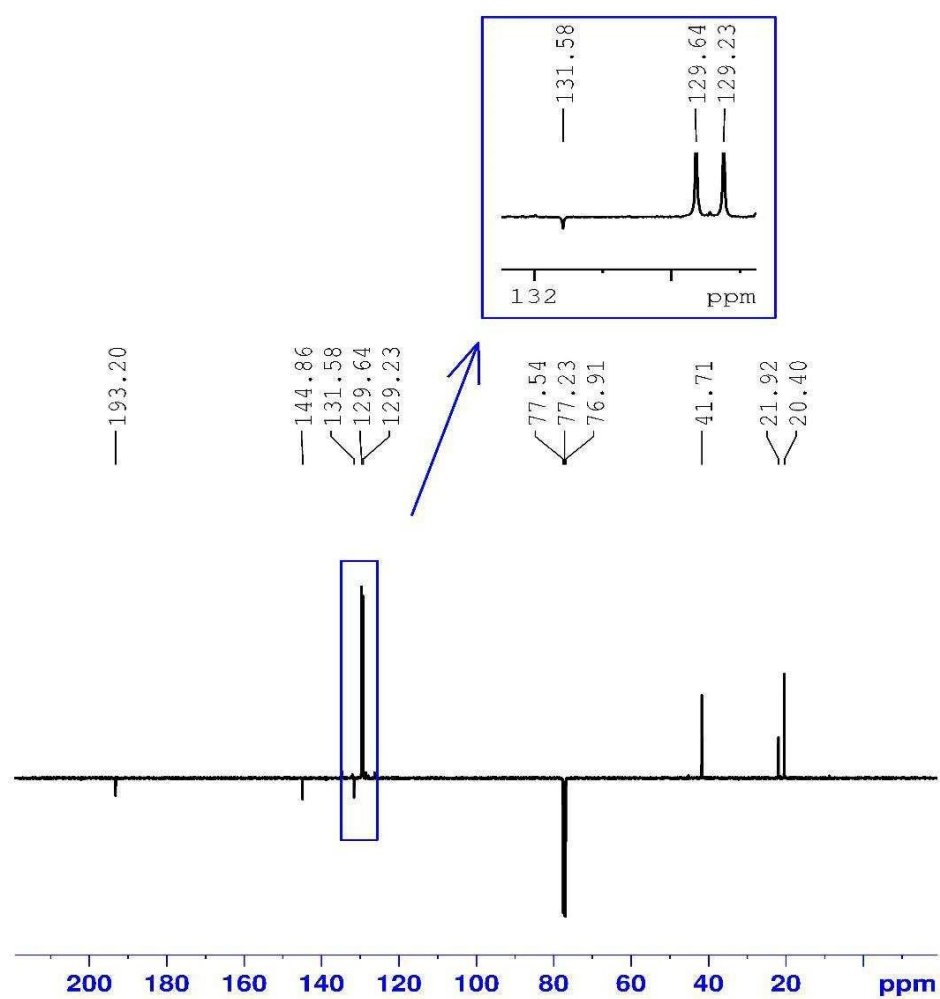


Figura 6.21: Espectro de RMN de ^{13}C , em CDCl_3 , da 4'-metil-2-bromo-propiofenona (4).

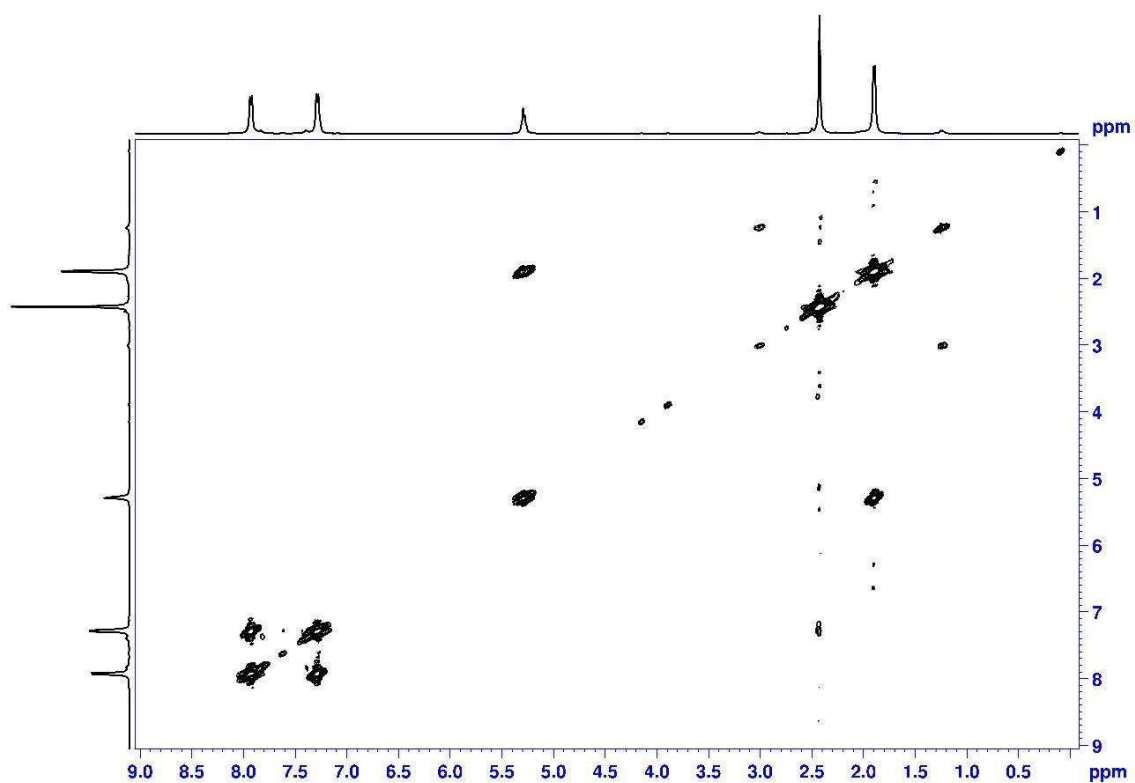


Figura 6.22: Espectro de COSY, em CDCl_3 , da 4'-metil-2-bromo-propiofenona (**4**).

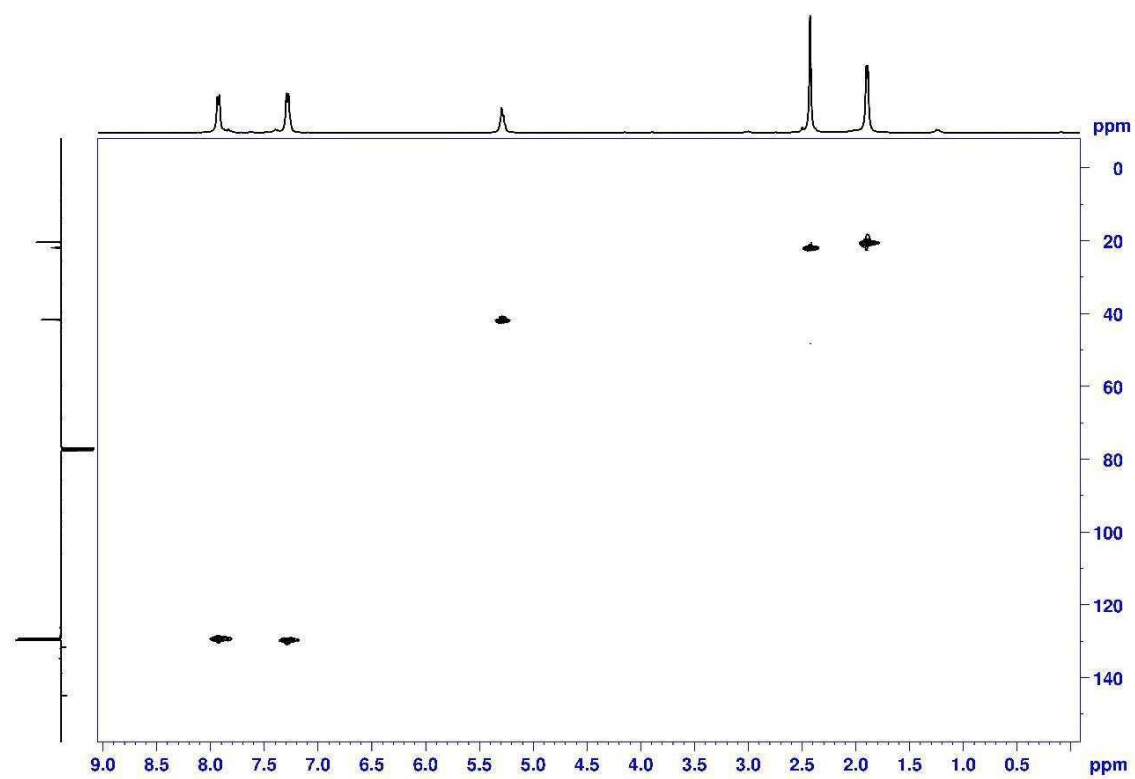


Figura 6.23: Espectro de HSQC, em CDCl_3 , da 4'-metil-2-bromo-propiofenona (**4**).

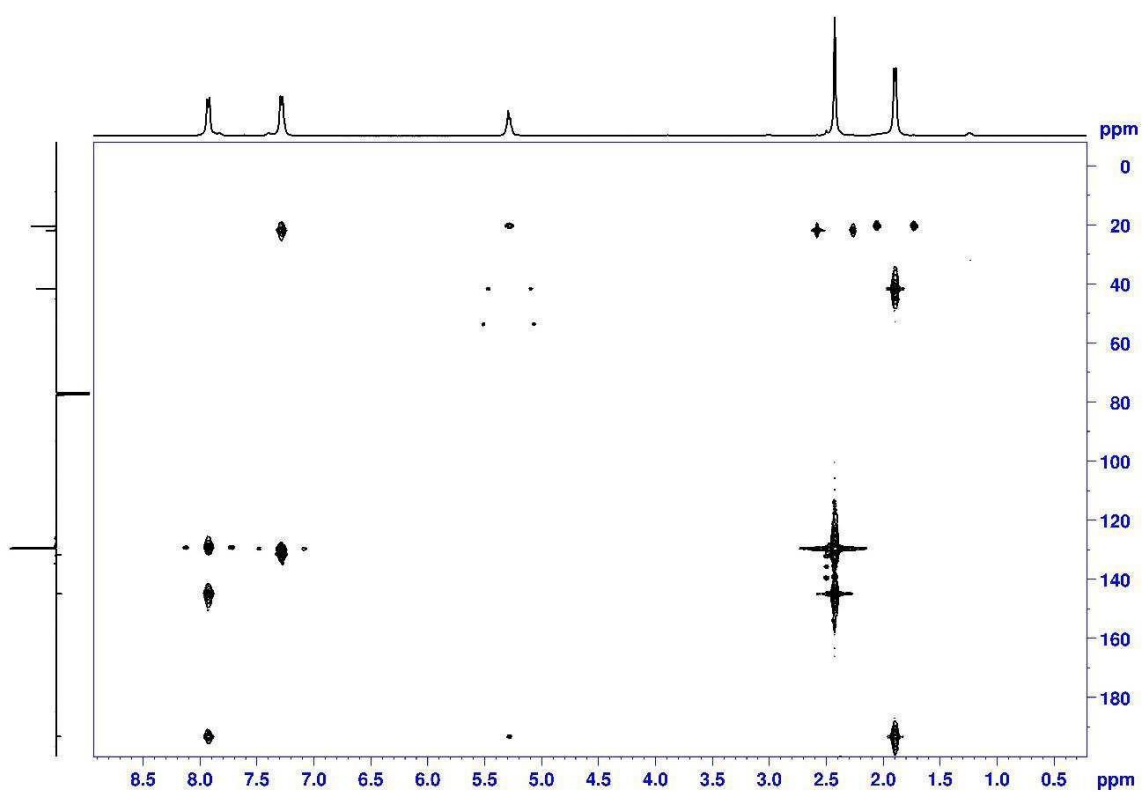


Figura 6.24: Espectro de HMBC, em CDCl₃, da 4'-metil-2-bromo-propiofenona (4).

Anexo 6.3: Espectros de RMN das catinonas protonadas 3'-MMC (7) e 4'-MMC (8)

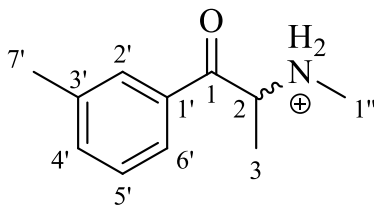


Figura 6.25: Estrutura química da 3'-MMC (7).

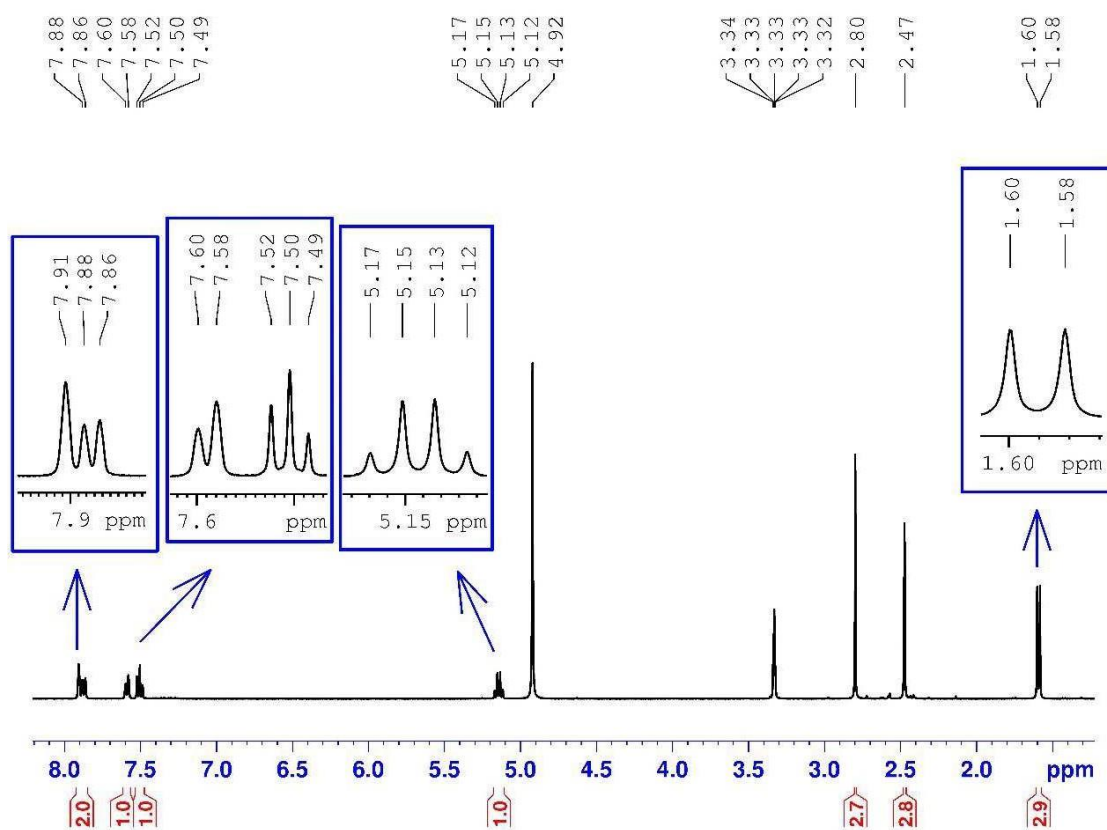


Figura 6.26: Espectro de RMN de ^1H , em CD_3OD , da 3'-MMC (7).

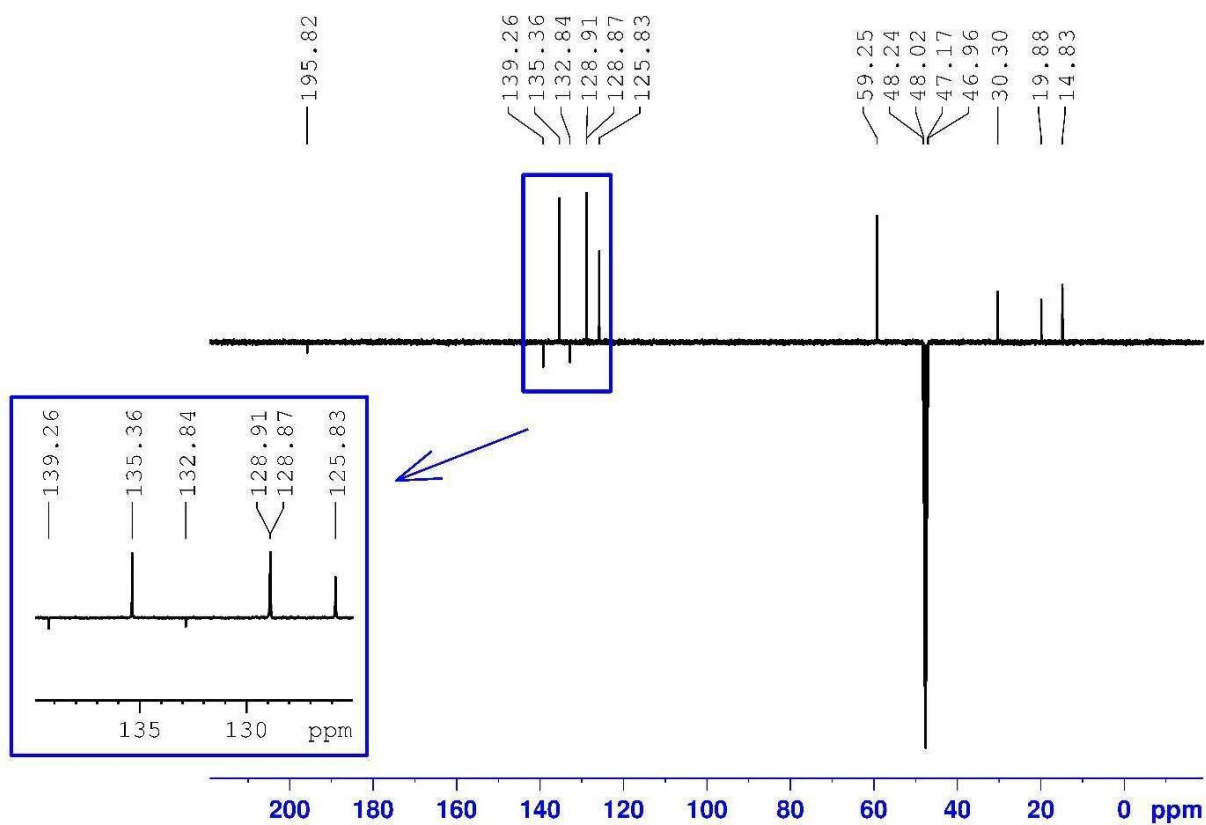


Figura 6.27: Espectro de RMN de ^{13}C , em CD_3OD , da 4'-metil-2-bromo-propiofenona (4).

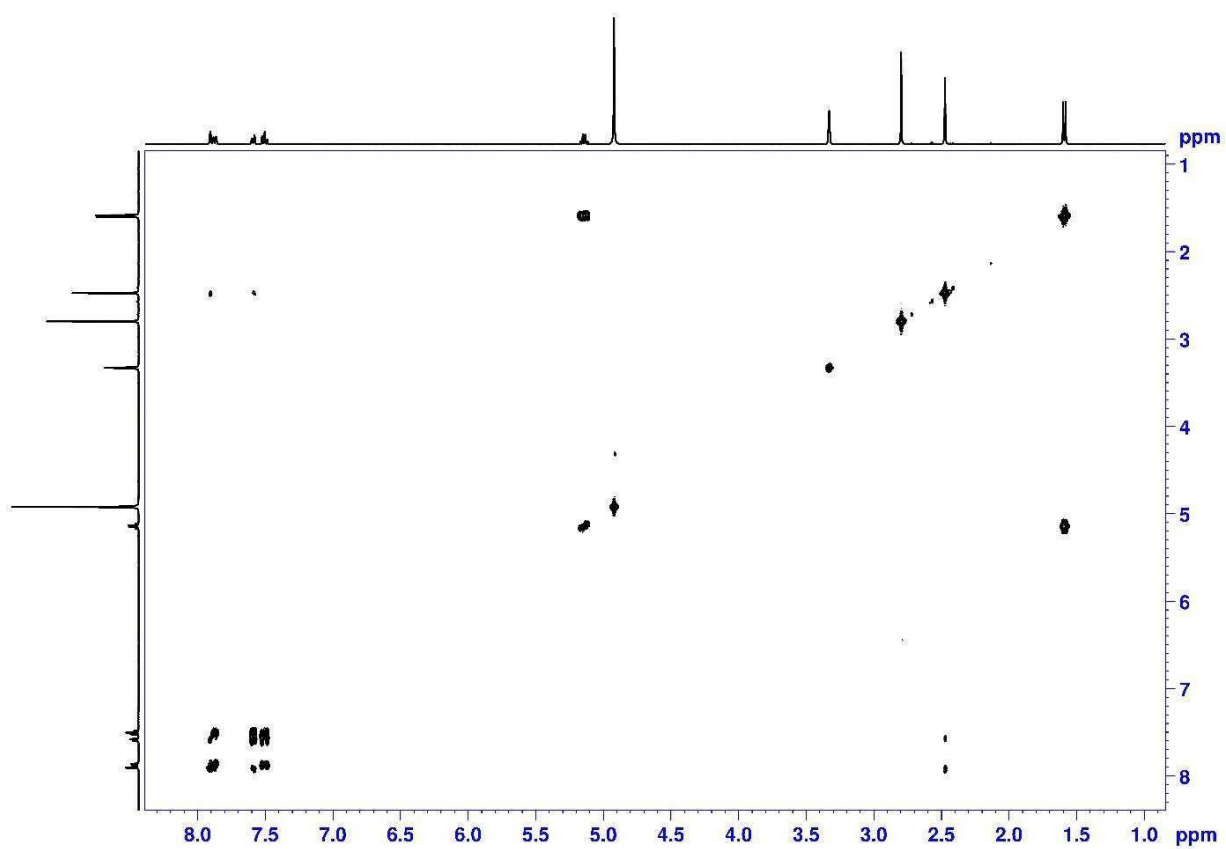


Figura 6.28: Espectro de COSY, em CD_3OD , da 3'-MMC (7).

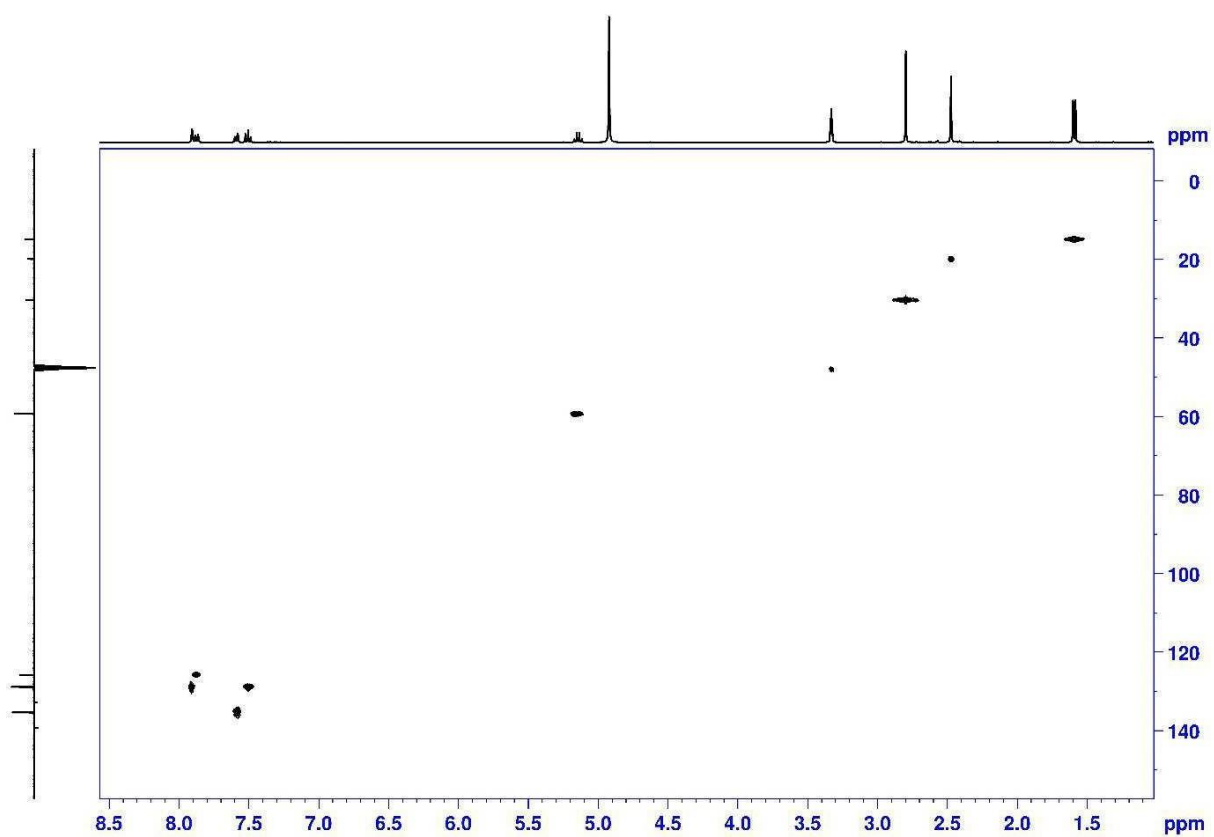


Figura 6.29: Espectro de HSQC, em CD_3OD , da 3'-MMC (7).

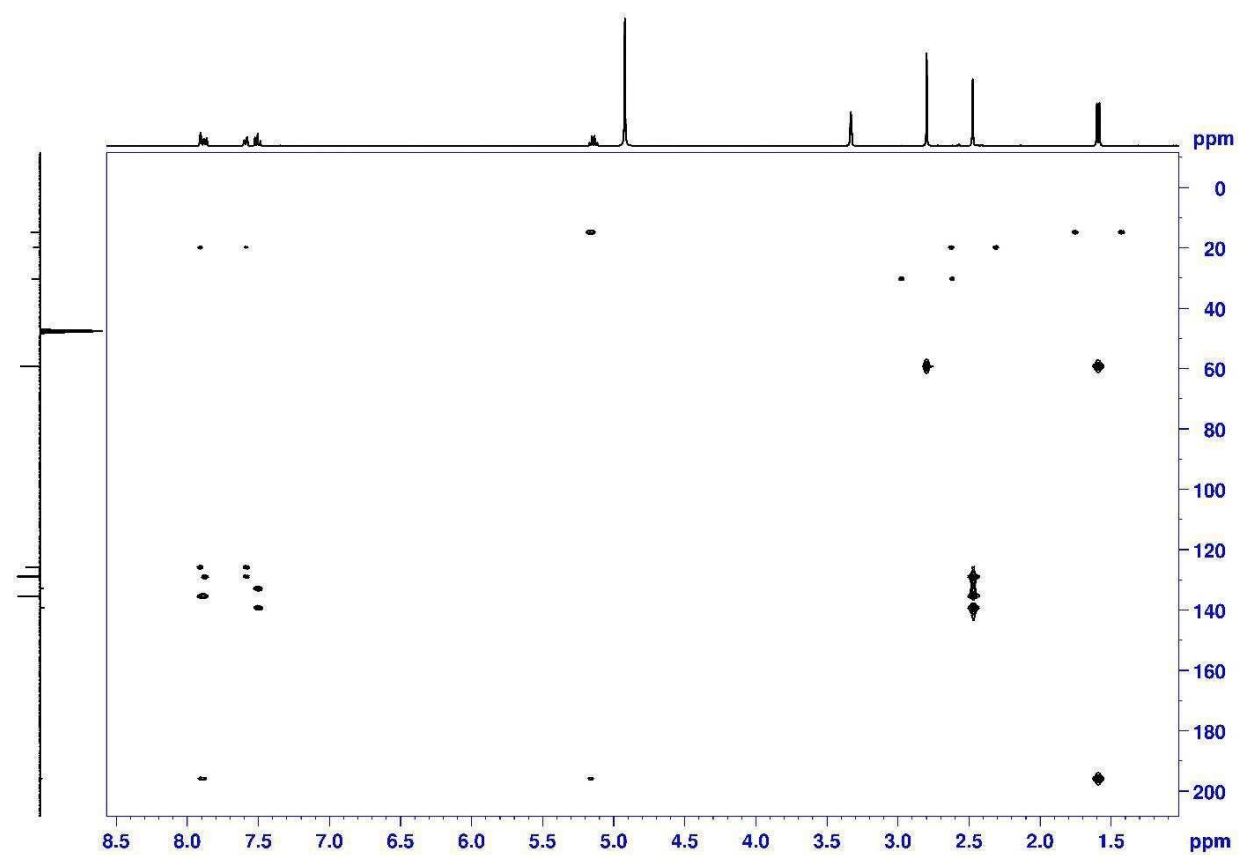


Figura 6.30: Espectro de HMBC, em CD_3OD , da 3'-MMC (7).

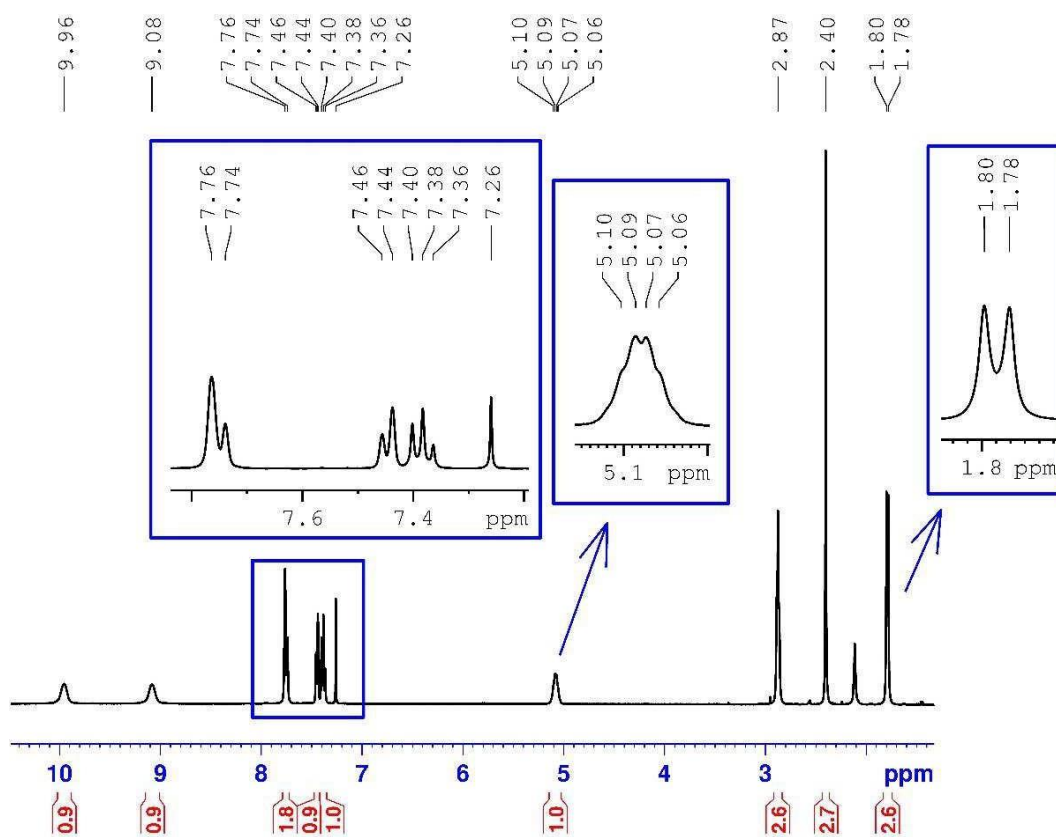


Figura 6.31: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da 3'-MMC (7).

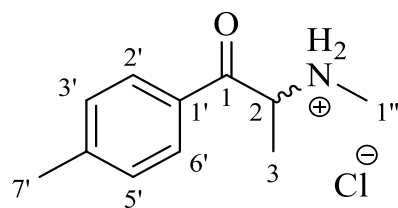


Figura 6.32: Estrutura química da 4'-MMC (**8**).

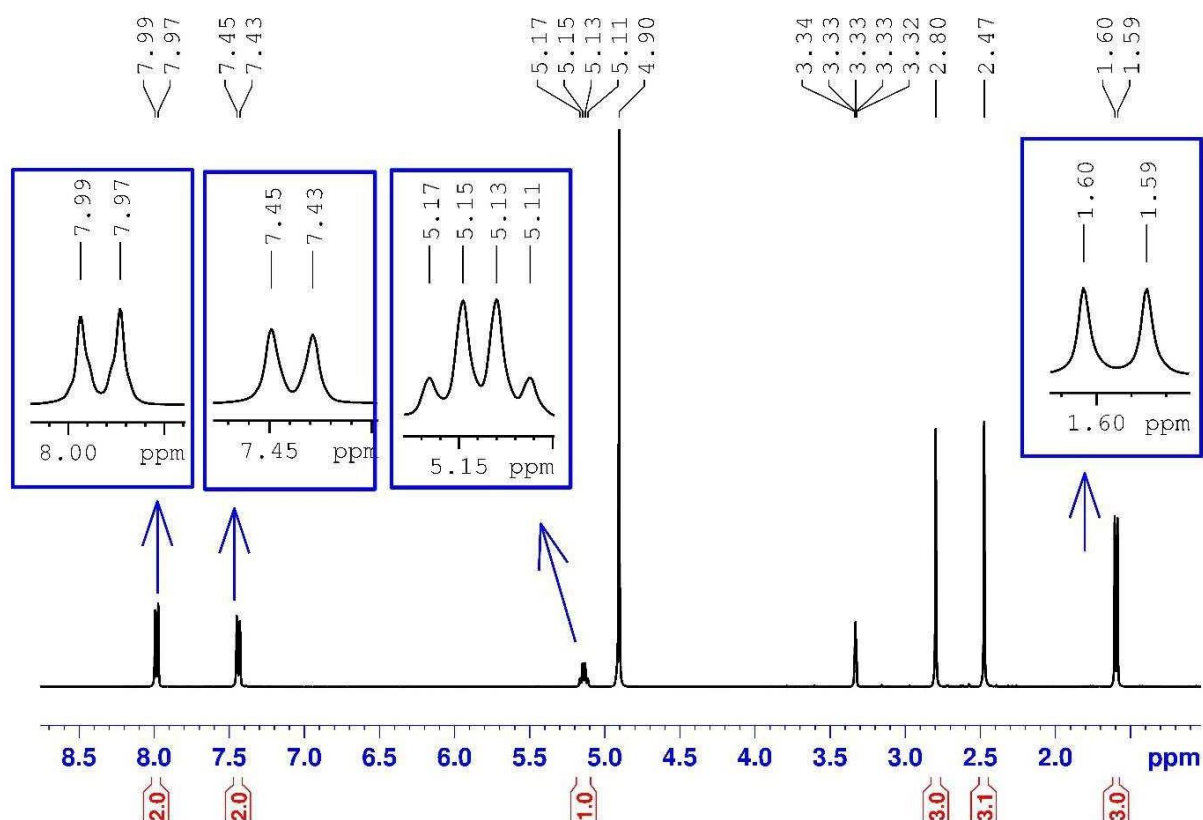


Figura 6.33: Espetro de RMN de ^1H , em CD_3OD , da 4'-MMC (**8**).

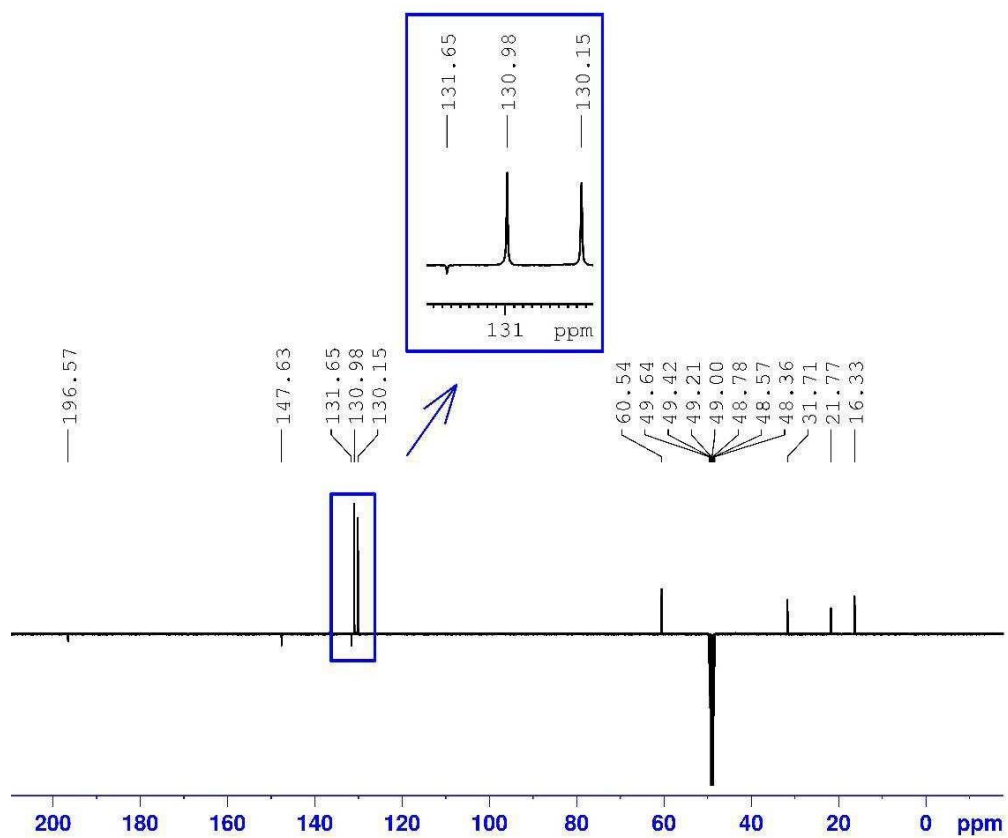


Figura 6.34: Espectro de RMN de ^{13}C , em CD_3OD , da 4'-MMC (8).

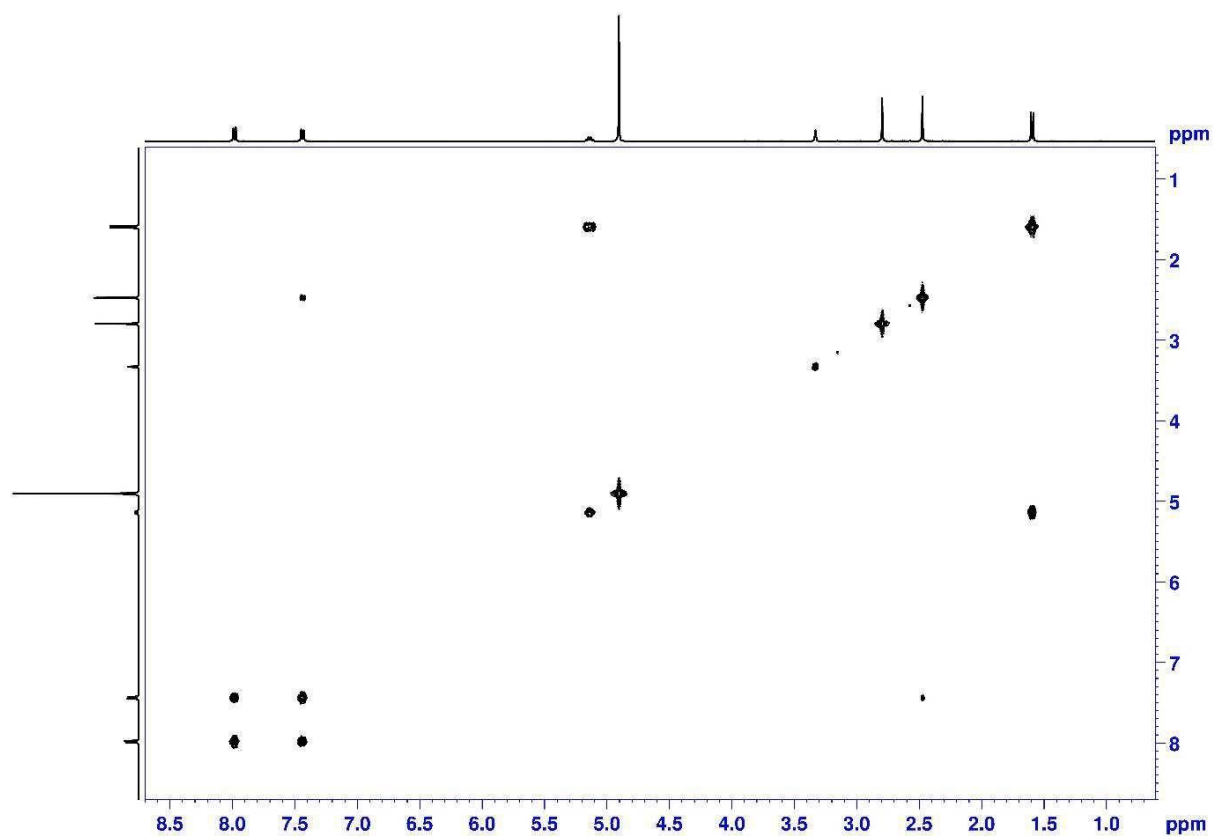


Figura 6.35: Espectro de COSY, em CD_3OD , da 4'-MMC (**8**).

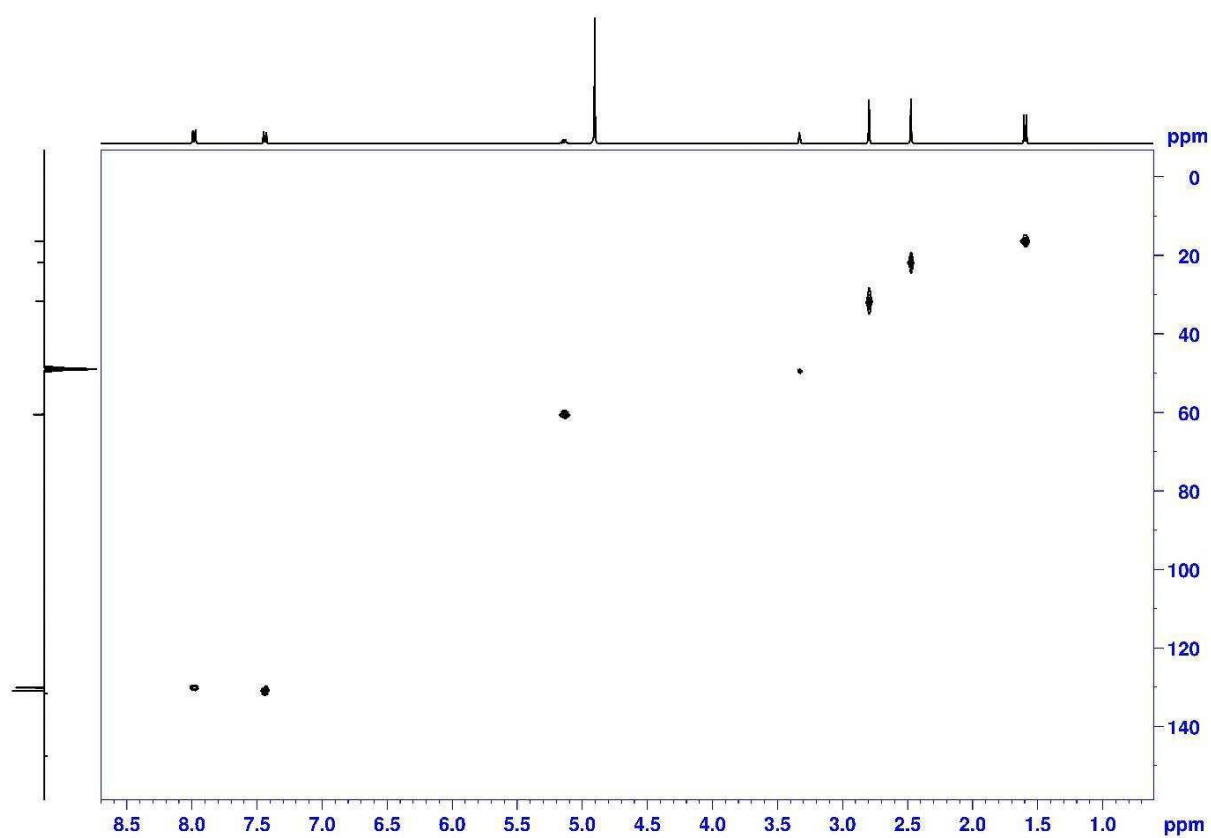


Figura 6.36: Espectro de HSQC, em CD_3OD , da 4'-MMC (**8**).

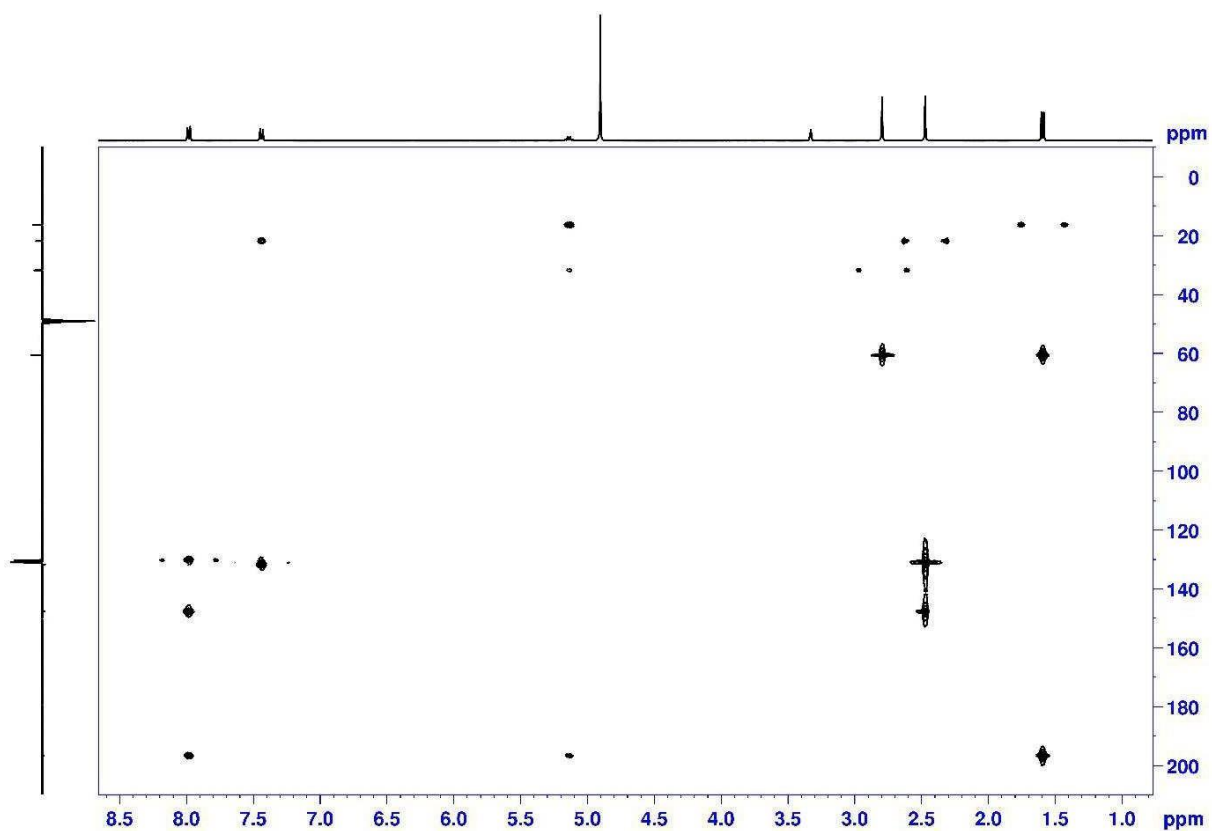


Figura 6.37: Espectro de HMBC, em CD_3OD , da 4'-MMC (**8**).

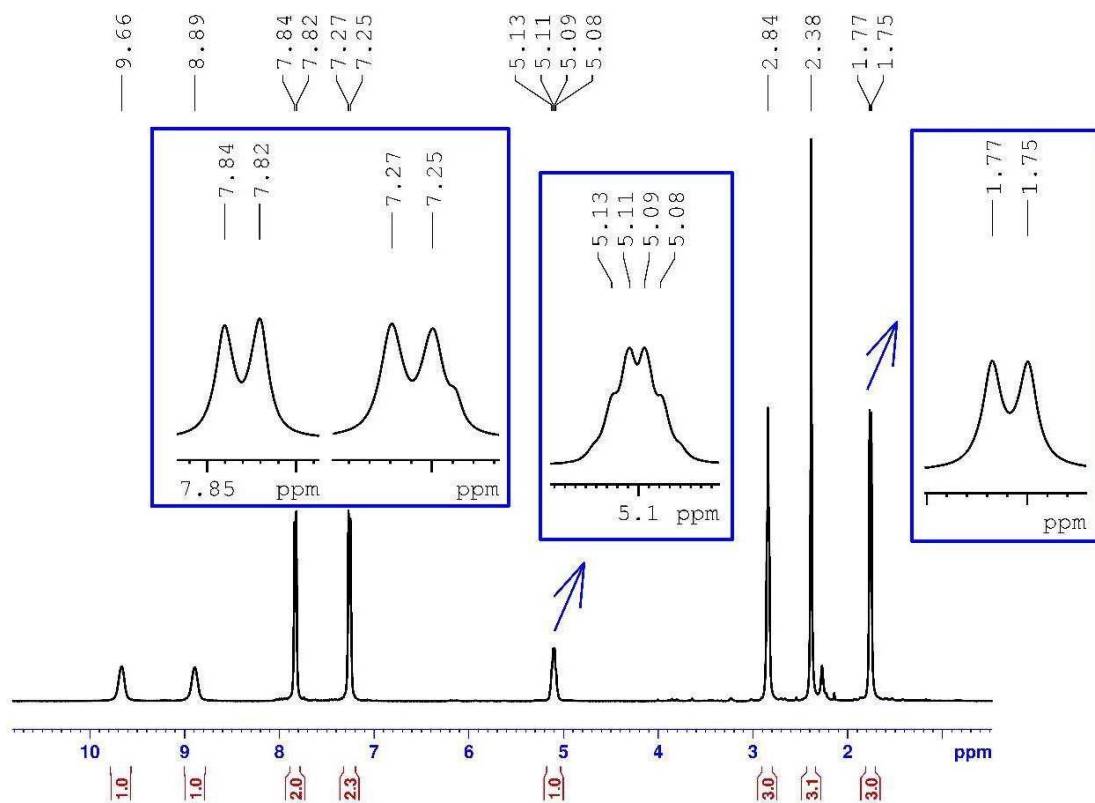


Figura 6.38: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da 4'-MMC (**8**).

Anexo 6.4: Espectros de RMN dos metabolitos reduzidos protonados 3'-MMC-OH (11) e 4'-MMC-OH (12)

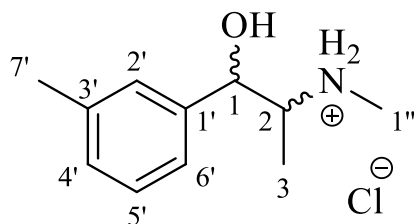


Figura 6.39: Estrutura química do metabolito 3'-MMC-OH (11).

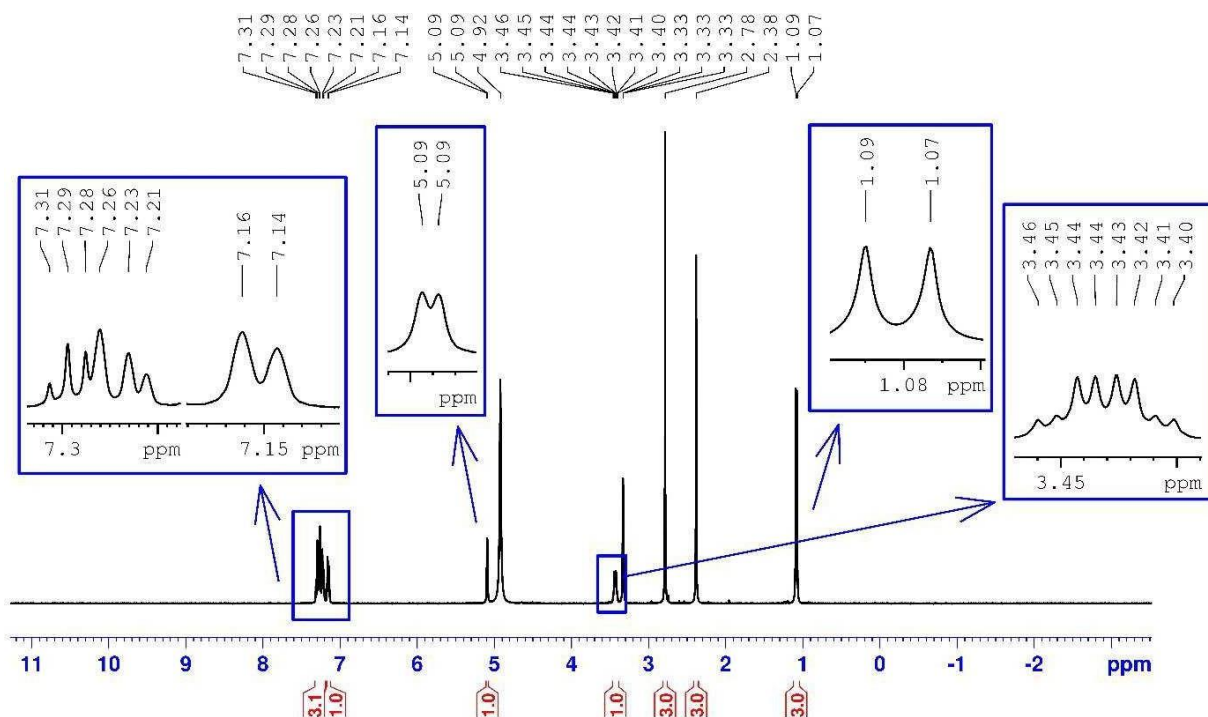


Figura 6.40: Espectro de RMN de ^1H , em CD_3OD , do metabolito 3'-MMC-OH (11).

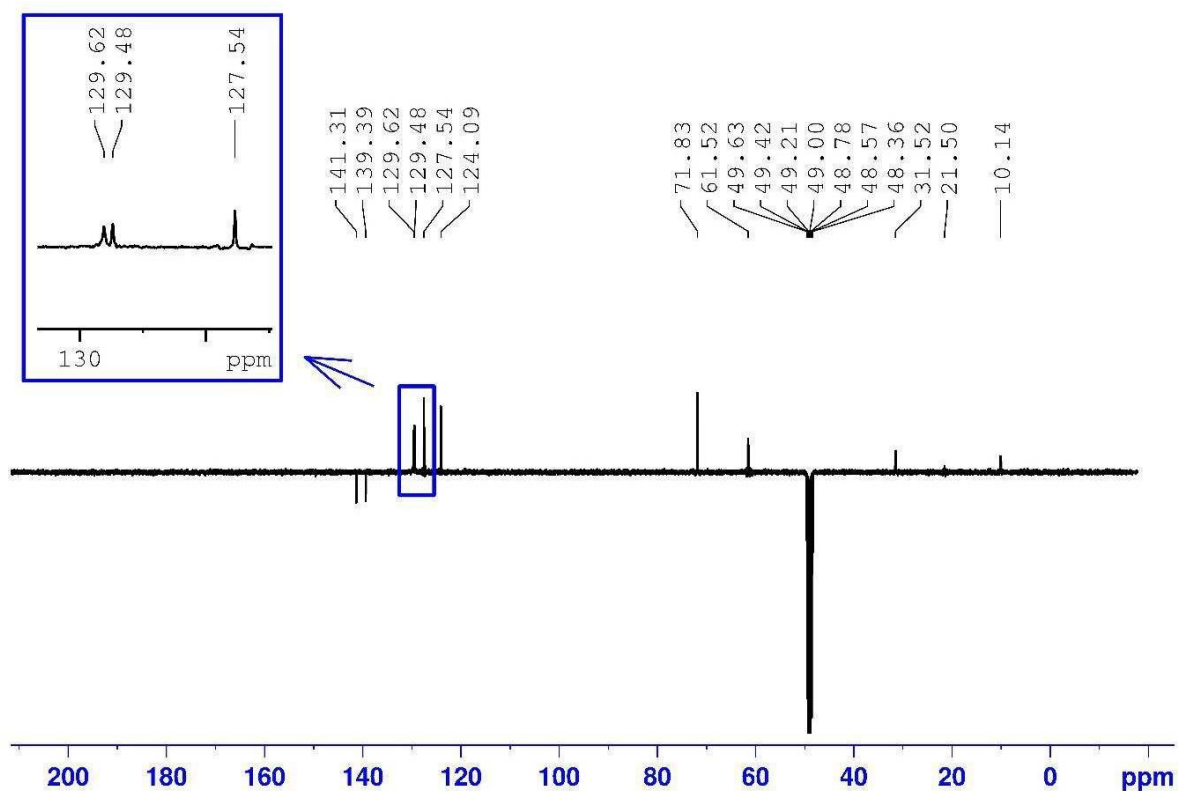


Figura 6.41: Espectro de RMN de ^{13}C , em CD_3OD , do metabolito 3'-MMC-OH (11).

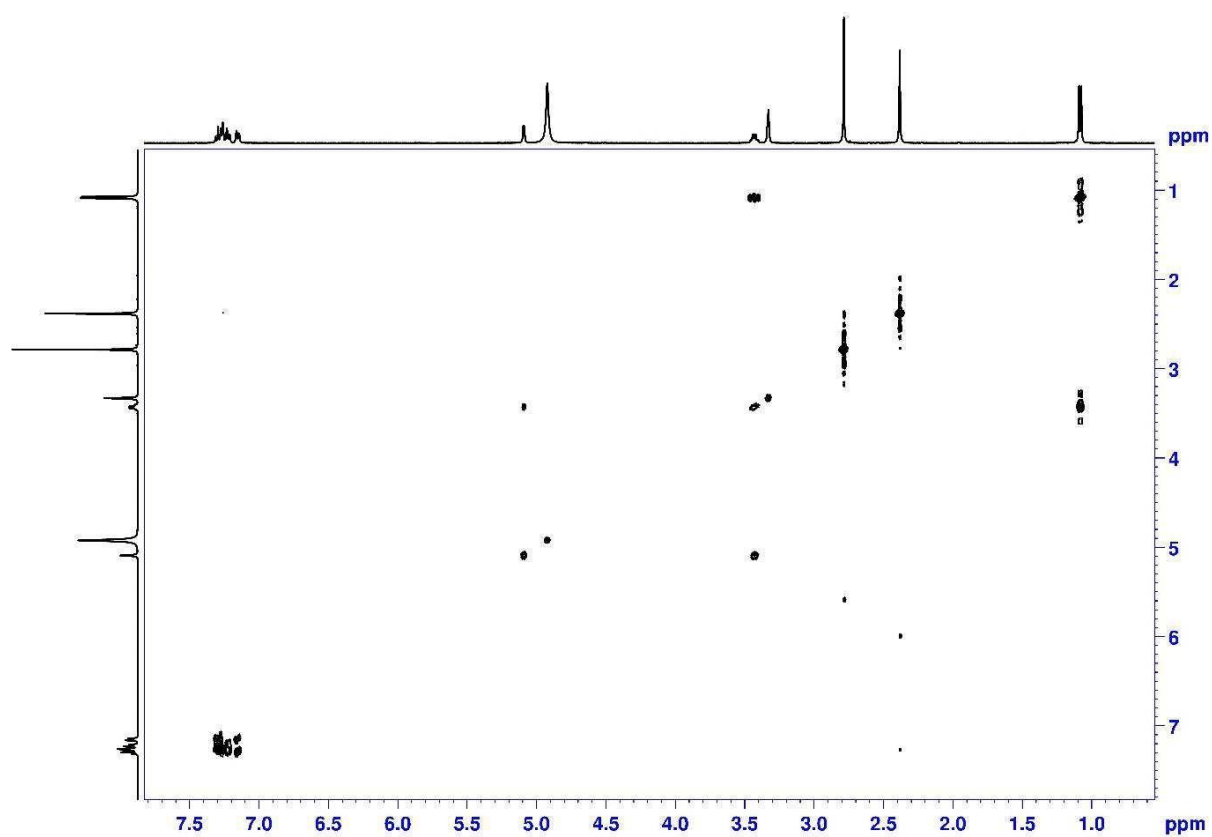


Figura 6.42: Espectro de COSY, em CD_3OD , do metabolito 3'-MMC-OH (11).

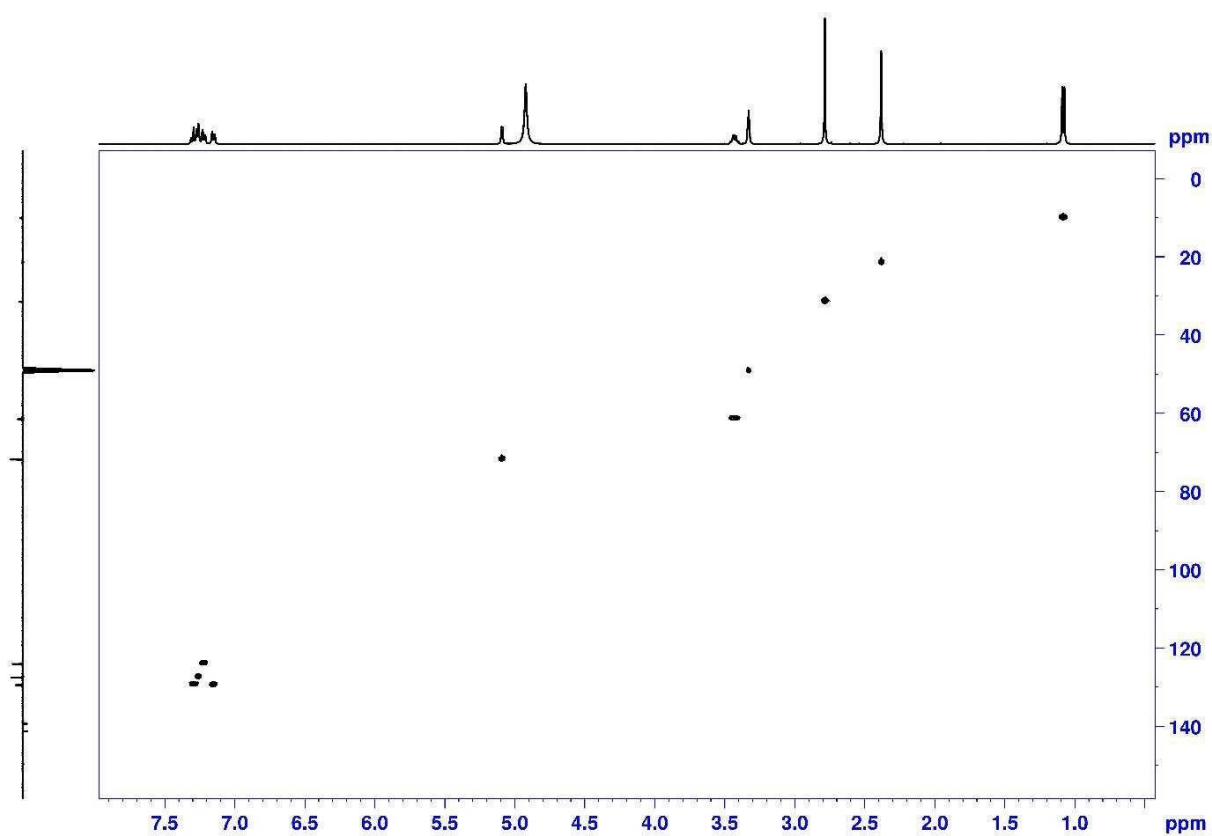


Figura 6.43: Espectro de HSQC, em CD_3OD , do metabolito 3'-MMC-OH (**11**).

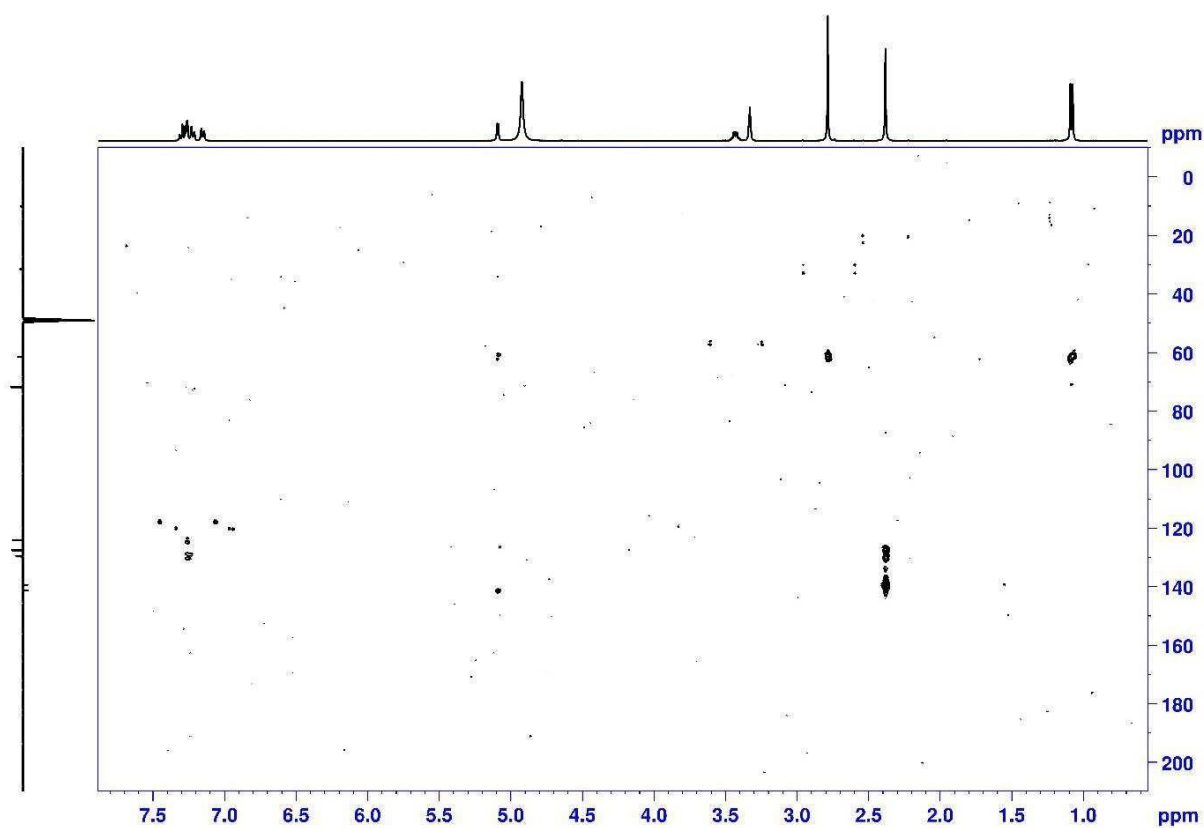


Figura 6.44: Espectro de HMBC, em CD_3OD , do metabolito 3'-MMC-OH (**11**).

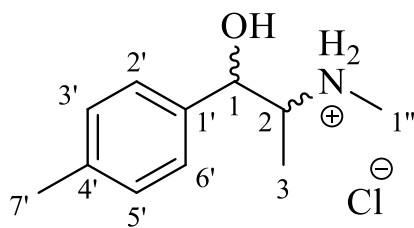


Figura 6.45: Estrutura química do metabolito 4'-MMC-OH (12).

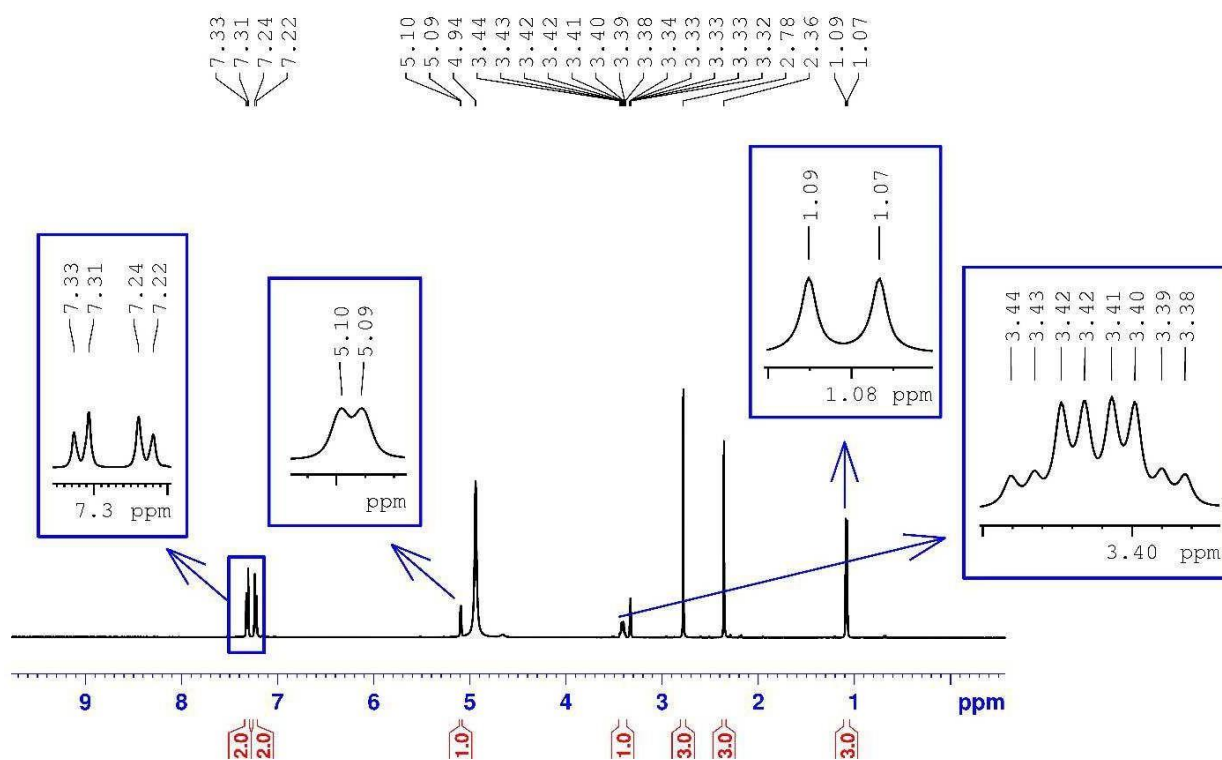


Figura 6.46: Espectro de RMN de ^1H , em CD_3OD , do metabolito 4'-MMC-OH (12).

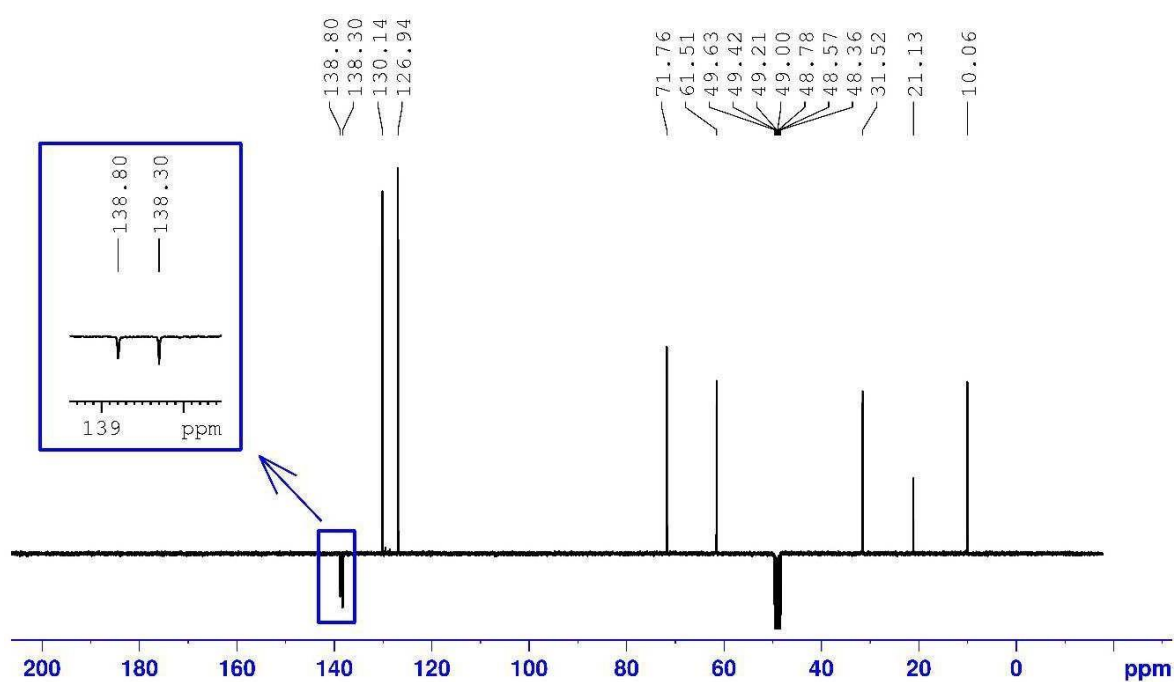


Figura 6.47: Espectro de RMN de ^{13}C , em CD_3OD , do metabolito 4'-MMC-OH (12).

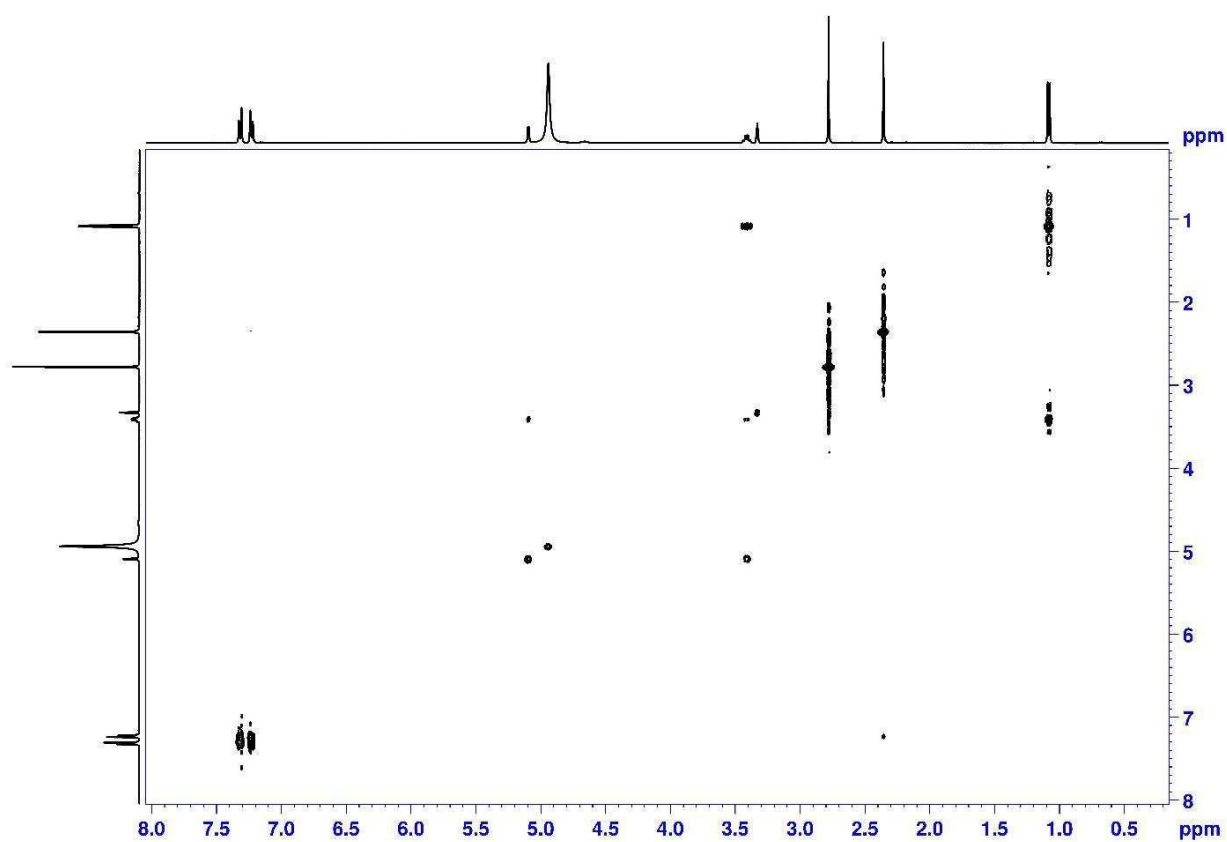


Figura 6.48: Espectro de COSY, em CD_3OD , do metabolito 4'-MMC-OH (12).

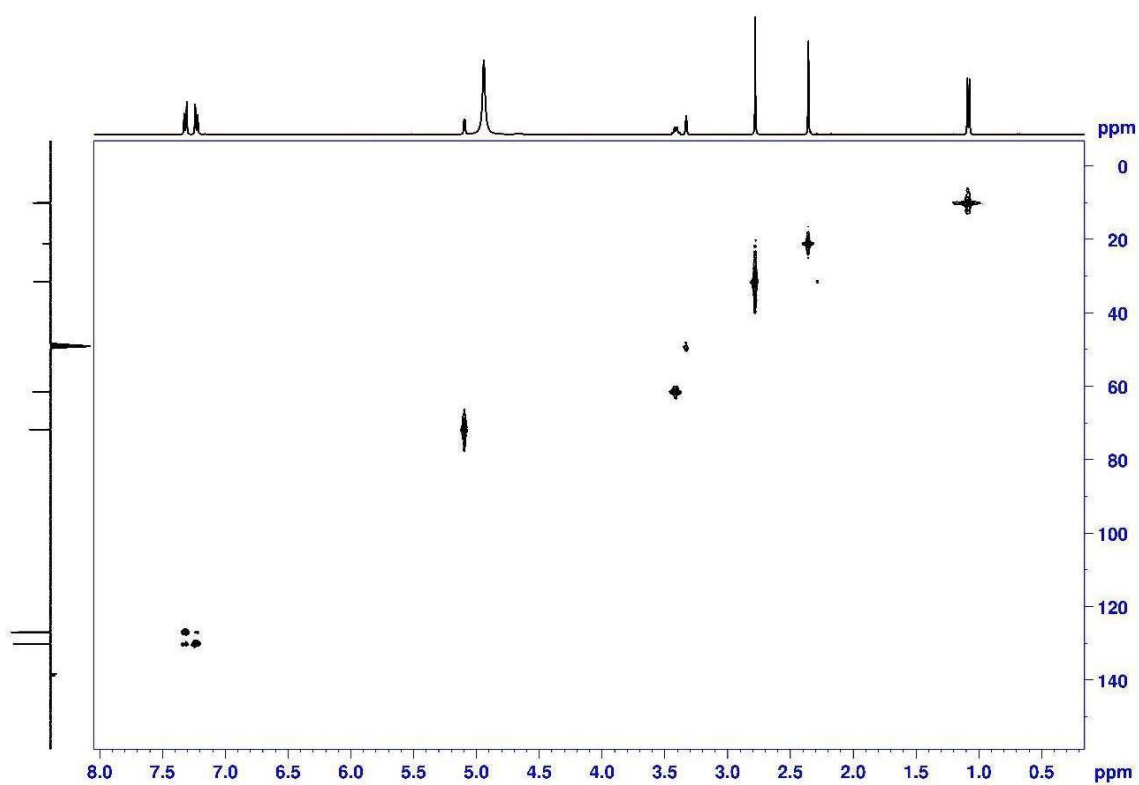


Figura 6.49: Espectro de HSQC, em CD₃OD, do metabolito 4'-MMC-OH (12).

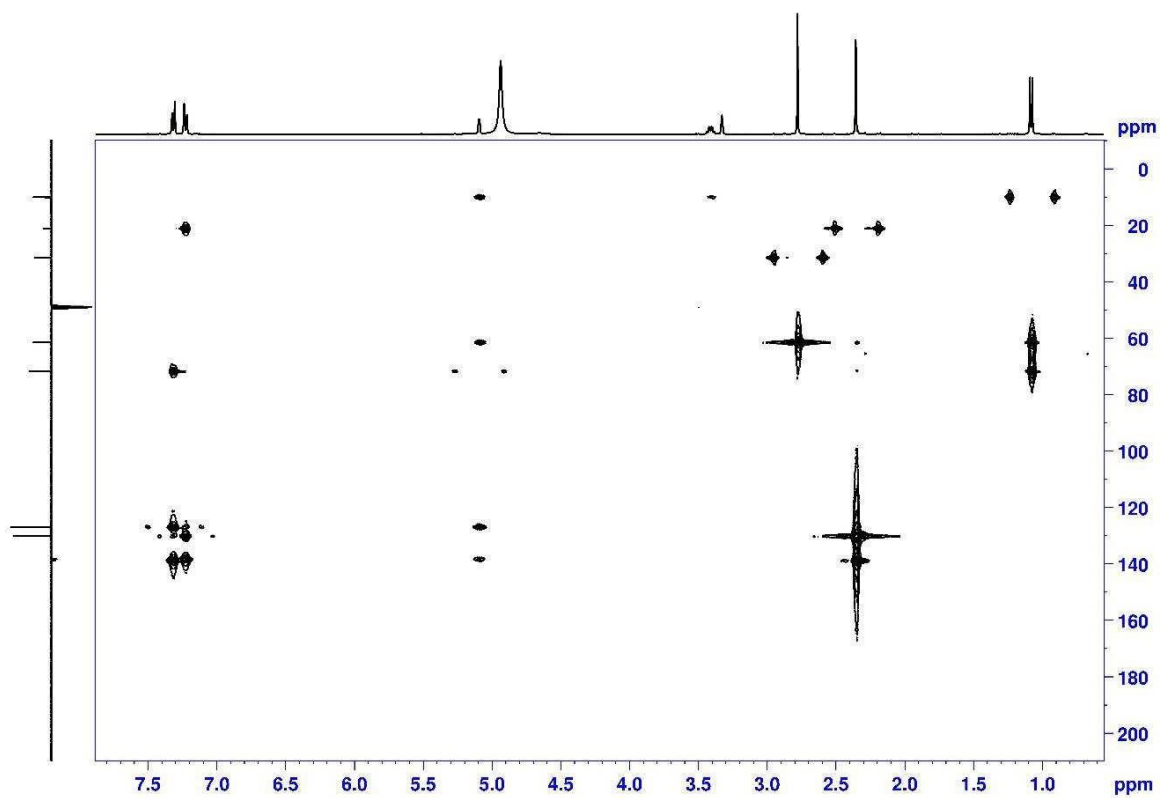


Figura 6.50: Espectro de HMBC, em CD₃OD, do metabolito 4'-MMC-OH (12).

Anexo 6.5: Espectros de RMN da amostra do LPC-PJ

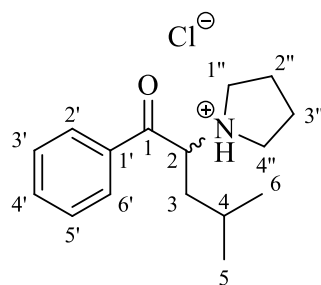


Figura 6.51: Estrutura química do α -PHiP protonado.

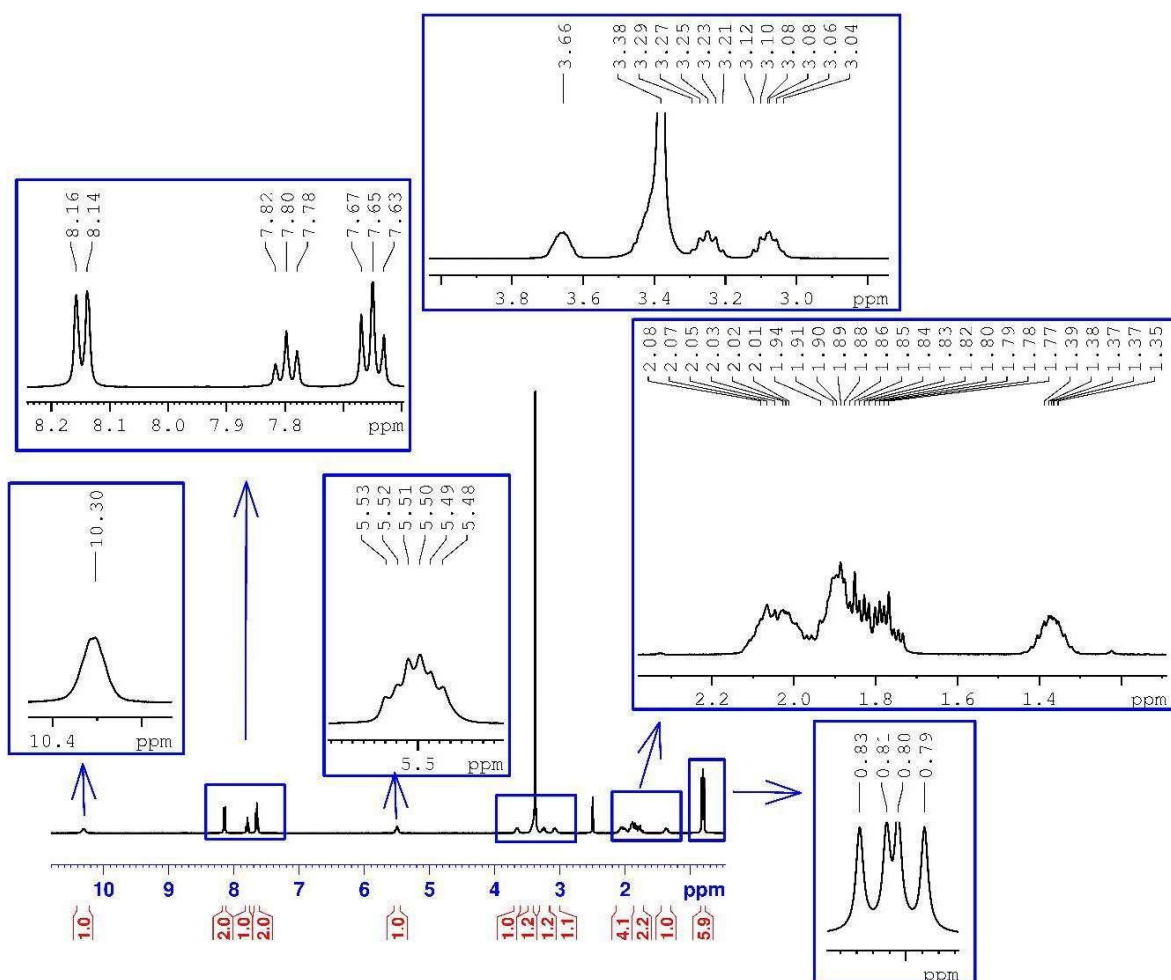


Figura 6.52: Espectro de RMN de ^1H , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, do α -PHiP.

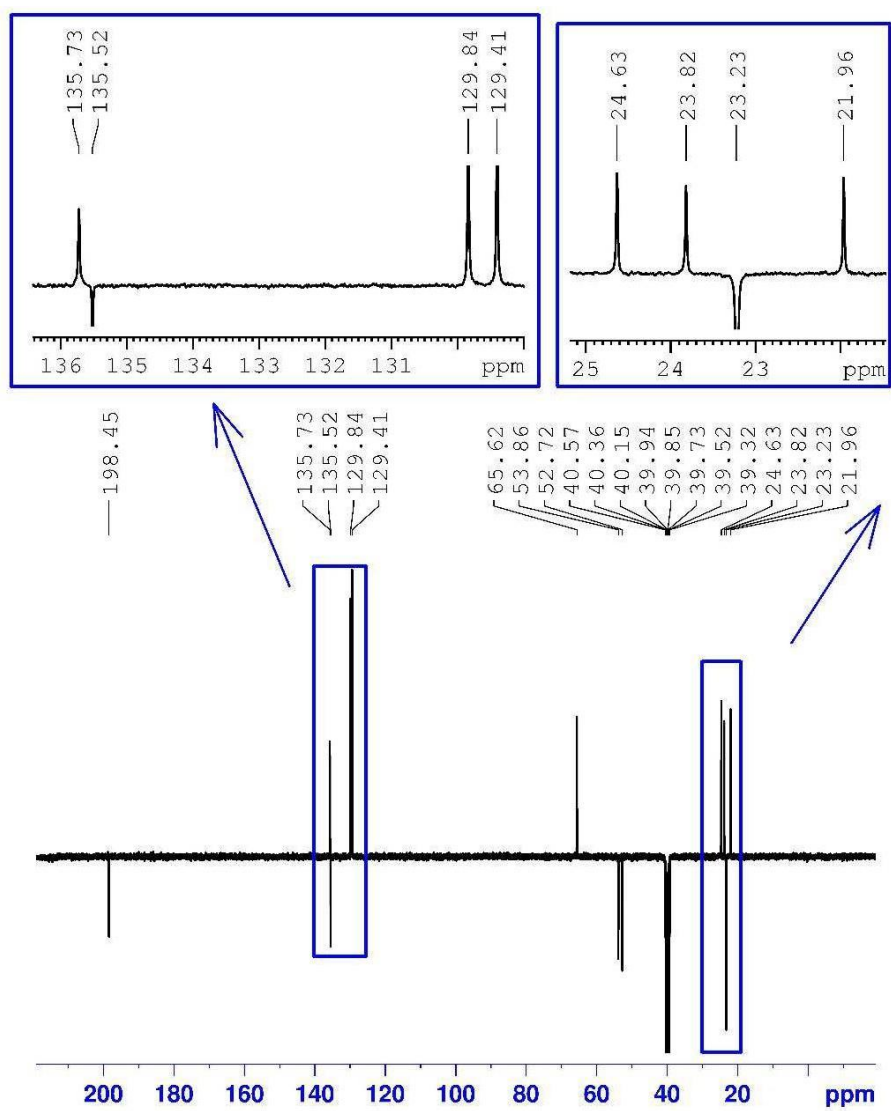


Figura 6.53: Espectro de RMN de ^{13}C , em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, do α -PHiP.

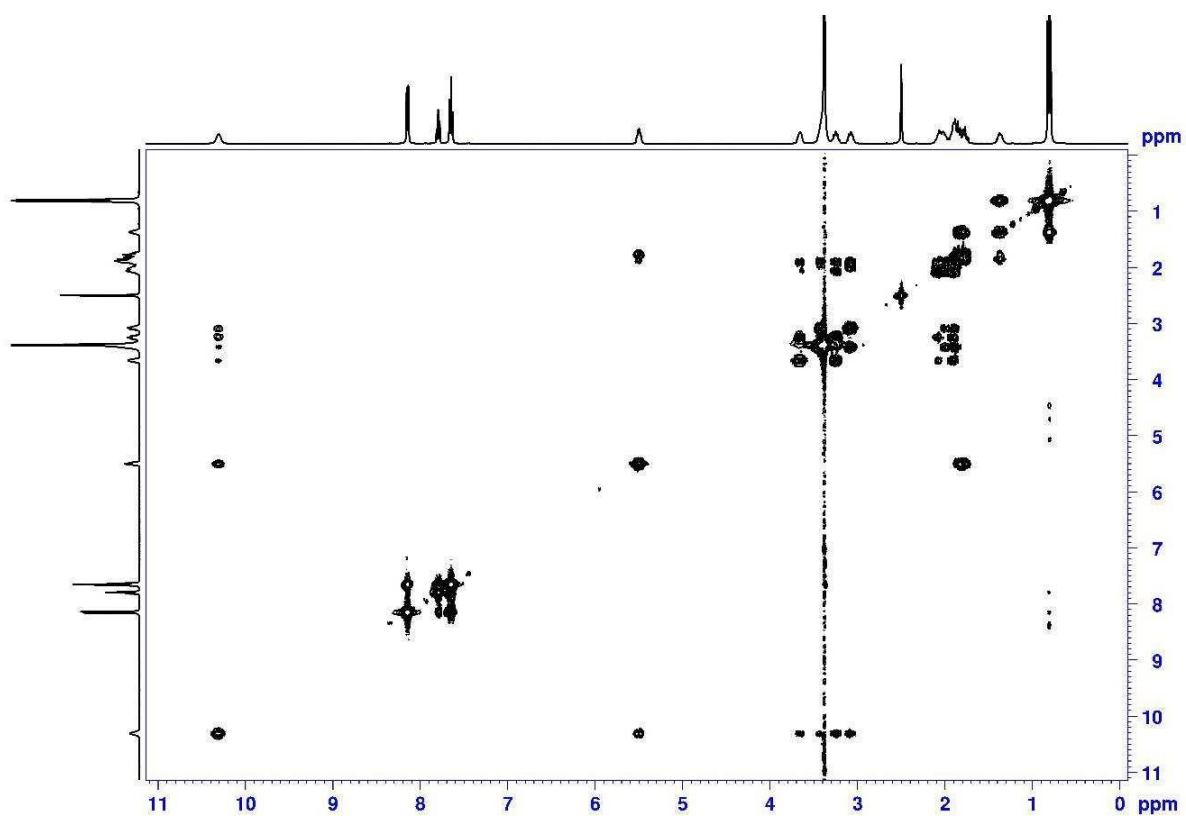


Figura 6.54: Espectro de COSY, em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, do α -PHiP.

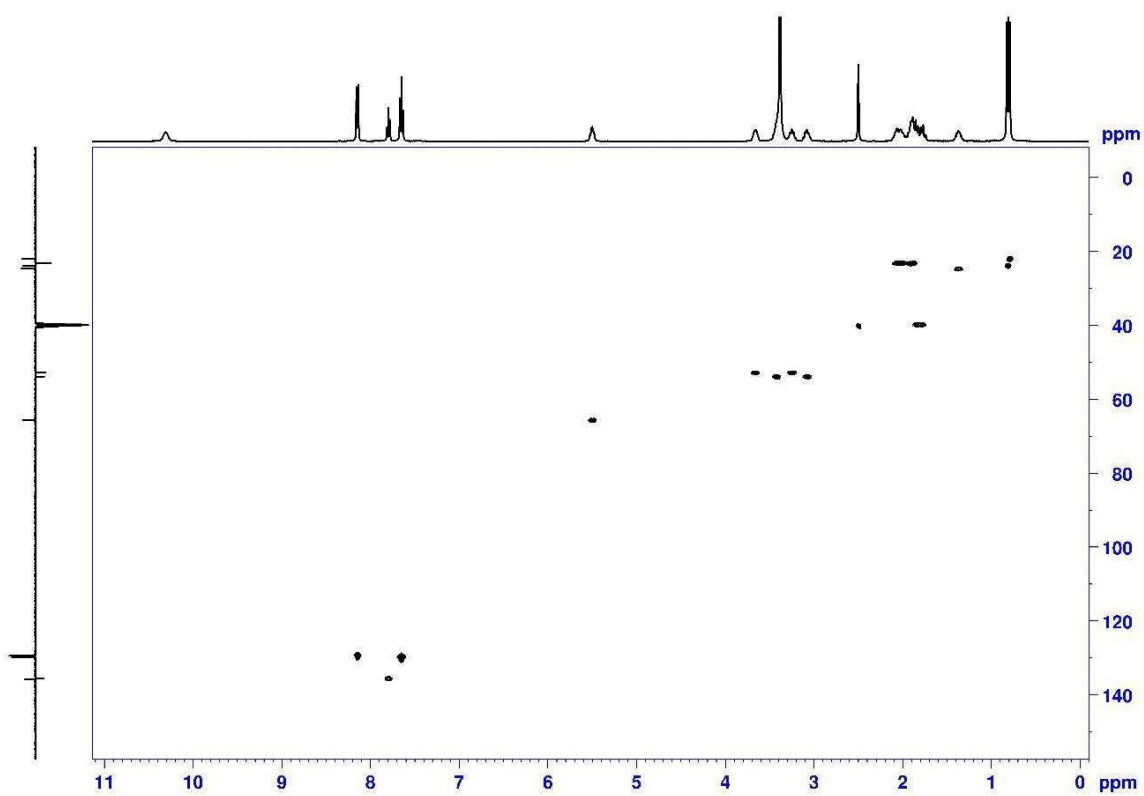


Figura 6.55: Espectro de HSQC, em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, do α -PHiP.

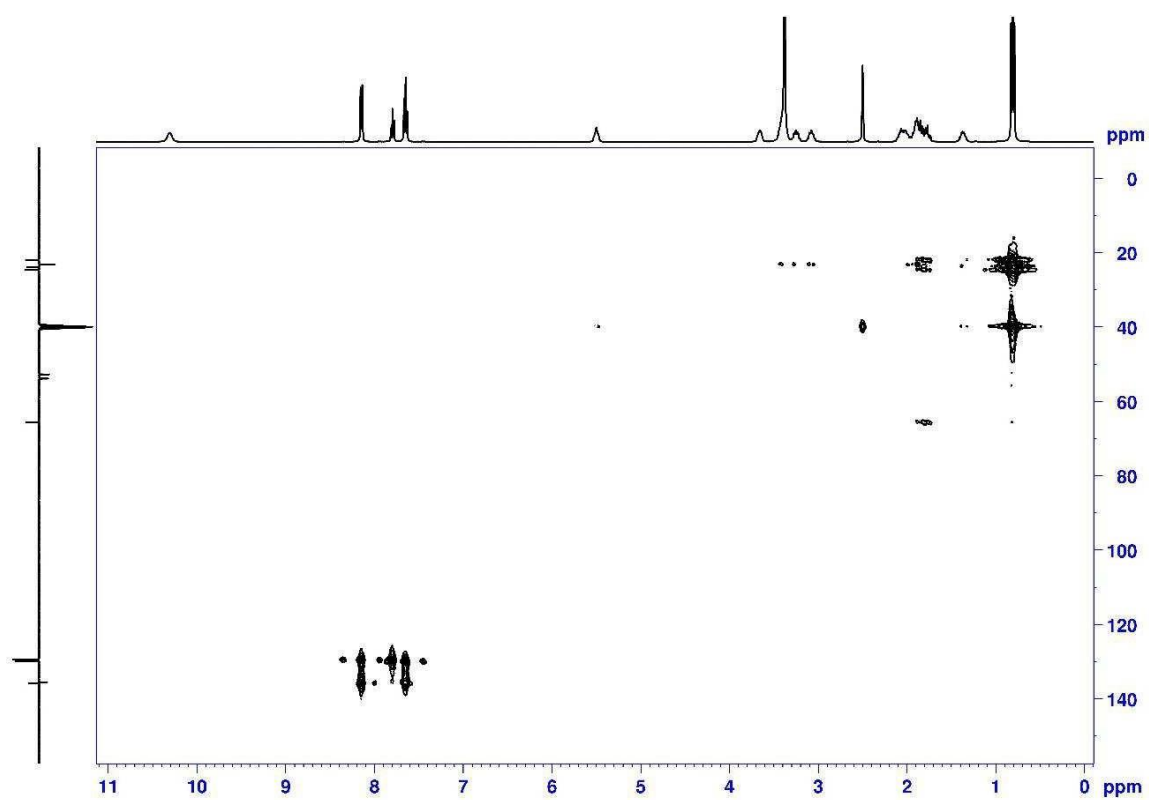


Figura 6.56: Espectro de HMBC, em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, do α -PHiP.

Anexo 6.6: Espectros de LC-ESI(+)-HRMS (QTOF) da 4'-MMC e dos seus metabolitos (gerados na incubação)

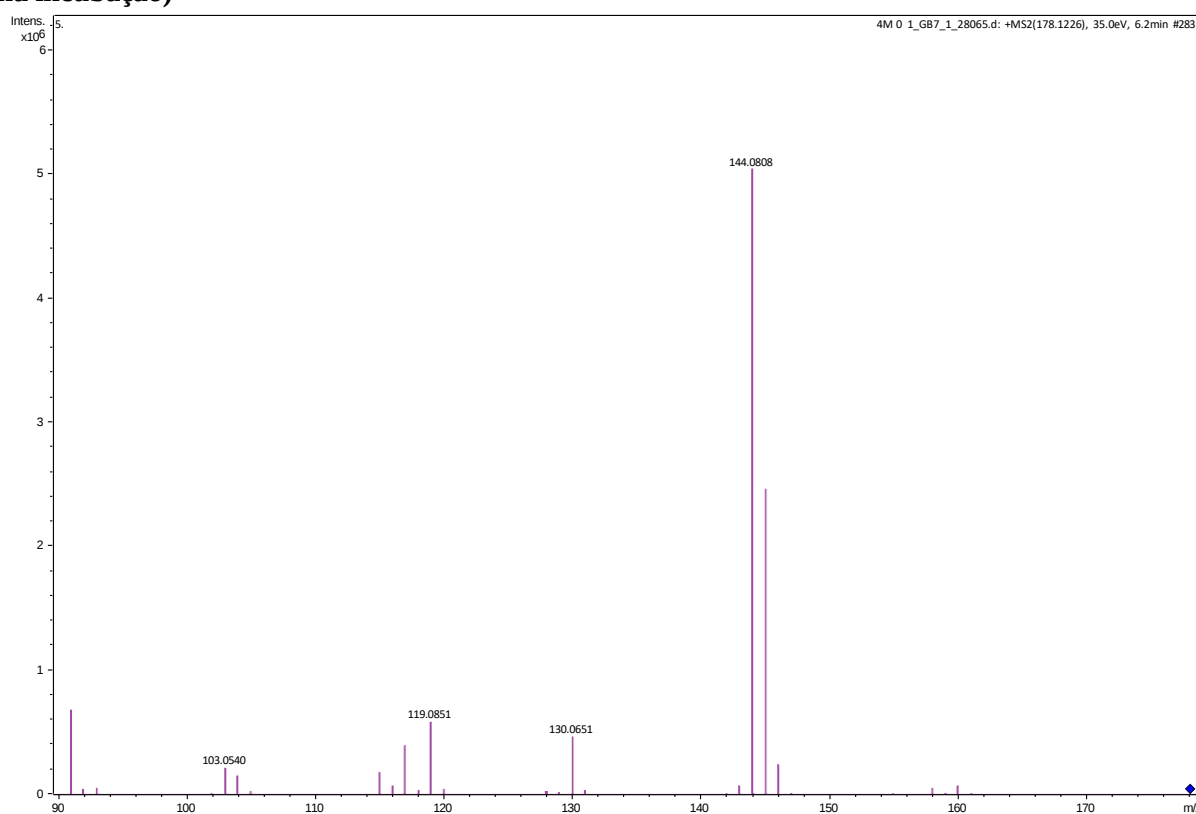


Figura 6.57: Espectro MS/MS da catinona 4'-MMC.

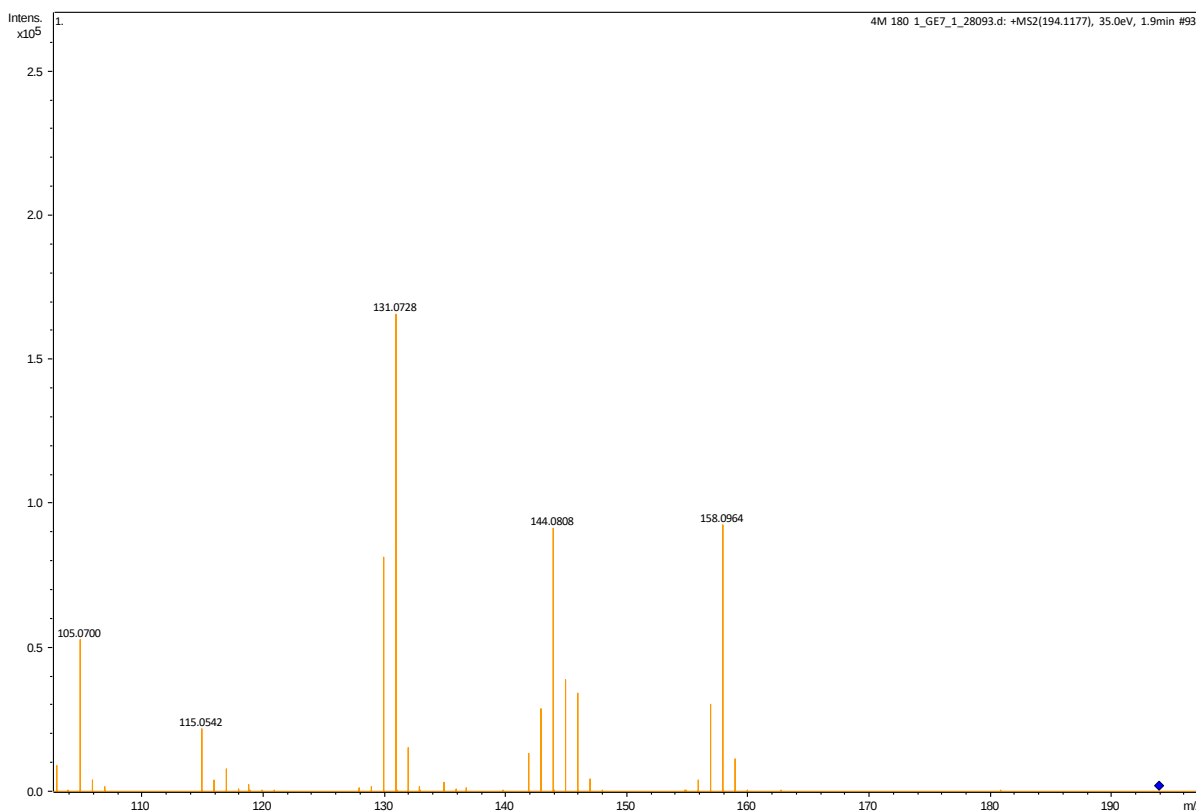


Figura 6.58: Espectro MS/MS do metabolito M1-4'-MMC (hidroxitolil-4'-metilmetcatinona) gerado na incubação.

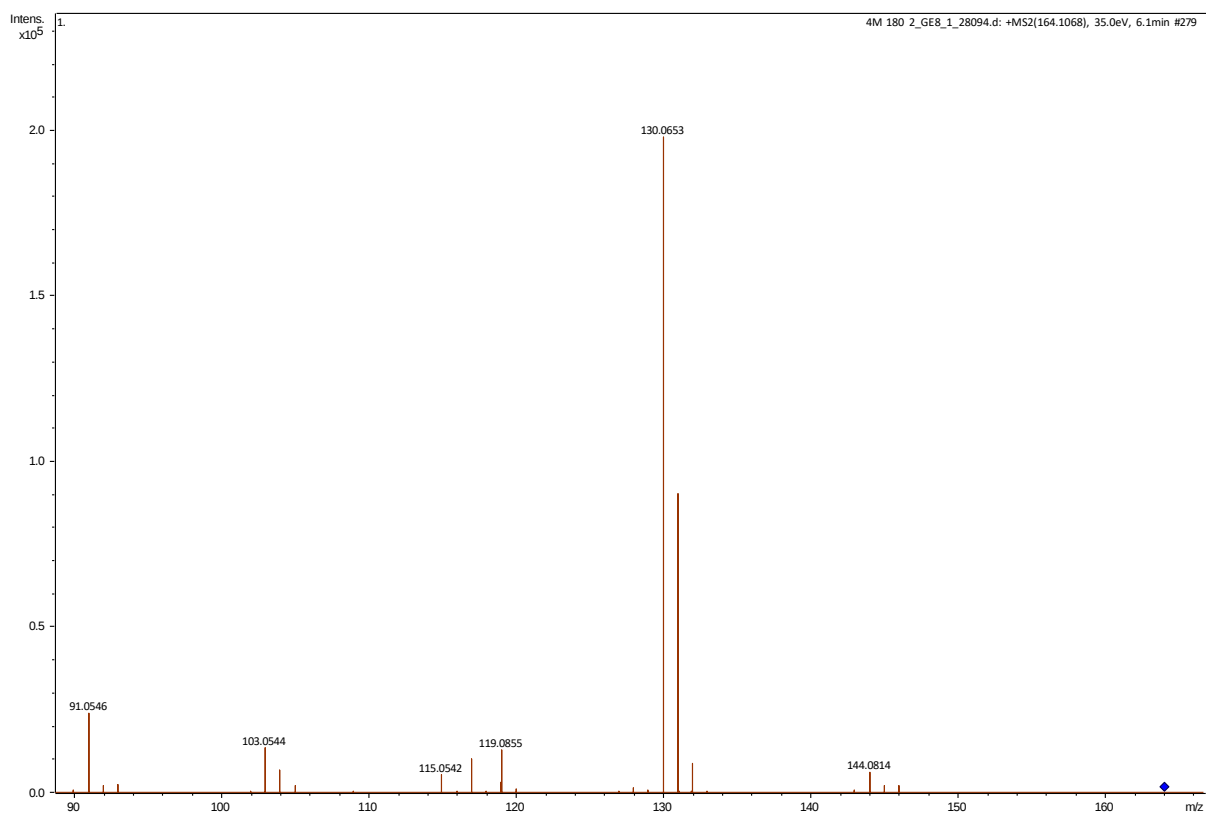


Figura 6.59: Espectro MS/MS do metabolito M2-4'-MMC (nor-mefedrona) gerado na incubação.

Anexo 6.7: Espectros de LC-ESI(+)-HRMS (QTOF) da 3'-MMC e dos seus metabolitos (gerados nas incubações)

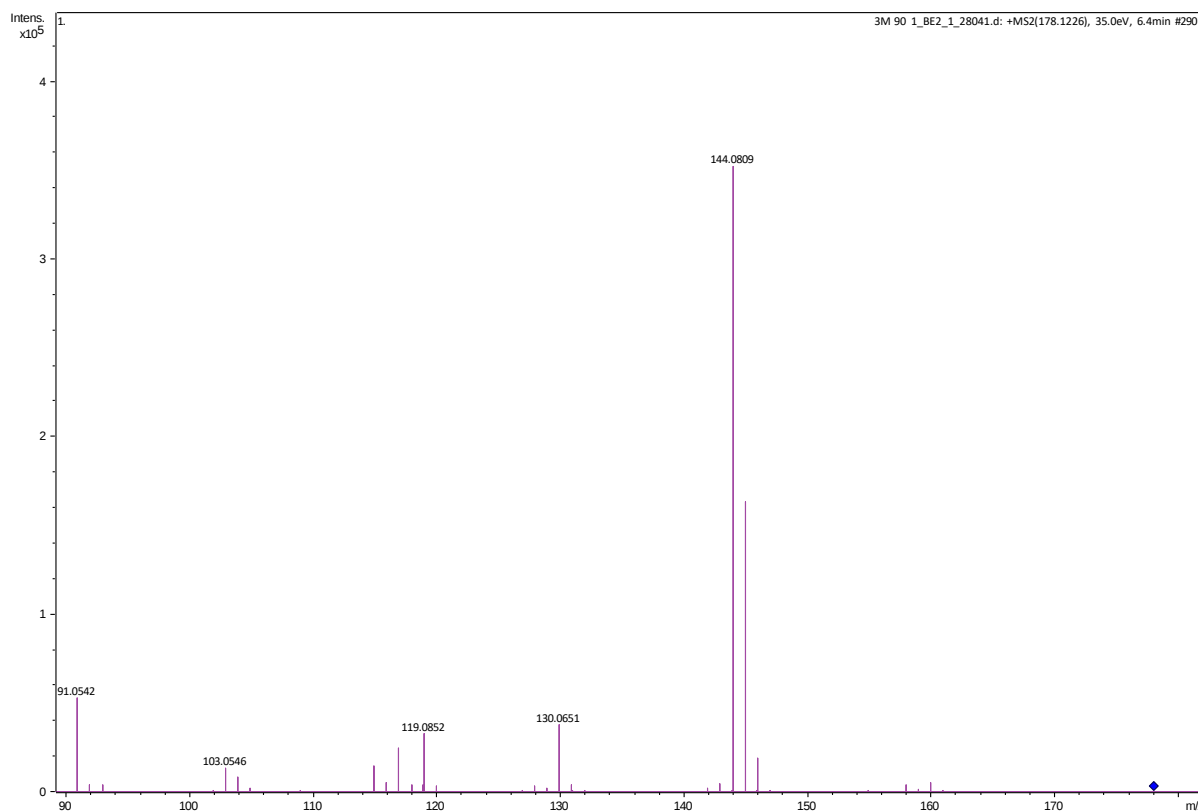


Figura 6.60: Espectro MS/MS da catinona 3'-MMC.

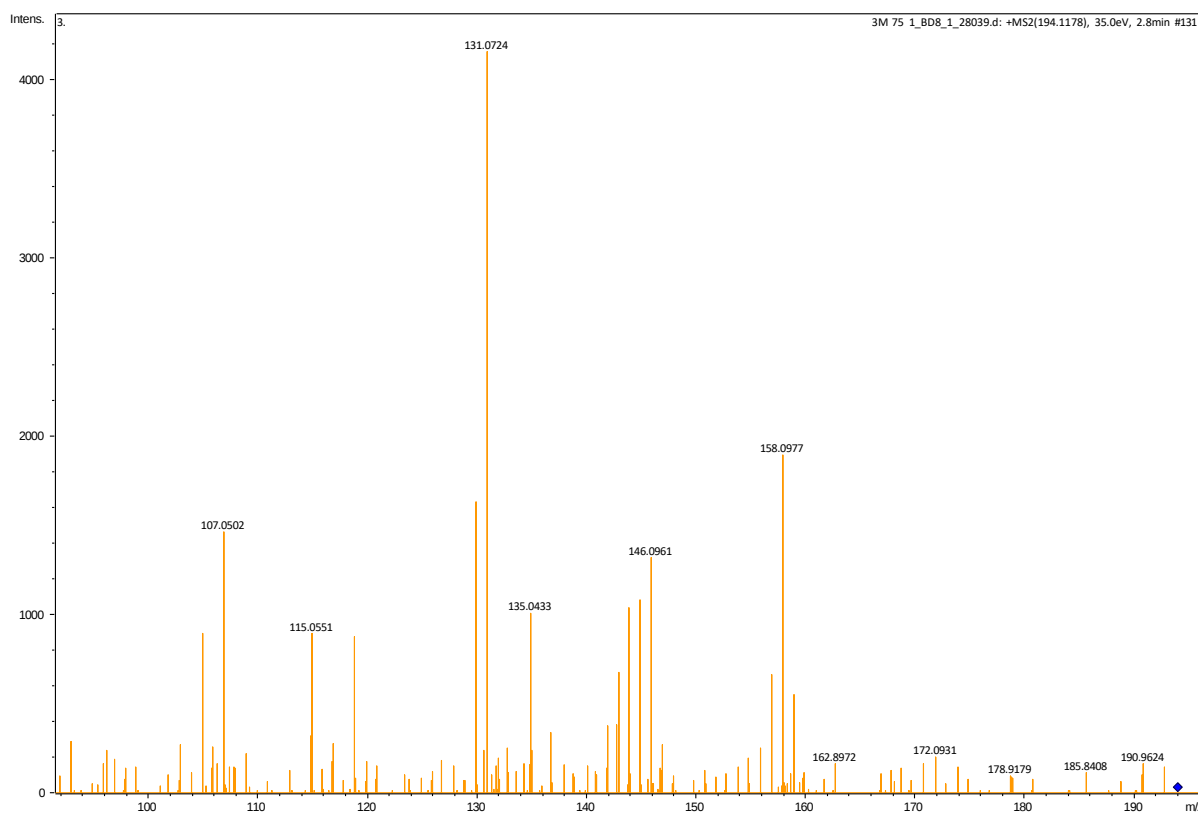


Figura 6.61: Espectro MS/MS do metabolito M1-3'-MMC (hidroxitolil-3'-metilmetcatinona) gerado na incubação.

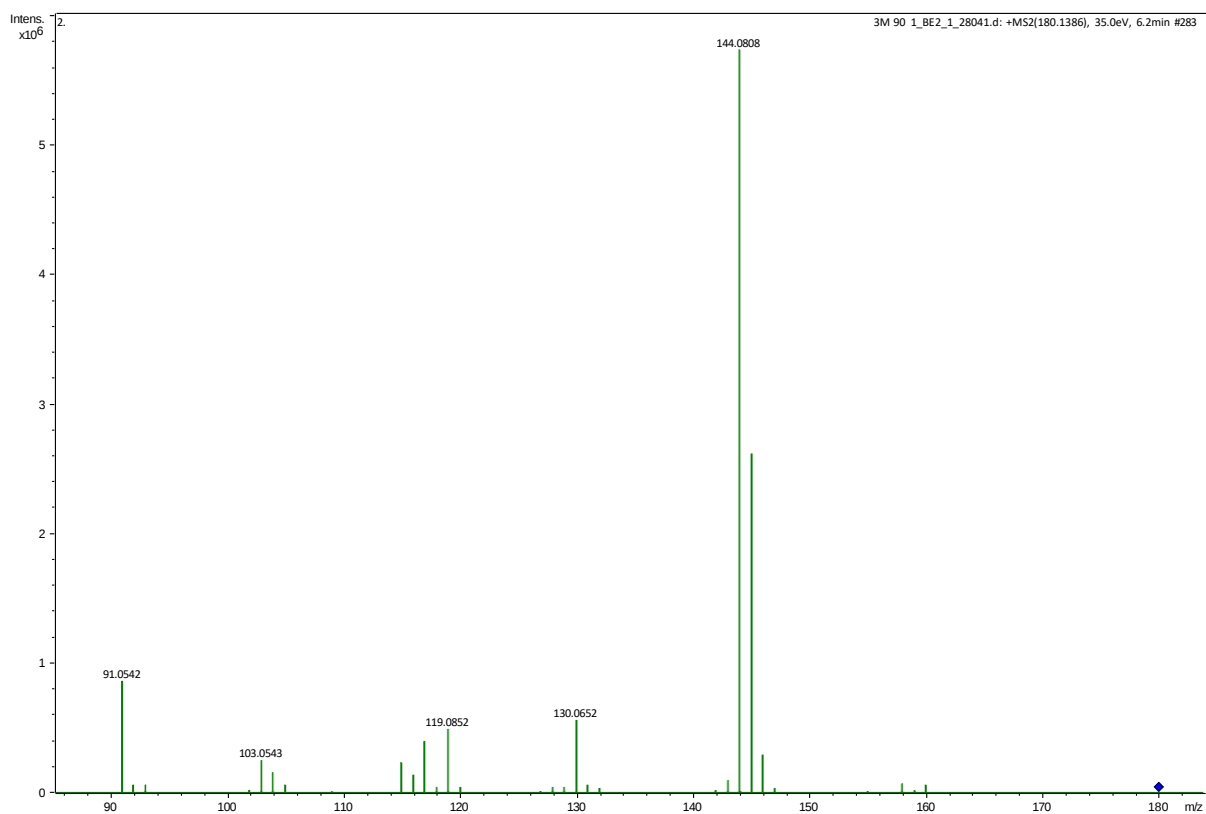


Figura 6.62: Espectro MS/MS do metabolito M2-3'-MMC (dihidro-3'-metilmetcatinona) gerado na incubação.