



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Sara Margarida Duarte Júlio

**IDENTIFICAÇÃO, SÍNTESE E QUANTIFICAÇÃO DE
NOVAS SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Forense orientada pela Doutora Helena Margarida Guerreiro Galla Gaspar e pelo Doutor Mário Jorge Dinis Barroso e coorientada pela Professora Doutora Maria Miguéns Pereira e apresentada ao Departamento de Química.

Julho de 2019

Departamento de Química
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

IDENTIFICAÇÃO, SÍNTESE E QUANTIFICAÇÃO DE NOVAS SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS

Sara Margarida Duarte Júlio

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Forense orientada pela Doutora Helena Margarida Guerreiro Galla Gaspar e pelo Doutor Mário Jorge Dinis Barroso e coorientada pela Professora Doutora Maria Miguéns Pereira e apresentada ao Departamento de Química.

Julho de 2019



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Agradecimentos

O meu primeiro obrigada dedico-o à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e a todos os meus professores e colegas por me terem recebido com tanto carinho nesta aventura de estudar a 200 km de casa.

Agradeço igualmente às instituições que me receberam nesta aventura ainda maior que foi o projeto de tese, à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e à Delegação do Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses.

Agradeço profundamente aos meus orientadores, à Doutora Mariette Pereira por me receber e pelo interesse mostrado no projeto, à Doutora Helena Gaspar pela sua exigência e apoio que me permitiram dar o melhor de mim neste que foi o ano mais difícil da minha vida e ao Doutor Mário Barroso pela dedicação e preocupação com o trabalho e por me contagiar com a sua boa disposição constante, mesmo nos dias mais cinzentos.

Um obrigada à Professora Susana Santos pela sua orientação durante toda a síntese e pela sua dedicação e apoio, essenciais para o excelente resultado alcançado.

Um obrigada à Professora Cristina Moiteiro, à Doutora Sílvia Carvalho e ao Mestre Paulo Vieira pelo apoio e disponibilização do necessário no laboratório. Um especial obrigada ao Miguel pelas horas de almoço e gargalhadas, sem as quais teria desmotivado por completo.

Agradeço a toda a equipa do Serviço de Química e Toxicologia Forenses do INMLCF, em especial ao Diretor do Serviço Dr. João Miguel Franco, à Dra. Suzana Fonseca, à Dra. Suzel Costa, ao Dr. Francisco Vale, ao Dr. Nuno Gonçalves, ao Dr. António Castañera e à Dra. Susana Simões, que de alguma forma contribuíram para este projeto e para a maravilhosa integração que me proporcionaram.

Agradeço à Dra. Andrea Alexandre do Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária o apoio na realização das análises por GC-FID e à Doutora Maria Conceição Oliveira do Instituto Superior Técnico nas análises por Espectrometria de Massa de Alta Resolução.

Por último, dedico o maior obrigada para os meus amigos e para a minha família, para o meu pai, para o meu irmão, para o João, mas principalmente para a minha mãe, quero agradecer-te não só por este último ano, mas pelos 23 anteriores, ambas sabemos que sem ti e tudo o que fizeste por mim eu não estava cá.

Um gigante obrigada a todos, sem cada um de vós, eu não teria conseguido!

Resumo

O presente trabalho foi realizado no âmbito de um protocolo de estágio entre a Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (FCTUC), a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) e o Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF) inserido num protocolo de colaboração existente entre a FCUL, o INMLCF e o Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC-PJ) que visa a análise de substâncias, a determinação de padrões e a investigação científica no âmbito das NSP.

As NSP são definidas como substâncias psicoativas não controladas pelas Convenções das Nações Unidas sobre os Estupefacientes e Substâncias Psicotrópicas, mas que possam constituir uma ameaça para a saúde pública. O surgimento destas substâncias levou à existência de diversas problemáticas, nomeadamente a sua difícil identificação devido ao número, diversidade e ritmo a que surgem, o acesso a materiais de referência certificados e a necessidade de validação de métodos para a sua análise em matrizes biológicas. Adicionalmente, é importante estender a investigação de NSP a compostos análogos às substâncias que se encontrem a emergir atualmente, adotando-se uma atitude proativa perante este fenómeno.

A presente dissertação teve três objetivos principais. O primeiro objetivo consistiu na análise, por RMN, de duas amostras de produtos apreendidos em Portugal, tendo-se identificado o canabinoide sintético 5F-ADB (composto adicionado à Convenção das Nações Unidas de 1971 em 2018, passando a partir desta data a ser considerado uma droga, e abrangido pelo Decreto-Lei n.º 15/93 desde fevereiro de 2019) e o derivado de fenciclidina 3-MeO-PCP (uma NSP abrangida pelo Decreto-Lei n.º 54/2013), ambos produtos psicoativos controlados em Portugal e com efeitos tóxicos letais.

O segundo objetivo foi a síntese de seis catinonas sintéticas (4-MDMB, 4-MNEB, 4-MDMP, 4-MNEP, 4-MDMH, 4-MDEB) com vista não só a fornecer ao LPC-PJ padrões para serem usados nas suas análises, como também para realizar a validação de um método analítico para a sua deteção e quantificação em sangue. Destas catinonas, a 4-MDMP, a 4-MDMH e a 4-MDEB são compostos nunca reportados na literatura, a 4-MDMB e a 4-MNEB encontram-se disponíveis para venda na *Cayman Chemical* e a 4-MNEP foi reportada na Europa, encontrando-se caracterizada na literatura. As catinonas foram sintetizadas na

forma de cloridrato e caracterizadas por RMN, HRMS-ESI e GC-FID, comprovando-se a sua obtenção com um grau de pureza adequado (94%-97%) para a utilização na validação do método analítico proposto.

Finalmente, o último objetivo deste trabalho foi a validação de um método analítico para a detecção e quantificação em sangue das catinonas sintetizadas, utilizando SPE e GC-MS, de modo a poder integrá-lo na rotina laboratorial do Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF) do INMLCF. O método analítico escolhido apresentou linearidade para um intervalo de 10-800 ng/mL, obtendo-se curvas de calibração com um R^2 superior a 0,99 para todos os analitos, utilizando um fator de ponderação de $1/x^2$; o LLOQ e o LOD foram de, respectivamente, 10 e 5 ng/mL para todos os compostos. O método foi considerado seletivo, preciso e exato para todas as catinonas estudadas de acordo com os critérios da Agência Mundial Antidopagem, da *International Conference on Harmonisation*, da *Food and Drug Administration*, bem como os critérios internos do SQTF. Durante a validação do método não se verificaram fenômenos de arrastamento e o método demonstrou-se robusto. O processo de extração permitiu obter recuperações entre 73,3% e 88,2% e o estudo da estabilidade dos compostos permitiu verificar que a catinona mais estável foi a 4-MNEB, seguida da 4-MNEP, da 4-MDMB, da 4-MDEB, da 4-MDMP e, por fim, da 4-MDMH. O método validado foi aplicado na análise de amostras reais que tinham produzido resultados positivos para anfetaminas, não se revelando, no entanto, positivas para as catinonas em estudo.

PALAVRAS-CHAVE: NSP; Catinonas Sintéticas; Síntese; RMN; Validação; GC-MS.

Abstract

The present work was carried out within the framework of an internship protocol between Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (FCTUC), Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) and Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF) inserted in a collaboration protocol between FCUL, INMLCF and Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC-PJ) which aims at studying new psychoactive substances (NPS).

NPS are defined as psychoactive substances not controlled by the United Nations Conventions on Narcotic Drugs and Psychotropic Substances, but which may pose a threat to public health. The emergence of these substances has led to several problems, such as difficulties in their identification, either due to the number, diversity, rate of appearance and limited access to certified reference materials, or to the need of validated methods for their analysis in biological matrices. Additionally, it is important to extend NPS research to compounds that are analogous to currently emerging substances, adopting thereby a proactive attitude towards this phenomenon.

This dissertation was focused on three main objectives. The first consisted in the analysis of two samples of products seized in Portugal using NMR, which led to the identification of the synthetic cannabinoid 5F-ADB (added to the 1971 United Nations Convention in 2018 and therefore considered a drug, and included in Decree-Law n.º 15/93 in February of 2019) and of the phencyclidine derivative 3-MeO-PCP (a NPS included in Decree-Law n.º 54/2013), both psychoactive substances controlled in Portugal and which may pose lethal effects.

The second objective was the synthesis of six synthetic cathinones (4-MDMB, 4-MNEB, 4-MDMP, 4-MNEP, 4-MDMH, 4-MDEB) in order to be able to supply the LPC-PJ with analytical standards, not only to be used in laboratory routine analysis but also to be used in the validation of an analytic method for their detection and quantification in blood. Three from these cathinones, 4-MDMP, 4-MDMH and 4-MDEB, are new compounds which have not been reported in the literature yet; 4-MDMB and 4-MNEB are available for purchase from Cayman Chemical and 4-MNEP was reported in Europe and it is characterized in literature. The cathinones were synthesized as hydrochloride salts, characterized by NMR, HRMS-ESI

and GC-FID and were obtained with a suitable degree of purity (94%-97%) for their subsequent use in the validation of the proposed analytical method.

Finally, the last objective was the validation of an analytical method for the detection and quantification in blood of those six cathinones, using SPE and GC-MS, with the aim of providing the laboratory of Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF) of INMLCF with a validated method to be used in the laboratorial routine. The developed analytical method proved to be linear in a range of 10-800 ng/mL, yielding calibration curves with an R^2 higher than 0.99 for all the analytes using the weighting factor $1/x^2$, while the LLOQ and the LOD were respectively 10 and 5 ng/mL for all compounds. The method was considered selective, precise and accurate for all studied cathinones according to the World Anti-Doping Agency, the International Conference on Harmonisation, the Food and Drug Administration, and the internal SQTF criteria as well. During the validation of the method no carry-over was observed and the method proved to be robust. Recoveries between 73.3% and 88.2% were obtained in the extraction process, and the stability study showed that the most stable cathinone was 4-MNEB, followed by 4-MNEP, 4MDMB, 4-MDEB, 4-MDMP and, finally, 4-MDMH. The validated method was applied in the analysis of real samples that had been tested positive for amphetamines, but none of the studied cathinones was detected.

KEYWORDS: NPS; Synthetic Cathinones; Synthesis; NMR; Validation; GC-MS.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract.....	vi
Índice.....	viii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas	xx
Índice de Anexos	xxiii
Abreviaturas	xxiv
1. Introdução.....	1
1.1. Novas Substâncias Psicoativas	1
Definição	1
Aparecimento e Evolução.....	2
Efeitos para a saúde humana	3
1.2. Evolução do mercado de NSP	4
1.3. Controlo de NSP (Europa e Portugal)	6
1.4. Canabinoides Sintéticos.....	9
Diversidade e Nomenclatura	9
Aparecimento e Evolução.....	11
Estatísticas	12
1.5. Catinonas Sintéticas.....	13
Origem e Diversidade.....	13
Aparecimento e Evolução.....	14
Estatísticas	15
Revisão Bibliográfica – Métodos de Detecção	15
1.6. Enquadramento do Trabalho	22
2. Materiais e Métodos.....	24
2.1. Equipamento e Materiais.....	24
Análise de Produtos Apreendidos e Síntese de Catinonas	24
Validação de um Método de Detecção e Quantificação de Catinonas por GC-MS	26
2.2. Reagentes e Solventes	27

Análise de Produtos Apreendidos e Síntese de Catinonas	27
Validação de um Método de Detecção e Quantificação de Catinonas por GC-MS	28
2.3. Identificação de NSP em Produtos Apreendidos	31
Amostra 1	31
Amostra 2	32
2.4. Síntese de Catinonas	32
Síntese das Cetonas.....	32
Caracterização do <i>p</i> -Tolunitrilo e das Cetonas Sintetizadas	34
Síntese das α -Bromocetonas	35
Caracterização das α -Bromocetonas Sintetizadas	36
Síntese das Catinonas	37
Caracterização das Catinonas Sintetizadas	39
Obtenção da Solução Etérea de Ácido Clorídrico (3M)	42
2.5. Validação de um Método de Detecção e Quantificação de Catinonas em Sangue por GC-MS.....	43
Identificação e Quantificação dos Compostos em estudo	43
Preparação das Amostras Biológicas.....	44
Otimização do Método	45
Validação do Método	46
Estudo de Seletividade	46
Eficiência do Processo de Extração (Recuperação)	48
Limite de Detecção e Limite Inferior de Quantificação	48
Avaliação do Fenómeno de Arrastamento (<i>Carry-over</i>).....	49
Linearidade e Modelo de Calibração.....	49
Precisão e Exatidão <i>intraday</i> (repetibilidade) e <i>interday</i>	50
Precisão Intermédia.....	51
Robustez	52
Estudo de Estabilidade	52
Análise de Amostras Reais.....	53
3. Resultados e Discussão	54
3.1. Identificação de NSP em Produtos Apreendidos	54
Amostra 1.....	54
Amostra 2.....	59
3.2. Síntese de Catinonas	63
Síntese das Cetonas.....	63
Síntese das α -Bromocetonas	67

Síntese das Catinonas.....	70
3.3. Validação de um Método de Detecção e Quantificação de Catinonas em Sangue por GC-MS.....	86
Identificação e Quantificação dos Compostos em estudo.....	86
Preparação das Amostras Biológicas.....	89
Otimização do Método.....	90
Validação do Método.....	94
Estudo de Seletividade	94
Eficiência do Processo de Extração (Recuperação).....	95
Limite de Detecção e Limite Inferior de Quantificação.....	96
Avaliação do Fenómeno de Arrastamento (<i>Carry-over</i>).....	98
Linearidade e Modelo de Calibração	98
Precisão e Exatidão <i>intraday</i> (repetibilidade) e <i>interday</i>	99
Precisão Intermédia	101
Robustez.....	102
Estudo de Estabilidade.....	102
Análise de Amostras Reais	105
4. Conclusões	107
5. Referências	109
6. Anexos	127

Índice de Figuras

Figura 1.1. Número de NSP reportadas ao UNODC anualmente entre 2009 e 2016.....	3
Figura 1.2. Proporção de NSP por grupo de efeito psicoativo. Adaptado de (UNODC, 2018d).	4
Figura 1.3. Número de NSP notificadas ao Mecanismo de Alerta Rápido da UE pela primeira vez entre 2005 e 2017 e respetivo número de NSP reportadas por semana em cada ano. Adaptado de (EMCDDA, 2018a).....	7
Figura 1.4. Número de apreensões e quantidade apreendida de NSP, por grupo, reportadas ao Mecanismo de Alerta Rápido da UE em 2016. Adaptado de (EMCDDA, 2018a).....	7
Figura 1.5. Exemplos de canabinoides sintéticos e respetiva classificação.....	10
Figura 1.6. Estrutura geral de muitos canabinoides e exemplo de aplicação do método de nomenclatura num canabinoide sintético. Adaptado de (EMCDDA, 2017).....	11
Figura 1.7. Alterações químicas (destacadas a negrito) que levaram a novos canabinoides sintéticos.....	12
Figura 1.8. Comparação entre a anfetamina e a metanfetamina e respetivas catinonas.	13
Figura 1.9. Estrutura das catinonas estudadas no presente trabalho.....	21
Figura 2.1. Esquema reacional geral da formação das catinonas na forma de cloridrato.....	32
Figura 2.2. Montagem utilizada para a obtenção da solução etérea de ácido clorídrico.....	43
Figura 3.1. Estrutura do 5F-ADB (Composto A da Amostra 1).	54
Figura 3.2. Correlações de COSY e HMBC do 5F-ADB em CDCl ₃	56
Figura 3.3. Estrutura do 3-MeO-PCP, presente na Amostra 2.	59
Figura 3.4. Correlações de HSQC-TOCSY, COSY e HMBC do 3-MeO-PCP em DMSO- <i>d</i> ₆	60
Figura 3.5. Mecanismo da adição de reagente de Grignard.	64
Figura 3.6. Mecanismo da formação das cetonas aquando da adição de água e H ₂ SO ₄	64
Figura 3.7. Comparação dos espectros de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) do <i>p</i> -tolunitrilo e das cetonas sintetizadas antes de serem purificadas.....	65
Figura 3.8. Comparação dos espectros de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) das cetonas sintetizadas após purificação.....	66
Figura 3.9. Mecanismo da formação das bromocetonas.	67
Figura 3.10. Comparação dos espectros de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da 4'-metilbutirofenona (8) e respetiva α-bromocetona.	68

Figura 3.11. Comparação dos espectros de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da 4 ² -metilvalerofenona (9) e respectiva α-bromocetona.....	68
Figura 3.12. Comparação dos espectros de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da 4 ² -metilhexanofenona (10) e respectiva α-bromocetona.....	69
Figura 3.13. Mecanismo de formação das catinonas na forma de cloridrato.	70
Figura 3.14. Comparação dos espectros de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da 4 ² -metil-2-bromobutirofenona (11) e das correspondentes catinonas sintetizadas: 4-MDMB (1), 4-MNEB (2) e 4-MDEB (6).....	71
Figura 3.15. Comparação dos espectros de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da 4 ² -metil-2-bromovalerofenona (12) e das correspondentes catinonas sintetizadas: 4-MDMP (3) e 4-MNEP (4).....	72
Figura 3.16. Comparação dos espectros de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da 4 ² -metil-2-bromohexanofenona (13) e da correspondente catinona sintetizada: 4-MDMH (5).	72
Figura 3.17. Correlações de COSY da catinona 4-MDMH (5) relativas ao anel aromático... 74	
Figura 3.18. Correlações de COSY das catinonas 4-MDMH (5) e 4-MDEB (6) relativas à cadeia alquílica.....	75
Figura 3.19. Correlações de COSY das catinonas 4-MDMH (5) e 4-MDEB (6) relativas ao grupo amino.	77
Figura 3.20. Correlações de HMBC para identificação dos carbonos quaternários.	78
Figura 3.21. Estrutura da 4 ² -metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona (1).....	79
Figura 3.22. Estrutura da 4 ² -metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (2).....	80
Figura 3.23. Estrutura da 4 ² -metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona (3).	81
Figura 3.24. Estrutura da 4 ² -metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4).....	82
Figura 3.25. Estrutura da 4 ² -metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona (5).	84
Figura 3.26. Estrutura da 4 ² -metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona (6).....	85
Figura 3.27. Fragmentações previstas por EI para as catinonas em estudo (Namera, et al., 2015).	87
Figura 3.28. Cromatogramas da mistura de catinonas (1-6) obtidos com derivatização com MSTFA/TMCS.....	91
Figura 3.29. Cromatogramas das catinonas 2 e 4 (77 µg/mL) obtidos com derivatização com MBTFA.....	91
Figura 3.30. Cromatograma da mistura de catinonas (1-6, 1,5 µg/mL) obtido sem derivatização.....	91
Figura 3.31. Cromatogramas da mistura de catinonas (1-6, 0,3 µg/mL) obtidos para diferentes programas de temperaturas (A e B).	92

Figura 3.32. Cromatogramas da mistura de catinonas (1-6 , 0,3 µg/mL) obtidos utilizando diferentes fluxo de hélio (A e B).....	92
Figura 3.33. Cromatogramas da mistura de catinonas (1-6 , 100 ng/mL de sangue) obtidos com diferentes tipos de sangue (A e B).....	93
Figura 3.34. Sobreposição dos cromatogramas da mistura de catinonas (1-6 , 0,3 µg/mL) obtidos com diferentes modos de injeção (razão de <i>split</i> de 1:5, 1:3 ou <i>splitless</i>).....	93
Figura 3.35. Sobreposição dos cromatogramas da mistura de catinonas (1-6 , 100 ng/mL de sangue) obtidos com diferentes solventes de lavagem.	94
Figura 3.36. Cromatogramas obtidos para a <i>Pool 1</i>	95
Figura 3.37. Comparação dos cromatogramas obtidos para o estudo do LOD.....	96
Figura 3.38. Cromatogramas obtidos para a avaliação do fenómeno de arrastamento (<i>carry-over</i>).	98
Figura 3.39. Comparação das curvas de calibração para a 4-MDMB (1) com e sem o calibrador a 1000 ng/mL.....	99
Figura 3.40. Estrutura das catinonas estudadas no presente trabalho.....	105
Figura 3.41. Cromatogramas obtidos para uma amostra controlo de 100 ng/mL e para as 6 amostras reais analisadas.	106
Figura 6.1. Espetro de RMN ¹ H do 5F-ADB (Composto A), em CDCl ₃	127
Figura 6.2. Espetro de RMN ¹ H do 5F-ADB (Composto A), em CDCl ₃ (ampliação).....	127
Figura 6.3. Espetro de RMN ¹³ C APT do 5F-ADB (Composto A), em CDCl ₃	128
Figura 6.4. Espetro de HSQC do 5F-ADB (Composto A), em CDCl ₃	128
Figura 6.5. Espetro de COSY do 5F-ADB (Composto A), em CDCl ₃	128
Figura 6.6. Espetro de HMBC do 5F-ADB (Composto A), em CDCl ₃	129
Figura 6.7. Espetro de RMN ¹ H da Amostra 1, em MeOD.....	129
Figura 6.8. Espetro de RMN ¹ H da Amostra 1, em MeOD (ampliação dos picos correspondentes ao 5F-ADB (Composto A)).	129
Figura 6.9. Espetro de RMN ¹³ C APT da Amostra 1, em MeOD.....	130
Figura 6.10. Espetro de HSQC da Amostra 1, em MeOD.....	130
Figura 6.11. Espetro de COSY da Amostra 1, em MeOD.	130
Figura 6.12. Espetro de HMBC da Amostra 1, em MeOD.....	131
Figura 6.13. Espetro de RMN ¹ H do 3-MeO-PCP, em DMSO- <i>d</i> ₆	132
Figura 6.14. Espetro de RMN ¹ H do 3-MeO-PCP, em DMSO- <i>d</i> ₆ (ampliação).	132
Figura 6.15. Espetro de RMN ¹³ C APT do 3-MeO-PCP, em DMSO- <i>d</i> ₆	133
Figura 6.16. Espetro de HSQC do 3-MeO-PCP, em DMSO- <i>d</i> ₆	133
Figura 6.17. Espetro de COSY do 3-MeO-PCP, em DMSO- <i>d</i> ₆	133
Figura 6.18. Espetro de HSQC-TOCSY do 3-MeO-PCP, em DMSO- <i>d</i> ₆	134
Figura 6.19. Espetro de HMBC do 3-MeO-PCP, em DMSO- <i>d</i> ₆	134

Figura 6.20. Espetro de RMN ¹ H do 3-MeO-PCP, em MeOD.	134
Figura 6.21. Espetro de RMN ¹ H do 3-MeO-PCP, em MeOD (ampliação).....	135
Figura 6.22. Espetro de RMN ¹³ C APT do 3-MeO-PCP, em MeOD.	135
Figura 6.23. Espetro de HSQC do 3-MeO-PCP, em MeOD.	135
Figura 6.24. Espetro de COSY do 3-MeO-PCP, em MeOD.	136
Figura 6.25. Espetro de HSQC-TOCSY do 3-MeO-PCP, em MeOD.	136
Figura 6.26. Espetro de HMBC do 3-MeO-PCP, em MeOD.	136
Figura 6.27. Espetro de RMN ¹ H do 3-MeO-PCP, em CDCl ₃	137
Figura 6.28. Espetro de RMN ¹ H do 3-MeO-PCP, em CDCl ₃ (ampliação).....	137
Figura 6.29. Espetro de RMN ¹³ C APT do 3-MeO-PCP, em CDCl ₃	137
Figura 6.30. Espetro de HSQC do 3-MeO-PCP, em CDCl ₃	138
Figura 6.31. Espetro de COSY do 3-MeO-PCP, em CDCl ₃	138
Figura 6.32. Espetro de HSQC-TOCSY do 3-MeO-PCP, em CDCl ₃	138
Figura 6.33. Espetro de HMBC do 3-MeO-PCP, em CDCl ₃	139
Figura 6.34. Espetro de RMN ¹ H do <i>p</i> -tolunitrilo (7), em CDCl ₃	140
Figura 6.35. Espetro de RMN ¹ H do <i>p</i> -tolunitrilo (7), em CDCl ₃ (ampliação).	140
Figura 6.36. Espetro de RMN ¹³ C APT do <i>p</i> -tolunitrilo (7), em CDCl ₃	141
Figura 6.37. Espetro de HSQC do <i>p</i> -tolunitrilo (7), em CDCl ₃	141
Figura 6.38. Espetro de COSY do <i>p</i> -tolunitrilo (7), em CDCl ₃	141
Figura 6.39. Espetro de HMBC do <i>p</i> -tolunitrilo (7), em CDCl ₃	142
Figura 6.40. Espetro de RMN ¹ H da 4 ² -metilbutirofenona (8), em CDCl ₃	142
Figura 6.41. Espetro de RMN ¹ H da 4 ² -metilbutirofenona (8), em CDCl ₃ (ampliação).	143
Figura 6.42. Espetro de RMN ¹³ C APT da 4 ² -metilbutirofenona (8), em CDCl ₃	143
Figura 6.43. Espetro de HSQC da 4 ² -metilbutirofenona (8), em CDCl ₃	143
Figura 6.44. Espetro de COSY da 4 ² -metilbutirofenona (8), em CDCl ₃	144
Figura 6.45. Espetro de HMBC da 4 ² -metilbutirofenona (8), em CDCl ₃	144
Figura 6.46. Espetro de RMN ¹ H da 4 ² -metilvalerofenona (9), em CDCl ₃	145
Figura 6.47. Espetro de RMN ¹ H da 4 ² -metilvalerofenona (9), em CDCl ₃ (ampliação).	145
Figura 6.48. Espetro de RMN ¹³ C APT da 4 ² -metilvalerofenona (9), em CDCl ₃	145
Figura 6.49. Espetro de HSQC da 4 ² -metilvalerofenona (9), em CDCl ₃	146
Figura 6.50. Espetro de COSY da 4 ² -metilvalerofenona (9), em CDCl ₃	146
Figura 6.51. Espetro de HMBC da 4 ² -metilvalerofenona (9), em CDCl ₃	146
Figura 6.52. Espetro de RMN ¹ H da 4 ² -metilhexanofenona (10), em CDCl ₃	147
Figura 6.53. Espetro de RMN ¹ H da 4 ² -metilhexanofenona (10), em CDCl ₃ (ampliação)....	147
Figura 6.54. Espetro de RMN ¹³ C APT da 4 ² -metilhexanofenona (10), em CDCl ₃	148
Figura 6.55. Espetro de HSQC da 4 ² -metilhexanofenona (10), em CDCl ₃	148
Figura 6.56. Espetro de COSY da 4 ² -metilhexanofenona (10), em CDCl ₃	148

Figura 6.57. Espetro de HMBC da 4'-metilhexanofenona (10), em CDCl ₃	149
Figura 6.58. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil-2-bromobutirofenona (11), em CDCl ₃	150
Figura 6.59. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil-2-bromobutirofenona (11), em CDCl ₃ (ampliação).....	150
Figura 6.60. Espetro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil-2-bromobutirofenona (11), em CDCl ₃ .	151
Figura 6.61. Espetro de HSQC da 4'-metil-2-bromobutirofenona (11), em CDCl ₃	151
Figura 6.62. Espetro de COSY da 4'-metil-2-bromobutirofenona (11), em CDCl ₃	151
Figura 6.63. Espetro de HMBC da 4'-metil-2-bromobutirofenona (11), em CDCl ₃	152
Figura 6.64. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil-2-bromovalerofenona (12), em CDCl ₃	153
Figura 6.65. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil-2-bromovalerofenona (12), em CDCl ₃ (ampliação).....	153
Figura 6.66. Espetro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil-2-bromovalerofenona (12), em CDCl ₃ .	153
Figura 6.67. Espetro de HSQC da 4'-metil-2-bromovalerofenona (12), em CDCl ₃	154
Figura 6.68. Espetro de COSY da 4'-metil-2-bromovalerofenona (12), em CDCl ₃	154
Figura 6.69. Espetro de HMBC da 4'-metil-2-bromovalerofenona (12), em CDCl ₃	154
Figura 6.70. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil-2-bromohexanofenona (13), em CDCl ₃	155
Figura 6.71. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil-2-bromohexanofenona (13), em CDCl ₃ (ampliação).....	155
Figura 6.72. Espetro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil-2-bromohexanofenona (13), em CDCl ₃	156
Figura 6.73. Espetro de HSQC da 4'-metil-2-bromohexanofenona (13), em CDCl ₃	156
Figura 6.74. Espetro de COSY da 4'-metil-2-bromohexanofenona (13), em CDCl ₃	156
Figura 6.75. Espetro de HMBC da 4'-metil-2-bromohexanofenona (13), em CDCl ₃	157
Figura 6.76. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona (1), em CDCl ₃	158
Figura 6.77. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona (1), em CDCl ₃ (ampliação).....	158
Figura 6.78. Espetro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona (1), em CDCl ₃	159
Figura 6.79. Espetro de HSQC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona (1), em CDCl ₃	159
Figura 6.80. Espetro de COSY da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona (1), em CDCl ₃	159
Figura 6.81. Espetro de HMBC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona (1), em CDCl ₃	160
Figura 6.82. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (2), em CDCl ₃	160
Figura 6.83. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (2), em CDCl ₃ (ampliação).....	160
Figura 6.84. Espetro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (2), em CDCl ₃	161
Figura 6.85. Espetro de RMN HSQC da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (2), em CDCl ₃	161
Figura 6.86. Espetro de RMN COSY da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (2), em CDCl ₃	161

Figura 6.87. Espectro de RMN HMBC da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (2), em CDCl ₃	162
Figura 6.88. Espectro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona (3), em CDCl ₃ . .	162
Figura 6.89. Espectro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona (3), em CDCl ₃ (ampliação).....	162
Figura 6.90. Espectro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona (3), em CDCl ₃	163
Figura 6.91. Espectro de HSQC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona (3), em CDCl ₃	163
Figura 6.92. Espectro de COSY da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona (3), em CDCl ₃	163
Figura 6.93. Espectro de HMBC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona (3), em CDCl ₃	164
Figura 6.94. Espectro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4), em CDCl ₃	164
Figura 6.95. Espectro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4), em CDCl ₃ (ampliação).	164
Figura 6.96. Espectro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4), em CDCl ₃	165
Figura 6.97. Espectro de HSQC da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4), em CDCl ₃	165
Figura 6.98. Espectro de COSY da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4), em CDCl ₃	165
Figura 6.99. Espectro de HMBC da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4), em CDCl ₃	166
Figura 6.100. Espectro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona (5), em CDCl ₃ ..	166
Figura 6.101. Espectro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona (5), em CDCl ₃ (ampliação).....	166
Figura 6.102. Espectro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona (5), em CDCl ₃	167
Figura 6.103. Espectro de HSQC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona (5), em CDCl ₃	167
Figura 6.104. Espectro de COSY da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona (5), em CDCl ₃	167
Figura 6.105. Espectro de HMBC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona (5), em CDCl ₃	168
Figura 6.106. Espectro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona (6), em CDCl ₃	168
Figura 6.107. Espectro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona (6), em CDCl ₃ (ampliação).....	168
Figura 6.108. Espectro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona (6), em CDCl ₃	169
Figura 6.109. Espectro de HSQC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona (6), em CDCl ₃	169
Figura 6.110. Espectro de COSY da 4'-metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona (6), em CDCl ₃	169
Figura 6.111. Espectro de HMBC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona (6), em CDCl ₃	170
Figura 6.112. Espectro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona (1), em DMSO- <i>d</i> ₆	171
Figura 6.113. Espectro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona (1), em DMSO- <i>d</i> ₆ (ampliação).....	171

Figura 6.114. Espetro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona (1), em DMSO- <i>d</i> ₆	172
Figura 6.115. Espetro de HSQC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona (1), em DMSO- <i>d</i> ₆ .	172
Figura 6.116. Espetro de COSY da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona (1), em DMSO- <i>d</i> ₆ .	172
Figura 6.117. Espetro de HMBC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona (1), em DMSO- <i>d</i> ₆ .	173
Figura 6.118. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (2), em DMSO- <i>d</i> ₆	173
Figura 6.119. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (2), em DMSO- <i>d</i> ₆ (ampliação).....	173
Figura 6.120. Espetro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (2), em DMSO- <i>d</i> ₆	174
Figura 6.121. Espetro de HSQC da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (2), em DMSO- <i>d</i> ₆	174
Figura 6.122. Espetro de COSY da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (2), em DMSO- <i>d</i> ₆	174
Figura 6.123. Espetro de HMBC da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (2), em DMSO- <i>d</i> ₆	175
Figura 6.124. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona (3), em DMSO- <i>d</i> ₆	175
Figura 6.125. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona (3), em DMSO- <i>d</i> ₆ (ampliação).....	175
Figura 6.126. Espetro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona (3), em DMSO- <i>d</i> ₆	176
Figura 6.127. Espetro de HSQC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona (3), em DMSO- <i>d</i> ₆	176
Figura 6.128. Espetro de COSY da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona (3), em DMSO- <i>d</i> ₆	176
Figura 6.129. Espetro de HMBC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona (3), em DMSO- <i>d</i> ₆	177
Figura 6.130. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4), em DMSO- <i>d</i> ₆	177
Figura 6.131. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4), em DMSO- <i>d</i> ₆ (ampliação).....	177
Figura 6.132. Espetro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4), em DMSO- <i>d</i> ₆	178
Figura 6.133. Espetro de HSQC da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4), em DMSO- <i>d</i> ₆	178
Figura 6.134. Espetro de COSY da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4), em DMSO- <i>d</i> ₆	178
Figura 6.135. Espetro de HMBC da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4), em DMSO- <i>d</i> ₆	179
Figura 6.136. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona (5), em DMSO- <i>d</i> ₆	179
Figura 6.137. Espetro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona (5), em DMSO- <i>d</i> ₆ (ampliação).....	179

Figura 6.138. Espectro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona (5), em DMSO- <i>d</i> ₆	180
Figura 6.139. Espectro de HSQC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona (5), em DMSO- <i>d</i> ₆	180
Figura 6.140. Espectro de COSY da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona (5), em DMSO- <i>d</i> ₆	180
Figura 6.141. Espectro de HMBC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona (5), em DMSO- <i>d</i> ₆	181
Figura 6.142. Espectro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona (6), em DMSO- <i>d</i> ₆	181
Figura 6.143. Espectro de RMN ¹ H da 4'-metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona (6), em DMSO- <i>d</i> ₆ (ampliação).....	181
Figura 6.144. Espectro de RMN ¹³ C APT da 4'-metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona (6), em DMSO- <i>d</i> ₆	182
Figura 6.145. Espectro de HSQC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona (6), em DMSO- <i>d</i> ₆	182
Figura 6.146. Espectro de COSY da 4'-metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona (6), em DMSO- <i>d</i> ₆	182
Figura 6.147. Espectro de HMBC da 4'-metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona (6), em DMSO- <i>d</i> ₆	183
Figura 6.148. Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-MDMB (1).....	184
Figura 6.149. Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-MNEB (2).....	184
Figura 6.150. Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-MDMP (3).....	184
Figura 6.151. Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-MNEP (4).....	185
Figura 6.152. Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-MDMH (5).....	185
Figura 6.153. Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-MDEB (6).....	185
Figura 6.154. Folha de cálculo utilizada para confirmação qualitativa: 4-MDMB (1).....	186
Figura 6.155. Folha de cálculo utilizada para confirmação qualitativa: 4-MNEB (2).....	186
Figura 6.156. Folha de cálculo utilizada para confirmação qualitativa: 4-MDMP (3).....	186
Figura 6.157. Folha de cálculo utilizada para confirmação qualitativa: 4-MNEP (4).....	187
Figura 6.158. Folha de cálculo utilizada para confirmação qualitativa: 4 MDMH (5).....	187
Figura 6.159. Folha de cálculo utilizada para confirmação qualitativa: 4-MDEB (6).....	187
Figura 6.160. Cromatogramas obtidos para a <i>Pool 2</i>	188
Figura 6.161. Cromatogramas obtidos para a <i>Pool 3</i>	188
Figura 6.162. Cromatogramas obtidos para a <i>Pool 4</i>	188
Figura 6.163. Cromatogramas obtidos para a <i>Pool 5</i>	188
Figura 6.164. Cromatogramas obtidos para a <i>Pool 6</i>	189

Figura 6.165. Cromatogramas obtidos para a <i>Pool</i> 7.	189
Figura 6.166. Cromatogramas obtidos para a <i>Pool</i> 8.	189
Figura 6.167. Cromatogramas obtidos para a <i>Pool</i> 9.	189
Figura 6.168. Cromatogramas obtidos para a <i>Pool</i> 10.	190
Figura 6.169. Sobreposição dos cromatogramas obtidos no estudo da recuperação para 25 ng/mL.	191
Figura 6.170. Sobreposição dos cromatogramas obtidos no estudo da recuperação para 100 ng/mL.	191
Figura 6.171. Sobreposição dos cromatogramas obtidos no estudo da recuperação para 500 ng/mL.	191
Figura 6.172. Comparação das curvas de calibração para a 4-MNEB (2) com e sem o calibrador a 1000 ng/mL.	192
Figura 6.173. Comparação das curvas de calibração para a 4-MDMP (3) com e sem o calibrador a 1000 ng/mL.	192
Figura 6.174. Comparação das curvas de calibração para a 4-MNEP (4) com e sem o calibrador a 1000 ng/mL.	192
Figura 6.175. Comparação das curvas de calibração para a 4-MDMH (5) com e sem o calibrador a 1000 ng/mL.	193
Figura 6.176. Comparação das curvas de calibração para a 4-MDEB (6) com e sem o calibrador a 1000 ng/mL.	193
Figura 6.177. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para uma amostra analisada dois dias após a sua extração (reinjeção) e uma amostra de controlo.	194
Figura 6.178. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para uma amostra analisada após três ciclos de congelação/descongelação e uma amostra de controlo.	194
Figura 6.179. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para uma amostra analisada após 1 semana no frigorífico e uma amostra de controlo.	195
Figura 6.180. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para uma amostra analisada após 1 mês no congelador e uma amostra de controlo.	195
Figura 6.181. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para uma amostra analisada após 1 mês no frigorífico e uma amostra de controlo.	195

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Exemplos de drogas clássicas e NSP, por grupo de efeito psicoativo	3
Tabela 1.2. Estrutura geral das catinonas sintéticas e exemplos de substituintes presentes nas mesmas.....	14
Tabela 1.3. Detecção/quantificação de catinonas em sangue por GC-MS.....	17
Tabela 1.4. Outros métodos de detecção/quantificação de catinonas em sangue	18
Tabela 1.5. Detecção/quantificação de catinonas em plasma	18
Tabela 1.6. Detecção/quantificação de catinonas em soro	19
Tabela 1.7. Detecção/quantificação de catinonas em urina	19
Tabela 1.8. Detecção/quantificação de catinonas em cabelo	20
Tabela 1.9. Detecção/quantificação de catinonas em saliva	20
Tabela 1.10. Detecção/quantificação de catinonas noutras matrizes biológicas.....	20
Tabela 1.11. Estrutura e dados relativos às catinonas sintetizadas no presente trabalho.....	23
Tabela 2.1. Reagentes e solventes utilizados na análise de produtos apreendidos e síntese de catinonas.....	28
Tabela 2.2. Reagentes e solventes utilizados na validação do método analítico.....	29
Tabela 2.3. Resumo das quantidades de reagentes e de produto e do tempo de reação e rendimento para a síntese das cetonas.....	34
Tabela 2.4. Resumo das quantidades de reagentes e de produto e do tempo de reação e rendimento para a síntese das bromocetonas.....	36
Tabela 2.5. Resumo das quantidades de reagentes e de produto e do tempo de reação e rendimento para a síntese das catinonas.....	39
Tabela 2.6. Intervalos de aceitação para as intensidades relativas dos iões monitorizados em modo SIM.....	44
Tabela 2.7. Composição de cada <i>pool</i> utilizada no estudo de seletividade.....	47
Tabela 2.8. Tabela ANOVA (fator único) utilizada no estudo da precisão intermédia.....	51
Tabela 2.9. Cálculo das estimativas de precisão <i>between-run</i> , repetibilidade e precisão intermédia e respetivo CV da precisão intermédia.....	52
Tabela 2.10. Características de cada amostra real analisada.....	53
Tabela 3.1. Correlações de COSY e HMBC para o 5F-ADB, em CDCl ₃ e em MeOD.....	57
Tabela 3.2. Dados de RMN ¹³ C e ¹ H para o 5F-ADB, em CDCl ₃ , e comparação com a literatura.....	58

Tabela 3.3. Dados de RMN ^{13}C e ^1H para o 5F-ADB, em MeOD, e comparação com a literatura.....	58
Tabela 3.4. Correlações de HSQSC-TOCSY, COSY e HMBC para o 3-MeO-PCP em cada solvente.....	61
Tabela 3.5. Dados de RMN ^{13}C e ^1H para o 3-MeO-PCP, em DMSO- d_6 , e comparação com a literatura.....	62
Tabela 3.6. Dados de RMN ^{13}C e ^1H para o 3-MeO-PCP, em MeOD, e comparação com a literatura.....	62
Tabela 3.7. Dados de RMN ^{13}C e ^1H para o 3-MeO-PCP, em CDCl_3 , e comparação com a literatura.....	63
Tabela 3.8. Comparação dos dados de RMN ^1H , em CDCl_3 , do <i>p</i> -tolunitrilo e das cetonas sintetizadas.....	66
Tabela 3.9. Comparação dos dados de RMN ^1H , em CDCl_3 , das cetonas e bromocetonas sintetizadas.....	69
Tabela 3.10. Resumo da quantidade obtida e rendimento global da síntese de cada catinona.....	72
Tabela 3.11. Comparação dos dados de RMN ^1H , em CDCl_3 , da zona aromática das bromocetonas e respectivas catinonas sintetizadas.....	73
Tabela 3.12. Comparação dos dados de RMN ^1H , em CDCl_3 , da zona alquílica das bromocetonas e respectivas catinonas sintetizadas.....	74
Tabela 3.13. Comparação dos dados de RMN ^1H , em CDCl_3 , dos grupos amino das catinonas sintetizadas.....	76
Tabela 3.14. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona (1).....	79
Tabela 3.15. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (2).....	80
Tabela 3.16. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona (3).....	81
Tabela 3.17. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4).....	82
Tabela 3.18. Comparação dos δ ^{13}C da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4), em DMSO- d_6	83
Tabela 3.19. Comparação dos δ ^1H da 4'-metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (4), em DMSO- d_6	83
Tabela 3.20. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona (5).....	84
Tabela 3.21. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona (6).....	85
Tabela 3.22. Determinação da pureza (%) das catinonas sintetizadas, por GC-FID.....	86

Tabela 3.23. Tempos de retenção e fragmentos iônicos utilizados na identificação dos compostos.....	87
Tabela 3.24. Identificação das catinonas em estudo numa amostra de sangue branco fortificada.....	88
Tabela 3.25. Resultados obtidos no estudo da recuperação ($n=3$).....	95
Tabela 3.26. Resultados obtidos no estudo de precisão e exatidão <i>intraday</i> para uma concentração de 10 ng/mL.....	97
Tabela 3.27. Dados de linearidade ($n=5$).....	99
Tabela 3.28. Resultados obtidos no estudo de precisão e exatidão <i>intraday</i> (repetibilidade, $n=6$) e <i>interday</i> ($n=5$).....	100
Tabela 3.29. Resultados obtidos no estudo de precisão intermédia (<i>combined intra & interday</i> , $n=15$).....	102
Tabela 3.30. Resultados obtidos no estudo da estabilidade ($n=3$).....	103
Tabela 6.1. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para o <i>p</i> -tolunitrilo (7), em CDCl_3 ...	142
Tabela 6.2. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metilbutirofenona (8), em CDCl_3	144
Tabela 6.3. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metilvalerofenona (9), em CDCl_3	147
Tabela 6.4. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metilhexanofenona (10), em CDCl_3	149
Tabela 6.5. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metil-2-bromobutirofenona (11), em CDCl_3	152
Tabela 6.6. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metil-2-bromovalerofenona (12), em CDCl_3	155
Tabela 6.7. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metil-2-bromohexanofenona (13), em CDCl_3	157

Índice de Anexos

Anexo A: Caracterização do composto 5F-ADB presente na Amostra 1.....	127
Anexo B: Caracterização do composto 3-MeO-PCP presente na Amostra 2.....	132
Anexo C: Caracterização do <i>p</i> -tolunitrilo e das cetonas por RMN.....	140
Anexo D: Caracterização das bromocetonas por RMN.....	150
Anexo E: Caracterização das catinonas por RMN, em CDCl ₃	158
Anexo F: Caracterização das catinonas por RMN, em DMSO- <i>d</i> ₆	171
Anexo G: Identificação dos Compostos em estudo.....	184
Anexo H: Estudo de Seletividade.....	188
Anexo I: Eficiência do Processo de Extração.....	191
Anexo J: Linearidade e Modelo de Calibração.....	192
Anexo K: Estudo de Estabilidade.....	194

Abreviaturas

^{13}C APT	Experiência de RMN ^{13}C - Protões Diretamente Ligados (do inglês <i>Attached Proton Test</i>)
3-MeO-PCP	3-Metoxifenciclidina
4-MDEB	4 ^o -Metil- <i>N,N</i> -dietilnorbufedrona
4-MDMB	4 ^o -Metil- <i>N,N</i> -dimetilnorbufedrona
4-MDMH	4 ^o -Metil- <i>N,N</i> -dimetilnorhexedrona
4-MDMP	4 ^o -Metil- <i>N,N</i> -dimetilnorpentedrona
4-MNEB	4 ^o -Metil- <i>N</i> -etilnorbufedrona (ou 4 ^o -metil- α -etilaminobutiofenona)
4-MNEP	4 ^o -Metil- <i>N</i> -etilnorpentedrona (ou 4 ^o -metil- α -etilaminopentiofenona, 4-MEAP)
5F-ADB	5F-MDMB-PINACA (metil 2- {[1-(5-fluoropentil)-1H-indazole-3-carbonil]amino}-3,3-dimetilbutanoato)
5F-AKB48	5F-APINACA (<i>N</i> -(adamantan-1-il)-1-(5-fluoropentil)-1H-indazole-3-carboxamida)
11-OH-THC	11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
AB-CHMINACA	<i>N</i> -(1-amino-3-metil-1-oxobutan-2-il)-1-(ciclohexilmetil)-1H-indazole-3-carboxamida
AMB-FUBINACA	Metil 2-(1-(4-fluorobenzil)-1H-indazole-3-carboxamido)-3-metilbutanoato
brs	Singuleto alargado (do inglês <i>broad singlet</i>)
CDCl_3	Clorofórmio Deuterado
Conc.	Concentração
COSY	Espetroscopia de Correlação Homonuclear (do inglês <i>Homonuclear Correlated Spectroscopy</i>)
CV	Coefficiente de Variação
d	Dupleto
DAD	Detetor de Diode Array (do inglês <i>Diode Array Detector</i>)
DCM	Diclorometano
dd	Duplo Dupleto

ddd	Duplo Duplo Dupleto
DLLME	Microextração Dispersiva Líquido-Líquido (do inglês <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>)
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido Deuterado
DP	Desvio Padrão
dt	Duplo Tripleto
EI	Impacto Eletrónico (do inglês <i>Electronic Impact</i>)
EMCDDA	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (do inglês <i>European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction</i>)
ER	Erro Relativo
ESI	Ionização por eletrospray (do inglês <i>ElectroSpray Ionization</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FCTUC	Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
FCUL	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
GC	Cromatografia Gasosa (do inglês <i>Gas Chromatography</i>)
HFBA	Anidrido Heptafluorobutírico (do inglês <i>Heptafluorobutyric anhydride</i>)
HMBC	Espetroscopia de Correlação Heteronuclear a múltiplas ligações (do inglês <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HRMS	Espetrometria de Massa de Alta Resolução (do inglês <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
HRMS/MS	Espetrometria de Massa de Alta Resolução em tandem
HR-TOF MS	Espetrometria de Massa de Alta Resolução por Tempo de Voo (do inglês <i>High Resolution Time Of Flight Mass Spectrometry</i>)
HSQC	Espetroscopia de Correlação Heteronuclear a uma ligação (do inglês <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>)
HSQC-TOCSY	Espetroscopia de Correlação Heteronuclear a uma ligação - Espetroscopia de Correlação Total (do inglês <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence - Total Correlated Spectroscopy</i>)
Hx/AcOEt	Hexano/Acetato de Etilo
INMLCF	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses
<i>J</i>	Constante de acoplamento
JWH-018	Naftalen-1-il(1-pentil-1H-indol-3-il)metanona

LC	Cromatografia Líquida (do inglês <i>Liquid Chromatography</i>)
LLE	Extração Líquido-Líquido (do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LLOQ	Limite inferior de quantificação (do inglês <i>Lower Limit of Quantification</i>)
LOD	Limite de detecção (do inglês <i>Limit of Detection</i>)
LPC-PJ	Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária
m	Múltiplo
MALDI	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (do inglês <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>)
MBTFA	N-Metil-N-bis(trifluoroacetamida)
MDA	3,4-Metilenedioxiamfetamina
MDMA	3,4-Metilenodioximetanfetamina
MDMB-CHMICA	Metil 2-(1-(ciclohexilmetil)-1H-indole-3-carboxamido)-3,3-dimetilbutanoato
MDPBP	3',4'-Metilenedioxi- α -pirrolidinobutiofenona
MDPV	3',4'-Metilenodioxipirovalerona
MEKC	Cromatografia Micelar Eletrocínética (do inglês <i>Micellar ElectroKinetic Chromatography</i>)
MeOD	Metanol deuterado- d_4
MeOH	Metanol
MIP	Polímero Impresso Molecularmente (do inglês <i>Molecularly Imprinted Polymer</i>)
MS	Espetrometria de Massa (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espetrometria de Massa em tandem
MS _{run} ; MS _r ; MS _T	Quadrados médios (<i>run</i> - inter grupos; <i>r</i> - intra grupos; <i>T</i> - totais)
MSTFA	N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
m/z	Razão massa/carga
OMS	Organização Mundial de Saúde
PFPA	Anidrido Pentafluoropropiónico (do inglês <i>PentaFluoro-Propionic Anhydride</i>)
PLE	Extração Líquida Pressurizada (do inglês <i>Pressurized Liquid Extraction</i>)
ppm	Partes por milhão
quart	Quarteto
QuEChERS	Método de preparação de amostras rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro (do inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)

quint	Quinteto
R _f	Fator de Retenção (do inglês <i>Retention Factor</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singuleto
sext	Sexteto
SI	Precisão Intermédia
SICAD	Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências
SIM	Monitorização seletiva de iões (do inglês <i>Selective Ion Monitoring</i>)
S/N	Razão sinal/ruído (do inglês <i>Signal/Noise</i>)
SPE	Extração em Fase Sólida (do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em Fase Sólida (do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i>)
SQTF	Serviço de Química e Toxicologia Forenses
t	Tripleto
td	Triplo duplete
TFAA	Anidrido Trifluoroacético (do inglês <i>TriFluoroAcetic Anhydride</i>)
THC	Δ^9 -tetrahydrocannabinol
THC-COOH	11-Nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
THF	Tetra-hidrofurano
TLC	Cromatografia em Camada Fina (do inglês <i>Thin-layer Chromatography</i>)
TMCS	Trimetilclorosilano
TOF MS	Espetrometria de Massa por tempo de Voo (do inglês <i>Time Of Flight Mass Spectrometry</i>)
t _R	Tempo de retenção
t _{Rr}	Tempo de retenção relativo
UE	União Europeia
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (do inglês <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>)
UHPSFC	Cromatografia de Fluido Supercrítico de Ultra Eficiência (do inglês <i>Ultra High Performance Supercritical Fluid Chromatography</i>)
ULOQ	Limite superior de quantificação (do inglês <i>Upper Limit of Quantification</i>)
UNODC	Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (do inglês <i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>)
UR-144	(1-pentil-1H-indol-3-il)(2,2,3,3-tetrametilciclopropil)metanona

UV-Vis	Ultravioleta-Visível
WADA	Agência Mundial Antidopagem (do inglês <i>World Anti-Doping Agency</i>)
α -PBP	α -pirrolidinobutiofenona
α -PVP	α -pirrolidinovalerofenona
δ	Desvio Químico
η	Rendimento

1. Introdução

1.1. Novas Substâncias Psicoativas

Definição

Uma substância psicoativa é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como «uma substância que, quando ingerida, afeta processos mentais, como cognição ou afeto», sendo que o termo ‘psicoativo’ não implica necessariamente produção de dependência (Babor, et al., 1994). As substâncias psicoativas podem ser classificadas, segundo a sua origem, em naturais (quando ocorrem naturalmente em plantas), em semissintéticas (quimicamente derivadas de substâncias naturais) ou em sintéticas (completamente criadas pelo ser humano), sendo algumas delas controladas legalmente (Houck & Siegel, 2015).

Nos anos 80 do século XX, devido ao aparecimento de novos compostos sintéticos no mercado de substâncias recreativas, com o objetivo de mimetizarem os efeitos das drogas controladas, mas serem legais, surgiu o termo ‘*designer drugs*’. Este termo referia-se a compostos psicoativos que foram especificamente desenvolvidos para que tivessem uma estrutura química diferente das substâncias controladas e deste modo contornarem a lei. (Babor, et al., 1994; Lavado, et al., 2018; UNODC, 2013).

Posteriormente, com o aparecimento de substâncias psicoativas cada vez mais diversificadas e em maior número surgiu o termo ‘novas substâncias psicoativas’ (NSP). Esta designação resultou da Decisão 2005/387/JAI do Conselho da União Europeia (UE) de 10 de maio de 2005 relativa ao intercâmbio de informações, avaliação de riscos e controlo de NSP (Conselho da União Europeia, 2005) sendo definida como «uma substância pura ou numa preparação não enumerada na Convenção Única das Nações Unidas de 1961 sobre os estupefacientes (alterada pelo Protocolo de 1972) ou na Convenção das Nações Unidas de 1971 sobre substâncias psicotrópicas e que possa constituir uma ameaça para a saúde pública comparável à das substâncias constantes das listas» dessas convenções. O termo NSP é adotado pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC) (UNODC, 2013) e pelo Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (EMCDDA) (EMCDDA, 2006), tendo sido oficialmente adotado em Portugal no final de 2012 para designar as substâncias que eram na altura vendidas em lojas vulgarmente conhecidas por *smartshops* (Assembleia Legislativa da R. Aut. da Madeira, 2012; Lavado, et al., 2018).

Atualmente, a definição do termo droga inclui também as NSP de acordo com a Diretiva (UE) 2017/2103 do Parlamento Europeu e do Conselho (Conselho da União Europeia, 2017). O termo droga passa a abranger, além de qualquer das substâncias enumeradas nas Convenções de 1961 e de 1971, qualquer das substâncias enumeradas em anexo dessa Diretiva, sendo que esta Diretiva revoga a Decisão 2005/387/JAI do Conselho da UE de 10 de maio de 2005, mas reforça a definição de ‘nova substância psicoativa’ adotada pelo UNODC e pelo EMCDDA e define ainda o procedimento para a inclusão de NSP na definição de droga.

Aparecimento e Evolução

Apesar da designação ‘novas substâncias psicoativas’ estas não são necessariamente novas invenções, algumas delas foram sintetizadas no início do século XX, tendo algumas sido originalmente desenvolvidas por indústrias farmacêuticas como potenciais agentes terapêuticos, mas que nunca foram comercializadas, pelo que o termo ‘novas’ refere-se à sua recente chegada ao mercado de substâncias recreativas (Lavado, et al., 2018; UNODC, 2013). O abuso de tais substâncias foi acontecendo de forma gradual, por exemplo, o abuso de cetamina foi notado nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa nos anos 80 e 90; nos anos 90 e no início da década seguinte começaram a surgir substâncias da família das feniletilaminas e das piperazinas; desde 2004 foi notado o aparecimento de canabinoides e catinonas sintéticas, bem como de outros grupos de NSP (UNODC, 2013).

Atualmente são considerados pelo UNODC nove grupos distintos de NSP (triptaminas, canabinoides sintéticos, catinonas sintéticas, substâncias à base de plantas, piperazinas, feniletilaminas, arilciclohexilaminas, aminoindanos e outras substâncias), que se apresentam na Figura 1.1 (UNODC, 2018a). Entre 2009 e 2017 foi reportado um total de 803 NSP diferentes por 111 países e territórios, sendo que de entre estas, os canabinoides sintéticos constituem a categoria com um maior número de diferentes substâncias reportadas (251), seguidos pela categoria de outras substâncias (155), catinonas sintéticas (148) e feniletilaminas (136). Apenas um número comparativamente reduzido de triptaminas, piperazinas, aminoindanos e substâncias à base de plantas são reportadas anualmente (Figura 1.1) (UNODC, 2018d).

É de salientar que desde o início da monitorização de NSP pelo UNODC em 2009, novas substâncias têm surgido todos os anos a um ritmo médio de cerca de uma substância por semana, sendo que o aparecimento de NSP já foi reportado em todas as regiões do mundo (UNODC, 2018c).

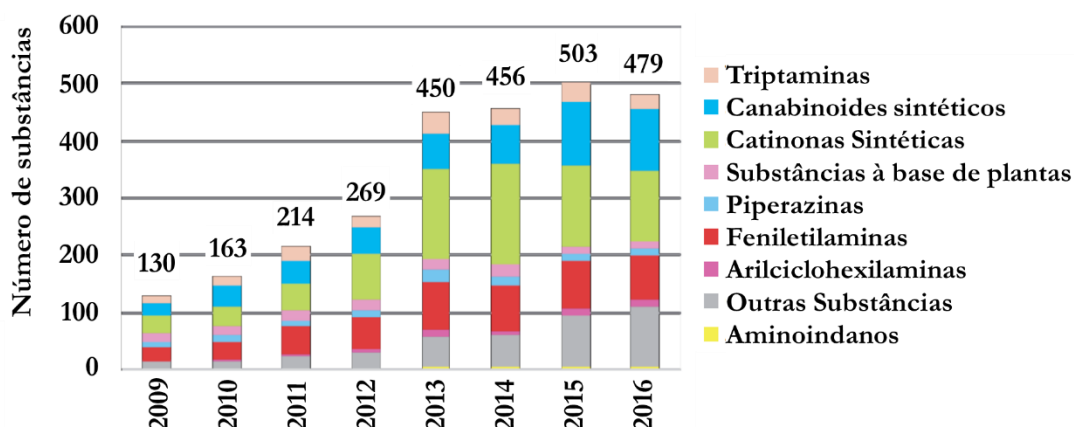


Figura 1.1. Número de NSP reportadas ao UNODC anualmente entre 2009 e 2016.

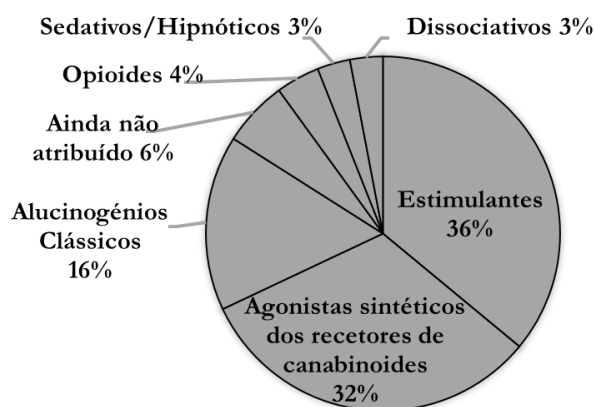
Adaptado de (UNODC, 2018d).

Efeitos para a saúde humana

As NSP interagem com o sistema nervoso central de forma semelhante às drogas clássicas, procurando produzir efeitos psicoativos análogos aos destas drogas, pelo que podem ser distribuídas de acordo com os seis grupos, apresentados na Tabela 1.1 e na Figura 1.2, usados para classificar as substâncias controladas pelas Convenções de 1961 e 1971 relativamente ao principal efeito psicoativo que produzem (UNODC, 2017a; UNODC, 2018c).

Tabela 1.1. Exemplos de drogas clássicas e NSP, por grupo de efeito psicoativo (UNODC, 2017a; UNODC, 2018c).

Grupo de efeito psicoativo	Exemplos de drogas clássicas	Exemplos de NSP
Estimulantes	Cocaína, Metanfetamina	Aminoindanos, Catinonas sintéticas, Piperazinas e Feniletilaminas
Canabinoides	Cannabis, Δ^9 -THC	Canabinoides sintéticos
Alucinogénios Clássicos	LSD, 2C-B	Feniletilaminas, Triptaminas
Opioides	Morfina, Heroína, Fentanil	Análogos de Fentanil (Furanil fentanil, ocfentanil)
Sedativos/Hipnóticos	Diazepam	Etizolam, clonazolam
Dissociativos	Fenciclidina	3-metoxifenciclidina, Desclorocetamina



Fonte: UNODC, early warning advisory on new psychoactive substances.
 Nota: A análise dos efeitos farmacológicos compreende NSP registadas até dezembro de 2017, sendo que substâncias à base de plantas foram excluídas da análise.

Figura 1.2. Proporção de NSP por grupo de efeito psicoativo. Adaptado de (UNODC, 2018d).

Os efeitos da maioria das NSP no corpo humano não são ainda completamente compreendidos, assim, é frequente que informações de segurança relativas à sua toxicidade não estejam disponíveis e que seja desconhecida a melhor forma de as neutralizar ou os seus efeitos adversos a longo prazo (UNODC, 2017a; UNODC, 2018d). Um dos aspetos mais preocupantes das NSP é que os seus utilizadores desconhecem o conteúdo e a dose da substância psicoativa presente nos produtos consumidos. Algumas destas substâncias também têm sido encontradas como adulterantes de drogas controladas. Estes dois fatores expõem os consumidores de NSP e de drogas controladas a riscos de saúde graves acrescidos (Giné, et al., 2014; UNODC, 2017a).

Apesar de não se conhecerem completamente os efeitos das NSP, o seu consumo tem sido associado a efeitos adversos severos incluindo intoxicações agudas e mortes (UNODC, 2017a). A gravidade destas substâncias é refletida pelos diversos casos de mortes associadas ao consumo de NSP pertencentes a diferentes grupos: mortes por *overdose* de opioides sintéticos nos EUA, Canadá e Europa; mortes associadas a NSP derivadas de benzodiazepinas; mortes associadas a catinonas sintéticas como a mefedrona, metedrona, butilona ou a 3',4'-metilenodioxipirovalerona (MDPV); e ainda casos de intoxicações agudas e mortes relacionadas com canabinoides sintéticos (EMCDDA, 2018b; UNODC, 2017a; UNODC, 2018b; UNODC, 2018d).

1.2. Evolução do mercado de NSP

O surgimento de NSP provocou uma transformação no mercado de drogas recreativas. Inicialmente, este mercado que era caracterizado por um número limitado de substâncias pertencentes a um número limitado de grupos químicos transformou-se num que

contém centenas de substâncias de diversos grupos químicos. Contudo, o surgimento destas substâncias não foi o primeiro fenómeno de inovação química alguma vez ocorrido, o mercado das drogas sintéticas tinha já sofrido um período de inovação química que levou principalmente à diversificação de substâncias da classe das anfetaminas, mas este foi limitado relativamente ao número e diversidade química das substâncias que surgiram. Durante este período, apesar da possibilidade de os consumidores notarem diferenças, os produtos disponíveis no mercado continham pelo menos alguma quantidade da substância psicoativa esperada. Esta expectativa mudou drasticamente com o aparecimento das NSP já que estas eram, por vezes, usadas para substituir a substância psicoativa esperada sem mudar a marca do produto. Um exemplo claro desta realidade é o caso dos comprimidos de ‘ecstasy’ que em 2005 continham maioritariamente 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), mas em 2014 alguns começaram a conter maioritariamente misturas de substâncias não controladas (como catinonas sintéticas e piperazinas) em substituição do MDMA (UNODC, 2018c).

A proliferação das NSP pode dever-se a vários fatores nomeadamente a ideia de legalidade que rodeia os seus produtos, comercializados como ‘*legal highs*’, a perceção de menores riscos associados ao uso de NSP, a possibilidade de compra através da Internet e a alterações na qualidade e disponibilidade de drogas clássicas. No entanto, a dinâmica das NSP pode ser bastante instável uma vez que algumas destas substâncias surgem para depois desaparecerem e outras estabelecem os seus próprios mercados. Se por um lado cerca de 60 NSP desapareceram do mercado desde 2013 (fenómeno que pode ser devido à dificuldade em identificar, nos laboratórios, substâncias menos conhecidas ou ao facto de algumas serem introduzidas exclusivamente para substituição temporária de drogas controladas e/ou de substâncias com efeitos desagradáveis vivenciados pelos consumidores (Lavado, et al., 2018; UNODC, 2017a)), por outro lado, foram registadas pelo UNODC, em 2016, 70 NSP nunca antes reportadas (UNODC, 2017a; UNODC, 2018c). Paralelamente, existe ainda um grupo de mais de 80 NSP que foram reportadas todos os anos de 2009 a 2015, sendo que algumas das substâncias recorrentes foram colocadas sob controlo internacional em 2015 e 2016, deixando por definição de ser NSP (UNODC, 2017a).

As NSP são vendidas em diversas plataformas, nomeadamente em lojas físicas especializadas, nos mercados privados, no mercado ilícito, na Internet ‘de superfície’ e na Internet ‘obscura’ (*Darknet*) (EMCDDA, 2018b; Lavado, et al., 2018). Na tentativa de evitar controlos, os produtos que contém NSP são rotulados ‘não para consumo humano’ e são vendidos como misturas de ervas ‘naturais’ como as ‘*spyce drugs*’ (que contém canabinoides sintéticos), ‘sais de banho’ (que contém catinonas sintéticas), ‘*research chemicals* para fins científicos’ ou ‘suplementos alimentares’ (Zanda & Fattore, 2017). Estas substâncias podem ser apresentadas de diversos modos, nomeadamente em embalagens brilhantes, coloridas e apelativas com o objetivo de parecerem alternativas legais às drogas clássicas; no entanto, com

a implementação de legislação relativa às NSP esta abordagem poderá ser progressivamente abandonada, situação notada no Reino Unido desde 2016, onde as NSP têm vindo a ser cada vez mais apresentadas em invólucros ou sacos de plástico sem informação sobre o seu conteúdo (Crew, 2017).

Em Portugal, segundo Lavado et al. e com base em inquéritos populacionais, a principal forma de aquisição de NSP parece ser através de amigos/conhecidos, não parecendo a Internet ser uma forma de aquisição predominante. Além destas, foi ainda referida de uma forma mais residual a aquisição no mercado de rua e/ou nos mesmos circuitos das substâncias controladas, sendo ainda mencionado o acesso a NSP em lojas, o que aponta para a existência de lojas que, de forma clandestina, ainda vendem NSP em Portugal (Lavado, et al., 2018).

1.3. Controlo de NSP (Europa e Portugal)

No contexto mundial, o continente europeu apresenta elevada importância para o mercado das drogas, tanto para as produzidas internamente, como para as traficadas a partir de outras zonas do mundo. As drogas ilícitas que têm entrada na Europa são produzidas principalmente na América do Sul, na Ásia Ocidental e no norte de África, enquanto as NSP são produzidas na China, sendo que existem ainda algumas drogas e substâncias precursoras que transitam para outros continentes através do continente europeu. Na Europa existe também produção de canábis, direcionada principalmente para consumo local, e de drogas sintéticas, destinadas à exportação para outras regiões do mundo (EMCDDA, 2018b).

A proliferação das NSP levou à existência de um mercado de drogas mais diversificado originando um conjunto de desafios para a monitorização, deteção e identificação de drogas, medidas legislativas e controlo de precursores (UNODC, 2018c).

Ao nível da UE, a estratégia legal adotada para dar resposta às ameaças a nível social e para a saúde pública causadas pelas NSP data de 2005 (Conselho da União Europeia, 2005) e assenta numa abordagem de três passos: um mecanismo de alerta rápido, uma avaliação de riscos e medidas de controlo. Esta estratégia está a ser revista a fim de criar um sistema mais rápido e mais eficaz, mas a nova legislação manterá a abordagem de três passos (EMCDDA, 2018b). O EMCDDA é responsável pelos primeiros dois passos, operar o Mecanismo de Alerta Rápido da UE juntamente com a Europol (a agência da UE para a cooperação em matéria de aplicação da lei) e realizar avaliações de risco, enquanto a Comissão Europeia, o Conselho da UE e o Parlamento Europeu são responsáveis pelo terceiro passo, a implementação de medidas de controlo (EMCDDA, 2018a).

Através da abordagem estratégica referida, até ao final de dezembro de 2017, o EMCDDA monitorizava mais de 670 NSP que surgiram no mercado europeu de droga nos

últimos 20 anos, sendo que as catinonas e os canabinoides sintéticos são os grupos com um maior número de substâncias diferentes (Figura 1.3) e que, em 2016, representaram em conjunto quase 80% do número de apreensões de NSP e 80% da quantidade de NSP apreendidas (Figura 1.4) (EMCDDA, 2018a; EMCDDA, 2018b).

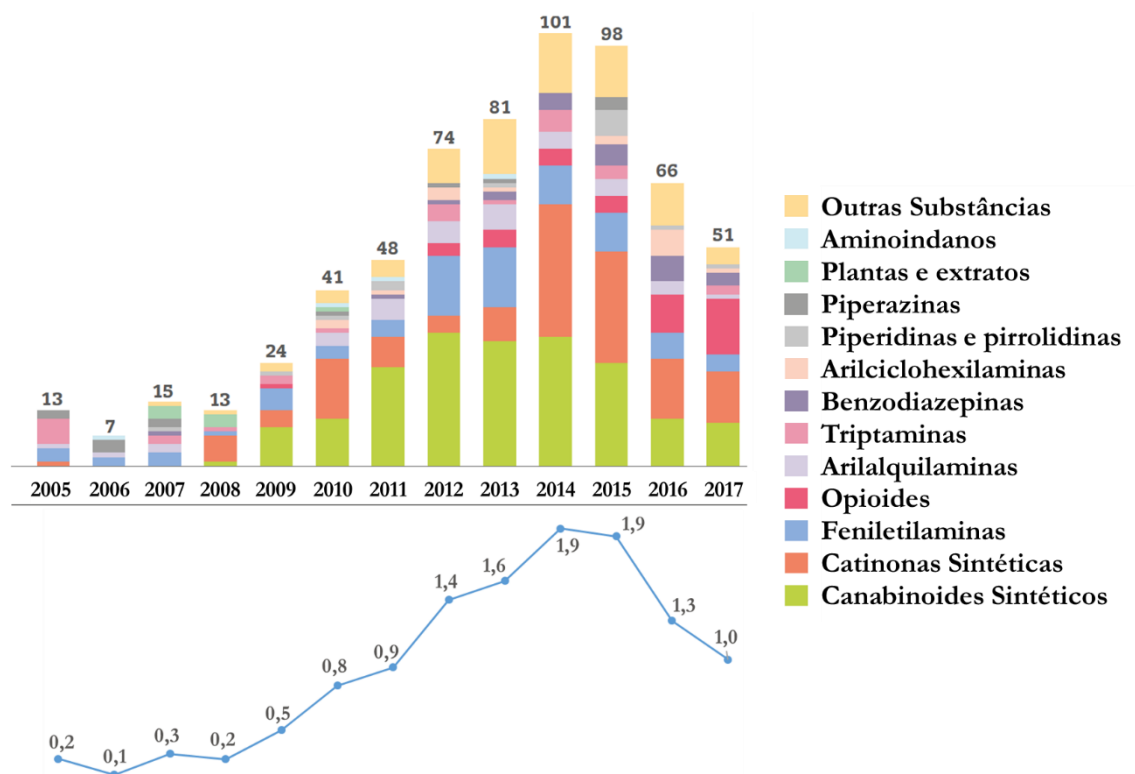


Figura 1.3. Número de NSP notificadas ao Mecanismo de Alerta Rápido da UE pela primeira vez entre 2005 e 2017 e respetivo número de NSP reportadas por semana em cada ano. Adaptado de (EMCDDA, 2018a).

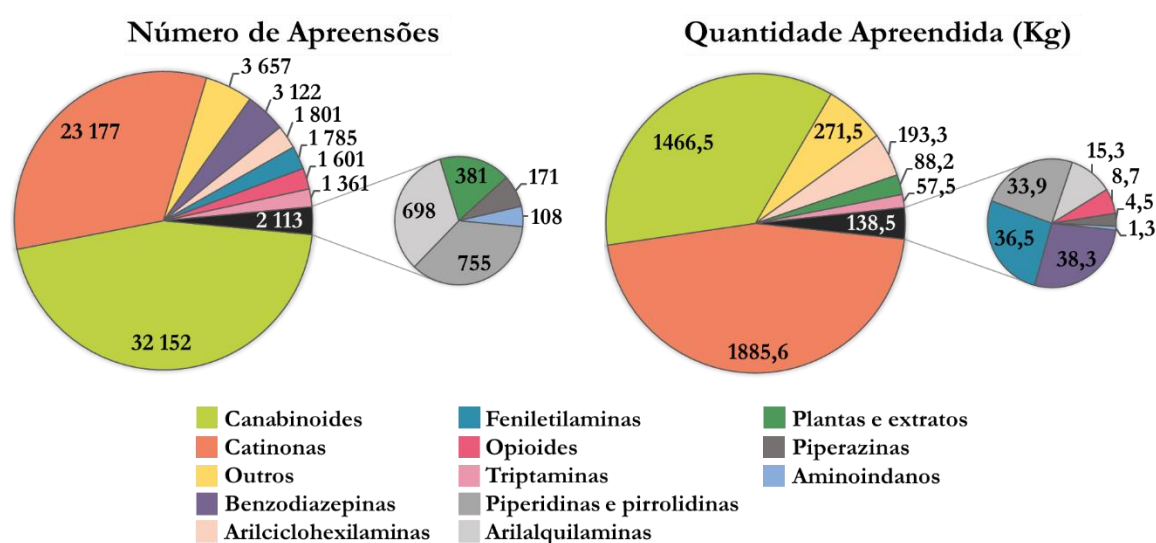


Figura 1.4. Número de apreensões e quantidade apreendida de NSP, por grupo, reportadas ao Mecanismo de Alerta Rápido da UE em 2016. Adaptado de (EMCDDA, 2018a).

Em Portugal, a principal lei referente a matéria de droga é o Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro (Ministério da Justiça Português, 1993) que define o «regime jurídico aplicável ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas» em Portugal. Mais tarde foi criada a Lei n.º 30/2000, de 29 de novembro (Assembleia da República Portuguesa, 2000) que entrou em vigor em julho de 2001 e que define o «regime jurídico aplicável ao consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas, bem como a proteção sanitária e social das pessoas que consomem tais substâncias sem prescrição médica», com esta lei foi descriminalizado o «consumo, aquisição e posse para consumo pessoal de plantas, substâncias ou preparações enunciadas nas tabelas» do Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro, passando tais atos a constituir contraordenação, desde que tais substâncias não excedam «a quantidade necessária para o consumo médio individual durante o período de 10 dias», sendo revogado parte do artigo 40º do Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro.

Com a ocorrência do fenómeno das NSP foi criado o Decreto-Lei n.º 54/2013, de 17 de abril (Ministério da Saúde Português, 2013a) que define «o regime jurídico da prevenção e proteção contra a publicidade e o comércio das novas substâncias psicoativas». Este Decreto-Lei define NSP como «as substâncias não especificamente enquadradas e controladas ao abrigo de legislação própria que, em estado puro ou numa preparação, podem constituir uma ameaça para a saúde pública comparável à das substâncias previstas naquela legislação, com perigo para a vida ou para a saúde e integridade física, devido aos efeitos no sistema nervoso central, podendo induzir alterações significativas a nível da função motora, bem como das funções mentais, designadamente do raciocínio, juízo crítico e comportamento, muitas vezes com estados de delírio, alucinações ou extrema euforia, podendo causar dependência e, em certos casos, produzir danos duradouros ou mesmo permanentes sobre a saúde dos consumidores» sendo consideradas NSP não só as substâncias constantes da lista presente na Portaria n.º 154/2013, de 17 de abril (Ministério da Saúde Português, 2013b), bem como, «os derivados, os isómeros e os sais daquelas substâncias, sempre que a sua existência seja possível, compreendendo todos os preparados em que as mesmas estejam associadas a outros compostos». Este Decreto-Lei procede à proibição da produção, importação, exportação, publicidade, distribuição, venda, detenção e disponibilização de NSP e configura um mecanismo de controlo para as mesmas, nomeadamente, estendendo as funções de prevenção, redução de riscos e danos, reinserção social e tratamento a cargo do Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD) às NSP (Ministério da Saúde Português, 2013a). A Portaria mencionada divide as NSP em feniletilaminas e derivados, piperazinas e derivados, derivados da catinona, canabinoides sintéticos, derivados análogos da cocaína, plantas e respetivos constituintes ativos e outros, podendo ser atualizada para incluir novas substâncias que vão surgindo e assim acompanhar a evolução constante do fenómeno das NSP (Ministério da Saúde Português, 2013b).

A implementação de legislação em Portugal que abranja as NSP teve como primeira consequência o encerramento das lojas que vendiam estes produtos, vulgarmente denominadas *smartsbops*, ou a sua reconversão noutra tipo de negócio (Lavado, et al., 2018).

1.4. Canabinoides Sintéticos

Diversidade e Nomenclatura

Os canabinoides sintéticos são um grupo diversificado de compostos psicoativos potentes que pretendem mimetizar os efeitos do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (a substância que é a principal responsável pela maioria dos efeitos psicoativos da planta *Cannabis*) através da sua ligação aos mesmos recetores de canabinoides no cérebro e nos órgãos periféricos a que se liga o THC (EMCDDA, 2017; Fattore & Fratta, 2011; Zanda & Fattore, 2017). Deste modo, os canabinoides sintéticos não são simplesmente versões sintéticas das substâncias naturalmente presentes na planta da canábis, como os seus nomes de rua ‘canábis sintética’ ou ‘marijuana sintética’ poderiam sugerir (UNODC, 2017a).

Os diferentes canabinoides sintéticos existentes podem ser classificados, como sugerido por Howlett *et al.* (Howlett, et al., 2002) e Thakur *et al.* (Thakur, et al., 2005), em canabinoides clássicos (análogos sintéticos do THC), canabinoides não clássicos (ciclo-hexilfenóis ou 3-arilciclo-hexilfenóis), canabinoides híbridos (com características estruturais de canabinoides clássicos e não clássicos), aminoalquilindoles (divididos em naftoilindoles, naftilmetilindoles, benzoilindoles e fenilacetilindoles), eicosanoides (endocanabinoides e seus derivados sintéticos) e outros (diarilpirazoles, naftoilpirroles, naftilmetilindenos, entre outros). Exemplos de canabinoides pertencentes a estas diferentes classes são apresentados na Figura 1.5.

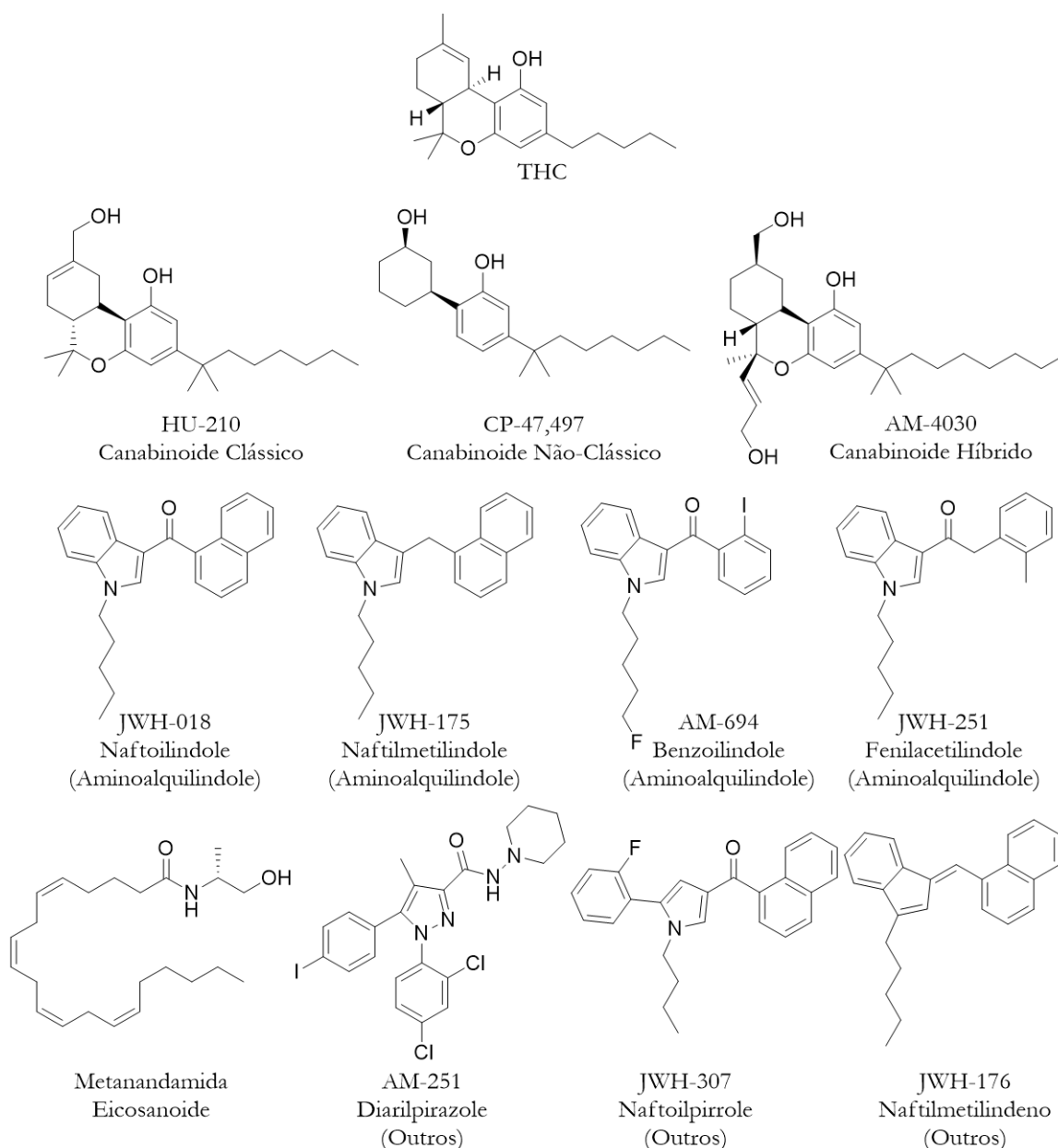


Figura 1.5. Exemplos de canabinoides sintéticos e respetiva classificação (Solimini, et al., 2017; Thakur, et al., 2005; UNODC, 2011).

Os compostos que constituem este grupo de substâncias apresentam nomes de código variados, alguns estão relacionados com o cientista ou a instituição que os sintetizou pela primeira vez, por exemplo, a série ‘HU’ provém da Universidade Hebraica de Jerusalém, a série ‘CP’ corresponde a Carl Pfizer, a ‘AM’ a Alexandros Makriyannis e a série ‘JWH’ a John W. Huffman, enquanto outros foram provavelmente escolhidos pelos fabricantes destes produtos para ajudar na sua comercialização, por exemplo os nomes ‘AKB-48’ e ‘2NE1’, que são denominações de bandas femininas asiáticas muito famosas, usados em vez de APINACA e APICA, respetivamente (EMCDDA, 2017).

Além dos anteriores, existem ainda nomes de código baseados num método de nomenclatura sistematizado pelo EMCDDA que assenta no facto de muitas das estruturas destes compostos serem constituídas pela combinação de quatro elementos: cauda, núcleo, ligação e grupo secundário (Figura 1.6). Neste método, é atribuído um nome de código a cada componente, por exemplo, ‘A’ corresponde a uma amina no grupo secundário e ‘CA’ a uma carboxamida, sendo depois alcançado o nome final respeitando o padrão: GrupoSecundário-CaudaNúcleoLigação (na presença de substituintes estes devem ser dispostos de acordo com o elemento a que estão ligados, à frente do nome se forem da cauda, antes do grupo secundário se forem deste elemento ou no fim do código se forem do núcleo). Aplicando este método aos canabinoides sintéticos que respeitem este tipo estrutura será possível identificar a respetiva estrutura química sem a sua longa denominação, tendo cada composto um nome único (Figura 1.6) (EMCDDA, 2017).

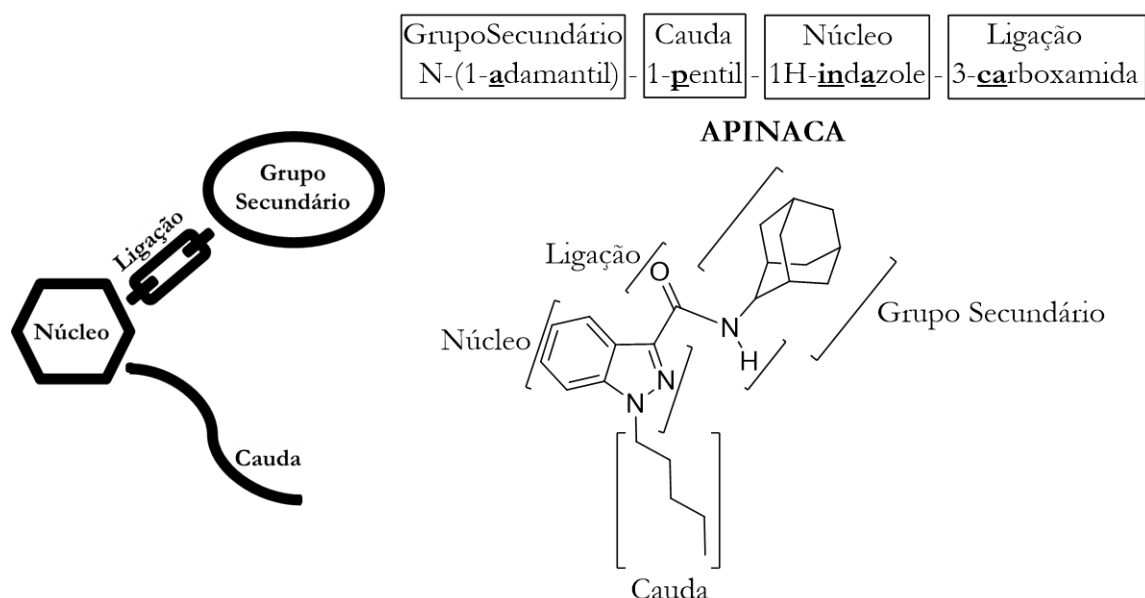


Figura 1.6. Estrutura geral de muitos canabinoides e exemplo de aplicação do método de nomenclatura num canabinoide sintético. Adaptado de (EMCDDA, 2017).

Assim sendo, na Europa são conhecidas, no total, 14 diferentes famílias químicas de canabinoides sintéticos (EMCDDA, 2017).

Aparecimento e Evolução

A síntese de muitos dos canabinoides remonta ao século XX, por exemplo, a série ‘HU’ foi sintetizada nos anos 60, a série ‘CP’ nos anos 70 e a série ‘JWH’ nos anos 80, sendo que muitos deles foram inicialmente desenhados para fins de investigação farmacêutica (Fattore & Fratta, 2011; UNODC, 2017a).

Os canabinoides sintéticos foram reportados como NSP pela primeira vez em 2004, sendo que o primeiro canabinoide sintético a ser reportado na Europa foi o JWH-018, em 2008. Estas substâncias foram reportadas pela primeira vez por diversos países, a nível mundial, entre 2008 e 2011 (surgindo na Europa em maior escala em 2008 e 2009) (UNODC, 2013; UNODC, 2017b). Após 2008, os canabinoides sintéticos foram evoluindo, sofrendo alterações estruturais sucessivas (relativamente à estrutura do JWH-018), de forma a mantê-los num estado legal ambíguo, nomeadamente, a primeira onda de naftoilindoles evoluiu para os naftoilindazoles, que posteriormente evoluíram para os indazol carboxamidas e depois para os indol carboxamidas (Figura 1.7) (UNODC, 2017a).

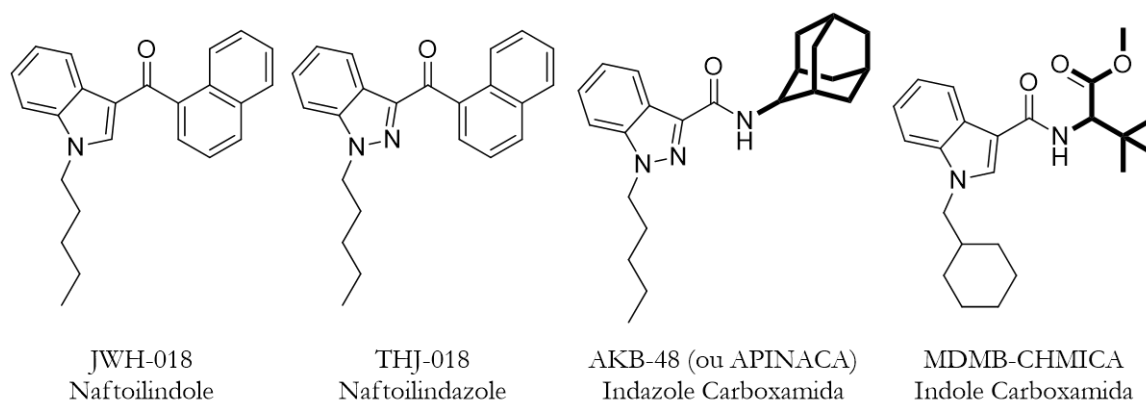


Figura 1.7. Alterações químicas (destacadas a negrito) que levaram a novos canabinoides sintéticos.

Adaptado de (UNODC, 2017a).

Estes compostos são vendidos como ‘misturas de ervas’ e ‘*legal highs*’ rotulados ‘não para consumo humano’ sob uma variedade de marcas tais como ‘*Spice*’, ‘*Spice Gold*’, ‘*Artic Spice*’, ‘*Yucatan Fire*’, ‘*Aroma*’, ‘*K2*’, ‘*Dream*’, ‘*Smoke*’ (UNODC, 2017a; Zanda & Fattore, 2017).

Estatísticas

Os canabinoides sintéticos pertencem a um grupo de compostos cuja variedade tem vindo a aumentar significativamente, enquanto em 2009 apenas eram conhecidas 32 substâncias diferentes, em 2017 eram já conhecidas mundialmente mais de 250 (UNODC, 2013). A nível europeu, os canabinoides sintéticos são o maior grupo de NSP monitorizadas pelo EMCDDA, contando com 179 notificações de 2008 a 2017, incluindo 10 reportados pela primeira vez em 2017 (EMCDDA, 2018b).

Na Europa, em 2016, este grupo de compostos foram as NSP mais frequentemente apreendidas, tendo mais de 32.000 apreensões, o que representa quase metade do total de apreensões de NSP desse ano, alcançando quase 1,5 toneladas de material apreendido. Em 2016, os canabinoides sintéticos mais frequentemente apreendidos foram o

MDMB-CHMICA, AB-CHMINACA, UR-144, 5F-AKB48 e AMB-FUBINACA (EMCDDA, 2018a).

Em Portugal, tendo em conta os dados reportados pelo Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC-PJ), foram identificados 15 canabinoides sintéticos distintos em 2016 e 16 em 2017, tendo os compostos predominantes sido o AB-CHMINACA e o JWH-018, respetivamente. Em 2017, a principal forma de apresentação destas substâncias foi a mistura herbácea, sendo a apresentação em pó quase igualmente frequente e identificando-se também a presença em micro-selos (AMB-FUBINACA) (Lavado, et al., 2018).

1.5. Catinonas Sintéticas

Origem e Diversidade

O arbusto de Khat (*Catha Edulis*) da família *celastraceae* é uma planta nativa do Corno de África e da Península Arábica. Nestas regiões a mastigação desta planta é um costume social, sendo as folhas frescas de Khat consumidas diariamente pelos seus efeitos estimulantes e eufóricos. Este arbusto passou a ser conhecido pelos europeus no fim do século XVIII e no século XIX, tendo os componentes ativos desta planta sido isolados no século XIX e XX, nomeadamente um alcaloide ‘katin’ foi identificado pela primeira vez em 1887, a ‘catina’ em 1930 e a ‘catinona’ em 1975. A *S*(-)-catinona é considerada o principal componente ativo responsável pelos efeitos farmacológicos da planta Khat (Arunotayanun & Gibbons, 2012; UNODC, 2013).

A catinona e os seus derivados embora estruturalmente relacionados com a família das feniletilaminas (que inclui a anfetamina e a metanfetamina) apresentam uma menor potência, sendo caracterizados pela presença de um grupo β -ceto na cadeia lateral das feniletilaminas (Figura 1.8) (UNODC, 2013).

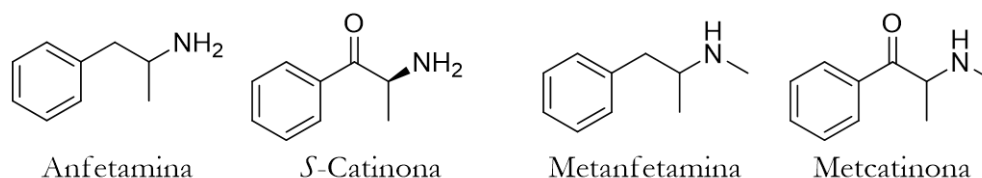
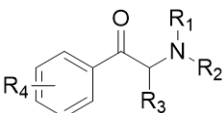
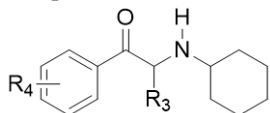
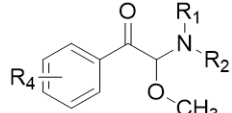
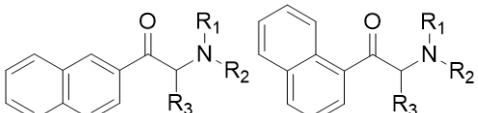
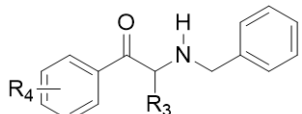
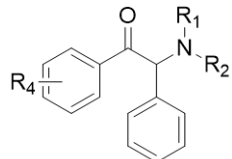
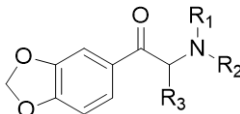
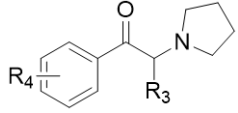
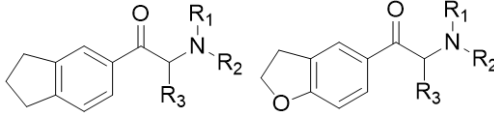
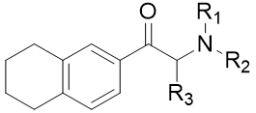


Figura 1.8. Comparação entre a anfetamina e a metanfetamina e respetivas catinonas.

A estrutura da catinona pode ainda ser considerada como um protótipo de onde foram desenvolvidas uma série de catinonas sintéticas cuja estrutura geral se encontra na Tabela 1.2

(UNODC, 2013), apresentando-se exemplos dos diferentes substituintes presentes nas catinonas reportadas ao EMCDDA entre 2005 e 2017.

Tabela 1.2. Estrutura geral das catinonas sintéticas e exemplos de substituintes presentes nas mesmas.

 Estrutura Genérica		
R ₁ e/ou R ₂	R ₃	R ₄
		H
Cadeias alifáticas	Cadeias alifáticas	Halogénios (F, Cl, Br) Grupo metoxilo (OCH ₃)
Grupo ciclo-hexilo	Grupo metoxilo	Grupo naftilo
		
Grupo benzilo	Grupo fenilo	Grupo 3'-4'metilenodioxio
		
Pirrolidina	Substituintes cíclicos	
		
Piperidina		

Aparecimento e Evolução

A síntese das primeiras catinonas remonta à década de 1920. A metcatinona foi a primeira a ser sintetizada em 1928, no entanto, esta só começou a ser uma substância de abuso nos anos 90. Seguidamente, foi sintetizada a mefedrona (ou 4-metilmecatinona), em 1929. A pirovalerona foi sintetizada pela primeira vez em 1964, tendo sido inicialmente comercializada para o tratamento de fadiga crónica e como um inibidor de apetite, no entanto, foi retirada do mercado por causar dependência. A MDPV foi sintetizada em 1967 e a metilona em 1996 (UNODC, 2013; Zanda & Fattore, 2017).

As catinonas sintéticas começaram a aparecer no mercado das drogas em meados dos anos 2000; em 2005, a metilona foi a primeira catinona sintética a ser reportada ao EMCDDA,

surgindo em 2007 relatos do uso de mefedrona. Estas substâncias foram reportadas pela primeira vez por diversos países, a nível mundial, entre 2008 e 2011, excetuando-se os dez países africanos em relação aos quais existem dados e onde estas não foram reportadas, tendo surgido na Europa em maior escala em 2009 (UNODC, 2013).

Estes compostos são vendidos como ‘sais de banho’, ‘cristais de banho’, ‘*plant food*’, ‘*herbal incense*’ ou ‘fertilizantes’ e são vulgarmente conhecidos por ‘*Blue Silk*’, ‘*Purple Wave*’, ‘*White Knight*’, ‘*White Lightning*’, ‘*Ocean Burst*’, ‘*Ivory Snow*’, ‘*Ivory Wave*’, ‘*Pure Ivory*’, ‘*Snow Leopard*’, ‘*Stardust*’, ‘*Vanilla Sky*’ (Zanda & Fattore, 2017)

Estatísticas

As catinonas sintéticas constituem um grupo de compostos de elevada diversidade, até ao fim de 2017 foram reportadas ao UNODC 148 catinonas diferentes (UNODC, 2018d). A nível europeu, este grupo de substâncias é o segundo maior grupo de NSP monitorizadas pelo EMCDDA, contando com 130 notificações no total, incluindo 12 reportadas pela primeira vez em 2017 (EMCDDA, 2018b).

Na Europa, em 2016, este grupo de compostos foram as NSP apreendidas em maior quantidade, tendo mais de 23.000 apreensões e alcançando quase 1,9 toneladas de material apreendido. Nesse ano, as catinonas sintéticas mais frequentemente apreendidas foram a α -pirrolidinovalerofenona (α -PVP), a 4-clorometcatinona, a 3-clorometcatinona, a 4-metil-*N,N*-dimetilcatinona e a 3-metilmetcatinona. Nos últimos anos, têm existindo indícios do aumento de interesse pela produção de catinonas sintéticas na Europa, nomeadamente apreensão de percursos, equipamento e laboratórios ilícitos usados para fabricar mefedrona, 4-clorometcatinona e 3-clorometcatinona (EMCDDA, 2018a).

Em Portugal, no âmbito do Mecanismo de Alerta Rápido, foram identificadas 11 catinonas sintéticas diferentes em 2016 e 26 em 2017, tendo os compostos predominantes sido a α -PVP e variantes (4-cloro- α -PVP), bem como a metilona. As amostras analisadas apresentavam-se exclusivamente em pó, excetuando-se a butilona apresentada em comprimidos (Lavado, et al., 2018).

Revisão Bibliográfica – Métodos de Detecção

Por forma a realizar uma revisão bibliográfica dos métodos de deteção e/ou quantificação de catinonas em matrizes biológicas foi realizada uma pesquisa utilizando a ferramenta ‘*Web of Science*’. Para tal, selecionaram-se todas as bases de dados e introduziu-se o termo ‘*cathinone*’, obtendo um total de 1409 resultados (pesquisa realizada no dia 16 de abril de 2019) e tendo-se posteriormente refinado esta pesquisa para diversas matrizes biológicas: *blood*

(sangue, 285 resultados), *urine* (urina, 229), *brain* (cérebro, 163), *plasma* (122), *liver* (fígado, 72), *serum* (soro, 53), *kidney* (rim, 47), *striatum* (corpo estriado – cérebro, 46), *hair* (cabelo, 35), *oral fluid* (saliva, 25), *lung* (pulmão, 13), *dried blood spots* (manchas de sangue seco, 4), *vitreous humor* (humor vítreo, 3) e *pericardial liquid* (líquido pericárdico, 2). De entre os artigos assim encontrados, alguns tratavam-se de artigos de revisão (Couto, et al., 2018; Ellefsen, et al., 2016; Ferreira, et al., 2019; Mercolini & Protti, 2016; Namera, et al., 2015) tendo-se consultado algumas das suas referências; para além disso também se completou a pesquisa com alguns artigos obtidos de outras fontes.

A leitura dos artigos encontrados permitiu constatar que a deteção e/ou quantificação de catinonas se encontra documentada em diversas matrizes biológicas, tais como as utilizadas para refinar a pesquisa bibliográfica e ainda biliar, conteúdo gástrico e líquido cefalorraquidiano. No entanto essa deteção é, por vezes, realizada recorrendo a métodos que foram validados para uma matriz biológica diferente da utilizada. Adicionalmente, foi possível comprovar a utilização de diversas técnicas de análise (cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida (LC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), cromatografia de fluido supercrítico de ultra eficiência (UHPSFC), ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e cromatografia micelar eletrocínica (MECK)) acopladas a espetrometria de massa (MS), espetrometria de massa em tandem (MS/MS), espetrometria de massa de alta resolução (HRMS), espetrometria de massa de alta resolução em tandem (HRMS/MS), espetrometria de massa por tempo de voo (TOF MS), espetrometria de massa de alta resolução por tempo de voo (HR-TOF MS), ultravioleta-visível (UV-Vis) e detetor de *diode array* (DAD), diversos métodos de extração (extração em fase sólida (SPE), SPE MonoSpin[®], SPE com polímero impresso molecularmente (MIP-SPE), microextração em fase sólida (SPME), extração líquido-líquido (LLE), extração líquida pressurizada (PLE), microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME), extração rápida, fácil, barata, eficaz, robusta e segura (QuEChERS), incubação e sonicação), diversos padrões internos (análogos deuterados de catinonas, anfetaminas, fenciclidinas, entre outros) e a deteção/quantificação de diversas catinonas. A informação obtida encontra-se esquematizada da Tabela 1.3 à 1.10, sendo que se optou por reunir apenas os métodos de deteção/quantificação que foram validados. Desta forma, encontram-se na Tabela 1.3 os diferentes métodos de extração, catinonas estudadas e respetivo padrão interno e reagente de derivatização utilizados para a sua deteção/quantificação em sangue por GC-MS (matriz biológica e técnica de análise utilizadas neste trabalho), apresentando-se posteriormente e de forma resumida as restantes técnicas de análise e métodos de extração para a deteção de catinonas em sangue e restantes matrizes biológicas.

Tabela 1.3. Detecção/quantificação de catinonas em **sangue** por GC-MS.

Método de Extração	Catinona	Padrão Interno (Derivatizante)	Referência
SPE	4 ^o -Metiletcatinona		
	Bufedrona	MDA- <i>d</i> ₅ (TFAA)	(deRoux & Dunn, 2017)
	Etcatinona		
	Etilona	Etilona- <i>d</i> ₅ (PFPA)	(Lee, et al., 2015)
		MDA- <i>d</i> ₅ (TFAA)	(deRoux & Dunn, 2017)
		MDA- <i>d</i> ₅ (TFAA)	(deRoux & Dunn, 2017)
	MDPV	Metapirileno	(Wyman, et al., 2013)
		Metaqualona	(Liveri, et al., 2016)
	Mefedrona	MDA- <i>d</i> ₅ (TFAA)	(deRoux & Dunn, 2017)
		Mefedrona- <i>d</i> ₃ (MBTFA)	(Margalho, et al., 2016)
		Mefedrona- <i>d</i> ₃ (PFPA)	(Lee, et al., 2015)
	Metcatinona		
	Metedrona	Mefedrona- <i>d</i> ₃ (MBTFA)	(Margalho, et al., 2016)
	Metilona	MDA- <i>d</i> ₅ (TFAA)	(deRoux & Dunn, 2017)
		Metilona- <i>d</i> ₃ (PFPA)	(Lee, et al., 2015)
Pentedrona	Metaqualona	(Liveri, et al., 2016)	
LLE	4 ^o -Clorometcatinona	Metanfetamina- <i>d</i> ₅ (PFPA)	(Tomczak, et al., 2018)
	Catinona	Metilmexiletina (HFBA)	(Kankaanpää, et al., 2004)
	N-Etilpentilona	Mepivacaína	(Atherton, et al., 2019)
	α-PBP		
	α-PVP	α-PVP- <i>d</i> ₈	(Namera, et al., 2013b)
	MDPBP	α-PVP- <i>d</i> ₈	(Namera, et al., 2013b)
		Metanfetamina- <i>d</i> ₅ (TFAA)	(Wiergowski, et al., 2016)
	MDPV	α-PVP- <i>d</i> ₈	(Namera, et al., 2013b)
		Anfetamina- <i>d</i> ₆ (TFAA)	(Gerace, et al., 2014)
	Mefedrona	Metanfetamina- <i>d</i> ₁₄ (PFPA)	(Dickson, et al., 2010)
MDMA- <i>d</i> ₅ (TFAA)		(Wikström, et al., 2010)	
Metilona	Metilona- <i>d</i> ₃ (HFBA)	(Pearson, et al., 2012)	
SPME	α-PVP		
	MDPV	α-PVP- <i>d</i> ₈	(Saito, et al., 2013)
	Pirovalerona		
DLLME	3 ^o -Metilmetcatinona		
	4 ^o -Fluorometcatinona		
	4 ^o -Metiletcatinona		
	α-PVP		
	Butilona		
	Catinona		
	Etilona	Mefedrona- <i>d</i> ₃ (Cloroformato de hexilo)	(Mercieca, et al., 2018)
	MDPV		
	Mefedrona		
	Metedrona		
Metilona			
Pentedrona			
Pentilona			
Não definido	Mefedrona	MDA- <i>d</i> ₅ (PFPA)	(Torrance & Cooper, 2010)

Tabela 1.4. Outros métodos de detecção/quantificação de catinonas em **sangue**.

Técnica de Análise	Método de Extração	Referência
LC-MS	LLE	(Adamowicz, et al., 2014; Cosbey, et al., 2013; Pieprzyca, et al., 2018)
LC-MS/MS	SPE	(Johnson & Botch-Jones, 2013; Rojek, et al., 2012; Rojek, et al., 2016; Vignali, et al., 2019)
	SPME	(Montesano, et al., 2017b)
	LLE	(Adamowicz & Hydzik, 2019; Adamowicz & Tokarczyk, 2016; Adamowicz, et al., 2013a; Adamowicz, et al., 2013b; Adamowicz, et al., 2016a; Adamowicz, et al., 2016b; Aknouche, et al., 2017; Ammann, et al., 2012; Barrios, et al., 2016; Costa, et al., 2019) (Gil, et al., 2013; Griffiths, et al., 2016; Marinetti & Antonides, 2013; Sørensen, 2011; Vaiano, et al., 2016; Yamagishi, et al., 2018; Zuba, et al., 2013)
	QuEChERS	(Kudo, et al., 2015; Usui, et al., 2014; Yonemitsu, et al., 2016)
LC-TOF MS	SPE	(Glicksberg, et al., 2016; Guale, et al., 2013)
	LLE	(Nash, et al., 2019)
HPLC-MS/MS	LLE	(Lusthof, et al., 2011)
UHPLC-MS/MS	SPE	(Zhang, et al., 2014)
	LLE	(Jamey, et al., 2016)
	DLLME	(Odoardi, et al., 2015)
UHPLC-TOF MS	SPE	(Pedersen, et al., 2013)
	LLE	(Pasin, et al., 2015)
MALDI-TOF MS	LLE	(Minakata, et al., 2015)

Tabela 1.5. Detecção/quantificação de catinonas em **plasma**.

Técnica de Análise	Método de Extração	Referência
GC-MS	SPE	(Alremeithi, et al., 2016; Alremeithi, et al., 2018; Derungs, et al., 2011)
	LLE	(Olesti, et al., 2016)
LC-MS/MS	SPE	(Beyer, et al., 2007; Wohlfarth & Weinmann, 2010)
	LLE	(Diestelmann, et al., 2018; Ellefsen, et al., 2015; Li, et al., 2014; Mercolini, et al., 2016; Novellas, et al., 2015; Olesti, et al., 2017; Wang, et al., 2012)
LC-TOF MS	LLE	(Shintani-Ishida, et al., 2016)
	LLE	(Shintani-Ishida, et al., 2015)
LC-HRMS	LLE	(Anizan, et al., 2014)
HPLC-UV-Vis	SPE	(Meetani, et al., 2019)
HPLC-DAD	LLE	(Maskell, et al., 2011)

Tabela 1.6. Detecção/quantificação de catinonas em **soro**.

Técnica de Análise	Método de Extração	Referência
GC-MS	SPE	(Grapp, et al., 2017)
	LLE	(Kankaanpää, et al., 2004; Maas, et al., 2015)
LC-MS/MS	SPE	(Kriikku, et al., 2011; Lehmann, et al., 2017; Smith, et al., 2016; Swortwood, et al., 2013)
	LLE	(Beck, et al., 2015; Maas, et al., 2015)
	—	(Bäckberg, et al., 2015)
LC-MS	LLE	(Hambuchen, et al., 2017)
HLPC-MS	SPE	(Bogusz, et al., 2000)

Tabela 1.7. Detecção/quantificação de catinonas em **urina**.

Técnica de Análise	Método de Extração	Referência
GC-MS	SPE	(Alremeithi, et al., 2016; Alremeithi, et al., 2018; Alsenedi & Morrison, 2018; Gerace, et al., 2014; Hong, et al., 2015; Liveri, et al., 2016; Springer, et al., 2002; Springer, et al., 2003a; Springer, et al., 2003b; Springer, et al., 2003c) (Springer, et al., 2003d; Wyman, et al., 2013)
	SPE MonoSpin [®]	(Namera, et al., 2014)
	LLE	(Hagan & Reidy, 2015; Kankaanpää, et al., 2004; Marais & Laurens, 2009; Meyer, et al., 2010; Ojanperä, et al., 2011; Paul & Cole, 2001; Strano-Rossi, et al., 2010)
	DLLME	(Mercieca, et al., 2018)
	—	(Molnár, et al., 2016)
LC-MS	LLE	(Zaitso, et al., 2009)
LC-MS/MS	SPE	(Fernandez, et al., 2007; Vignali, et al., 2019)
	LLE	(Adamowicz & Hydzik, 2019; Beck, et al., 2015; Gil, et al., 2013; Matsuta, et al., 2015; Mercolini, et al., 2016; Shima, et al., 2013; Shima, et al., 2014; Shima, et al., 2015)
	QuEChERS	(Kudo, et al., 2015; Usui, et al., 2014)
	—	(Al-Saffar, et al., 2013; Bäckberg, et al., 2015; O'Byrne, et al., 2013; Olesti, et al., 2017)
LC-HRMS	SPE	(Concheiro, et al., 2013; Concheiro, et al., 2015)
LC-HRMS/MS	LLE	(Bertol, et al., 2014)
LC-TOF MS	SPE	(Glicksberg, et al., 2016; Guale, et al., 2013; Shintani-Ishida, et al., 2015; Shintani-Ishida, et al., 2016)
LC-HR-TOF MS	LLE	(Paul, et al., 2014)
HPLC-DAD	SPE	(Mayer, et al., 2013)
HPLC-UV-Vis	SPE	(Meetani, et al., 2019)
UHPLC-MS	—	(Borovcová, et al., 2018)
UHPLC-MS/MS	SPE	(Tang, et al., 2014)
	—	(Bell, et al., 2011; Rosano, et al., 2017; Zhang, et al., 2014)
UHPLC-TOF MS	SPE	(Sundström, et al., 2013)
UHPSFC-MS	—	(Borovcová, et al., 2018)
MECK-MS/MS	SPE	(Švidrnoch, et al., 2014)

Tabela 1.8. Detecção/quantificação de catinonas em **cabelo**.

Técnica de Análise	Método de Extração	Referência
GC-MS	Incubação	(Kim, et al., 2007)
	Incubação e LLE	(Kintz, 2017; Martin, et al., 2012)
	Sonicação e SPE	(Kikura-Hanajiri, et al., 2007)
LC-MS	LLE	(Namera, et al., 2013b)
LC-MS/MS	Incubação	(Boumba, et al., 2017; Wikström, et al., 2010)
	Incubação e SPE	(Lendoiro, et al., 2017)
	Incubação e LLE	(Shaha, et al., 2012)
	Sonicação	(Rust, et al., 2012)
	Sonicação e SPE	(Freni, et al., 2019)
LC-HRMS	LLE	(Frison, et al., 2016)
	Incubação e Sonicação	(Odoardi, et al., 2017)
HPLC-MS	SPE MonoSpin [®]	(Namera, et al., 2013a)
HPLC-MS/MS	SPE	(Wyman, et al., 2013)
HPLC-HRMS/MS	PLE e SPE	(Montesano, et al., 2017a)
UHPLC-MS/MS	Incubação	(Salomone, et al., 2016)
	Incubação e Sonicação	(Strano-Rossi, et al., 2014)
	Incubação e LLE	(Jamey, et al., 2016)

Tabela 1.9. Detecção/quantificação de catinonas em **saliva**.

Técnica de Análise	Método de Extração	Referência
GC-MS	LLE	(Kankaanpää, et al., 2004; Mohamed, 2017; Mohamed & Bakdash, 2017; Mohamed, et al., 2016)
LC-MS/MS	SPE	(Castro, et al., 2014)
	LLE	(Mercolini, et al., 2016; Williams, et al., 2017)
UHPLC-MS/MS	SPE	(Amaratunga, et al., 2013; Miller, et al., 2017)
	MIP-SPE	(Sorribes-Soriano, et al., 2019)
	—	(Strano-Rossi, et al., 2012)

Tabela 1.10. Detecção/quantificação de catinonas noutras matrizes biológicas.

Matriz Biológica	Técnica de Análise	Método de Extração	Referência
Cérebro	LC-MS/MS	SPE	(Novellas, et al., 2015; Peters, et al., 2016)
		LLE	(Olesti, et al., 2017)
Fígado e Sangue	LC-MS/MS	SPE	(Rojek, et al., 2012)
Humor Vítreo, Líquido Pericárdico e Sangue	GC-MS	SPE	(Margalho, et al., 2016)
Manchas de Sangue Seco	LC-MS/MS	—	(Ambach, et al., 2014)

Após concluir a pesquisa mencionada realizou-se ainda a procura de artigos diretamente relacionados com a detecção/quantificação, em matrizes biológicas, das catinonas que irão ser utilizadas no presente trabalho: 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (4-MDMB) (1), 4'-metil-*N*-etilnorbufedrona (4-MNEB) (2), 4'-metil-*N,N*-dimetilnorpentedrona (4-MDMP) (3), 4'-metil-*N*-etilnorpentedrona (4-MNEP) (4), catinona já reportada ao EMCDDA, em janeiro de 2014 (EMCDDA, 2014), 4'-metil-*N,N*-dimetilnorhexedrona (4-MDMH) (5), 4'-metil-*N,N*-dietilnorbufedrona (4-MDEB) (6) (Figura 1.9).

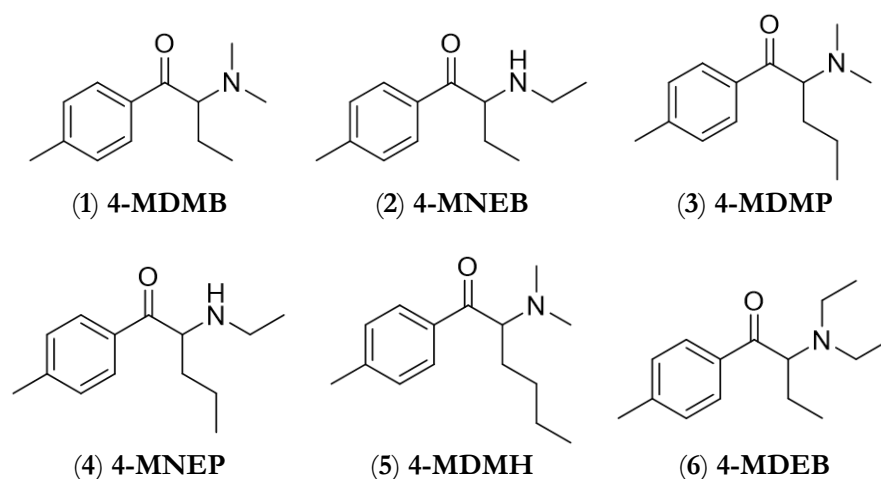


Figura 1.9. Estrutura das catinonas estudadas no presente trabalho.

Os dois primeiros casos de detecção de 4-MNEP em amostras clínicas foram reportados em 2017, incidindo na análise de urina por UHPLC-MS/MS e tendo sido realizada uma curva de calibração para 0-1000 ng/mL, obtendo-se concentrações de 7676 ng/mL e 4554 ng/mL (Varma, et al., 2017). Em 2019, foram reportados outros 10 casos positivos para 4-MNEP, com concentrações de 1,1 a 2296,4 ng/mL (LOQ 0,4 ng/mL) após a análise, por LC-MS/MS, de 758 amostras de urina de um serviço de urgências (167 das quais foram positivas para pelo menos uma substância ilícita) (Weng, et al., 2019). Em 2016 e em 2018 foi reportada a separação e detecção de diastereoisômeros de diversas catinonas em urina e plasma por GC-MS e por GC-MS com ionização química em modo de íão negativo, respetivamente, recorrendo a SPE e derivatização quiral com cloreto de (*S*)-(-)-*N*-(trifluoroacetil)pirrolidina-2-carbonil, tendo sido incluída nestes estudos a 4-MNEB, no entanto, não foi efetuada a validação do método para esta catinona (Alremeithi, et al., 2016; Alremeithi, et al., 2018).

1.6. Enquadramento do Trabalho

O presente trabalho foi realizado no âmbito de um protocolo de estágio entre a Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (FCTUC), a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) e o Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF) inserido num protocolo de colaboração existente entre a FCUL, o INMLCF e o Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC-PJ) que visa a análise de substâncias, a determinação de padrões e a investigação científica no âmbito das NSP.

O projeto incidiu em três das problemáticas das NSP: o facto de a identificação destas substâncias ser particularmente difícil devido ao número, diversidade e ritmo a que surgem (EMCDDA, 2017); o facto de o acesso a materiais de referência certificados para a identificação de NSP acarretar dificuldades práticas tais como preço elevado, prazos de entrega longos e cumprimento de questões legais, sendo estas idealmente ultrapassadas recorrendo a síntese orgânica direcionada (Brandt, et al., 2014); e o facto de os laboratórios forenses necessitarem de criar métodos para a análise de NSP em matrizes biológicas, como sangue, urina e cabelo, cuja validação necessita de investigação, tempo e recursos humanos que podem por em causa a capacidade de resposta das análises de rotina do laboratório (Katz, et al., 2014); adicionalmente torna-se ainda importante estender a síntese e estudo de NSP a compostos análogos e derivados de substâncias que se encontrem a emergir atualmente de modo a distribuir informação analítica adicional e de forma proativa à comunidade forense, policial e clínica (Brandt, et al., 2014; Gaspar, et al., 2018).

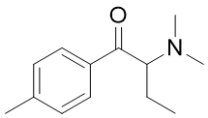
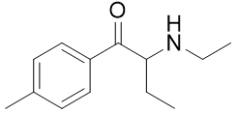
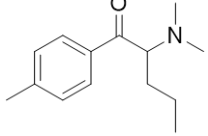
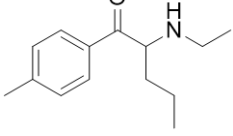
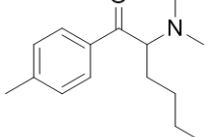
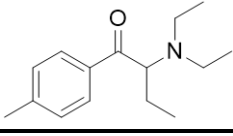
Deste modo, o trabalho desenvolvido teve como objetivos, em primeiro lugar, proceder à identificação de NSP em duas amostras de produtos apreendidos em Portugal e fornecidos pelo LPC-PJ, recorrendo a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

Em segundo lugar, proceder à síntese de padrões de catinonas para fornecer ao LPC-PJ de modo a facilitar a identificação de substâncias por GC-MS nas análises de rotina do laboratório (realizado na FCUL, tal como o primeiro objetivo) tendo-se decidido sintetizar as seis catinonas apresentadas na Tabela 1.11 (4-MDMB (1), 4-MNEB (2), 4-MDMP (3), 4-MNEP (4), 4-MDMH (5) e 4-MDEB (6)). A escolha destas catinonas teve por base uma análise cuidada da estrutura de todas as catinonas reportadas ao EMCDDA entre 2005 e 2017 por forma a sintetizar catinonas que ainda não tivessem sido reportadas na Europa, optando por se sintetizar os compostos 1, 2, 3, 5 e 6 de modo a se obter uma série de catinonas na qual se mantinha o grupo amino, aumentando o tamanho da cadeia alquílica (catinonas 1, 3 e 5) e outra série na qual se alterava o grupo amino, mantendo o tamanho da cadeia (catinonas 1, 2 e 6), produzindo-se assim dois pares de catinonas isoméricas (1 e 2; 5 e 6). Adicionalmente

decidiu-se sintetizar a catinona **4** por ser isomérica da **3** tendo-se assim três pares de isômeros para estudar.

Por último, efetuar a validação de um método de detecção e quantificação dessas catinonas em matrizes biológicas por GC-MS no Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF) do INMLCF – Delegação do Sul.

Tabela 1.11. Estrutura e dados relativos às catinonas sintetizadas no presente trabalho.

Estrutura	Composto Nome IUPAC; Fórmula Molecular; Massa Molar; Número CAS
	4-MDMB (1) (<i>R,S</i>)-2-(dimetilamino)-1-(4-metilfenil)butan-1-ona; C ₁₃ H ₁₉ NO; 206 g/mol; (novo composto)
	4-MNEB (2) (<i>R,S</i>)-2-(etilamino)-1-(4-metilfenil)butan-1-ona C ₁₃ H ₁₉ NO; 206 g/mol; 18268-19-4
	4-MDMP (3) (<i>R,S</i>)-2-(dimetilamino)-1-(4-metilfenil)pentan-1-ona C ₁₄ H ₂₁ NO; 220 g/mol; (novo composto)
	4-MNEP (4) (<i>R,S</i>)-2-(etilamino)-1-(4-metilfenil)pentan-1-ona C ₁₄ H ₂₁ NO; 220 g/mol; 18297-05-7
	4-MDMH (5) (<i>R,S</i>)-2-(dimetilamino)-1-(4-metilfenil)hexan-1-ona C ₁₅ H ₂₃ NO; 234 g/mol; (novo composto)
	4-MDEB (6) (<i>R,S</i>)-2-(dietilamino)-1-(4-metilfenil)butan-1-ona C ₁₅ H ₂₃ NO; 234 g/mol; (novo composto)

2. Materiais e Métodos

2.1. Equipamento e Materiais

Análise de Produtos Apreendidos e Síntese de Catinonas

Os espectros de RMN foram obtidos num espectrofotômetro Bruker Avance 400, a uma frequência de 400,13 MHz (^1H RMN) e 100,61 MHz (^{13}C RMN), e foi utilizado o *software* Topspin (versão 4.0.5) para processamento de dados. Os desvios químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm), sendo utilizados como referência os valores dos sinais residuais dos solventes: clorofórmio deuterado (CDCl_3) - $\delta\text{H}=7,26$ e $\delta\text{C}=77,16$; dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) - $\delta\text{H}=2,50$ e $\delta\text{C}=39,52$; metanol deuterado- d_4 (MeOD) - $\delta\text{H}=3,31$ e $\delta\text{C}=49,00$ (Gottlieb, et al., 1997; Fulmer, et al., 2010), e as constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hertz. A identificação e caracterização dos compostos presentes em material apreendido e dos compostos sintetizados foi feita através da análise de espectros de RMN unidimensionais (^1H e ^{13}C APT) e bidimensionais (COSY, HSQC, HMBC e em alguns casos HSQC-TOCSY).

Todas as pesagens foram efetuadas numa balança OHAUS[®] PIONEERTM (modelo PA224, max 220 g, d=0,0001 g) ou numa Precisa (modelo 205 A SCS, max 205 g, d=0,0001 g).

A técnica de cromatografia em camada fina (TLC) foi realizada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ em alumínio da Merck (referência 1.05554.0001) e a técnica de TLC preparativa foi realizada em placas de 20x20 cm e 0,25 mm (809123) ou 0,5 mm (809053) de sílica gel 25 UV₂₅₄ em vidro da Macherey-Nagel. As placas foram visualizadas com recurso a luz ultravioleta de 254 nm.

A evaporação de solvente sob vácuo foi realizada num evaporador rotativo Büchi R-200, equipado com uma bomba de pressão Büchi Vac[®] V-500, um controlador de pressão Büchi B-721 e um banho térmico Büchi B-490 ou num evaporador rotativo Büchi R-200, equipado com um sistema de vácuo Büchi B-169 e um banho térmico Büchi B-490.

Para a análise de produtos apreendidos utilizou-se um equipamento de ultrassons da Transsonic (modelo 460) e filtros de membrana inorgânicos da Whatman® com 0,2 µm de espessura e 25 mm de diâmetro.

Na síntese de catinonas utilizou-se uma placa de agitação/aquecimento da Heidolph (modelo MR 3001 K) e papel de filtro da Filter-Lab de 90 mm de diâmetro e poro de 10-13 µm (referência 1250) ou 43-48 µm (1300/80). A técnica de cromatografia em coluna foi realizada com sílica gel 60, de poro 0,04-0,06 mm, da Scharlau (referência GE00481000) e a amostra foi aplicada na coluna depois de adsorvida em sílica gel 60, de poro 0,063-0,200 mm, da Merck (referência 1.07734.1000). A adição de Br₂ aquando da síntese de bromocetonas foi efetuada recorrendo a micropipetas de volume fixo da VWR de 50 µL e de 5 µL.

A análise por HRMS-ESI das catinonas sintetizadas foi realizada num espectrómetro de massa QqTOF Impact IITM (Bruker Daltonics) operando em modo de alta resolução. As amostras foram analisadas por análise de injeção de fluxo usando um gradiente isocrático 30/70 A/B de 0,1% ácido fórmico em água (A) e 0,1% ácido fórmico em acetonitrilo (B), com um fluxo de 10 µL/min por 15 min. O analisador de TOF encontrava-se calibrado numa gama de razões massa/carga (m/z) de 100-1500 recorrendo a um padrão de calibração interno (Tunemix solution) fornecido pela Agilent. Os espectros de massa em *full scan* foram adquiridos num intervalo de 100-1350 m/z , a uma taxa espectral de 1 Hz. Os dados obtidos foram processados usando o programa Data Analysis 4.2.

A análise por GC-FID das catinonas sintetizadas foi realizada num cromatógrafo de gases da Agilent (modelo 7890B) com detetor por ionização de chama, injetor automático e coluna (modelo 19091J-413, HP-5, 30 m x 320 µm e 0,25 µm de espessura de filme) da Agilent. O programa de temperaturas utilizado consistia numa temperatura inicial de 80 °C mantida por 1 min, seguida por um gradiente térmico de 12 °C/min até 270 °C, mantidos por 7 min. As amostras foram injetadas em modo de *split*, com uma razão de 1:40, e o volume de injeção foi de 1 µL. O processamento de dados foi realizado com o *software Open LAB CDS ChemStation*. As soluções analisadas foram preparadas dissolvendo cerca de 5 mg de cada composto em 1 mL de uma solução 1:1 CHCl₃/metanol (MeOH): 4-MDMB (1) - 5,0 mg/mL, 4-MNEB (2) - 5,2 mg/mL, 4-MDMP (3) - 5,1 mg/mL, 4-MNEP (4) - 5,4 mg/mL, 4-MDMH (5) - 5,2 mg/mL e 4-MDEB (6) - 5,2 mg/mL. A determinação do grau de pureza foi realizada efetuando a análise de 5 repetições de cada solução de catinona, intercaladas com brancos, calculando-se a média da percentagem das áreas dos sinais obtidos nas 5 injeções (bem como o respetivo desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dado pelo quociente entre o DP e a média).

Validação de um Método de Detecção e Quantificação de Catinonas por GC-MS

A preparação das soluções padrão de cada catinona foi efetuada utilizando uma balança Kern (modelo ABT 120-4NM, max 120 g, d=0,0001 g) e um equipamento de ultrassons da Transsonic (modelo 570/H). A preparação da solução tampão de fosfato foi efetuada utilizando uma balança Denver Instrument (modelo XS-410, max 410 g, d=0,01 g).

A água desionizada foi obtida com uma resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ utilizando um sistema de purificação de água da Millipore (modelo Simplicity).

As amostras de sangue branco utilizadas durante a otimização e validação do método analítico (com exceção do estudo de seletividade) foram fornecidas pelo Instituto Português de Sangue (sangue com prazo de validade expirado para transfusões). As amostras de sangue utilizadas para o estudo de seletividade do método, bem como as amostras de sangue às quais foi aplicado o método validado, foram colhidas quer no âmbito do Código da Estrada quer *post mortem* em autópsias médico-legais efetuadas no Serviço de Patologia Forense do INMLCF – Delegação do Sul ou nos Gabinetes Médico-Legais que atuam na sua dependência (sangue cardíaco ou periférico). Todas as amostras biológicas referidas foram conservadas a $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ e protegidas da luz.

Para a preparação de soluções e das amostras biológicas utilizaram-se micropipetas de 2-20 μL , 10-100 μL e 100-1000 μL (modelo Reference) e um dispensador (modelo Multipette M4) da Eppendorf, tendo sido usadas pontas da mesma marca ou da Thermo Scientific (modelo ART) para as amostras de sangue.

Durante a preparação de amostras utilizou-se um homogeneizador de rolos da Stuart Scientific (modelo SRT 9), uma centrífuga da Thermo Scientific (modelo Heraeus Megafuge 16), e um equipamento de vortex da Retsch. Adicionalmente, utilizaram-se tubos de 10 mL (79x16mm) da Sarstedt (referência 62.551.201) e *vials* de 300 μL da Thermo Scientific Chromacol (referência 03-FIV).

No processo de SPE utilizaram-se colunas Oasis[®] MCX (60 mg de enchimento e 3 mL de volume) da Waters Corporation em câmaras de extração (capacidade para 20 colunas) da Varian ou da Agilent Technologies ligadas a uma bomba de vácuo da Gast Manufacturing (modelo DOA-P504-BN).

A evaporação das amostras sob corrente de azoto foi realizada num evaporador da Caliper LifeSciences (modelo TurboVap[®] LV).

Nas análises de GC-MS foi utilizado um aparelho da Agilent Technologies composto por um cromatógrafo de gases (modelo 6890), acoplado a um espectrômetro de massa (modelo 5973 Inert), equipado com um injetor automático (modelo 7683) e uma coluna capilar HP-5MS (Agilent Technologies; 30 m x 250 μm e 0,25 μm de espessura de filme). Foi usado o seguinte programa de temperaturas otimizado: temperatura inicial de 90 °C (2 min), subida de 10 °C/min até 170 °C, novo gradiente de 2 °C/min até 180 °C, seguido de gradiente de 20 °C/min até 300 °C (1 min); temperatura do injetor de 220 °C e do detetor 280 °C. O gás de arraste utilizado como fase móvel foi hélio da Gasin (pureza >99,9998%) com um fluxo de 1,5 mL/min. O volume de injeção foi de 2 μL com uma razão de *split* de 1:3. Os espectros de massa foram adquiridos por impacto eletrônico (EI), com uma energia de 70 eV, iniciando-se a sua aquisição 10 min após a injeção da amostra. Os espectros de massa em modo de *full scan* foram obtidos para um intervalo de m/z de 50 a 550. No modo de monitorização seletiva de iões (SIM) foram definidos três valores de m/z correspondentes aos fragmentos iônicos característicos de cada catinona estudada e um valor de m/z para os padrões internos utilizados (185 para a cocaína- d_3 e 243 benzoilecgonina- d_3). A substituição do *liner* (4 mm de diâmetro), *o-ring* e septo (11 mm de diâmetro) foi efetuada a cada 100 injeções de modo a prevenir a diminuição da sensibilidade e eventuais contaminações de análises de diferente natureza. Estes consumíveis do GC-MS, bem como a lâ de vidro usada eram da Agilent Technologies.

A aquisição e processamento de dados foi realizada recorrendo ao *software* Enhanced Data Analysis, MSD ChemStation versão E.02.00.493, da Agilent Technologies.

2.2. Reagentes e Solventes

Análise de Produtos Apreendidos e Síntese de Catinonas

Todos os reagentes e solventes foram adquiridos comercialmente e utilizados sem purificação prévia, com exceção do tetra-hidrofurano (THF) seco utilizado na síntese das cetonas e das catinonas que foi previamente seco por destilação e mantido em peneiras moleculares e a solução etérea de ácido clorídrico que foi obtida como indicado no ponto “Obtenção da Solução Etérea de Ácido Clorídrico (3M)”. Todos os reagentes e solventes utilizados, bem como as suas características, apresentam-se na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Reagentes e solventes utilizados na análise de produtos apreendidos e síntese de catinonas.

Reagente/Solvente	Característica	Marca	Referência
Acetato de etilo	≥99,9%	Carlo Erba	448254
Acetona	≥99,8%	Carlo Erba	400962
Ácido bromídrico	48%	Carlo Erba	402925
Ácido clorídrico	37%	Sigma-Aldrich	30721-2.5L
Ácido sulfúrico	95-97%	Sigma-Aldrich	30743-2.5L
Br ₂	≥99,5%	Merck	1.01948.0050
C ₅ H ₁₁ MgBr	2M em éter dietílico	Aldrich	290998-100ML
C ₄ H ₉ MgCl	2M em THF	Aldrich	291005-100ML
C ₃ H ₇ MgCl	2M em éter dietílico	Aldrich	224391-100ML
CDCl ₃	99,8% de deutério	Aldrich	151823-100G
Cloreto de sódio	≥99,0%	Honeywell Fluka	S9888-1KG
Diclorometano (DCM)	≥99,9%	Honeywell Riedel-de Haën	32222-2.5L
Dietilamina	≥99,5%	Sigma-Aldrich	31730-250ML
Dimetilamina	2M em THF	Aldrich	391956-100ML
DMSO- <i>d</i> ₆	99,8% de deutério	Aldrich	151874-25G
Éter dietílico	≥99,8%	Honeywell Riedel-de Haën	32203-5L
Etilamina	2M em THF	Aldrich	395072-100ML
<i>n</i> -Hexano	≥98,5%	Carlo Erba	446903
MeOD	99,8% de deutério	Aldrich	151947-25G
MeOH	≥99,9%	Carlo Erba	524102
Peneiras moleculares	Diâmetro 4Å	Sigma-Aldrich	208590-500G
<i>P</i> -tolunitrilo	98%	Aldrich	132330-100G
Sulfato de magnésio anidro	62,0-70,0%	BDH	29118-500G
Sulfato de sódio anidro	≥99,0%	Carlo Erba	483007
THF	99,9%	Riedel-de Haën	33709

A solução aquosa de HCl 6M foi preparada utilizando o HCl 37%, (246 mL de ácido num total de 500 mL de solução) e a solução aquosa de hidróxido de sódio 5M encontrava-se previamente preparada.

Validação de um Método de Detecção e Quantificação de Catinonas por GC-MS

Todos os reagentes e solventes adquiridos comercialmente foram utilizados nos diferentes procedimentos da validação da metodologia sem purificação prévia, sendo apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Reagentes e solventes utilizados na validação do método analítico.

Reagente/Solvente	Característica	Marca	Referência
Acetato de etilo para GC	≥99,8%	Merck	1.10972.1000
Acetonitrilo para LC	≥99,9%	Fluka Analytical	34967-2.5L
Ácido Clorídrico 37%	36,1%	VWR Chemicals	20252.290
Amónia 25%	≥25,0%	Merck	1.05432.1000
Benzoilecgonina- <i>d</i> ₃	1,000±0,005 mg/mL	Cerilliant	B-008
Cocaína- <i>d</i> ₃	1,000±0,005 mg/mL	Cerilliant	C-014
DCM	≥99,8%	Merck	1.06050.1000
Ecgonina metil éster- <i>d</i> ₃	0,1002±0,0006 mg/mL	LoGiCal	LGCAMP1345.85-12
<i>n</i> -Hexano	≥96,0%	Merck	1.04374.1000
Isopropanol	≥99,8%	Merck	1.09634.1000
MBTFA	————	Macherey-Nagel	701410.201
MeOH para GC	≥99,8%	Merck	1.06011.2500
MeOH	≥99,9%	Honeywell Riedel-de Haën	34885-2.5L
MSTFA	————	Macherey-Nagel	701270.510
KH ₂ PO ₄	99,9%	VWR Chemicals	26936.293
TMCS	————	Macherey-Nagel	701280.201

As soluções padrão de cada uma das catinonas estudadas foram preparadas em acetonitrilo com a concentração de 1 mg/mL. Para tal, foram pesados aproximadamente 5 mg de cada composto que foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL e dissolvidos com auxílio de ultrassons.

A solução de trabalho utilizada durante a fase de testes para otimização do método foi preparada em acetonitrilo com a concentração de 10 µg/mL, pipetando-se 100 µL de cada solução padrão para um balão volumétrico de 10 mL e perfazendo-se o volume com acetonitrilo.

As soluções de trabalho utilizadas aquando da validação do método foram preparadas de igual forma, em acetonitrilo, com a concentração de 10 µg/mL e de 1 µg/mL. Para a mais concentrada pipetaram-se 100 µL de cada solução padrão para um balão volumétrico de 10 mL e para a menos concentrada pipetou-se 1 mL da solução a 10 µg/mL para um balão volumétrico de 10 mL, perfazendo-se o volume em ambos os casos com acetonitrilo. Repetiu-se o processo de forma independente, obtendo-se dois conjuntos de soluções (soluções de calibradores e soluções de controlos). Adicionalmente, foi preparada uma solução para o estudo do limite de deteção (LOD) com concentração de 0,1 µg/mL, em acetonitrilo, pipetando-se 200 µL da solução de calibradores com 1 µg/mL para um balão volumétrico de 2 mL e perfazendo-se o volume com acetonitrilo.

A solução de padrão interno utilizada durante a fase de testes para otimização do método foi preparada em acetonitrilo com a concentração de 10 µg/mL, pipetando-se 100 µL de cada solução de padrão deuterado a 1 mg/mL (benzoilecgonina-*d*₃ e cocaína-*d*₃) e 1 mL de solução padrão de ecgonina metil éster-*d*₃ para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com acetonitrilo.

A solução de padrão interno utilizada aquando da validação do método foi preparada em acetonitrilo com a concentração de 5 µg/mL, pipetando-se 50 µL da solução padrão de cocaína-*d*₃ a 1 mg/mL para um balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com acetonitrilo.

A solução tampão de fosfato (KH₂PO₄ 0,1 M) foi preparada pesando 13,6 g de KH₂PO₄, dissolvendo-se em água desionizada e transferindo-se aos poucos para um balão volumétrico de 1 L.

A solução de HCl 5N foi preparada pipetando-se 6 mL de ácido clorídrico 37% para um balão volumétrico de 100 mL e perfazendo-se o volume com água desionizada.

A solução de HCl 0,1N foi preparada pipetando-se 5 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 250 mL e perfazendo-se o volume com água desionizada.

A solução de DCM/isopropanol/amónia (78/20/2, v/v/v; 200 mL) foi preparada medindo-se 156 mL de DCM e 40 mL de isopropanol e pipetando-se 4 mL de amónia 25% para um frasco de 250 mL.

A solução de DCM/MeOH (70/30, v/v; 200 mL) foi preparada medindo-se 140 mL de DCM e 60 mL de MeOH para um frasco de 250 mL.

A solução de MSTFA/TMCS (95/5, v/v; 20 mL) utilizada durante a fase de testes para otimização do método foi preparada adicionando-se 19 mL de MSTFA e 1 mL de TMCS num frasco de 50 mL.

As soluções padrão de cada catinona, as soluções de trabalho e as soluções de padrão interno foram conservadas a -20 °C, protegidas da luz. A solução tampão de fosfato foi mantida à temperatura ambiente. As restantes soluções mencionadas foram conservadas a 5 °C, protegidas da luz.

2.3. Identificação de NSP em Produtos Apreendidos

No presente trabalho foram analisadas duas amostras resultantes de produtos apreendidos em Portugal, por forma a identificar os seus componentes e verificar a presença de NSP.

Amostra 1

A primeira amostra analisada – Amostra 1 – apresentava-se na forma de matriz vegetal. Para a preparação desta amostra foi realizada a sua extração adicionando-se 15 mL de MeOH, levando-se aos ultrassons (5s) e recolhendo-se a solução orgânica resultante com uma seringa acoplada a um filtro de membrana. Efetuou-se este procedimento três vezes, perfazendo um total de 45 mL de MeOH. De seguida, evaporou-se o solvente à secura, obtendo-se 144,8 mg de extrato, ao qual foi adicionado MeOD, o que provocou a formação de um precipitado que foi dissolvido em CDCl_3 (após filtração e recolha da solução de MeOD). Por fim, efetuou-se a aquisição de espectros de RMN da parte da amostra dissolvida em cada um dos solventes.

Posteriormente, procedeu-se à evaporação dos solventes deuterados obtendo-se 21,6 mg de Amostra 1 recuperada de MeOD e 94,3 mg de Amostra 1 recuperada de CDCl_3 .

A análise de ambas por TLC, com uma mistura de 50/50 de Hexano/Acetato de Etilo (Hx/AcOEt), revelou serem constituídas por uma mistura de dois compostos (Composto A com fator de retenção (R_f) 0,86 e Composto B com R_f 0,61) que foram purificados por TLC preparativa.

A Amostra 1 (recuperada de MeOD) foi purificada por dissolução em MeOH e algumas gotas de DCM, aplicação numa placa de TLC preparativa de 0,25 mm de espessura e eluição duas vezes com uma mistura de 40/60 de Hx/AcEt. A recuperação dos dois compostos foi efetuada delineando e raspando a sílica correspondente a cada um, seguida de lavagem desta com DCM (Composto A) ou com DCM e uma mistura de 50/50 DCM/MeOH (Composto B). Após filtração e evaporação do solvente, os compostos obtidos (1,0 mg de Composto A e 2,3 mg de B) foram dissolvidos em CDCl_3 e analisados por RMN de ^1H .

A Amostra 1 (recuperada de CDCl_3) foi purificada por dissolução em DCM, aplicação numa placa de TLC preparativa de 0,50 mm de espessura e eluição duas vezes, primeiro com uma mistura de 60/40 de Hx/AcOEt e depois com uma mistura de 40/60 de Hx/AcEt. A recuperação dos dois compostos foi efetuada tal como descrito para a Amostra 1 recuperada de MeOD. Após filtração e evaporação do solvente, os compostos obtidos (2,6 mg de Composto A e 5,0 mg de B) foram dissolvidos em CDCl_3 e analisados por RMN.

Amostra 2

A segunda amostra analisada – Amostra 2 – apresentava-se na forma de pó branco. A amostra foi analisada por RMN, pesando cerca de 15 mg de amostra e dissolvendo-a em cada um dos solventes deuterados: DMSO-*d*₆, CDCl₃ e MeOD.

2.4. Síntese de Catinonas

A síntese das catinonas desejadas foi realizada tendo por base um procedimento composto por três passos: formação da cetona, devidamente purificada por cromatografia em coluna, formação da respectiva α -bromocetona, utilizada sem nenhum tipo de purificação e formação da catinona pretendida na forma de sal, tal como apresentado na Figura 2.1.

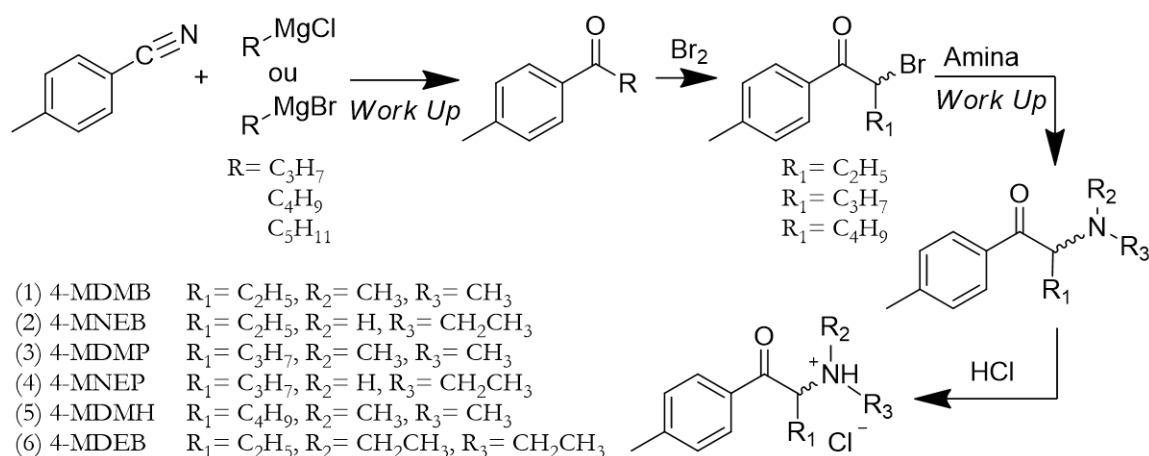


Figura 2.1. Esquema reacional geral da formação das catinonas na forma de cloridrato.

Síntese das Cetonas

A síntese das cetonas foi realizada tendo por base os trabalhos de Meltzer et al. (Meltzer, et al., 2006) nos quais foram preparadas cetonas recorrendo à alquilação de compostos nitrílicos disponíveis comercialmente, seguida de hidrólise ácida.

A uma solução do reagente de Grignard pretendido (num excesso de 20%) adicionaram-se 10 mL de THF seco e a quantidade desejada de *p*-tolunitrilo (adicionado sólido aos poucos durante 30 min). A reação foi realizada em atmosfera inerte de azoto, à temperatura ambiente (tendo-se verificado que o aquecimento da mistura reacional até cerca de 30 °C-40 °C

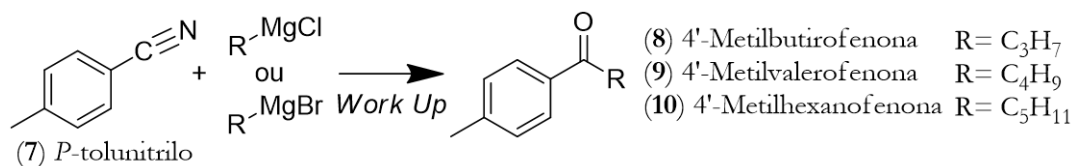
não refletiu melhoria no rendimento) e foi acompanhada por TLC utilizando como eluente uma mistura de 90/10 Hx/AcEt.

Posteriormente, procedeu-se ao *work-up* da reação, para tal verteu-se a mistura reacional sob 12 g de gelo, observando-se a formação de uma fase gelatinosa branca e uma fase líquida amarela. Seguidamente, foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico, gota a gota, com agitação, formando-se uma fase orgânica de cor amarela ou verde, conforme os casos, e uma fase aquosa turva, deixando-se a hidrolisar durante a noite.

No dia seguinte, verificou-se, nalguns casos, variação da cor da fase orgânica (de amarelo para verde ou de verde para castanho ou para azulado) e noutro caso a evaporação do solvente da fase orgânica ocorrendo a cristalização da mesma, não tendo sido observadas alterações na fase aquosa. De seguida, efetuou-se a extração da cetona sintetizada, para tal separou-se a fase orgânica formada durante o *work-up* (Fase Orgânica 1), lavou-se a fase aquosa com 3×50 mL de éter dietílico (Fase Orgânica 2) e com 3×50 mL de DCM (Fase Orgânica 3). Secou-se cada fase orgânica extraída com sulfato de sódio ou sulfato de magnésio anidros, filtrou-se e evaporou-se o solvente sob vácuo. Realizou-se TLC de cada fase orgânica utilizando como eluente uma mistura de 90/10 Hx/AcEt, por forma a observar a sua pureza, e realizou-se um espetro de RMN ¹H, em CDCl₃, verificando-se a formação da cetona pretendida e a presença de *p*-tolunitrilo (entre 13% e 53%).

Seguidamente, procedeu-se à purificação de cada cetona sintetizada por cromatografia em coluna. Para esse fim, utilizou-se como eluente uma mistura de 97/3 Hx/AcEt, cerca de 18 cm de sílica e recolheram-se frações de 25 ou 50 mL. Para efetuar a aplicação da amostra esta foi dissolvida em DCM, adsorvida em sílica, evaporada à secura sob vácuo e aplicada de forma uniforme na coluna. A eluição foi acompanhada por TLC e a recolha de frações terminou quando se constatava que já não continham o produto pretendido. Posteriormente, procedeu-se à evaporação sob vácuo de todas as frações recolhidas e à realização de TLC e espetros de RMN ¹H, em CDCl₃, para confirmar que frações continham cetona pura. Por fim, juntaram-se essas frações, obtendo-se um óleo incolor ou um sólido incolor/branco e rendimentos compreendidos ente 34% e 49%, tendo cada cetona sintetizada sido caracterizada realizando espetros de RMN ¹H, ¹³C APT, HSQC, COSY e HMBC, em CDCl₃. Na Tabela 2.3 apresenta-se um resumo das quantidades de reagentes utilizados e de produto obtido em cada reação, bem como o tempo e rendimento da mesma.

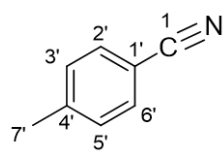
Tabela 2.3. Resumo das quantidades de reagentes e de produto e do tempo de reação e rendimento para a síntese das cetonas.



<i>P</i> -tolunitrilo (7) (g; mmol)	Reagente de <i>Grignard</i> (g; mmol)	Cetona após purificação (g; mmol)	Tempo de reação	η
2,4793; 20,7	C ₃ H ₇ MgCl (2,5507; 24,8)	4'-Metilbutirofenona (8) (1,3439; 8,3)	6 h	40%
2,4793; 20,7	C ₃ H ₇ MgCl (2,5918; 25,2)	4'-Metilbutirofenona (8) (1,3030; 8,0)	27 h	39%
2,4811; 20,8	C ₃ H ₇ MgCl (2,5713; 25,0)	4'-Metilbutirofenona (8) (1,2100; 7,5)	25,5 h	36%
2,3465; 19,6	C ₄ H ₉ MgCl (2,7581; 23,6)	4'-Metilvalerofenona (9) (1,1786; 6,7)	23,5 h	34%
2,3433; 19,6	C ₄ H ₉ MgCl (2,4273; 23,6)	4'-Metilvalerofenona (9) (1,5343; 8,7)	25,5 h	44%
2,2229; 18,6	C ₅ H ₁₁ MgBr (3,9278; 22,4)	4'-Metilhexanofenona (10) (1,7505; 9,2)	33,5 h	49%

Caracterização do *p*-Tolunitrilo e das Cetonas Sintetizadas

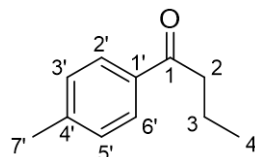
P-tolunitrilo (4-metilbenzonitrilo) (7): Sólido branco amorfo. RMN ¹H (CDCl₃,



400 MHz), δ (ppm): 7,54 (2H, d, $J= 7,3$ Hz, H-2'/H-6'); 7,27 (2H, d, $J= 7,2$ Hz, H-3'/H-5'); 2,42 (3H, s, H-7'); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 143,83 (C-4'); 132,19 (C-2'/C-6'); 129,96 (C-3'/C-5'); 119,32

(C-1); 109,42 (C-1'); 21,99 (C-7').

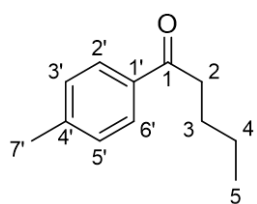
4'-Metilbutirofenona 1 (1-(4-Metilfenil)butan-1-ona) (8): Óleo incolor. RMN ¹H (CDCl₃,



400 MHz), δ (ppm): 7,86 (2H, d, $J= 8,2$ Hz, H-2'/H-6'); 7,25 (2H, d, $J= 8,2$ Hz, H-3'/H-5'); 2,91 (2H, t, $J= 7,3$ Hz, H-2); 2,40 (3H, s, H-7');

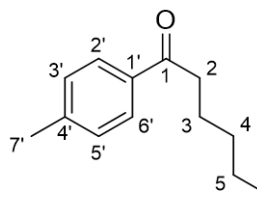
1,76 (2H, sext, $J= 7,4$ Hz, H-3); 0,99 (3H, t, $J= 7,4$ Hz, H-4); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 200,29 (C-1); 143,72 (C-4'); 134,73 (C-1'); 129,33 (C-3'/C-5'); 128,29 (C-2'/C-6'); 40,54 (C-2); 21,74 (C-7'); 18,00 (C-3); 14,04 (C-4).

4'-Metilvalerofenona (1-(4-Metilfenil)pentan-1-ona) (9): Óleo incolor. RMN ¹H (CDCl₃,



400 MHz), δ (ppm): 7,86 (2H, d, $J= 8,1$ Hz, H-2'/H-6'); 7,25 (2H, d, $J= 7,6$ Hz, H-3'/H-5'); 2,94 (2H, t, $J= 7,5$ Hz, H-2); 2,41 (3H, s, H-7'); 1,71 (2H, quint, $J= 7,5$ Hz, H-3); 1,40 (2H, sext, $J= 7,5$ Hz, H-4); 0,95 (3H, t, $J= 7,4$ Hz, H-5); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 200,49 (C-1); 143,73 (C-4'); 134,73 (C-1'); 129,36 (C-3'/C-5'); 128,33 (C-2'/C-6'); 38,38 (C-2); 26,74 (C-3); 22,65 (C-4); 21,76 (C-7'); 14,10 (C-5).

4'-Metilhexanofenona (1-(4-Metilfenil)hexan-1-ona) (10): Sólido branco amorfo. RMN



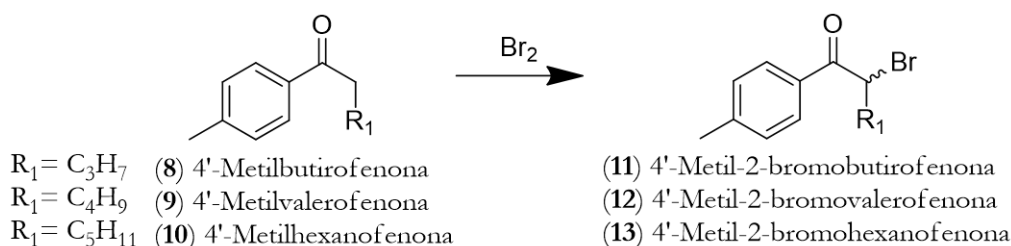
¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 7,86 (2H, d, $J= 8,2$ Hz, H-2'/H-6'); 7,25 (2H, d, $J= 7,6$ Hz, H-3'/H-5'); 2,93 (2H, t, $J= 7,5$ Hz, H-2); 2,41 (3H, s, H-7'); 1,73 (2H, m, H-3); 1,40-1,31 (4H, m, H-4/H-5); 0,91 (3H, t, $J= 7,0$ Hz, H-6); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 200,51 (C-1); 143,73 (C-4'); 134,73 (C-1'); 129,36 (C-3'/C-5'); 128,32 (C-2'/C-6'); 38,63 (C-2); 31,72 (C-4); 24,33 (C-3); 22,69 (C-5); 21,76 (C-7'); 14,12 (C-6).

Síntese das α -Bromocetonas

A síntese das bromocetonas foi realizada tendo por base os trabalhos de Santali et al. (Santali, et al., 2011) nos quais foram preparadas bromocetonas recorrendo à halogenação das respetivas cetonas em meio ácido.

A uma solução da cetona sintetizada em DCM, na proporção de cerca de 0,6 mL de DCM por cada 0,001 mol de cetona, adicionou-se, sob agitação, uma gota de ácido bromídrico e uma gota de Br₂ e aguardou-se até que a cor alaranjada desaparecesse. De seguida, adicionou-se aproximadamente um equivalente de Br₂, gota a gota, deixando-se reagir por alguma horas e acompanhando-se por TLC utilizando como eluente uma mistura de 95/5 Hx/AcEt. A mistura reacional foi seca em corrente de ar obtendo-se um óleo amarelado/alaranjado e rendimentos compreendidos ente 74% e 90%, tendo-se posteriormente realizado espectro de RMN ¹H, em CDCl₃, verificando-se a formação da bromocetona pretendida e a presença de dibromocetona (entre 12% e 33%). Adicionalmente, caracterizou-se cada bromocetona sintetizada realizando espectros de RMN ¹H, ¹³C APT, HSQC, COSY e HMBC, em CDCl₃. Na Tabela 2.4 apresenta-se um resumo das quantidades de reagentes utilizados e de produto obtido em cada reação, bem como o tempo e rendimento da mesma.

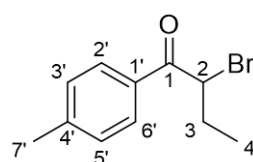
Tabela 2.4. Resumo das quantidades de reagentes e de produto e do tempo de reação e rendimento para a síntese das bromocetonas.



Cetona após purificação (g; mmol)	Br ₂ (g; mmol)	Bromocetona (g; mmol)	Tempo de reação	η
4 ² -Metilbutirofenona (8) (1,3439; 8,3)	1,4040; 8,8	4 ² -Metil-2-bromobutirofenona (11) (1,8060; 7,5)	4 h	90%
4 ² -Metilbutirofenona (8) (1,3030; 8,0)	1,2792; 8,0	4 ² -Metil-2-bromobutirofenona (11) (1,6703; 6,9)	3 h	86%
4 ² -Metilbutirofenona (8) (1,2100; 7,5)	1,2480; 7,8	4 ² -Metil-2-bromobutirofenona (11) (1,5024; 6,2)	2 h	84%
4 ² -Metilvalerofenona (9) (1,1786; 6,7)	1,0920; 6,8	4 ² -Metil-2-bromovalerofenona (12) (1,3068; 5,1)	6,5 h	77%
4 ² -Metilvalerofenona (9) (1,5343; 8,7)	1,4040; 8,8	4 ² -Metil-2-bromovalerofenona (12) (1,8758; 7,4)	3 h	84%
4 ² -Metilhexanofenona (10) (1,7505; 9,2)	1,5600; 9,8	4 ² -Metil-2-bromohexanofenona (13) (1,8402; 6,8)	3 h	74%

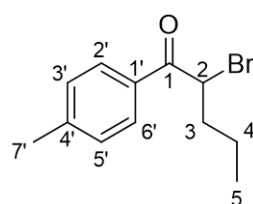
Caracterização das α-Bromocetonas Sintetizadas

4²-Metil-2-bromobutirofenona 1 (2-bromo-1-(4-Metilfenil)butan-1-ona) (11): Óleo



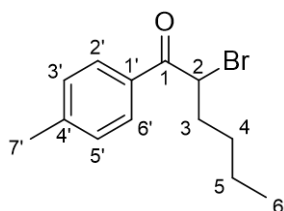
amarelo-alaranjado. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 7,92 (2H, d, J= 8,2 Hz, H-2'/H-6'); 7,29 (2H, d, J= 8,0 Hz, H-3'/H-5'); 5,06 (1H, dd, J= 7,6/6,5 Hz, H-2); 2,43 (3H, s, H-7'); 2,30-2,07 (2H, m, H-3); 1,08 (3H, t, J= 7,3 Hz, H-4); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 193,07 (C-1); 144,83 (C-4'); 132,09 (C-1'); 129,61 (C-3'/C-5'); 129,10 (C-2'/C-6'); 49,25 (C-2); 27,08 (C-3); 21,87 (C-7'); 12,37 (C-4).

4²-Metil-2-bromovalerofenona (2-bromo-1-(4-Metilfenil)pentan-1-ona) (12): Óleo



amarelo-alaranjado. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 7,92 (2H, d, J= 8,2 Hz, H-2'/H-6'); 7,29 (2H, d, J= 8,0 Hz, H-3'/H-5'); 5,14 (1H, dd; 7,6/6,7); 2,43 (3H, s, H-7'); 2,23-2,04 (2H, m, H-3); 1,64-1,36 (2H, m, H-4); 0,97 (3H, t, J= 7,4 Hz, H-5); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 193,14 (C-1); 144,84 (C-4'); 132,06 (C-1'); 129,63 (C-3'/C-5'); 129,11 (C-2'/C-6'); 47,23 (C-2); 35,62 (C-3); 21,88 (C-7'); 20,94 (C-4); 13,74 (C-5).

4'-Metil-2-bromohexanofenona (2-bromo-1-(4-Metilfenil)hexan-1-ona) (13): Óleo



amarelo-alaranjado. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), δ (ppm): 7,92 (2H, d, $J= 8,2$ Hz, H-2'/H-6'); 7,29 (2H, d, $J= 8,0$ Hz, H-3'/H-5'); 5,12 (1H, t, $J= 7,2$ Hz, H-2); 2,43 (3H, s, H-7'); 2,28-2,04 (2H, m, H-3); 1,53-1,30 (2H, m, H-4); 1,41-1,34 (2H, m, H-5); 0,91 (3H, t, $J= 6,9$ Hz, H-6); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ (ppm): 193,14 (C-1); 144,84 (C-4'); 132,08 (C-1'); 129,63 (C-3'/C-5'); 129,11 (C-2'/C-6'); 47,47 (C-2); 33,42 (C-3); 29,82 (C-4); 22,43 (C-5); 21,88 (C-7); 14,04 (C-6).

Síntese das Catinonas

A síntese das catinonas foi realizada tendo por base três métodos diferentes de acordo com o tipo de amina utilizada, recorrendo, no entanto, ao mesmo procedimento de *work-up*.

A síntese das catinonas contendo um grupo dimetilamino, 4-MDMB (1), 4-MDMP (3), 4-MDMH (5), teve por base os trabalhos de McDermott et al. (McDermott, et al., 2011), nos quais uma solução da amina desejada 2M em THF foi adicionada à bromocetona adequada (4'-metil-2-bromobutirofenona (11), 4'-metil-2-bromoalerofenona (12) ou 4'-metil-2-bromohexanofenona (13)) numa proporção de 14 mmol de amina para 3,4 mmol de bromocetona, à temperatura ambiente. Desta forma, a uma solução da bromocetona sintetizada dissolvida em 4 mL de THF seco foram adicionados, com agitação, 4 equivalentes de uma solução de dimetilamina 2M em THF, gota a gota, observando-se a formação de um precipitado. A reação foi acompanhada por TLC utilizando como eluente uma mistura de 95/5 Hx/AcOEt e a mistura reacional foi seca em corrente de ar. De seguida, procedeu-se ao *work-up* da reação tendo por base os trabalhos de Santali et al. (Santali, et al., 2011); para tal, adicionou-se HCl 6M, gota a gota, até ser atingido $\text{pH} = 1$, separou-se uma primeira fase orgânica (Fase Orgânica 1), lavou-se a fase aquosa com 3×50 mL de DCM (Fase Orgânica 2), recolheu-se a fase aquosa e adicionou-se NaOH 5M, gota a gota, até ser atingido $\text{pH} = 10$ e lavou-se com 3×50 mL de DCM (Fase Orgânica 3). Secou-se cada fase orgânica extraída com sulfato de sódio ou sulfato de magnésio anidros, filtrou-se e evaporou-se o solvente sob vácuo. Posteriormente, procedeu-se à obtenção das catinonas na forma de cloridrato tendo por base os trabalhos de Meltzer et al. (Meltzer, et al., 2006); para tal, adicionou-se HCl em solução etérea (3M) a cada fase orgânica extraída anteriormente, obtendo-se, apenas nalgumas das fases, sólidos beges. De seguida, procedeu-se à sua filtração e lavagem com éter dietílico e acetona fria até se obter um sólido branco, que foi posteriormente seco sob vácuo.

A síntese da catinona 4-MDEB (**6**) contendo um grupo dietilamino teve por base os trabalhos de Hyde et al. (Hyde, et al., 1928) nos quais a bromocetona arrefecida é adicionada lentamente a uma solução aquosa de 50% de amina previamente arrefecida, na proporção de 1 mmol de bromocetona para 2 mmoles de amina, a mistura reacional é mantida a baixa temperatura durante a adição, sendo depois deixada à temperatura ambiente. Desta forma, a uma solução de 50% (V/V) de amina em DCM, arrefecida num banho de gelo, foi adicionada bromocetona previamente arrefecida, gota a gota, com agitação, na proporção referida. Após a adição o banho de gelo foi retirado e a reação decorreu à temperatura ambiente, não se observando a formação de precipitado. A reação foi acompanhada por TLC utilizando como eluente uma mistura de 95/5 Hx/AcOEt e a mistura reacional foi seca em corrente de ar. Por fim, procedeu-se ao *work-up* da reação e posterior obtenção da catinona na forma de cloridrato como descrito anteriormente, obtendo-se um pó bege claro.

A síntese das catinonas contendo um grupo etilamino, 4-MNEB (**2**) e 4-MNEP (**4**), consistiu numa adaptação dos métodos anteriormente descritos para a síntese das catinonas **1**, **3**, **5** e **6**: a uma solução de etilamina 2M em THF, arrefecida num banho de gelo, foi adicionada bromocetona previamente arrefecida, gota a gota, com agitação, na proporção de 1 mmol de bromocetona para 4 mmoles de etilamina. Após a adição o banho de gelo foi retirado e a reação decorreu à temperatura ambiente, observando-se a formação de um precipitado. A reação foi acompanhada por TLC utilizando como eluente uma mistura de 95/5 Hx/AcOEt e a mistura reacional foi seca sob vácuo. Por fim, procedeu-se ao *work-up* da reação e posterior obtenção das catinonas na forma de cloridrato como descrito anteriormente, obtendo-se pós brancos.

A síntese de todas as catinonas foi conseguida a partir da bromocetona adequada com rendimentos compreendidos ente 19% e 73%, tendo-se realizado espectros de RMN ¹H, em CDCl₃, para verificar a formação da catinona pretendida e caracterizado cada catinona sintetizada realizando espectros de RMN ¹H, ¹³C APT, HSQC, COSY e HMBC, em CDCl₃ e DMSO-*d*₆. Na Tabela 2.5 apresenta-se um resumo das quantidades de reagentes utilizados e de produto obtido em cada reação, bem como o tempo e rendimento da mesma.

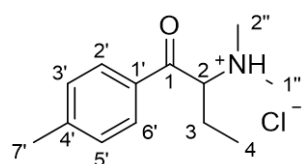
Tabela 2.5. Resumo das quantidades de reagentes e de produto e do tempo de reação e rendimento para a síntese das catinonas.

<p>(11) 4^l-Metil-2-bromobutirofenona</p> <p>(12) 4^l-Metil-2-bromovalerofenona</p> <p>(13) 4^l-Metil-2-bromohexanofenona</p> <p style="margin-left: 20px;">R₁ = C₂H₅</p> <p style="margin-left: 20px;">R₁ = C₃H₇</p> <p style="margin-left: 20px;">R₁ = C₄H₉</p>	<p>(1) 4-MDMB R₁ = C₂H₅, R₂ = CH₃, R₃ = CH₃</p> <p>(2) 4-MNEB R₁ = C₂H₅, R₂ = H, R₃ = CH₂CH₃</p> <p>(3) 4-MDMP R₁ = C₃H₇, R₂ = CH₃, R₃ = CH₃</p> <p>(4) 4-MNEP R₁ = C₃H₇, R₂ = H, R₃ = CH₂CH₃</p> <p>(5) 4-MDMH R₁ = C₄H₉, R₂ = CH₃, R₃ = CH₃</p> <p>(6) 4-MDEB R₁ = C₂H₅, R₂ = CH₂CH₃, R₃ = CH₂CH₃</p>	
--	---	--

Bromocetona (g; mmol)	Amina (g; mmol)	Catinona (g; mmol)	Tempo de reação	η
4 ^l -Metil-2-bromobutirofenona (11) (1,8060; 7,5)	Dimetilamina (1,3524; 30,0)	4-MDMB (1) (0,3490; 1,4)	24 h	19%
4 ^l -Metil-2-bromobutirofenona (11) (1,6703; 6,9)	Etilamina (1,2532; 27,8)	4-MNEB (2) (0,9276; 3,8)	19 h	55%
4 ^l -Metil-2-bromobutirofenona (11) (1,5024; 6,2)	Dietilamina (0,9191; 12,6)	4-MDEB (6) (0,7939; 2,9)	27,5 h	47%
4 ^l -Metil-2-bromovalerofenona (12) (1,3068; 5,1)	Dimetilamina (0,9286; 20,6)	4-MDMP (3) (0,6544; 2,6)	92,5 h	50%
4 ^l -Metil-2-bromovalerofenona (12) (1,8758; 7,4)	Etilamina (1,3254; 29,4)	4-MNEP (4) (1,0476; 4,1)	19 h	56%
4 ^l -Metil-2-bromohexanofenona (13) (1,8402; 6,8)	Dimetilamina (1,2352; 27,4)	4-MDMH (5) (1,3450; 5,0)	47,5 h	73%

Caracterização das Catinonas Sintetizadas

4^l-Metil-N,N-dimetilnorbufedrona (Cloridrato de (R,S)-2-(dimetilamino)-

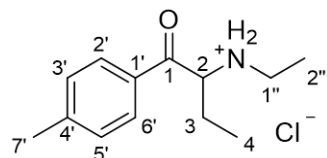


1-(4-Metilfenil)butan-1-ona) (1): Pó branco amorfo (349,0 mg; η = 7 %). HRMS-ESI(+): m/z 206,1544 ($[M+H]^+$, C₁₃H₂₀NO⁺, calculada 206,1539). Pureza (GC-FID): 96,28% (DP 0,83; CV 0,86%).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 12,30 (1H, brs, NH); 7,91 (2H, d, J = 7,3 Hz, H-2'/H-6'); 7,33 (2H, d, J = 7,3 Hz, H-3'/H-5'); 5,11 (1H, m, H-2); 2,94 (6H, brs, H-1''/H-2''); 2,43 (3H, s, H-7'); 2,32-2,18 (1H, m, H-3); 2,13-1,99 (1H, m, H-3); 1,00 (3H, t, J = 6,8 Hz, H-4); RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 195,77 (C-1); 146,94 (C-4'); 133,49 (C-1'); 130,27 (C-3'/C-5'); 128,94 (C-2'/C-6'); 65,43 (C-2); 42,92 (C-1''); 38,17 (C-2''); 23,62 (C-3); 21,96 (C-7'); 10,73 (C-4). RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ (ppm): 10,43 (1H, brs, NH); 7,99 (2H, d, J = 7,7 Hz, H-2'/H-6'); 7,44 (2H, d, J = 7,8 Hz, H-3'/H-5'); 5,42 (1H, m, H-2); 2,86 (3H, s, H-2''); 2,79 (3H, s, H-1''); 2,42 (3H, s, H-7'); 2,10-1,89 (2H, m, H-3); 0,74 (3H, t, J = 7,4 Hz, H-4); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz), δ (ppm): 195,70 (C-1); 146,01 (C-4'); 132,21 (C-1');

129,88 (C-3'/C-5'); 128,99 (C-2'/C-6'); 67,94 (C-2); 42,48 (C-1''); 40,69 (C-2''); 21,55 (C-3); 21,35 (C-7'); 8,46 (C-4).

4'-Metil-N-etilnorbufedrona (Cloridrato de (R,S)-2-(etilamino)-1-(4-Metilfenil)-

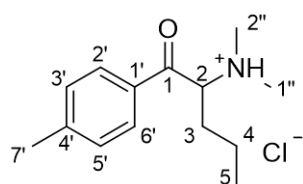


butan-1-ona) (2): Pó branco amorfo (927,6 mg; $\eta = 18\%$).

HRMS-ESI(+): m/z 206,1545 ($[M+H]^+$, $C_{13}H_{20}NO^+$, calculada 206,1539). Pureza (GC-FID): 96,14% (DP 1,47; CV 1,53%).

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz), δ (ppm): 7,91 (2H, d, $J = 7,1$ Hz, H-2'/H-6'); 7,33 (2H, d, $J = 7,2$ Hz, H-3'/H-5'); 5,06 (1H, m, H-2); 3,34-3,23 (1H, m, H-1''); 3,14-3,02 (1H, m, H-1''); 2,53-2,37 (1H, m, H-3); 2,44 (3H, s, H-7'); 2,31-2,18 (1H, m, H-3); 1,54 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, H-2''); 0,97 (3H, t, $J = 6,7$ Hz, H-4); RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz), δ (ppm): 194,41 (C-1); 146,54 (C-4'); 131,56 (C-1'); 130,14 (C-3'/C-5'); 129,11 (C-2'/C-6'); 62,42 (C-2); 43,04 (C-1''); 24,37 (C-3); 21,99 (C-7'); 11,94 (C-2''); 9,27 (C-4). RMN 1H ($DMSO-d_6$, 400 MHz), δ (ppm): 9,33 (1H, brs, NH); 9,03 (1H, brs, NH); 7,99 (2H, d, $J = 7,9$ Hz, H-2'/H-6'); 7,42 (2H, d, $J = 7,9$ Hz, H-3'/H-5'); 5,24 (1H, m, H-2); 3,07-2,96 (1H, m, H-1''); 2,96-2,85 (1H, m, H-1''); 2,41 (3H, s, H-7'); 2,10-1,97 (1H, m, H-3); 1,97-1,85 (1H, m, H-3); 1,26 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, H-2''); 0,76 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, H-4); RMN ^{13}C ($DMSO-d_6$, 100 MHz), δ (ppm): 195,64 (C-1); 145,64 (C-4'); 131,44 (C-1'); 129,75 (C-3'/C-5'); 128,87 (C-2'/C-6'); 61,13 (C-2); 41,11 (C-1''); 23,01 (C-3); 21,28 (C-7'); 11,13 (C-2''); 8,31 (C-4).

4'-Metil-N,N-dimetilnorpentedrona (Cloridrato de (R,S)-2-(dimetilamino)-1-



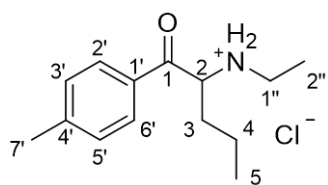
-(4-Metilfenil)pentan-1-ona) (3): Pó branco amorfo (654,4 mg;

$\eta = 13\%$). HRMS-ESI(+): m/z 220,1700 ($[M+H]^+$, $C_{14}H_{22}NO^+$, calculada 220,1696). Pureza (GC-FID): 97,09% (DP 1,08; CV 1,11%). RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz), δ (ppm): 12,56 (1H, brs,

NH); 7,88 (2H, d, $J = 7,2$ Hz, H-2'/H-6'); 7,35 (2H, d, $J = 7,5$ Hz, H-3'/H-5'); 5,04 (1H, t, $J = 6,3$ Hz, H-2); 3,03 (3H, brs, H-2''); 2,81 (3H, brs, H-1''); 2,45 (3H, s, H-7'); 2,24-2,11 (1H, m, H-3); 2,02-1,89 (1H, m, H-3); 1,58-1,42 (1H, m, H-4); 1,37-1,20 (1H, m, H-4); 0,92 (3H, t, $J = 6,8$ Hz, H-5); RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz), δ (ppm): 195,84 (C-1); 147,03 (C-4'); 133,49 (C-1'); 130,33 (C-3'/C-5'); 128,87 (C-2'/C-6'); 63,83 (C-2); 43,04 (C-1''); 37,80 (C-2''); 32,30 (C-3); 21,99 (C-7'); 19,69 (C-4); 14,07 (C-5). RMN 1H ($DMSO-d_6$, 400 MHz), δ (ppm): 10,46 (1H, brs, NH); 8,00 (2H, d, $J = 7,9$ Hz, H-2'/H-6'); 7,44 (2H, d, $J = 7,7$ Hz, H-3'/H-5'); 5,38 (1H, m, H-2); 2,86 (3H, s, H-2''); 2,79 (3H, s, H-1''); 2,42 (3H, s, H-7'); 1,96-1,83 (2H, m, H-3); 1,22-0,99 (2H, m, H-4); 0,79 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, H-5); RMN ^{13}C ($DMSO-d_6$, 100 MHz), δ (ppm):

196,04 (C-1); 146,04 (C-4'); 132,39 (C-1'); 129,88 (C-3'/C-5'); 129,00 (C-2'/C-6'); 66,78 (C-2); 42,29 (C-1''); 40,76 (C-2''); 30,26 (C-3); 21,34 (C-7'); 17,51 (C-4); 13,68 (C5).

4'-Metil-N-etilnorpentedrona (Cloridrato de (R,S)-2-(etilamino)-1-(4-Metilfenil)-



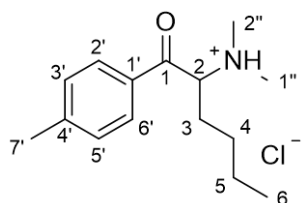
pentan-1-ona) (4): Pó branco amorfo (1,0476 g; $\eta = 21\%$).

HRMS-ESI(+): m/z 220,1704 ($[M+H]^+$, $C_{14}H_{22}NO^+$, calculada 220,1696). Pureza (GC-FID): 96,12% (DP 1,58; CV 1,64%).

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz), δ (ppm): 10,55 (1H, brs, NH); 8,40

(1H, brs, NH); 7,90 (2H, d, $J = 7,3$ Hz, H-2'/H-6'); 7,33 (2H, d, $J = 7,3$ Hz, H-3'/H-5'); 5,05 (1H, m, H-2); 3,33-3,20 (1H, m, H-1''); 3,12-3,00 (1H, m, H-1'); 2,44 (3H, s, H-7'); 2,36-2,23 (1H, m, H-3); 2,23-2,11 (1H, m, H-3); 1,54 (3H, t, $J = 6,3$ Hz, H-2''); 1,54-1,39 (1H, m, H-4); 1,39-1,22 (1H, m, H-4); 0,85 (3H, t, $J = 6,4$ Hz, H-5); RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz), δ (ppm): 194,61 (C-1); 146,47 (C-4'); 131,62 (C-1'); 130,11 (C-3'/C-5'); 129,10 (C-2'/C-6'); 61,58 (C-2); 42,97 (C-1''); 33,07 (C-3); 21,99 (C-7'); 18,41 (C-4); 13,98 (C-5); 11,89 (C-2''). RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ (ppm): 9,39 (1H, brs, NH); 9,05 (1H, brs, NH); 7,98 (2H, d, $J = 7,9$ Hz, H-2'/H-6'); 7,42 (2H, d, $J = 7,9$ Hz, H-3'/H-5'); 5,24 (1H, m, H-2); 3,07-2,95 (1H, m, H-1''); 2,95-2,83 (1H, m, H-1'); 2,41 (3H, s, H-7'); 1,96-1,78 (2H, m, H-3); 1,36-1,21 (1H, m, H-4); 1,25 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H-2''); 1,14-0,98 (1H, m, H-4); 0,77 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, H-5); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz), δ (ppm): 195,88 (C-1); 145,73 (C-4'); 131,52 (C-1'); 129,82 (C-3'/C-5'); 128,93 (C-2'/C-6'); 60,37 (C-2); 41,19 (C-1''); 31,98 (C-3); 21,34 (C-7'); 17,21 (C-4); 13,71 (C-5); 11,22 (C-2'').

4'-Metil-N,N-dimetilnorhexedrona (Cloridrato de (R,S)-2-(dimetilamino)-1-



-(4-Metilfenil)hexan-1-ona) (5): Pó branco amorfo (1,3450 g;

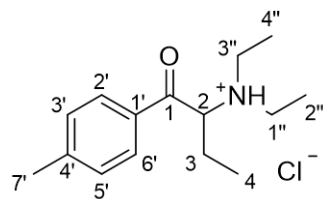
$\eta = 27\%$). HRMS-ESI(+): m/z 234,1858 ($[M+H]^+$, $C_{15}H_{24}NO^+$, calculada 234,1852). Pureza (GC-FID): 94,46% (DP 0,96;

CV 1,02%). RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz), δ (ppm): 12,53 (1H, brs,

NH); 7,89 (2H, d, $J = 7,3$ Hz, H-2'/H-6'); 7,35 (2H, d, $J = 7,4$ Hz, H-3'/H-5'); 5,03 (1H, m, H-2); 3,03 (3H, brs, H-2''); 2,80 (3H, brs, H-1''); 2,45 (3H, s, H-7'); 2,27-2,13 (1H, m, H-3); 2,05-1,92 (1H, m, H-3); 1,52-1,38 (1H, m, H-4); 1,38-1,27 (2H, m, H-5); 1,27-1,13 (1H, m, H-4); 0,82 (3H, t, $J = 6,5$ Hz, H-6); RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz), δ (ppm): 195,83 (C-1); 147,03 (C-4'); 133,53 (C-1'); 130,34 (C-3'/C-5'); 128,89 (C-2'/C-6'); 63,84 (C-2); 43,04 (C-1''); 37,82 (C-2''); 30,00 (C-3); 28,04 (C-4); 22,63 (C5); 21,99 (C-7'); 13,66 (C6). RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ (ppm): 10,37 (1H, brs, NH); 8,00 (2H, d, $J = 7,6$ Hz, H-2'/H-6'); 7,44

(2H, d, $J= 7,9$ Hz, H-3'/H-5'); 5,37 (1H, m, H-2); 2,86 (3H, brs, H-2''); 2,78 (3H, brs, H-1''); 2,42 (3H, s, H-7'); 1,98-1,85 (2H, m, H-3); 1,29-1,14 (2H, m, H-5); 1,14-0,95 (2H, m, H-4); 0,74 (3H, t, $J= 7,0$ Hz, H-6); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz), δ (ppm): 195,99 (C-1); 146,09 (C-4'); 132,30 (C-1'); 129,91 (C-3'/C-5'); 129,00 (C-2'/C-6'); 66,93 (C-2); 42,43 (C-1''); 40,75 (C-2''); 27,93 (C-3); 25,89 (C-4); 21,85 (C5); 21,35 (C-7'); 13,52 (C6).

4'-Metil-N,N-dietilnorbufedrona (Cloridrato de (R,S)-2-(dietilamino)-1-



-(4-Metilfenil)butan-1-ona) (6): Pó bege amorfo (793,9 mg; $\eta= 14$ %). HRMS-ESI(+): m/z 234,1848 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{NO}^+$, calculada 234,1852). Pureza (GC-FID): 96,14% (DP 1,04; CV 1,08%). RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz), δ (ppm): 11,39 (1H, brs,

NH); 7,89 (2H, d, $J= 7,2$ Hz, H-2'/H-6'); 7,35 (2H, d, $J= 7,2$ Hz, H-3'/H-5'); 5,10 (1H, m, H-2); 3,84-3,71 (1H, m, H-3''); 3,57-3,43 (1H, m, H-3''); 3,43-3,29 (1H, m, H-1''); 3,14-3,01 (1H, m, H-1''); 2,57-2,47 (1H, m, H-3); 2,45 (3H, s, H-7'); 2,14-1,99 (1H, m, H-3); 1,57 (3H, t, $J= 6,6$ Hz, H-4''); 1,44 (3H, t, $J= 6,4$ Hz, H-2''); 1,01 (3H, t, $J= 6,7$ Hz, H-4); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz), δ (ppm): 195,72 (C-1); 146,95 (C-4'); 133,38 (C-1'); 130,31 (C-3'/5'); 128,92 (C-2'/6'); 63,57 (C-2); 48,21 (C-1''); 45,90 (C-3''); 23,80 (C-3); 21,98 (C-7'); 11,86 (C-4''); 11,35 (C-4); 10,37 (C-2''). RMN ^1H (DMSO- d_6 400 MHz), δ (ppm): 9,68 (1H, brs, NH); 8,08 (2H, d, $J= 7,8$ Hz, H-2'/H-6'); 7,44 (2H, d, $J= 7,8$ Hz, H-3'/H-5'); 5,36 (1H, m, H-2); 3,40-3,28 (1H, m, H-3''); 3,23-3,09 (2H, m, H-1''/H-3''); 3,09-2,95 (1H, m, H-1''); 2,42 (3H, s, H-7'); 2,06-1,89 (2H, m, H-3); 1,28 (3H, t, $J= 7,1$ Hz, H-4''); 1,21 (3H, t, $J= 7,1$ Hz, H-2''); 0,73 (3H, t, $J= 7,4$ Hz, H-4); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz), δ (ppm): 195,73 (C-1); 146,22 (C-4'); 132,02 (C-1'); 129,88 (C-3'/C-5'); 129,17 (C-2'/C-6'); 65,13 (C-2); 46,54 (C-1''); 43,19 (C-3''); 21,62 (C-3); 21,36 (C-7'); 9,58 (C-2''); 8,57 (C-4); 7,64 (C-4'').

Obtenção da Solução Etérea de Ácido Clorídrico (3M)

A solução etérea de ácido clorídrico, utilizada na obtenção das catinonas na forma de cloridrato, foi produzida recorrendo à montagem apresentada na Figura 2.2. Para tal foi adicionado gota-a-gota ácido sulfúrico a 96 % (38,3 mL; 0,375 mol) sobre cloreto de sódio (43,83 g; 0,75 mol), previamente seco na estufa a 100 °C durante a noite, levando à formação de ácido clorídrico que borbulhou em éter etílico (250 mL; 0,75 mol) durante algumas horas, até à sua estabilização.



Figura 2.2. Montagem utilizada para a obtenção da solução etérea de ácido clorídrico.

2.5. Validação de um Método de Detecção e Quantificação de Catinonas em Sangue por GC-MS

No presente trabalho efetuou-se a validação de um método de detecção e quantificação das seis catinonas sintetizadas, em sangue, por GC-MS e recorrendo a SPE, tendo sido avaliados diferentes parâmetros tais como seletividade, eficiência do processo de extração (recuperação), LOD, limite inferior de quantificação (LLOQ), arrastamento (*carry-over*), linearidade, limite superior de quantificação (ULOQ), precisão, exatidão e estabilidade, tendo-se, por fim, aplicado o método validado à análise de amostras reais.

Identificação e Quantificação dos Compostos em estudo

A identificação dos compostos em estudo foi efetuada em modo SIM analisando o tempo de retenção (t_R) de cada composto, bem como o tempo de retenção relativo (t_{Rr}), a presença de três iões característicos e as intensidades relativas desses iões, em comparação com os resultados obtidos para uma amostra controlo, tendo por base os critérios de avaliação da Agência Mundial Antidopagem (WADA) (WADA, 2010).

Relativamente ao tempo de retenção, o seu valor absoluto deve encontrar-se num intervalo de $\pm 2\%$ ou $\pm 0,1$ min do t_R do mesmo composto numa amostra de controlo e o seu valor relativo (dado pelo quociente entre o t_R do composto e o t_R de um padrão interno) deve

encontrar-se num intervalo de $\pm 1\%$ do t_{Rr} numa amostra de controlo ou $\pm 0,1\%$ se o padrão interno utilizado se tratar de um análogo deuterado do composto em estudo.

Relativamente às intensidades relativas dos iões monitorizados, estas são dadas pela percentagem da área do pico de cada ião relativamente à área do pico do ião mais abundante que é tida como 100%, devendo as intensidades relativas encontrar-se nos intervalos de aceitação apresentados na Tabela 2.6, comparativamente às intensidades relativas observadas para uma amostra de controlo.

Finalmente, para a identificação de um composto é ainda necessário verificar-se uma razão sinal/ruído (S/N) superior a 3 para todos os iões monitorizados, sendo esta avaliada recorrendo a uma função do *software* que compara a intensidade de um pico com a intensidade do ruído da linha de base adjacente a esse pico.

Tabela 2.6. Intervalos de aceitação para as intensidades relativas dos iões monitorizados em modo SIM.

Intensidade Relativa (%)	Intervalo de aceitação (%)
>50	± 10 (intervalo absoluto)
25-50	± 20 (intervalo relativo)
5-<25	± 5 (intervalo absoluto)
<5	± 50 (intervalo relativo)

A quantificação dos compostos em estudo foi efetuada por aplicação do método de padrão interno, no qual este é adicionado a cada amostra numa determinada concentração constante (250 ng/mL). A escolha do padrão interno teve por base os compostos utilizados no método aplicado pelo SQTf para a análise de cocaína e metabolitos, tendo-se usado nos estudos de otimização do método uma mistura de benzoilecgonina- d_3 , cocaína- d_3 e ecgonina metil éster- d_3 e na validação do método uma solução contendo apenas cocaína- d_3 (5 $\mu\text{g/mL}$).

Preparação das Amostras Biológicas

A preparação das amostras biológicas consistiu primeiramente no descongelamento das mesmas até à temperatura ambiente por movimentos de rotação e inversão. De seguida, preparou-se uma mistura de 8 mL de solução tampão de fosfato (KH_2PO_4 0,1 M), 25 μL de solução de mistura de padrões internos (ficando à concentração de 500 ng/mL em sangue) ou de solução de padrão interno de cocaína- d_3 (250 ng/mL) e a quantidade necessária da solução de catinonas adequada, dependendo da etapa do processo de otimização ou validação. Por fim, foram adicionados 500 μL de sangue a essa mistura, procedendo-se posteriormente à sua

homogeneização por movimentos de rotação e inversão durante 15 min, seguida de centrifugação a 3500 rpm durante 15 min.

Após a centrifugação, procedeu-se à extração das amostras por SPE, utilizando colunas Oasis[®] MCX, começando por se acondicionar as colunas com 2 mL de MeOH e 2 mL de água desionizada. De seguida, adicionou-se o sobrenadante das amostras centrifugadas e efetuou-se a lavagem das colunas com 2 mL de água desionizada, 2 mL de HCl 0,1N e 2 mL de MeOH (ou outro solvente de lavagem testado durante a otimização do método). Após a lavagem das colunas, adicionaram-se 2 mL de hexano e efetuou-se a secagem das colunas sob vácuo por 10 min. Finalmente, eluíram-se os analitos com 2 mL da solução de DCM/isopropanol/amónia (78/20/2, v/v/v).

Após o processo de SPE, os extratos foram evaporados à secura a 45 °C sob corrente de azoto durante 20 min. Por fim, reconstituíram-se os extratos secos adicionando 65 µL de MeOH, homogeneizando-se no equipamento de vortex, (ou 65 µL de solução de derivatizante, incubando-se a 80 °C por 30 min, na fase de otimização do método) e transferiu-se para *vials* posteriormente encapsulados.

Otimização do Método

O método analítico validado foi previamente otimizado em diversos aspetos, nomeadamente o uso ou não de agentes de derivatização, o programa de temperaturas usado, o fluxo de hélio, o tipo de sangue a utilizar, a razão de *split* e ainda o solvente de lavagem das colunas de SPE.

O uso de agentes de derivatização foi avaliado recorrendo aos métodos de derivatização mais frequentemente utilizados no SQTF: derivatização por sililação, utilizando uma mistura de MSTFA/TMCS, ou por acilação, utilizando MBTFA, tendo-se também testado não recorrer a derivatização e acabando por se optar não derivatizar os analitos.

O programa de temperaturas foi otimizado de modo a separar o melhor possível os picos das catinonas, colmatando assim eventuais problemas a baixas concentrações, uma vez que se pretendia identificar as catinonas, não só pelo seu espectro de massa, mas também pelo seu t_R , tendo-se ainda testado dois valores de fluxo de hélio de modo a diminuir o t_R das catinonas, sem afetar a sua separação, encontrando-se as condições finais apresentadas na secção de Equipamento e Materiais.

A escolha do tipo de sangue a utilizar foi efetuada após serem analisadas amostras fortificadas de sangue cardíaco *post mortem* ou de sangue de vivo de modo a avaliar a existência

de eventuais interferentes que impedissem a sua utilização, acabando por se optar pelo sangue de vivo em toda a validação já que este não apresentava interferentes aos tempos de retenção e iões monitorizados de cada um dos analitos; no estudo de seletividade procurou-se estudar várias origens diferentes de sangue, pelo que foi também utilizado sangue cardíaco.

As condições de *split* foram otimizadas com o objetivo de aumentar a sensibilidade do método, tendo sido testadas duas razões de *split* (1:3 e 1:5) e ainda o modo *splitless*, decidindo usar-se uma razão de *split* de 1:3.

Por fim, foram testados três solventes de lavagem das colunas de SPE (uma mistura de DCM/MeOH, isopropanol ou MeOH) de forma a escolher o solvente que proporcionasse uma melhor eficiência de extração, tendo-se optado por usar MeOH.

Validação do Método

Após concluída a otimização de diversos aspetos do método analítico procedeu-se à sua validação de modo a garantir que o método desenhado cumpre os objetivos desejados e que produz resultados de confiança, podendo assim ser inserido na rotina laboratorial.

Estudo de Seletividade

Para o estudo da seletividade do método analítico, foram selecionadas aleatoriamente 40 amostras de sangue (20 colhidas no âmbito do Código da Estrada e 20 de sangue cardíaco *post mortem*). Cada conjunto de 20 amostras foi dividido em cinco grupos contendo quatro amostras diferentes (500 µL de cada uma), obtendo-se assim 10 *pools* de sangue com a composição apresentada na Tabela 2.7. Após a homogeneização das *pools* de sangue por movimentos de inversão e rotação, procedeu-se à preparação de 20 tubos contendo 8 mL de solução tampão de fosfato e 250 ng/mL de solução de padrão interno, adicionando-se depois em 10 dos tubos 500 µL de sangue de cada *pool* (conjunto A – brancos) e nos outros 10 tubos 500 µL de sangue de cada *pool* e 50 µL da solução de controlos de catinonas a 1 µg/mL (ficando a 100 ng/mL) (conjunto B – fortificados).

As 20 amostras assim preparadas foram analisadas recorrendo ao método otimizado com o objetivo de avaliar a presença das seis catinonas estudadas em cada uma delas, sendo um método considerado seletivo, segundo os critérios de validação de métodos do SQTF, quando se verifica uma percentagem de falsos positivos igual a 0% e de falsos negativos <10%. Algumas destas amostras eram positivas para algumas substâncias, permitindo assim a avaliação da sua eventual influência na análise das catinonas em estudo.

Tabela 2.7. Composição de cada *pool* utilizada no estudo de seletividade.

	<i>Pool</i>	Amostra	Gênero	Idade	Álcool (g/L)	Outras substâncias presentes nas amostras
Código da Estrada	1	1	Feminino	29	—	—
		2	Feminino	34	—	THC; 11-OH-THC; THC-COOH
		3	Feminino	44	1,66	—
		4	Feminino	33	—	—
	2	5	Masculino	67	—	—
		6	Feminino	54	—	—
		7	Masculino	50	1,85	—
		8	Feminino	40	1,81	—
	3	9	Masculino	52	1,40	—
		10	Masculino	52	—	—
		11	Masculino	70	1,91	—
		12	Masculino	62	—	—
4	13	Masculino	20	—	—	
	14	Feminino	30	—	—	
	15	Feminino	96	—	—	
	16	Masculino	74	0,50	—	
5	17	Masculino	64	2,58	—	
	18	Masculino	28	1,86	—	
	19	Masculino	35	1,63	—	
	20	Masculino	34	—	—	
Sangue Cardíaco <i>post mortem</i>	6	21	Masculino	49	0,13	—
		22	Masculino	58	—	—
		23	Masculino	45	1,31	Alprazolam; Benzoilecgonina; Quetiapina
		24	Feminino	83	—	—
	7	25	Masculino	55	—	—
		26	Masculino	42	—	Fenitoína; Fenobarbital; Levetiracetam; Lidocaína
		27	Masculino	—	—	—
		28	Masculino	86	—	<i>N</i> -desmetil-tramadol; <i>O</i> -desmetil-tramadol; Tramadol
	8	29	Masculino	88	—	—
		30	Masculino	60	0,68	Carboxihemoglobina; Diazepam; <i>meta</i> -Clorofenilpiperazina; Nordiazepam; Olanzapina; Trazodona; 7-amino-clonazepam
		31	Masculino	73	—	Fentanil; Levetiracetam; Morfina; <i>N</i> -desmetil-tramadol; <i>O</i> -desmetil-tramadol; Tramadol
		32	Feminino	76	—	Fluoxetina
9	33	Masculino	47	—	THC; THC-COOH	
	34	Feminino	37	—	Mirtazapina; THC; 11-OH-THC; THC-COOH	
	35	Masculino	75	—	—	
	36	Masculino	84	—	—	
10	37	Masculino	48	—	—	
	38	Masculino	—	—	Carboxihemoglobina; Diazepam; Nordiazepam	
	39	Masculino	20	—	—	
	40	Masculino	50	—	—	

Eficiência do Processo de Extração (Recuperação)

A avaliação da eficiência da extração foi realizada para três gamas de trabalho, baixa (25 ng/mL), média (100 ng/mL) e alta (500 ng/mL), tendo sido analisados três replicados para cada gama. Para tal, preparam-se dois conjuntos de 9 tubos contendo 8 mL de solução tampão de fosfato e 500 µL de sangue branco, tendo-se depois fortificado apenas um dos conjuntos com as catinonas em estudo (12,5 ou 50 µL da solução de controlos a 1 µg/mL para a gama baixa ou média, respetivamente, e 25 µL da solução de controlos a 10 µg/mL para a gama alta). Posteriormente, procedeu-se à extração por SPE dos dois conjuntos de amostras, tendo-se antes da evaporação adicionado 25 µL de solução de padrão interno (ficando a 250 ng/mL) aos dois conjuntos e fortificado o outro conjunto de amostras com as catinonas em estudo, adicionando os volumes indicados anteriormente.

Por fim, analisaram-se as amostras preparadas e calculou-se a percentagem de recuperação do método de extração utilizando a Equação 2.1, sendo que esta deve encontrar-se entre 40% e 120%, segundo os critérios de validação de métodos do SQTF.

$$\text{Recuperação}(\%) = \frac{(\text{Área}_{\text{analito}}/\text{Área}_{\text{padrão interno}})_{\text{Amostras fortificadas antes da extração}}}{(\text{Área}_{\text{analito}}/\text{Área}_{\text{padrão interno}})_{\text{Amostras fortificadas depois da extração}}} \times 100 \quad (2.1)$$

Limite de Detecção e Limite Inferior de Quantificação

Para determinar o LOD preparam-se tubos contendo 8 mL de solução tampão de fosfato, 250 ng/mL de padrão interno, 500 µL de sangue branco e 1, 2, 5 ou 10 ng/mL dos compostos em estudo (utilizando para tal 5, 10, 25 ou 50 µL da solução de calibradores a 0,1 µg/mL, respetivamente), tendo-se preparado cinco replicados para cada concentração e analisado todas as amostras utilizando o método descrito. O limite de deteção para cada catinona foi definido como a menor concentração em que se verificaram valores de S/N superiores a 3 para todos os replicados e em que o analito foi identificado de acordo com os critérios de avaliação da WADA (WADA, 2010) para pelo menos 90% dos replicados (tendo-se usado como controlo positivo um replicado de 10 ng/mL) (ICH, 2005).

A determinação do LLOQ foi realizada juntamente com o estudo de linearidade, tendo-se definido que o LLOQ de cada catinona seria o valor de concentração do calibrador mais baixo da curva de calibração no qual fosse possível identificar o analito de acordo com os critérios de avaliação da WADA (WADA, 2010) e quantificá-lo com precisão e exatidão

(CV<20% e ER entre $\pm 20\%$ da concentração teórica, determinados com base nos resultados obtidos para as amostras analisadas aquando do estudo de precisão e exatidão *intraday* (repetibilidade)) (FDA, 2018).

Avaliação do Fenómeno de Arrastamento (*Carry-over*)

O estudo de eventuais fenómenos de arrastamento foi efetuado em simultâneo com o restante processo de validação através da análise de amostras brancas injetadas após o calibrador e o controlo mais altos nos cinco dias do estudo de linearidade e avaliação da ausência de picos correspondentes às catinonas estudadas.

Linearidade e Modelo de Calibração

No presente trabalho partiu-se do pressuposto que a variância das diferenças entre as concentrações teóricas e as concentrações calculadas não era constante ao longo da gama de concentrações utilizadas no estudo de linearidade, ou seja, que se verificava heterocedasticidade dos dados, uma vez que tal se verifica frequentemente nas análises realizadas no SQTF. Assim sendo, recorreu-se ao método dos mínimos quadrados ponderados de modo a equilibrar a contribuição de cada calibrador da reta de calibração por forma a melhorar a exatidão das quantificações realizadas, tendo sido considerados diferentes fatores de ponderação baseados tanto na variável independente ($1/x$, $1/x^2$, $1/\sqrt{x}$) como na variável dependente ($1/y$, $1/y^2$, $1/\sqrt{y}$). A escolha do fator de ponderação a utilizar teve por base a avaliação do somatório do erro relativo (ER) para os cinco dias de validação obtido por comparação entre a concentração teórica e a concentração calculada por interpolação da área cromatográfica relativa (quociente entre a área do pico cromatográfico do analito e do padrão interno) na equação de regressão linear ponderada obtida para cada fator de ponderação, tendo-se, desta forma, selecionado o fator $1/x^2$, uma vez que, de entre os avaliados, foi o que originou um menor somatório de ER.

O estudo de linearidade foi inicialmente realizado utilizando 8 calibradores com concentrações de 10, 25, 50, 200, 400, 600, 800 e 1000 ng/mL, não efetuando réplicas e traçando-se seis curvas de calibração, uma por cada catinona, sendo que, tendo em conta os critérios de aceitação das curvas de calibração considerados pelo SQTF, os valores dos coeficientes de correlação linear (r) e de determinação (R^2) deviam ser superiores a 0,99.

As amostras de calibradores utilizadas em cada dia de validação foram preparadas com 8 mL de solução tampão de fosfato, 250 ng/mL de padrão interno, 500 μ L de sangue branco e a quantidade necessária de solução de calibradores das catinonas: 5; 12,5; 25 e 100 μ L da

solução a 1 µg/mL para os calibradores a 10, 25, 50 e 200 ng/mL, respetivamente, e 20, 30, 40 e 50 µL da solução a 10 µg/mL para os calibradores a 400, 600, 800 e 1000 ng/mL, respetivamente, aplicando-se o método analítico otimizado para a análise das amostras assim preparadas e repetindo-se todo o procedimento durante cinco dias ao longo de um mês. No entanto, após avaliar o ER obtido utilizando as curvas de calibração considerando o calibrador de 1000 ng/mL em comparação com o ER obtido sem considerar o calibrador de 1000 ng/mL optou-se por não considerar esse calibrador por forma a obter resultados mais lineares e um menor ER, melhorando-se a exatidão do método.

Adicionalmente, foram preparadas e analisadas amostras de controlo em três gamas de trabalho, baixa (25 ng/mL), média (100 ng/mL) e alta (500 ng/mL), tendo sido analisados três replicados para cada gama. As amostras de controlo utilizadas em cada dia de validação foram preparadas com 8 mL de solução tampão de fosfato, 250 ng/mL de padrão interno, 500 µL de sangue branco e a quantidade necessária de solução de controlos das catinonas (solução esta que era independente da solução utilizada para a preparação dos calibradores): 12,5 µL ou 50 µL da solução a 1 µg/mL para a gama baixa ou média, respetivamente, e 25 µL da solução a 10 µg/mL para a gama alta, aplicando-se o método analítico otimizado para a análise das amostras assim preparadas. Estas amostras foram utilizadas para validar a curva de calibração em cada dia de trabalho, verificando se as concentrações calculadas utilizando a curva de calibração desse dia se encontravam num intervalo de $\pm 15\%$ da concentração teórica (FDA, 2018), sendo também utilizadas para o estudo da precisão intermédia do método.

Precisão e Exatidão *intraday* (repetibilidade) e *interday*

O estudo da precisão e exatidão foi realizado em simultâneo com estudo de linearidade do método ao longo dos cinco dias de validação. Desta forma, a precisão e exatidão em condições de repetibilidade (*intraday*) foram estimadas através da análise de seis amostras (um calibrador e cinco replicados) de igual concentração num mesmo dia, tendo sido estudadas para as concentrações de 10, 50, 200, 600 e 800 ng/mL; a precisão e exatidão *interday* foram estimadas através da análise de cinco amostras (cinco calibradores) de igual concentração, uma por cada dia de validação, tendo sido estudadas para as concentrações dos calibradores.

As estimativas da precisão e da exatidão foram efetuadas através do cálculo do CV e do ER, expressos em percentagem, utilizando a Equação 2.2 e a Equação 2.3, respetivamente, sendo que os valores de CV devem ser $<15\%$ (ou $<20\%$ para o LLOQ) e os valores de ER devem situar-se entre $\pm 15\%$ (ou $\pm 20\%$ para o LLOQ) da concentração teórica (FDA, 2018).

$$CV(\%) = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Conc.Média}} \times 100 \quad (2.2)$$

$$ER(\%) = \frac{\text{Conc.calculada} - \text{Conc.Teórica}}{\text{Conc.Teórica}} \times 100 \quad (2.3)$$

Precisão Intermédia

O estudo da precisão intermédia (SI) foi realizado em simultâneo com a avaliação da linearidade do método, utilizando para tal os resultados obtidos aquando da análise das amostras de controlo de cada dia de validação, tendo, desta forma, sido estudadas três gamas de trabalho, baixa (25 ng/mL), média (100 ng/mL) e alta (500 ng/mL), e tendo sido analisados três replicados para cada gama (n=15).

Os resultados obtidos foram utilizados para efetuar uma análise de variância ANOVA de fator único conforme apresentada na Tabela 2.8, tendo-se posteriormente calculado uma estimativa da precisão *between-run* (S_{run}) e da repetibilidade (S_r), utilizadas para calcular uma estimativa da precisão intermédia (S_I), com a qual foi, por fim, calculado o CV da Precisão Intermédia, segundo as equações apresentadas na Tabela 2.9. Adicionalmente, foi também calculado o ER para cada gama de trabalho utilizando a Equação 2.3. Novamente, os valores de CV_{SI} devem ser <15% e os valores de ER devem situar-se entre $\pm 15\%$ da concentração teórica (FDA, 2018).

Tabela 2.8. Tabela ANOVA (fator único) utilizada no estudo da precisão intermédia.

Fonte de Variação	Quadrados Médios (MS_{run} ; MS_r ; MS_T)	Graus de Liberdade
Inter Grupos (<i>run</i>)	$MS_{run} = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{p - 1}$	$p - 1$
Intra Grupos (residual)	$MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (x_{ij} - x_i)^2}{p(n - 1)}$	$p(n - 1)$
Total	$MS_T = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{x})^2 + \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{pn - 1}$	$pn - 1$

p – número de seqüências de análise para cada nível de concentração ($p=5$); n – número de replicados em cada seqüência ($n=3$); \bar{x}_i – média da concentração de n replicados da seqüência i ; $\bar{\bar{x}}$ – média das médias de p seqüências; x_{ij} – concentração de um replicado j da seqüência i .

Tabela 2.9. Cálculo das estimativas de precisão *between-run*, repetibilidade e precisão intermédia e respetivo CV da precisão intermédia.

Variância	Expressão
Precisão <i>Between-run</i> (S_{run})	$S_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MS_r}{n}}$
Repetibilidade (S_r)	$S_r = \sqrt{MS_r}$
Precisão Intermédia (S_I)	$S_I = \sqrt{S_{run}^2 + S_r^2}$
CV da Precisão Intermédia	$CV_{S_I}(\%) = \frac{S_I}{\text{Conc. Média}} \times 100$

Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada aquando do estudo de precisão e exatidão e do estudo de precisão intermédia executados em simultâneo com o estudo de linearidade através da avaliação do impacto das alterações que ocorrem naturalmente durante a validação de um método, nomeadamente, mudança de *liner*, utilização de colunas de extração e de solventes de diferentes lotes, utilização de soluções de reagentes diferentes (em particular para a solução tampão de fosfato, para a solução de HCl 0,1N e para a solução de DCM/isopropanol/amónia) e utilização de curvas de calibração diferentes.

Estudo de Estabilidade

Ao longo da validação do método analítico realizou-se um estudo de estabilidade das seis catinonas estudadas, para três gamas de trabalho, baixa (25 ng/mL), média (100 ng/mL) e alta (500 ng/mL), tendo sido avaliadas cinco condições que diferiam quanto à temperatura e tempo de armazenamento.

Com esse objetivo foram preparadas soluções de 5 mL, utilizando a solução de controlos das catinonas em estudo e contendo, para a gama baixa, 125 µL da solução de catinonas a 1 µg/mL, 500 µL de água desionizada e 4,375 mL de sangue branco, para a gama média, 50 µL da solução de catinonas a 10 µg/mL e 4,950 mL de sangue branco e, para a gama alta, 250 µL da solução de catinonas a 10 µg/mL, 500 µL de água desionizada e 4,250 mL de sangue branco, tendo sido preparados três conjuntos de soluções.

Cada conjunto foi submetido às condições desejadas sendo que o primeiro conjunto foi guardado no congelador (a -10 °C) durante duas semanas tendo sido descongelado completamente e voltando a congelar ao segundo e ao terceiro dias, o segundo conjunto foi guardado no congelador (a -10 °C) durante um mês e o terceiro conjunto foi guardado no

frigorífico (entre 2 e 8 °C) durante um mês (tendo sido analisado ao fim de uma semana e ao fim de um mês). No dia em que se pretendia analisar as amostras de cada um dos conjuntos referidos preparam-se tubos contendo 8 mL de solução tampão de fosfato, 250 ng/mL de padrão interno e 500 µL de sangue previamente fortificado, tendo sido preparados três replicados para cada gama de trabalho estudada.

Adicionalmente, estudou-se ainda a estabilidade dos compostos após o processo de extração através da reinjeção de *vials* preparados e deixados à temperatura ambiente durante dois dias.

A estabilidade dos compostos para cada uma das condições e concentrações referidas foi avaliada com base nas indicações do *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX, 2013), sendo que se considerou um composto como estável quando a sua concentração média calculada para a amostra a avaliar se encontrava incluída num intervalo de estabilidade obtido a partir da concentração média calculada de três amostras controlo preparadas e analisadas no mesmo dia que as amostras a avaliar mais ou menos o erro relativo aceite para o método (concentração calculada média \pm 15%).

Análise de Amostras Reais

Uma vez finalizada a validação do método analítico procedeu-se à sua aplicação para a análise de algumas amostras reais com o objetivo de avaliar a presença das catinonas estudadas. Para tal, foram selecionadas 6 amostras de sangue que tinham sido previamente analisadas no SQTf e cujo resultado se revelou positivo para anfetaminas, apresentando-se na Tabela 2.10 as características de cada amostra. Para a análise destas amostras foram preparados tubos contendo 8 mL de solução tampão de fosfato, 250 ng/mL de padrão interno e 500 µL de sangue de cada amostra escolhida.

Tabela 2.10. Características de cada amostra real analisada.

Tipo de Amostra	Amostra Real	Género	Idade	Álcool (g/L)	Outras substâncias
Código da Estrada	1	Masculino	22	0,17	MDMA; MDA
	2	Masculino	35	1,46	MDMA
	3	Masculino	20	—	MDMA; MDA; Benzoilecgonina; Ecgonina metil éster; THC; 11-OH-THC; THC-COOH
Sangue Cardíaco <i>post mortem</i>	4	Masculino	43	—	MDMA; MDA
	5	Masculino	32	—	MDMA; MDA
Sangue Periférico <i>post mortem</i>	6	Masculino	24	—	MDMA; MDA

3. Resultados e Discussão

3.1. Identificação de NSP em Produtos Apreendidos

No presente trabalho foram analisadas duas amostras resultantes de produtos apreendidos em Portugal, por forma a verificar a presença de NSP. As amostras foram previamente analisadas por GC-MS no LPC-PJ, obtendo-se a indicação de que a Amostra 1 continha uma mistura de 5F-ADB e 3-MeO-PCP e a Amostra 2 continha uma mistura de 3-MeO-PCP e 1-(ciclohex-1-en-1-il)piperidina, tendo-se posteriormente procedido à análise de RMN com o objetivo de confirmar esses resultados e identificando-se as NSP presentes em cada amostra. Inicialmente, procedeu-se à análise dos espectros de ^{13}C e ^1H , obtendo-se o desvio químico de cada sinal, bem como a integração e multiplicidade dos sinais de prótons. Pela análise do espectro de HSQC atribuíram-se os prótons correspondentes a cada carbono e pelas restantes técnicas bidimensionais atribuíram-se inequivocamente os sinais de ^1H e de ^{13}C de cada composto.

Amostra 1

A análise dos espectros de RMN da Amostra 1 em MeOD demonstrou que esta se tratava de uma mistura, desta forma procedeu-se à sua purificação por TLC preparativa, obtendo-se o Composto A, identificado como o 5F-ADB (Figura 3.1), não tendo sido possível, no entanto, identificar o outro composto purificado.

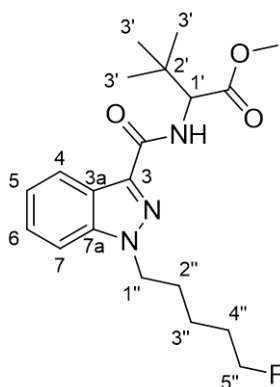


Figura 3.1. Estrutura do 5F-ADB (Composto A da Amostra 1).

A análise dos espectros de RMN em CDCl_3 para o composto purificado (Anexo A, Figuras 6.1-6.6) permitiu, inicialmente, atribuir os sinais correspondentes ao grupo substituinte ligado à posição 3 do indazole: um singuleto a 1,09 ppm e com integração de 9H correspondente ao sinal de próton dos metilos do grupo *ter*-butilo; o singuleto a 3,76 ppm que integra para 3H característico do metilo do grupo metoxilo; um duplete a 7,55 ppm correspondente ao próton ligado ao azoto, uma vez que no espectro de HSQC não apresenta nenhuma correlação; no espectro de HMBC foi possível verificar uma correlação entre o sinal de próton do grupo metoxilo e o sinal de um carbono quaternário a 172,34 ppm, permitindo atribuir este último ao carbonilo do grupo éster; as correlações em HMBC entre o sinal dos prótons do grupo *ter*-butilo e os sinais de um carbono quaternário a 35,19 ppm e de um grupo metino a 59,61 ppm permitiram atribuir estes sinais aos carbonos C-2' e C-1', respetivamente; a correlação verificada em COSY entre o sinal de próton do grupo metino em posição 1' e o próton do NH confirma a posição adjacente destes dois grupos; a correlação no espectro de HMBC do próton do grupo metino em posição 1' com o carbono quaternário a 162,46 ppm permitiu verificar que este correspondia ao carbonilo da amida (Figura 3.2).

De seguida, foi possível identificar os sinais correspondentes aos grupos metilénicos da cadeia alquílica $\delta^1\text{H}/\delta^{13}\text{C}$: 4,42t/49,32; 2,06-1,97m/29,47; 1,53-1,43m/22,81d ($J=5,1$ Hz); 1,89-1,68m/30,04d ($J=19,6$ Hz); 4,44dt/83,89d ($J=164,7$ Hz). A atribuição dos sinais dos grupos metilénicos em posição 3'' (22,81 ppm), 4'' (30,04 ppm) e 5'' (83,89 ppm) foi efetuada com base nos valores dos desvios químicos dos sinais de carbono e respetivas constantes de acoplamento, uma vez que uma maior proximidade ao átomo de fluor corresponderá a um maior desvio químico de sinal do carbono (efeito desblindante do fluor devido à sua elevada eletronegatividade) e a uma maior constante de acoplamento; a multiplicidade do sinal a 4,42 ppm, um tripleto, permitiu atribuí-lo ao grupo em posição 1''; a correlação observada no espectro de COSY entre o sinal do grupo metilénico em posição 1'' e o sinal a 2,06-1,97 ppm permitiu atribuir este último ao grupo em posição 2''; as correlações observadas no espectro de COSY e apresentadas na Figura 3.2 permitiram confirmar estas atribuições.

Por último, efetuou-se a atribuição dos sinais correspondentes ao grupo indazol: o sinal dos prótons do grupo metilénico em posição 1'' correlaciona em HMBC com um carbono quaternário a 140,95 ppm, sendo este atribuído ao carbono C-7a (uma vez que os carbonos C-3a e C-3 se encontram a mais de três ligações dos prótons em posição 1'' e por isso não seria espectável observar estas correlações); o sinal de carbono correspondente ao C-7a correlaciona também com os sinais de prótons aromáticos a 8,34 ppm (1H) e 7,43-7,39 ppm (2H), mas não apresenta nenhuma correlação com o sinal a 7,27 ppm, deste modo foi possível atribuir este

sinal ao próton H-5 e os restantes sinais aos prótons H-4, H-6 e H-7, já que não seria de esperar uma correlação entre o carbono C-7a e o próton H-5 por este se encontrar a mais de três ligações desse carbono; a atribuição dos restantes prótons aromáticos (H-4, H-6 e H-7) foi efetuada pelo facto de o próton H-5 correlacionar, em COSY, com o duplete a 8,34 ppm que apresenta uma constante de acoplamento característica de correlações entre prótons aromáticos a três ligações correspondendo ao próton H-4, por consequência o multiplete a 7,43-7,39 ppm corresponde aos sinais dos prótons H-6 e H-7, que se encontram sobrepostos; a atribuição dos restantes carbonos quaternários (C-3a e C-3) foi determinada pela correlação em HMBC entre o sinal dos prótons H-6/H-7 com o carbono quaternário a 123,04 ppm permitindo a atribuição deste ao carbono C-3a (uma vez que o carbono C-3 se encontra a mais de três ligações desses prótons) e consequentemente o sinal a 136,88 ppm ao carbono C-3; a atribuição dos carbonos ligados aos prótons H-6 e H-7 foi conseguida pela correlação observada no espetro de HMBC entre o próton H-4 e o carbono a 126,88 ppm que permitiu atribuir este sinal ao carbono C-6 e sinal a 140,95 ppm ao carbono C-7 (uma vez que o carbono C-7 se encontra a mais de três ligações do próton H-4) (Figura 3.2).

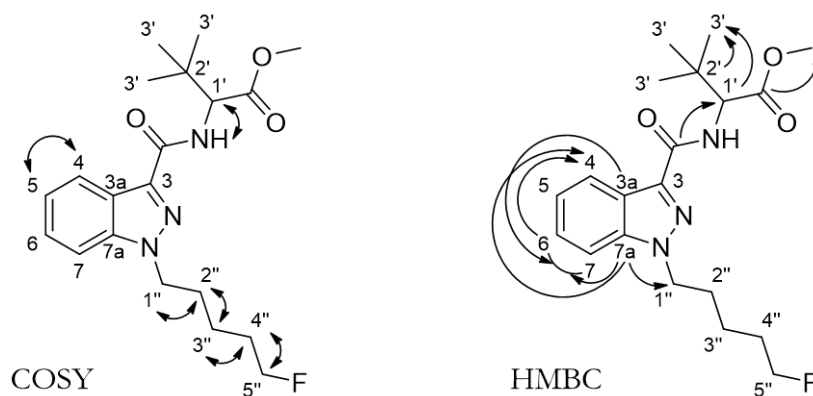


Figura 3.2. Correlações de COSY e HMBC do 5F-ADB em CDCl₃.

De modo semelhante foi efetuada a caracterização do 5F-ADB em MeOD a partir dos espetros de RMN obtidos para a Amostra 1 antes de purificada (Anexo A, Figuras 6.7-6.12). Na Tabela 3.1 apresentam-se as correlações observadas nos espetros de COSY e HMBC para cada solvente. Os valores de desvios químicos de ¹H e ¹³C e as respetivas atribuições obtidas para o 5F-ADB e apresentados nas Tabelas 3.2 e 3.3 estão de acordo com os dados da literatura (Banister, et al., 2016; Langer, et al., 2016).

O 5F-ADB é um canabinoide sintético que foi reportado ao EMCDDA em janeiro de 2015, tendo sido detetado em casos fatais reportados em 2015 e 2018 (Hasegawa, et al., 2015; Kusano, et al., 2018). Em 2018, o EMCDDA elaborou um relatório de avaliação de risco sobre este canabinoide (EMCDDA, 2018c), incluído na série de relatórios de avaliação de riscos parte integrante da abordagem de três passos delineada pelo Conselho da União Europeia em 2005. Em consequência, este canabinoide foi recentemente incluído na Convenção das Nações Unidas de 1971 sendo, por isso, uma droga controlada internacionalmente desde novembro de 2018. Em Portugal, está abrangida pelo Decreto-Lei n.º 15/93, pois faz parte da lista de substâncias da Tabela II-A anexa a este Decreto-Lei, desde fevereiro de 2019.

Tabela 3.1. Correlações de COSY e HMBC para o 5F-ADB, em CDCl₃ e em MeOD.

Posição	Amostra 1, CDCl ₃		Amostra 1, MeOD	
	COSY ^a	HMBC ^b	COSY ^a	HMBC ^b
CO ₂ CH ₃	—	1', OCH ₃	—	1', OCH ₃
CONH	—	1'	—	1'
3	—	—	—	—
3a	—	6/7	—	5, 7
4	5	—	5	6
5	4, 6/7	—	4, 6	7
6	6/7	4	5, 7	4
7	6/7	5	6	5
7a	—	4, 6/7, 1"	—	4, 6, 1"
1'	NH	3'	—	3'
2'	—	1', 3'	—	1', 3'
3'	—	1', 3'	—	1', 3'
1"	2"	2"	2"	2", 3"
2"	1", 3"	1"	1", 3"	1", 3", 4"
3"	2", 4"	1", 2", 5"	2", 4"	1", 2", 4", 5"
4"	3", 5"	—	3", 5"	2", 5"
5"	4"	—	4"	3", 4"
OCH ₃	—	—	—	—
NH	1'	—	—	—

^aProtões com correlação em COSY com os δ ¹H das posições da 1ª coluna;

^bProtões com correlação em HMBC com os δ ¹³C das posições da 1ª coluna.

Tabela 3.2. Dados de RMN ¹³C e ¹H para o 5F-ADB, em CDCl₃, e comparação com a literatura.

Posição	δ ¹³ C (multiplicidade; <i>J</i> (Hz))		δ ¹ H (integração; multiplicidade; <i>J</i> (Hz))	
	Amostra 1 (APT)	Banister <i>et al</i> , 2016	Amostra 1 ^a	Banister <i>et al</i> , 2016
CO ₂ CH ₃	172,34 (-)	172,3 (CO)	—	—
CONH	162,46 (-)	162,5 (CO)	—	—
3	136,88 (-)	137,0 (C)	—	—
3a	123,04 (-)	123,1 (C)	—	—
4	122,97 (+)	123,0 (CH)	8,34 (1H; d; 8,2)	8,35 (1H; d; 8,1)
5	122,78 (+)	122,8 (CH)	7,27 (^b)	^c
6	126,88 (+)	126,9 (CH)	7,43-7,39 (1H; m)	7,42-7,39 (1H; m)
7	109,27 (+)	109,3 (CH)	7,43-7,39 (1H; m)	7,42-7,39 (1H; m)
7a	140,95 (-)	141,0 (C)	—	—
1'	59,61 (+)	59,6 (CH)	4,73 (1H; d; 9,8)	4,73 (1H; d; 9,6)
2'	35,19 (-)	35,2 (C)	—	—
3'	26,82 (+)	26,8 (CH ₃)	1,09 (9H; s)	1,09 (9H; s)
1"	49,32 (-)	49,3 (CH ₂)	4,42 (2H; t; 7,1)	4,42 (2H; t; 7,2)
2"	29,47 (-)	29,5 (CH ₂)	2,06-1,97 (2H; m)	1,99 (2H; quint; 7,8)
3"	22,81 (d; 5,1) (-)	22,8 (d; 4,5) (CH ₂)	1,53-1,43 (2H; m)	1,48 (2H; quint; 8,1)
4"	30,04 (d, 19,6) (-)	30,3 (d; 19,5) (CH ₂)	1,89-1,68 (2H; m)	1,84-1,67 (2H; m)
5"	83,89 (d; 164,7) (-)	83,9 (d; 163,5) (CH ₂)	4,44 (2H; dt; 47,3/6,0)	4,52 (1H; t; 5,7); 4,36 (1H; t; 6,0)
OCH ₃	51,97 (+)	51,9 (CH ₂)	3,76 (3H; s)	3,76 (3H; s)
NH	—	—	7,55 (1H; d; 9,6)	7,55 (1H; d; 9,6)

^aA atribuição dos prótons aos carbonos correspondentes foi baseada no HSQC; ^bSinal sobreposto ao do solvente; ^cValor em falta na literatura.

Tabela 3.3. Dados de RMN ¹³C e ¹H para o 5F-ADB, em MeOD, e comparação com a literatura.

Posição	δ ¹³ C (multiplicidade; <i>J</i> (Hz))		δ ¹ H (integração; multiplicidade; <i>J</i> (Hz))	
	Amostra 1 (APT)	Langer <i>et al</i> , 2016	Amostra 1 ^a	Langer <i>et al</i> , 2016
CO ₂ CH ₃	173,03 (-)	173,06	—	—
CONH	164,2 (-)	164,23	—	—
3	137,29 (-)	137,34	—	—
3a	123,84 (-)	123,88	—	—
4	122,94 (+)	122,98	8,19 (1H; d; 8,2)	8,19 (dt; 8,2/1,0)
5	123,98 (+)	123,99	7,29 (1H; t; 7,6)	7,29 (ddd; 8,2/6,9/0,8)
6	128,10 (+)	128,11	7,46 (1H; t; 7,8)	7,46 (ddd; 8,6/6,9/1,1)
7	111,13 (+)	111,14	7,66 (1H; d; 8,6)	7,65 (dt; 8,6/0,9)
7a	142,42 (-)	142,46	—	—
1'	61,22 (+)	61,25	4,60 (1H; s)	4,60 (s)
2'	35,78 (-)	35,81	—	—
3'	27,03 (+)	27,05	1,09 (9H; s)	1,09 (9H; s)
1"	50,16 (-)	50,18	4,53 (2H; t; 6,9)	4,53 (2H; t; 7,0)
2"	30,40 (-)	30,42	2,01 (2H; quint; 7,4)	2,01 (2H; quint; 7,4)
3"	23,65 (d; 5,2) (-)	23,69 (d; 5,2)	1,47-1,41 (2H; m)	1,44 (2H; m)
4"	30,99 (d; 19,8) (-)	31,02 (d; 19,8)	1,80-1,66 (2H; m)	1,77-1,68 (2H; m)
5"	84,64 (d; 163,9) (-)	84,65 (d; 164,0)	4,39 (2H; dt; 47,5/6,0)	4,39 (2H; dt; 47,5/6,0)
OCH ₃	52,45 (+)	52,45	3,77 (3H; s)	3,77 (3H; s)

^aA atribuição dos prótons aos carbonos correspondentes foi baseada no HSQC

Amostra 2

A Amostra 2 foi analisada por RMN em três solventes diferentes confirmando-se que continha 3-MeO-PCP (Figura 3.3) misturado outro composto cuja estrutura não foi possível identificar.

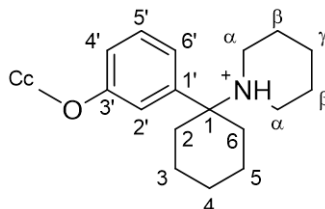


Figura 3.3. Estrutura do 3-MeO-PCP, presente na Amostra 2.

A análise dos espectros de RMN obtidos (Anexo B, da Figura 6.13 à 6.19 em DMSO-*d*₆, da Figura 6.20 à 6.26 em MeOD e da Figura 6.27 à 6.33 em CDCl₃) permitiu realizar a caracterização completa do composto, apresentando-se de seguida as atribuições em DMSO-*d*₆, a título de exemplo.

Inicialmente, efetuou-se a análise do espectro de HSQC-TOCSY de modo a identificar os prótons que pertenciam ao sistema de spins de cada anel presente na estrutura do 3-MeO-PCP: as correlações entre o sinal de carbono do grupo metilénico com desvio químico de 46,94 ppm e os sinais de próton (δ 3,68-3,61; 2,18-2,07; 2,07-1,94; 1,74-1,61; 1,60-1,52; 1,20-1,10 e 10,47) permitiram identificar os sinais pertencentes ao anel de piridina, em virtude de se ter verificado uma correlação desse carbono com um multipeto com desvio químico de 10,47 ppm (atribuível ao próton do NH por não apresentar correlações no espectro de HSQC); as correlações entre o carbono do grupo metilénico com desvio químico de 29,93 ppm e os sinais de próton (δ 3,00-2,92; 2,18-2,07; 1,74-1,61; 1,06-0,93; 1,52-1,43; 1,20-1,10) permitiram identificar o anel de ciclohexano (Figura 3.4).

De seguida, foi possível identificar os sinais correspondentes aos restantes grupos metilénicos do anel de piridina: a correlação em HQSC entre o sinal de carbono a 21,84 ppm e os sinais de próton a 1,60-1,52 ppm (1H, m) e 1,20-1,10 ppm (1H, m) permitiu atribuí-los ao carbono e prótons da posição γ , uma vez que este carbono é o único deste anel que correlaciona com sinais de próton a integrar apenas para 2H; a correlação em COSY entre o sinal do próton atribuído ao NH e os sinais a 3,68-3,61 ppm (2H) e 2,18-2,07 ppm (2H) possibilita a sua atribuição aos prótons H- α , identificando-se consequentemente os sinais dos prótons H- β (2,07-1,94 ppm (2H) e 1,74-1,61 ppm (2H)) (Figura 3.4).

Posteriormente, foi possível identificar os sinais correspondentes ao anel de ciclohexano: o sinal de um carbono quaternário a 70,20 ppm atribuível ao carbono C-1, por ser o único carbono quaternário não aromático; no espectro de HQSC foi possível observar correlações entre o sinal de carbono a 24,55 ppm e os sinais de próton a 1,52-1,43 ppm (1H, m) e 1,20-1,10 ppm (1H, m) permitindo atribuí-los ao carbono e prótons da posição 4, uma vez que este carbono é o único deste anel que correlaciona com sinais de próton a integrar apenas para 2H; a correlação em COSY entre os sinais dos prótons H-4 e os sinais a 1,74-1,61 ppm (2H) e 1,06-0,93 ppm (2H) possibilita a sua atribuição aos prótons H-3/5, identificando-se consequentemente os sinais dos prótons H-2/6 (3,00-2,92 ppm (2H) e 2,18-2,07 ppm (2H)) (Figura 3.4).

Por fim, foi possível identificar os sinais correspondes ao anel aromático: o singuleto a 3,80 ppm que integra para 3H, característico do metilo do grupo metoxilo; o tripleto a 7,43 ppm (1H) e o singuleto a 7,15 ppm (1H) característicos de prótons aromáticos e atribuíveis aos prótons H-5' e H-2' devido á sua multiplicidade, respetivamente; no espectro de HMBC foi possível verificar uma correlação entre o sinal de próton do grupo metoxilo e o sinal de um carbono quaternário a 172,34 ppm que permitiu atribuir este último ao carbono C-3' (identificando-se por consequência o sinal do restante carbono quaternário C-1' a 132,34 ppm); as correlações em HMBC entre o sinal do carbono C-3' com um duplete a 7,06 ppm e entre o sinal do carbono C-1 com um duplete a 7,18 ppm possibilitaram a identificação dos prótons H-4' e H-6', respetivamente (Figura 3.4).

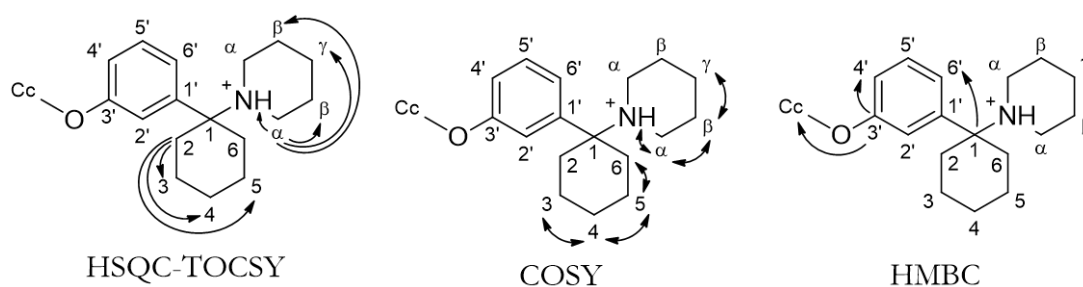


Figura 3.4. Correlações de HSQC-TOCSY, COSY e HMBC do 3-MeO-PCP em DMSO-*d*₆.

De modo semelhante foi efetuada a caracterização do 3-MeO-PCP em MeOD e CDCl₃. Na Tabela 3.4 apresentam-se as correlações observadas nos espectros de HSQC-TOCSY, COSY e HMBC para cada solvente. Os valores de desvios químicos de ¹H e ¹³C e as respetivas atribuições obtidas para o 3-MeO-PCP e apresentados nas Tabelas 3.5-3.7 estão de acordo com os dados da literatura (De Paoli, et al., 2013; Response, 2015; Wallach, et al., 2014).

O 3-MeO-PCP é um derivado de fenciclidina que foi reportado ao EMCDDA em março de 2012, tendo sido detetado num caso de intoxicação fatal reportado em 2016 (Bakota, et al., 2016). Atualmente, este composto encontra-se incluído no Decreto-Lei n.º 54/2013, de 17 de abril, uma vez que é um isómero do 4-MeO-PCP que se encontra na lista de substâncias presente na Portaria n.º 154/2013, de 17 de abril e que segundo o Artigo 3º do Decreto-Lei este também abrange derivados, isómeros e sais das substâncias incluídas nessa lista.

Tabela 3.4. Correlações de HSQC-TOCSY, COSY e HMBC para o 3-MeO-PCP em cada solvente.

Posição	Amostra 2, DMSO- <i>d</i> ₆			Amostra 2, MeOD		
	HSQC-TOCSY ^a	COSY ^b	HMBC ^c	HSQC-TOCSY ^a	COSY ^b	HMBC ^c
1	————	————	2/6, 2', 6'	————	————	2/6, 3/5, 2', 6'
2/6	2/6, 3/5, 4	2/6, 3/5	2/6, 4	2/6, 3/5, 4	2/6, 3/5	2/6, 3/5, 4
3/5	2/6, 3/5, 4	2/6, 3/5, 4	3/5	2/6, 3/5, 4	2/6, 3/5, 4	2/6, 4
4	2/6, 3/5, 4	3/5, 4	2/6, 3/5, 4	2/6, 3/5, 4	3/5, 4	2/6, 3/5
1'	————	————	2/6, 2', 4', 5', 6'	————	————	2/6, 5'
2'	2', 4', 5', 6'	————	4', 5', 6'	2', 4', 5', 6'	4', 6'	4', 6'
3'	————	————	2', 4', 5', Cc	————	————	2', 5' Cc
4'	2', 4', 5', 6'	5'	5', 6'	2', 4', 5', 6'	5'	2', 5', 6'
5'	2', 4', 5', 6'	4', 6'	————	2', 4', 5', 6'	4', 6'	————
6'	2', 4', 5'	5'	2', 4', 5'	2', 4', 5', 6'	5'	2', 4', 5'
α	NH, α, β, γ	NH, α, β	α, γ	α, β, γ	α, β	α, β, γ
β	NH, α, β, γ	α, β, γ	α, β	α, β, γ	α, γ	α
γ	α, β, γ	β, γ	α, β, γ	α, β, γ	β, γ	α, β
Cc	Cc	————	————	Cc	————	————
NH	————	α	————	————	————	————

Posição	Amostra 2, CDCl ₃		
	HSQC-TOCSY ^a	COSY ^b	HMBC ^c
1	————	————	2/6, 6'
2/6	2/6, 3/5, 4	2/6, 3/5	2/6
3/5	2/6, 3/5, 4	2/6, 3/5, 4	2/6, 3/5
4	2/6, 3/5, 4	3/5	3/5, 4
1'	————	————	2/6, 2', 4', 5', 6'
2'	2', 4', 5', 6'	————	4', 5', 6'
3'	————	————	2', 5', Cc
4'	2', 4', 5', 6'	5'	5', 6'
5'	2', 4', 5', 6'	4', 6'	————
6'	2', 4', 5', 6'	5'	4', 5'
α	NH, α, β, γ	NH, α, β	α, β
β	NH, α, β, γ	α, β, γ	β, γ
γ	α, β, γ	β	α
Cc	Cc	————	————
NH	————	α	————

^aProtões com correlação em COSY com os δ ¹H das posições da 1ª coluna; ^bProtões com correlação em HSQC-TOCSY com os δ ¹³C das posições da 1ª coluna; ^cProtões com correlação em HMBC com os δ ¹³C das posições da 1ª coluna.

Tabela 3.5. Dados de RMN ¹³C e ¹H para o 3-MeO-PCP, em DMSO-*d*₆, e comparação com a literatura.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$			$\delta^1\text{H}$ (integração; multiplicidade; <i>J</i> (Hz))	
	Amostra 2 (APT)	Response, 2015	Wallach <i>et al</i> , 2014	Amostra 2 ^a	Wallach <i>et al</i> , 2014
1	70,20 (-)	70,67	70,67	————	————
2/6	29,93 (-)	30,41	30,38	3,00-2,92 (2H; m); 2,18-2,07 (2H; m)	2,95 (2H; d; 11,6); 2,20-2,05 (2H; m)
3/5	22,50 ^b (-)	22,96	22,95	1,74-1,61 (2H; m); 1,06-0,93 (2H; m) ^b	1,68 (2H; t; 13,2); 1,01 (2H; quart; 13,0)
4	24,55 (-)	25,01	24,99	1,52-1,43 (1H; m); 1,20-1,10 (1H; m)	1,47 (1H; d; 12,3); 1,22-1,08 (1H; m)
1'	132,34 (-)	132,80	132,81	————	————
2'	116,34 (+)	116,80	116,75	7,15 (1H; s)	7,16 (1H; brs)
3'	159,64 (-)	160,11	160,08	————	————
4'	114,02 (+)	114,48	114,48	7,06 (1H; dd; 8,2/2,1)	7,06 (1H; dd; 8,2/1,9)
5'	129,87 (+)	130,33	130,30	7,43 (1H; t; 8,0)	7,43 (1H; t; 8,0)
6'	121,91 (+)	122,36	122,35	7,18 (1H; d; 8,0)	7,18 (1H; d; 8,2)
α	46,94 (-)	47,41	47,39	3,68-3,61 (2H; m); 2,18-2,07 (2H; m)	3,65 (2H; d; 9,7); 2,20-2,08 (2H; m)
β	22,53 ^c (-)	23,01	22,95	2,07-1,94 (2H; m); 1,74-1,61 (2H; m) ^c	2,03 (2H; quart; 13,0); 1,68 (2H; t; 13,2)
γ	21,84 (-)	22,29	22,32	1,60-1,52 (1H; m); 1,20-1,10 (1H; m)	1,57 (1H; d; 12,7); 1,22-1,08 (1H; m)
Cc	55,30 (+)	55,75	55,76	3,80 (3H; s)	3,81 (3H; s)
NH	————	————	————	10,47 (1H; m)	————

^aA atribuição dos prótons aos carbonos correspondentes foi baseada no HSQC; ^b, ^cAs atribuições ao par de sinais b e c poderão estar trocadas.

Tabela 3.6. Dados de RMN ¹³C e ¹H para o 3-MeO-PCP, em MeOD, e comparação com a literatura.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^1\text{H}$ (integração; multiplicidade; <i>J</i> (Hz))	
	Amostra 2 (APT)	Georgia <i>et al</i> , 2013	Amostra 2 ^a	Georgia <i>et al</i> , 2013
1	72,78 (-)	72,7 (C)	————	————
2/6	32,36 (-)	32,5 (CH ₂)	3,04-2,97 (2H; m); 1,98-1,92 (2H; m)	3,02-2,97 (2H; m); 1,94-1,59 (2H; m)
3/5	24,04 (-)	24,1 (CH ₂)	1,83-1,80 (2H; m); 1,26-1,19 (2H; m)	1,94-1,59 (2H; m); 1,42-1,15 (2H; m)
4	26,04 (-)	26,1 (CH ₂)	1,61-1,57 (1H; m); 1,37-1,31 (1H; m)	1,42-1,15 (2H; m)
1'	133,39 (-)	133,5 (C)	————	————
2'	117,42 (+)	117,4 (CH)	7,17 (1H; t; 2,1)	7,16 (1H; t; 2,1)
3'	161,93 (-)	161,9 (C)	————	————
4'	115,60 (+)	115,6 (CH)	7,10 (1H; dd; 8,2/2,3)	7,09 (1H; ddd; 8,3/2,4/0,8)
5'	131,48 (+)	131,5 (CH)	7,49 (1H; t; 8,0)	7,48 (1H; t; 8,2)
6'	122,91 (+)	122,9 (CH)	7,22 (1H; d; 7,9)	7,21 (1H; ddd; 8,0/1,9/0,8)
α	48,97 (-)	^b	3,76-3,69 (2H; m); 2,45-2,37 (2H; m)	3,73-3,69 (2H; m); 2,46-2,38 (2H; m)
β	24,70 (-)	24,8 (CH ₂)	1,89-1,84 (4H; m)	1,94-1,59 (4H; m)
γ	23,12 (-)	23,2 (CH ₂)	1,76-1,68 (2H; m)	1,94-1,59 (2H; m)
Cc	55,99 (+)	56,0 (OCH ₃)	3,86 (3H; s)	3,86 (3H; s)

^aA atribuição dos prótons aos carbonos correspondentes foi baseada no HSQC; ^bValor em falta na literatura.

Tabela 3.7. Dados de RMN ^{13}C e ^1H para o 3-MeO-PCP, em CDCl_3 , e comparação com a literatura.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^1\text{H}$ (integração; multiplicidade; J (Hz))	
	Amostra 2 (APT)	Wallach <i>et al</i> , 2014	Amostra 2 ^a	Wallach <i>et al</i> , 2014
1	71,07 (-)	70,95	————	————
2/6	30,83 (-)	30,70	2,79-2,72 (2H; m); 2,58-2,48 (2H; m)	2,79 (2H; d; 11,6); 2,62 (2H; td; 13,2/2,6)
3/5	22,87 (-)	22,81	1,77-1,70 (2H; m); 1,18-1,08 (2H; m)	1,87-1,68 (2H; m); 1,24-1,03 (2H; m)
4	24,59 (-)	24,50	1,53-1,45 (1H; m); 1,41-1,34 (1H; m)	1,60-1,53 (1H; m); 1,44 (1H; qt; 13,0/4,0)
1'	132,29 (-)	132,36	————	————
2'	116,82 (+)	116,79	7,00 (1H; m)	7,07-7,03 (1H; m)
3'	160,19 (-)	160,15	————	————
4'	113,54 (+)	113,45	6,95 (1H; dd; 8,2/1,8)	7,00 (1H; dd; 8,2/2,2)
5'	130,21 (+)	130,09	7,39 (1H; t; 8,0)	7,44 (1H; t; 8,0)
6'	121,66 (+)	121,59	7,03 (1H; d; 8,0)	7,07 (1H; d; 8,0)
α	47,31 (-)	47,20	3,71-3,63 (2H; m); 2,20-2,07 (2H; m)	3,70 (2H; d; 11,4); 2,17 (2H; quart; 11,6)
β	23,02 (-)	22,92	2,48-2,39 (2H; m); 1,77-1,70 (2H; m)	2,60-2,45 (2H; m); 1,87-1,68 (2H; m)
γ	22,56 (-)	22,53	1,12-0,97 (2H; m)	1,87-1,68 (1H; m); 1,24-1,03 (1H; m)
Cc	55,58 (+)	55,50	3,83 (3H; s)	3,88 (3H; s)
NH	————	————	11,10 (1H; brs)	————

^aA atribuição dos prótons aos carbonos correspondentes foi baseada no HSQC

Em conclusão, a caracterização efetuada por RMN permitiu confirmar a identificação obtida por GC-MS, tendo-se detetado o canabinoide sintético 5F-ADB e o derivado de fenciclidina 3-MeO-PCP, duas substâncias psicoativas controladas em Portugal e com efeitos tóxicos letais.

3.2. Síntese de Catinonas

A síntese das catinonas consistiu num processo composto por três passos: formação da cetona, purificada por cromatografia em coluna, formação da respetiva α -bromocetona, utilizada sem purificação prévia e formação da catinona pretendida na forma de cloridrato, como referido anteriormente e apresentado na Figura 2.1.

Síntese das Cetonas

A primeira etapa da síntese das catinonas consistiu na formação de cetonas por adição de um reagente de Grignard ao *p*-tolunitrilo. Esta reação tem por base a adição nucleofílica do

carbono nucleofílico do reagente de Grignard ao carbono eletrofílico do grupo nitrilo formando-se um intermediário que corresponde ao anião de uma imina (Figura 3.5) (Bruice, 2016; Clayden, et al., 2012). De seguida é adicionada água que provoca a quebra do complexo formado anteriormente, obtendo-se a imina (Figura 3.6) (Bruice, 2016), sendo depois adicionado ácido para ocorrer a hidrólise da mesma. O ácido adicionado irá protonar o átomo de azoto da imina o que aumenta a suscetibilidade desta a adição nucleofílica, facilitando o ataque do nucleófilo (água), que posteriormente é desprotonado. De seguida ocorre reprotonação, sendo que esta, apesar de poder ocorrer de novo no átomo de oxigénio ou no átomo de azoto, ocorre preferencialmente no átomo de azoto uma vez que o grupo $-NH_2$ é uma base mais forte que o grupo $-OH$. Por fim, dá-se a saída do grupo NH_3 , libertado na forma gasosa, e a consequente desprotonação do grupo carbonilo obtendo-se a cetona final (Figura 3.6) (Bruice, 2016; Clayden, et al., 2012).

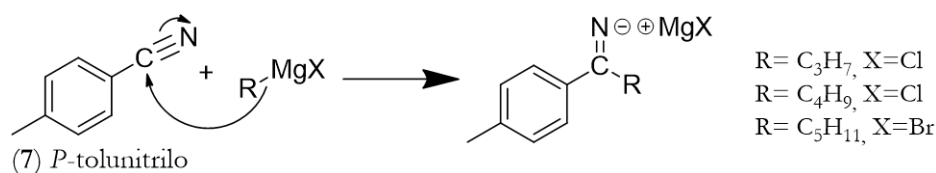


Figura 3.5. Mecanismo da adição de reagente de Grignard.

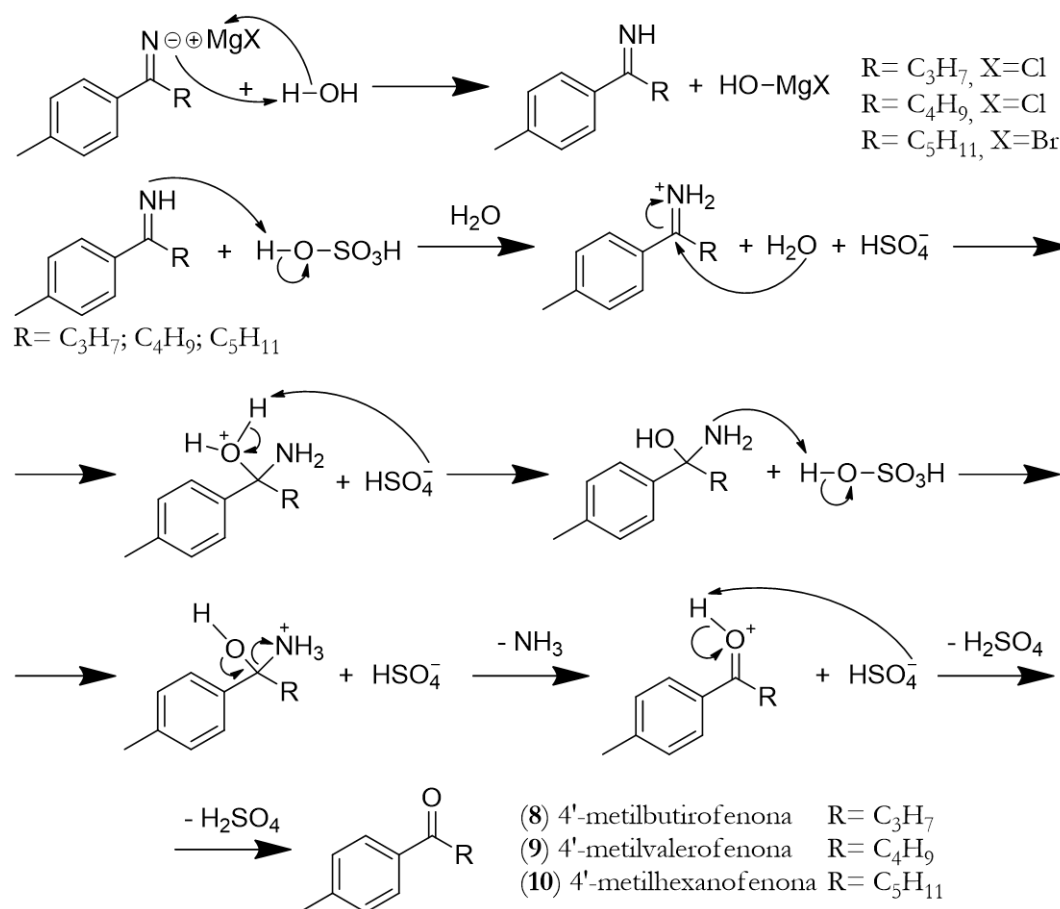


Figura 3.6. Mecanismo da formação das cetonas aquando da adição de água e H₂SO₄.

Após o isolamento dos produtos da reação, foi necessário confirmar a formação da cetona desejada através da realização de um espectro de RMN ^1H , em CDCl_3 . Através da comparação dos espectros de RMN ^1H do *p*-tolunitrilo e das cetonas sintetizadas (Figura 3.7) verificou-se um aumento dos desvios químicos correspondentes aos prótons *orto* (relativamente ao grupo cetona) do anel aromático das cetonas, relativamente aos do *p*-tolunitrilo e o surgimento de sinais correspondentes aos prótons da cadeia alquílica das cetonas obtidas. A análise dos espectros realizados permitiu ainda constatar a presença de *p*-tolunitrilo que não reagiu completamente, o que comprovou a necessidade de proceder à purificação das cetonas sintetizadas.

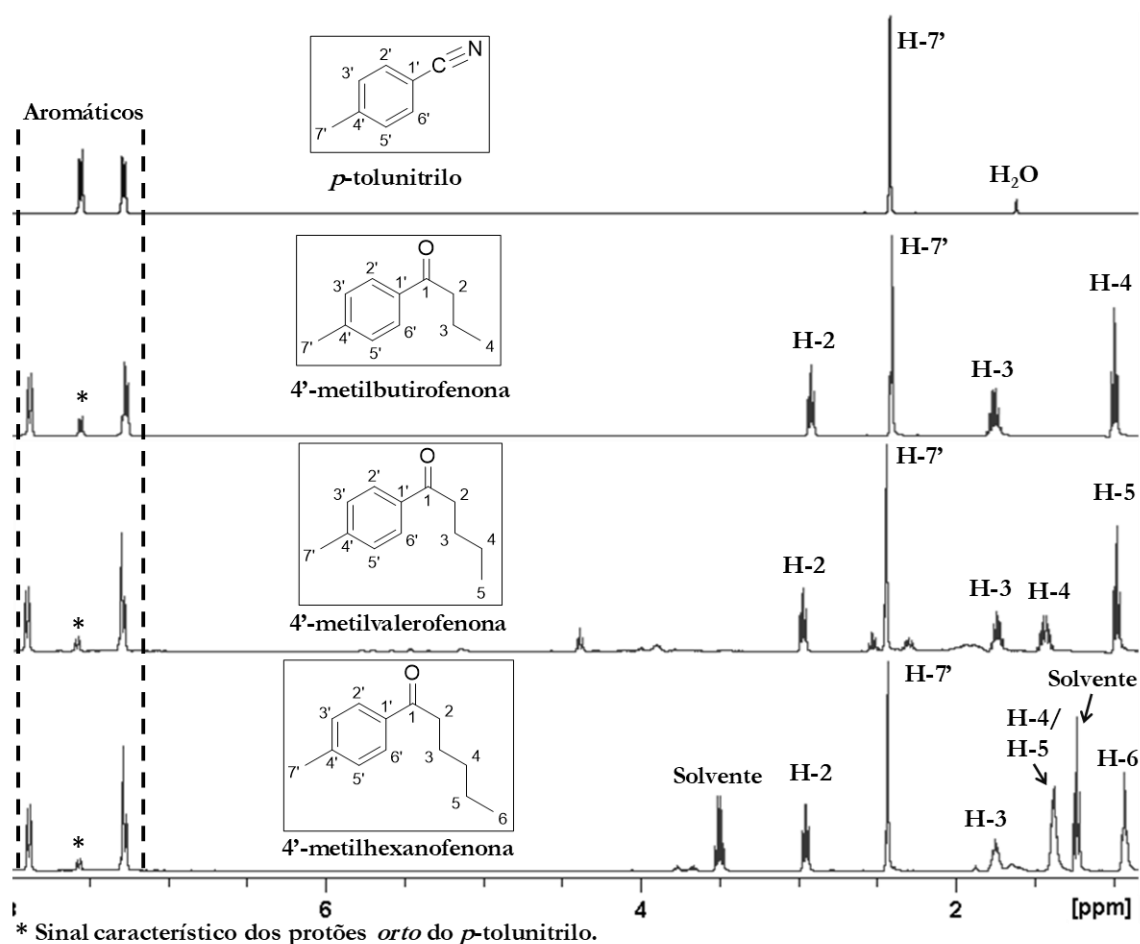


Figura 3.7. Comparação dos espectros de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) do *p*-tolunitrilo e das cetonas sintetizadas antes de serem purificadas.

Por forma a obter cetonas puras recorreu-se à técnica de cromatografia em coluna, tendo-se realizado espectros de RMN ^1H de modo a confirmar a pureza das diferentes frações recolhidas. Através da análise dos espectros obtidos (Figura 3.8) constatou-se o

desaparecimento dos sinais correspondentes aos prótons *orto* do *p*-tolunitrilo, existindo apenas sinais correspondentes aos diferentes prótons das cetonas sintetizadas.

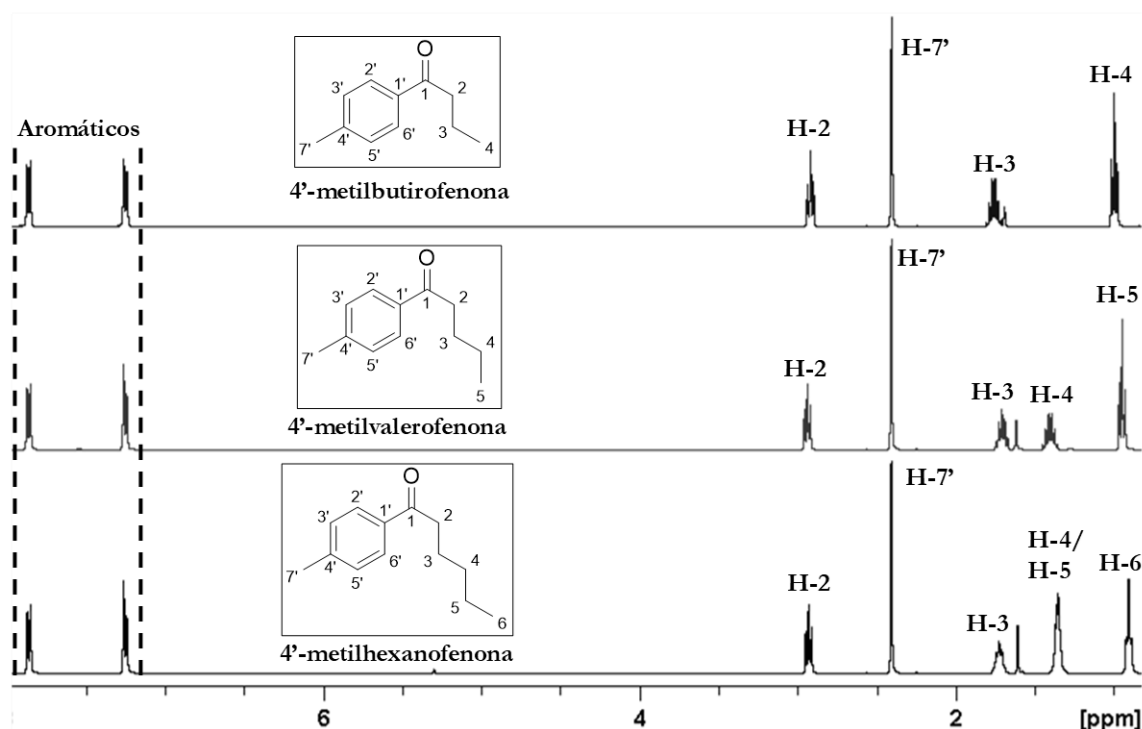


Figura 3.8. Comparação dos espectros de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) das cetonas sintetizadas após purificação.

Na Tabela 3.8 apresentam-se os desvios químicos de todos os sinais de RMN ^1H , em CDCl_3 , para o *p*-tolunitrilo e para as cetonas sintetizadas. O desvio químico correspondente aos prótons *orto* do *p*-tolunitrilo (H-2'/H-6'), encontra-se a 7,54 ppm, enquanto nas cetonas encontra-se a 7,86 ppm, em contrapartida os desvios químicos dos restantes prótons aromáticos (H-3'/H-5'), bem como do grupo metilo (H-7') quase não sofrem alteração. O desvio químico correspondente aos prótons α das cetonas surge compreendido entre 2,94-2,92 ppm, o dos prótons H-3 entre 1,76-1,71 ppm, o dos prótons H-4 do composto **9** e H-4/H-5 do composto **10** entre 1,40-1,31 ppm e por fim o dos prótons do grupo metilo terminal entre 1,00-0,91 ppm.

Tabela 3.8. Comparação dos dados de RMN ^1H , em CDCl_3 , do *p*-tolunitrilo e das cetonas sintetizadas.

Composto	Atribuição						H-2'/ H-6'	H-3'/ H-5'	H-7'
	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6			
<i>P</i> -tolunitrilo (7)	—	—	—	—	—	—	7,54	7,26	2,42
4'-Metilbutirofenona (8)	2,92	1,76	1,00	—	—	—	7,86	7,25	2,40
4'-Metilvalerofenona (9)	2,94	1,71	1,40	0,95	—	—	7,86	7,25	2,40
4'-Metilhexanofenona (10)	2,93	1,73	1,40-1,31	1,40-1,31	0,91	—	7,86	7,25	2,41

Os espectros de RMN e os respectivos dados correspondentes à caracterização do *p*-tolunitrilo e de cada cetona sintetizada apresentam-se no Anexo C (Figuras 6.34-6.57 e Tabelas 6.1-6.4) e na secção ‘Síntese das Cetonas’ do subcapítulo 2.4.

Síntese das α -Bromocetonas

Após o processo de purificação, as cetonas sintetizadas foram utilizadas na formação das bromocetonas por adição de bromo molecular em meio ácido. A α -halogenação das cetonas inicia-se pela formação de um enol, catalisada pela presença de ácido, ocorrendo a protonação do oxigénio do carbonilo seguida da perda de um hidrogénio α e conseqüente obtenção do enol. De seguida, dá-se o ataque do carbono nucleofílico do enol ao eletrófilo (bromo molecular), formando-se uma mistura racémica, uma vez que este ataque pode ocorrer em qualquer dos lados da ligação dupla plana. Por fim, o ácido catalisador é regenerado aquando da desprotonação do grupo carbonilo, obtendo-se a bromocetona desejada (Figura 3.9) (Clayden, et al., 2012).

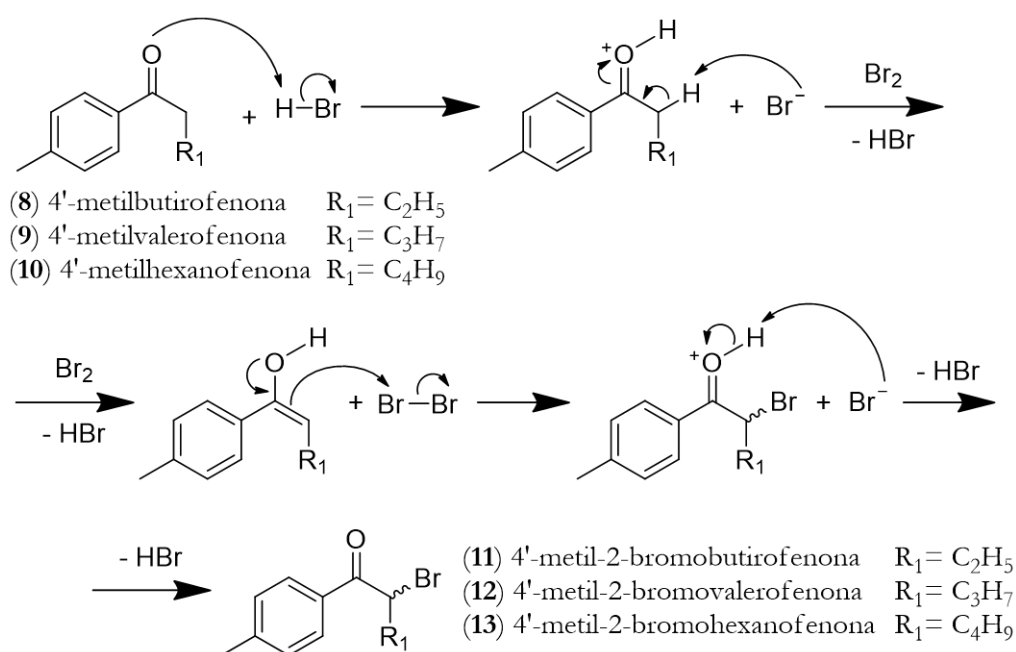
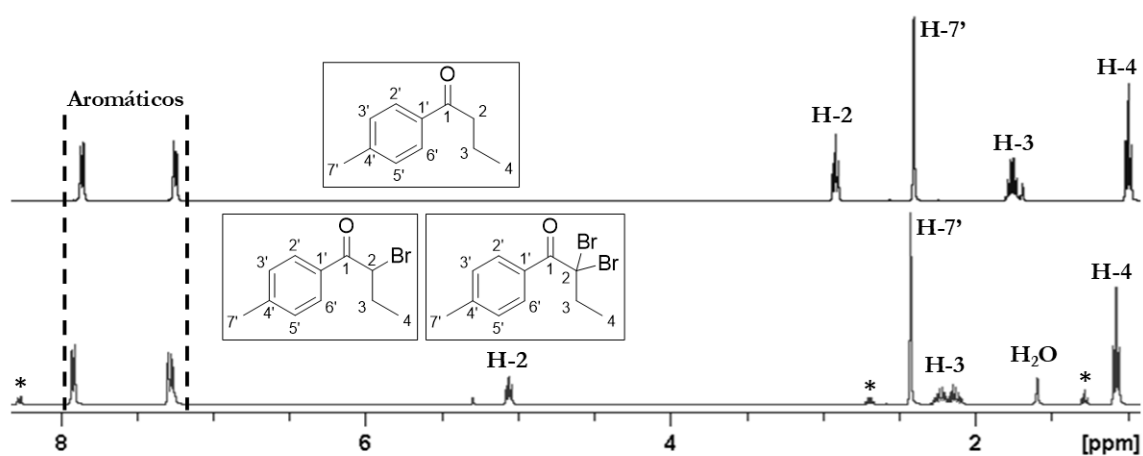


Figura 3.9. Mecanismo da formação das bromocetonas.

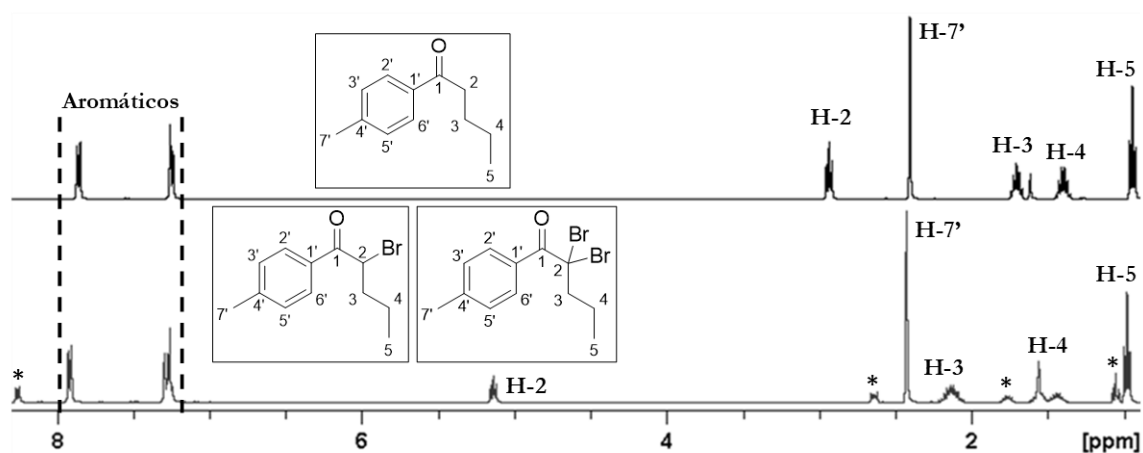
A mistura reacional obtida não sofreu qualquer processo de purificação, sendo apenas necessário confirmar a formação da bromocetona desejada através da realização de um espectro de RMN 1H , em $CDCl_3$. Através da comparação dos espectros de RMN 1H das cetonas puras

e respectivas bromocetonas (Figuras 3.10-3.12) verificou-se um aumento dos desvios químicos correspondentes aos prótons da cadeia alquílica das bromocetonas, devido ao efeito desblindante do átomo de bromo na posição α . A intensidade deste efeito diminui com o aumento da distância ao átomo de bromo, pelo que o aumento nos desvios químicos é maior para os prótons α e progressivamente menor para os restantes prótons da cadeia alquílica. A análise dos espectros obtidos permitiu ainda constatar a formação da respetiva dibromocetona pela presença de sinais correspondentes a estes compostos (em especial o do grupo metilénico vicinal ao carbono dibromado, a 2,70-2,60 ppm), no entanto, a presença desta não afetou a restante síntese.



* Sinais de dibromocetona.

Figura 3.10. Comparação dos espectros de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) da 4'-metilbutirofenona (8) e respetiva α -bromocetona.



* Sinais de dibromocetona.

Figura 3.11. Comparação dos espectros de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) da 4'-metilvalerofenona (9) e respetiva α -bromocetona.

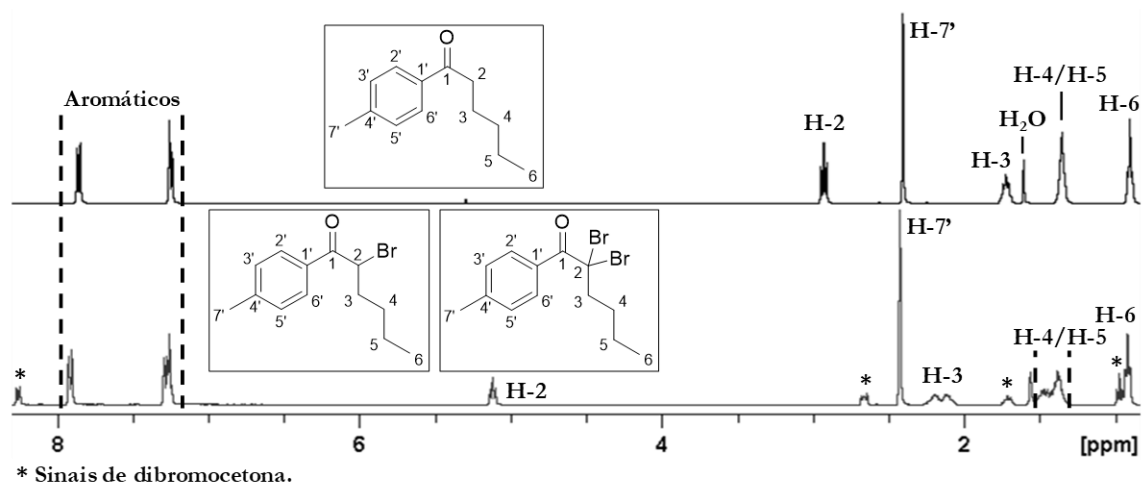


Figura 3.12. Comparação dos espectros de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) da 4'-metilhexanofenona (**10**) e respetiva α -bromocetona.

Na Tabela 3.9 apresentam-se os desvios químicos de todos os sinais de RMN ^1H , em CDCl_3 , para as cetonas e bromocetonas sintetizadas. O desvio químico correspondente aos prótons α das cetonas (H-2), encontra-se compreendido entre 2,94-2,92 ppm e integra para 2, enquanto nas bromocetonas encontra-se compreendido entre 5,14-5,06 ppm e integra para 1. O aumento de desvio químico verificado bem como a diminuição da integração dos sinais dos prótons H-2 nas bromocetonas, confirma a substituição de um hidrogénio α pelo bromo. Adicionalmente, importa realçar que os prótons H-3 do composto **11** e **13** são diastereotópicos, bem como os prótons H-4 do composto **12**, ao contrário do sucedido para as respetivas cetonas de partida.

Tabela 3.9. Comparação dos dados de RMN ^1H , em CDCl_3 , das cetonas e bromocetonas sintetizadas.

Composto	Atribuição							
	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-2'/H-6'	H-3'/H-5'	H-7'
4'-Metilbutirofenona (8)	2,92	1,76	1,00	—	—	7,86	7,25	2,40
4'-Metil-2-bromobutirofenona (11)	5,06	2,30-2,07	1,08	—	—	7,92	7,29	2,43
4'-Metilvalerofenona (9)	2,94	1,71	1,40	0,95	—	7,86	7,25	2,40
4'-Metil-2-bromovalerofenona (12)	5,14	2,23-2,04	1,64-1,36	0,97	—	7,92	7,29	2,43
4'-Metilhexanofenona (10)	2,93	1,73	1,40-1,31	1,40-1,31	0,91	7,86	7,25	2,41
4'-Metil-2-bromohexanofenona (13)	5,12	2,28-2,04	1,53-1,30	1,53-1,30	0,91	7,92	7,29	2,43

Os espectros de RMN e os respectivos dados correspondentes à caracterização de cada bromocetona sintetizada apresentam-se no Anexo D (Figuras 6.58-6.75 e Tabelas 6.5-6.7) e na secção ‘Síntese das α -Bromocetonas’ do subcapítulo 2.4.

Síntese das Catinonas

Após a síntese das bromocetonas a mistura reacional foi utilizada, sem qualquer purificação, na formação das catinonas por adição da amina desejada segundo uma reação de substituição nucleofílica do tipo S_N2 . Este tipo de reação ocorre num único passo dando-se o ataque do nucleófilo (amina) ao mesmo tempo que o grupo rejeitado (Br) sai (Figura 3.13) (Clayden, et al., 2012). Se a reação ocorrer num carbono quiral dá-se inversão de configuração, uma vez que o ataque do nucleófilo ocorre do lado oposto do grupo de saída (Clayden, et al., 2012); no caso da síntese realizada obteve-se uma mistura racémica, uma vez que a mistura reacional proveniente da formação das bromocetonas já era ela própria uma mistura racémica. Finalmente, foi adicionado ácido clorídrico em solução etérea por forma a serem sintetizadas catinonas na forma de cloridrato (Figura 3.13).

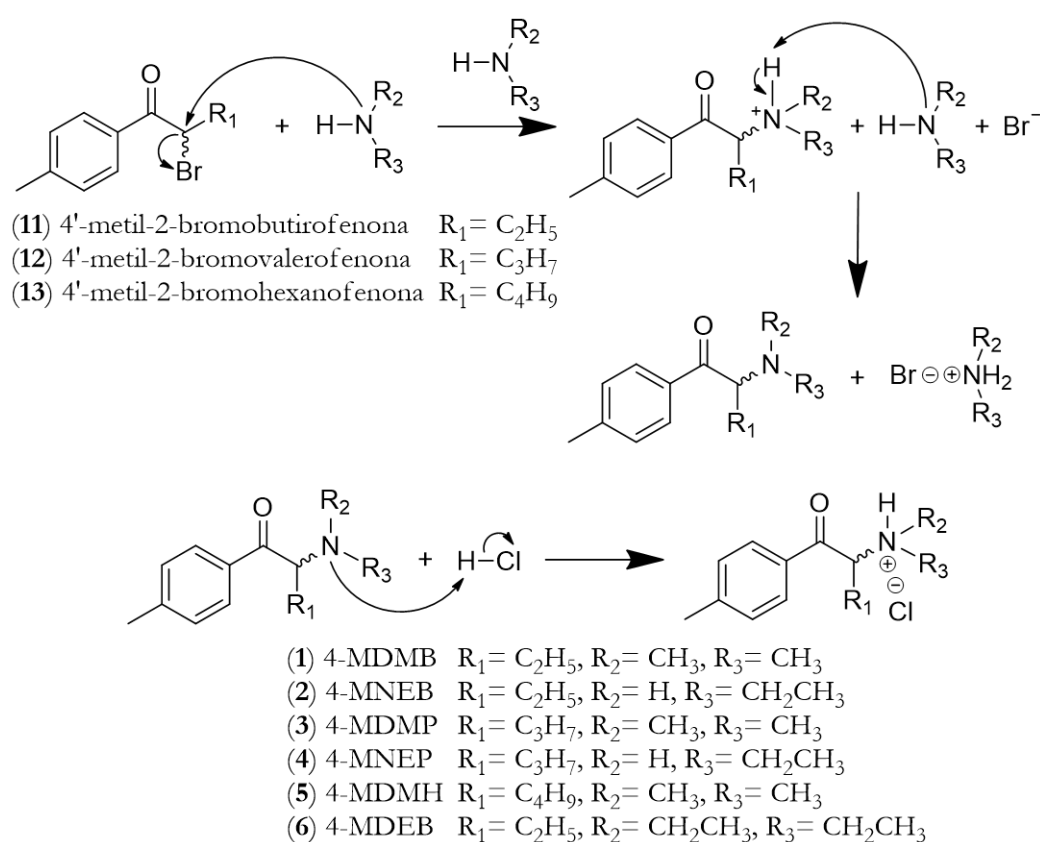


Figura 3.13. Mecanismo de formação das catinonas na forma de cloridrato.

Após a lavagem e cristalização do produto obtido pela adição de ácido clorídrico em solução etérea foi necessário confirmar a formação da catinona desejada através da realização de um espectro de RMN ^1H , em CDCl_3 . Através da comparação dos espectros de RMN ^1H das bromocetonas e catinonas sintetizadas (Figuras 3.14-3.16) verificou-se o surgimento de sinais adicionais nos espectros das catinonas, sendo que os sinais de maior desvio químico corresponderão aos prótons diretamente ligados ao átomo de azoto (NH) e os sinais de menor desvio químico corresponderão aos prótons dos grupos ligados ao átomo de azoto (H-1'', H-2'', H-3'' e H-4'').

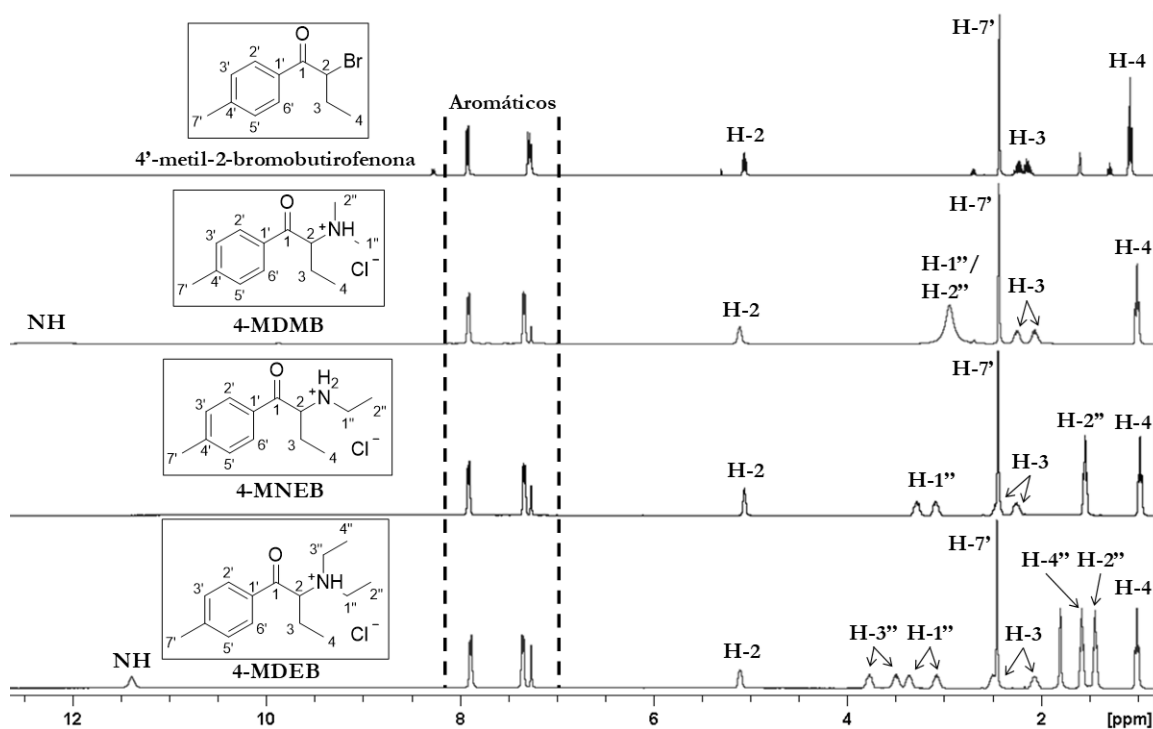


Figura 3.14. Comparação dos espectros de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) da 4'-metil-2-bromobutyrofenona (11) e das correspondentes catinonas sintetizadas: 4-MDMB (1), 4-MNEB (2) e 4-MDEB (6).

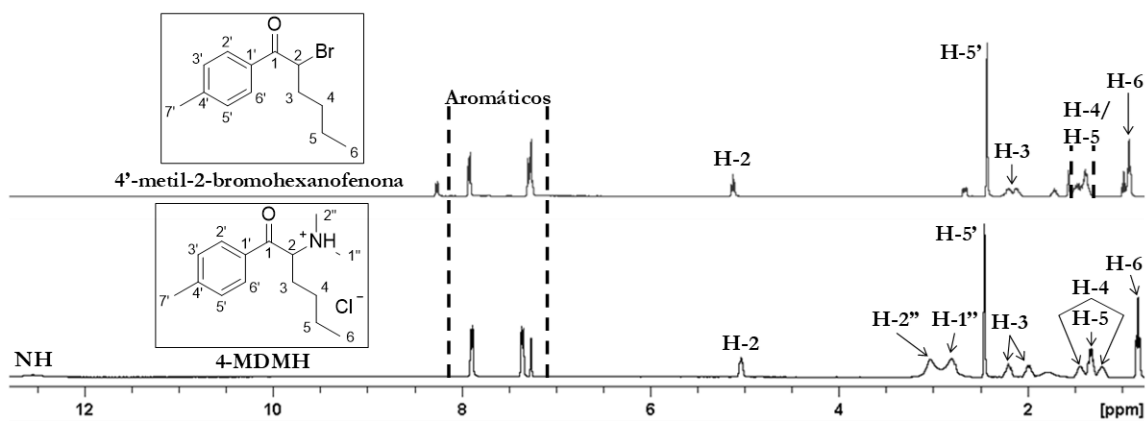


Figura 3.15. Comparação dos espectros de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) da 4'-metil-2-bromovalerofenona (**12**) e das correspondentes cationas sintetizadas: 4-MDMP (**3**) e 4-MNEP (**4**).

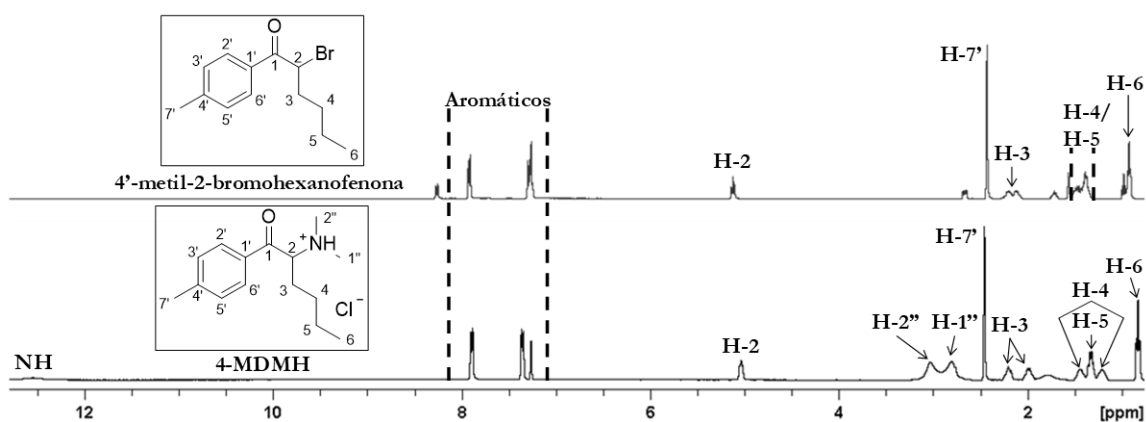


Figura 3.16. Comparação dos espectros de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) da 4'-metil-2-bromohexanofenona (**13**) e da correspondente cationa sintetizada: 4-MDMH (**5**).

Na Tabela 3.10 apresenta-se um resumo da quantidade obtida de cada cationa sintetizada, bem como o rendimento global da síntese da mesma.

Tabela 3.10. Resumo da quantidade obtida e rendimento global da síntese de cada cationa

Cationa	Quantidade	Rendimento Global
4-MDMB (1)	349,0 mg	7%
4-MNEB (2)	927,6 mg	18%
4-MDMP (3)	654,4 mg	13%
4-MNEP (4)	1,0476 g	21%
4-MDMH (5)	1,3450 g	27%
4-MDEB (6)	793,9 mg	14%

Após a síntese de todas as cationas procedeu-se à caracterização completa das mesmas, assim como à atribuição inequívoca de todos os sinais dos espectros de ^1H e ^{13}C . Para tal, recorreu-se primeiramente a espectros de RMN ^1H e de COSY por forma a efetuar a

atribuição de todos os sinais de próton dos compostos de partida, tendo-se de seguida, por comparação, procedido à atribuição de todos os sinais de próton das catinonas sintetizadas.

Esta atribuição iniciou-se pela identificação dos sinais da zona aromática das catinonas, por comparação com os sinais da mesma zona nas respetivas bromocetonas (Tabela 3.11). Os sinais correspondentes aos prótons aromáticos das catinonas apresentam-se como dois dubletos com desvios químicos compreendidos entre 7,91-7,88 ppm (H-2'/H-6') e 7,35-7,33 ppm (H-3'/H-5'), cada um a integrar para 2H, à semelhança dos respetivos sinais nas bromocetonas que se apresentam como dois dubletos, a 7,92 ppm (H-2'/H-6') e 7,29 ppm (H-3'/H-5'), cada um a integrar para 2H. Além destes é ainda possível identificar o sinal correspondente ao grupo metilo do anel aromático como um singuleto com desvios químicos compreendidos entre 2,45-2,43 ppm, a integrar para 3H, à semelhança do respetivo sinal nas bromocetonas que se apresenta como um singuleto a 2,43 ppm, a integrar para 3H.

Tabela 3.11. Comparação dos dados de RMN ¹H, em CDCl₃, da zona aromática das bromocetonas e respetivas catinonas sintetizadas.

Composto	Atribuição		
	H-2'/6' (2H, d)	H-3'/5' (2H, d)	H-7' (3H, s)
4'-Metil-2-bromobutirofenona (11)	7,92	7,29	2,43
4-MDMB (1)	7,91	7,33	2,43
4-MNEB (2)	7,91	7,33	2,44
4-MDEB (6)	7,89	7,35	2,45
4'-Metil-2-bromovalerofenona (12)	7,92	7,29	2,43
4-MDMP (3)	7,88	7,35	2,45
4-MNEP (4)	7,90	7,33	2,44
4'-Metil-2-bromohexanofenona (13)	7,92	7,29	2,43
4-MDMH (5)	7,89	7,35	2,45

As atribuições apresentadas anteriormente foram corroboradas através da análise dos espectros de COSY de cada catinona sintetizada nos quais se verificou a existência de correlações entre os prótons do grupo metilo (H-7') e os prótons em posição *meta* para o grupo acilo (H-3'/H-5') e entre estes prótons e os prótons *orto* (H-2'/H-6'), como é apresentado na Figura 3.17 para a catinona 4-MDMH (5), a título de exemplo.

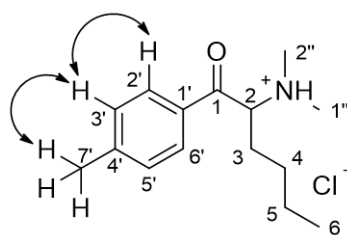


Figura 3.17. Correlações de COSY da catinona 4-MDMH (5) relativas ao anel aromático.

Após a atribuição dos sinais da zona aromática prosseguiu-se com a identificação dos da zona alquílica das catinonas, por comparação com os sinais da mesma zona nas respetivas bromocetonas (Tabela 3.12), sendo que a análise das correlações presentes nos espectros de COSY das catinonas foi indispensável para proceder à correta atribuição de todos os sinais, como é apresentado na Figura 3.18 para as catinonas 4-MDMH (5) e 4-MDEB (6), a título de exemplo.

Tabela 3.12. Comparação dos dados de RMN ^1H , em CDCl_3 , da zona alquílica das bromocetonas e respetivas catinonas sintetizadas.

Composto	Atribuição				
	H-2 (1H, multiplicidade)	H-3 (H, multiplicidade)	H-4 (3H, t)	H-5	H-6
Com cadeia CHCH_2CH_3					
4^o-Metil-2-bromobutirofenona (11)	5,06 (dd)	2,30-2,07 (2H, m)	1,08	—	—
4-MDMB (1)	5,11 (brs)	2,32-2,18 (1H, m); 2,13-1,99 (1H, m)	1,00	—	—
4-MNEB (2)	5,06 (brs)	2,53-2,37 (1H, m); 2,31-2,18 (1H, m)	0,97	—	—
4-MDEB (6)	5,10 (brs)	2,57-2,47 (1H, m); 2,14-1,99 (1H, m)	1,01	—	—
Com cadeia $\text{CHC}_2\text{H}_4\text{CH}_3$					
4^o-Metil-2-bromovalerofenona (12)	5,14 (t)	2,23-2,04 (2H, m)	1,64-1,36 (2H, m)	0,97	—
4-MDMP (3)	5,04 (t)	2,24-2,11 (1H, m); 2,02-1,89 (1H, m)	1,58-1,42 (1H, m); 1,37-1,20 (1H, m)	0,92	—
4-MNEP (4)	5,05 (brs)	2,36-2,23 (1H; m); 2,23-2,11 (1H; m)	1,54-1,39 (1H; m); 1,39-1,22 (1H; m)	0,85	—
Com cadeia $\text{CHC}_3\text{H}_6\text{CH}_3$					
4^o-Metil-2-bromohexanofenona (13)	5,12 (t)	2,28-2,04 (2H, m)	1,53-1,30 (2H, m)	1,53-1,30	0,91
4-MDMH (5)	5,03 (d)	2,27-2,13 (1H, m); 2,05-1,92 (1H, m)	1,52-1,38 (1H, m); 1,27-1,13 (1H, m)	1,38-1,27	0,82

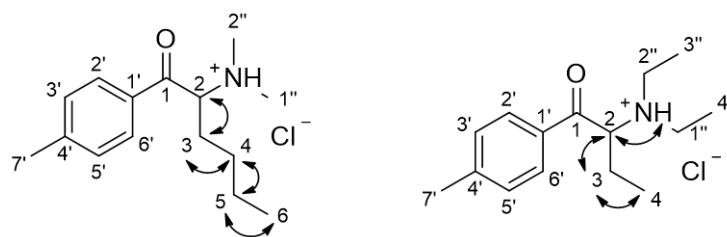


Figura 3.18. Correlações de COSY das cationonas 4-MDMH (5) e 4-MDEB (6) relativas à cadeia alquílica.

Analisando a Tabela 3.12 é possível constatar que todas as cationonas apresentam um sinal com desvios químicos compreendidos entre 5,11-5,03 ppm, a integrar para 1H, à semelhança do respetivo sinal nas bromocetonas que se apresenta com desvios químicos compreendidos entre 5,14-5,06 ppm, a integrar para 1H e atribuído ao H-2. A atribuição do protão H-2 pode ser confirmada em algumas das cationonas sintetizadas pela existência de uma correlação no espetro de COSY com o protão diretamente ligado ao átomo de azoto (NH), tal como exemplificado para a 4-MDEB (6) na Figura 3.18.

A atribuição dos sinais correspondentes aos restantes protões da cadeia alquílica das cationonas foi conseguida através das correlações presentes nos espetros de COSY entre os protões H-2 e H-3, H-3 e H-4, H-4 e H-5 e H-5 e H-6, como exemplificado na Figura 3.18.

Desta forma, para todas as cationonas sintetizadas o sinal atribuído aos protões H-3 apresenta-se como dois multipletos, com desvios químicos compreendidos entre 2,57-2,11 ppm e 2,31-1,89 ppm, cada um a integrar para 1H, enquanto o respetivo sinal nas bromocetonas se apresenta como um multipletos, com desvios químicos compreendidos entre 2,30-2,04 ppm, a integrar para 2H. O mesmo sucede para o sinal atribuído aos protões H-4 das cationonas com cadeia alquílica constituída por $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ e por $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (compostos 3, 4 e 5) nas quais o sinal se apresenta como dois multipletos, com desvios químicos compreendidos entre 1,58-1,38 ppm e 1,39-1,13 ppm, cada um a integrar para 1H, enquanto o respetivo sinal nas bromocetonas se apresenta como um multipletos, com desvios químicos compreendidos entre 1,64-1,30 ppm, a integrar para 2H. Esta diferença deve-se ao facto de os protões destes grupos CH_2 passarem a ser diastereotópicos aquando da formação das cationonas na forma de cloridrato, uma vez que a rotação da amina passa a ser restrita devido à protonação do azoto.

Em contrapartida o sinal atribuído aos protões H-5 da cationona com cadeia alquílica constituída por $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (composto 5) apresenta-se como um único multipletos, com desvios químicos compreendidos entre 1,38-1,27 ppm, a integrar para 2H, à semelhança

do respectivo sinal na bromocetona que se apresenta como um multipeto, com desvios químicos compreendidos entre 1,53-1,30 ppm, a integrar para 2H.

Finalmente, para todas as catinonas sintetizadas o sinal atribuído ao grupo metilo terminal apresenta-se como um tripleto, com desvios químicos compreendidos entre 1,01-0,82 ppm, a integrar para 3H, à semelhança do respectivo sinal nas bromocetonas que se apresenta como um tripleto, com desvios químicos compreendidos entre 1,08-0,91 ppm, a integrar para 3H.

Após a atribuição dos sinais da zona alquílica das catinonas efetuou-se a identificação dos sinais do grupo amino das mesmas (Tabela 3.13), sendo que a correta atribuição destes sinais foi auxiliada pela análise das correlações presentes nos espectros de COSY, como demonstrado na Figura 3.19 para as catinonas 4-MDMH (5) e 4-MDEB (6), a título de exemplo.

Tabela 3.13. Comparação dos dados de RMN ¹H, em CDCl₃, dos grupos amino das catinonas sintetizadas.

Composto		Atribuição			
Com grupo dimetilamino	H-1'' (3H, brs)	H-2'' (3H, brs)	H-3''	H-4''	NH (1H, brs)
4-MDMB (1)	2,94	2,94	—	—	12,30
4-MDMP (3)	2,81	3,03	—	—	12,56
4-MDMH (5)	2,80	3,03	—	—	12,53
Com grupo etilamino	H-1'' (1H, m); (1H, m)	H-2'' (3H, t)	H-3''	H-4''	NH; NH (1H, brs); (1H, brs)
4-MNEB (2)	3,34-3,23; 3,14-3,02	1,54	—	—	—
4-MNEP (4)	3,33-3,20; 3,12-3,00	1,54	—	—	10,55; 8,40
Com grupo dietilamino	H-1'' (1H, m); (1H, m)	H-2'' (3H, t)	H-3'' (1H, m); (1H, m)	H-4'' (3H, t)	NH (1H, brs)
4-MDEB (6)	3,43-3,29; 3,14-3,01	1,44	3,84-3,71; 3,57-3,43	1,57	11,39

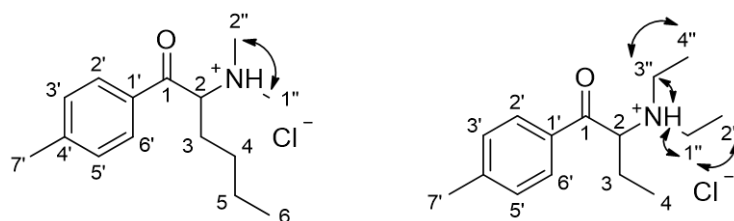


Figura 3.19. Correlações de COSY das cationonas 4-MDMH (5) e 4-MDEB (6) relativas ao grupo amino.

Analisando a Tabela 3.13 é possível constatar que quase todas as cationonas apresentam os sinais correspondentes aos prótons diretamente ligados ao átomo de azoto (NH), sendo que as cationonas com um grupo dimetilamino ou dietilamino (compostos **1**, **3**, **5** e **6**) apresentam um singuleto alargado, com desvios químicos compreendidos entre 12,56-11,39 ppm, a integrar para 1H, enquanto a cationona com um grupo etilamino (composto **4**) apresenta dois singuletos alargados, com desvio químicos de 10,55 ppm e 8,40 ppm, cada um a integrar para 1H, o que comprova a síntese de cationonas na sua forma protonada.

Relativamente aos prótons correspondentes aos grupos ligados ao átomo de azoto, nas cationonas com um grupo dimetilamino os espectros de próton, no caso da 4-MDMB (**1**), apresentam um singuleto alargado adicional, com desvio químico a 2,94 ppm, a integrar para 6H, atribuído aos prótons H-1''/H-2'', enquanto as cationonas **3** e **5** apresentam dois singuletos alargados adicionais, com desvios químicos a 2,81/2,80 ppm e 3,03 ppm, cada um a integrar para 3H, atribuídos aos prótons H-1'' e H-2'', respetivamente. Para as cationonas que apresentam dois singuletos verifica-se a existência de correlações de COSY entre os prótons H-1'' e H-2'' como exemplificado na Figura 3.19 para a cationona 4-MDMH (**5**).

Nas cationonas com um grupo etilamino os espectros de próton apresentam dois multipletos adicionais, com desvios químicos compreendidos entre 3,34-3,20 ppm e 3,14-3,00 ppm, cada um a integrar para 1H, atribuídos aos prótons H-1'' (sendo estes diastereotópicos), e ainda um tripleto adicional, com desvio químico a 1,54 ppm, a integrar para 3H, atribuído aos prótons H-2''. Em ambas as cationonas verifica-se a existência de correlações de COSY entre os prótons H-1'' e H-2'', à semelhança do exemplificado na Figura 3.19 para os prótons H-1'' e H-2'' da cationona 4-MDEB (**6**).

Finalmente, na cationona com um grupo dietilamino o espectro de próton apresenta quatro multipletos adicionais, com desvios químicos compreendidos entre 3,43-3,29 ppm e 3,14-3,01 ppm (atribuídos aos prótons H-1'') e 3,84-3,71 ppm e 3,57-3,43 ppm (atribuídos aos prótons H-3''), cada um a integrar para 1H (de notar que estes prótons são novamente diastereotópicos), e ainda dois tripletos adicionais, com desvio químico a 1,44 ppm (atribuído

aos prótons H-2'') e a 1,57 ppm (atribuído aos prótons H-4''), a integrar para 3H. Para a atribuição destes sinais revelaram-se extremamente importantes as correlações de COSY existentes entre o sinal do NH e os sinais dos prótons H-1''/H-3'', bem como entre os prótons H-1'' e H-2'' e entre os prótons H-3'' e H-4'', como exemplificado na Figura 3.19.

Após a atribuição completa de todos os sinais dos espectros de RMN ^1H para as catinonas sintetizadas e por forma a obter a caracterização completa das mesmas realizaram-se experiências de RMN adicionais (^{13}C APT, HSQC e HMBC).

A análise dos espectros de HSQC permitiu fazer a atribuição direta entre os sinais de carbono e os respetivos prótons a eles ligados e atribuídos de forma inequívoca anteriormente.

A análise dos espectros de HMBC (compostos por correlações carbono-próton a 2 e 3 ligações) permitiu, por um lado, confirmar as atribuições já feitas e, por outro, proceder à atribuição dos sinais dos carbonos quaternários (Figura 3.20). Todas as catinonas sintetizadas possuem os mesmos três carbonos quaternários, assim sendo o sinal correspondente ao carbono do grupo carbonilo pode ser identificado uma vez que apresenta correlações de HMBC com os prótons H-2 (apenas para algumas das catinonas sintetizadas), H-3 e H-2''/H-6''; o sinal correspondente ao carbono C-4' pode ser identificado por apresentar uma correlação de HMBC com os prótons H-7' e, por fim, o último sinal quaternário corresponderá o carbono C-1', que apresenta uma correlação de HMBC com os prótons H-3''/H-5''.

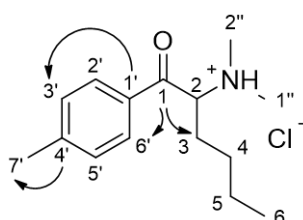


Figura 3.20. Correlações de HMBC para identificação dos carbonos quaternários.

Para além da caracterização completa das catinonas em CDCl_3 , foi também realizada a caracterização completa em $\text{DMSO}-d_6$, apresentando-se de seguida tabelas com os dados de RMN referentes a essas caracterizações, para cada catinona e cada solvente.

Na Figura 3.21 apresenta-se a estrutura da catinona 4-MDMB (**1**) e na Tabela 3.14 os dados de RMN da sua caracterização completa em CDCl₃ e em DMSO-*d*₆. Os espectros de RMN obtidos em CDCl₃, apresentam-se no Anexo E (Figuras 6.76-6.81) e em DMSO-*d*₆ no Anexo F (Figuras 6.112-6.117).

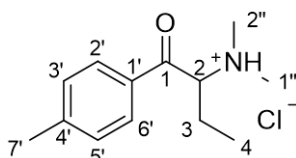


Figura 3.21. Estrutura da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (**1**).

Tabela 3.14. Dados de RMN ¹³C, ¹H, COSY e HMBC para a 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (**1**).

	Posição	δ ¹³ C	APT	δ ¹ H (integração; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)) ^a	COSY ^b	HMBC ^c
CDCl ₃	1	195,77	-	—	—	3, 2'/6'
	2	65,43	+	5,11 (1H; m)	3	3, 4
	3	23,62	-	2,32-2,18 (1H; m); 2,13-1,99 (1H; m)	2, 4	2, 4
	4	10,73	+	1,00 (3H; t; 6,8)	3	2, 3
	1'	133,49	-	—	—	3'/5'
	2'/6'	128,94	+	7,91 (2H; d; 7,3)	3'/5'	2'/6'
	3'/5'	130,27	+	7,33 (2H; d; 7,3)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
	4'	146,94	-	—	—	2'/6', 7'
	7'	21,96	+	2,43 (3H; s)	3'/5'	3'/5'
	1'' ^d	42,92	+	2,94 (3H; brs)	—	—
2'' ^d	38,17	+	2,94 (3H; brs)	—	—	
NH	—	—	12,30 (1H; brs)	—	—	
DMSO- <i>d</i> ₆	1	195,70	-	—	—	3, 2'/6'
	2	67,94	+	5,42 (1H; m)	3, NH	3, 4, 1'', 2''
	3	21,55	-	2,10-1,89 (2H; m)	2, 4	2, 4
	4	8,46	+	0,74 (3H; t; 7,4)	3	2, 3
	1'	132,21	-	—	—	3'/5'
	2'/6'	128,99	+	7,99 (2H; d; 7,7)	3'/5'	2'/6'
	3'/5'	129,88	+	7,44 (2H; d; 7,8)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
	4'	146,01	-	—	—	2'/6', 7'
	7'	21,35	+	2,42 (3H; s)	3'/5'	3'/5'
	1'' ^d	42,48	+	2,79 (3H; s)	2'', NH	2''
2'' ^d	40,69	+	2,86 (3H; s)	1'', NH	1''	
NH	—	—	10,43 (1H; brs)	2, 1'', 2''	—	

^aA atribuição dos prótons aos carbonos correspondentes foi baseada no HSQC; ^bPrótons com correlação em COSY com os δ ¹H da 4ª coluna; ^cPrótons com correlação em HMBC com os δ ¹³C da 2ª coluna; ^dAs atribuições ao par de sinais d poderão estar trocadas.

Na Figura 3.22 apresenta-se a estrutura da catinona 4-MNEB (**2**) e na Tabela 3.15 os dados de RMN da sua caracterização completa em CDCl₃ e em DMSO-*d*₆. Os espectros de RMN obtidos em CDCl₃, apresentam-se no Anexo E (Figuras 6.82-6.87) e em DMSO-*d*₆ no Anexo F (Figuras 6.118-6.123).

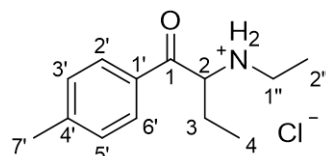


Figura 3.22. Estrutura da 4'-metil-N-etilnorbufedrona (**2**).

Tabela 3.15. Dados de RMN ¹³C, ¹H, COSY e HMBC para a 4'-metil-N-etilnorbufedrona (**2**).

	Posição	δ ¹³ C	APT	δ ¹ H (integração; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)) ^a	COSY ^b	HMBC ^c
CDCl ₃	1	194,41	-	—————	—————	2, 3, 2'/6'
	2	62,42	+	5,06 (1H; m)	3	3, 4, 1''
	3	24,37	-	2,53-2,37 (1H; m); 2,31-2,18 (1H; m)	2, 4	2, 4
	4	9,27	+	0,97 (3H; t; 6,7)	3	2, 3
	1'	131,56	-	—————	—————	3'/5'
	2'/6'	129,11	+	7,91 (2H; d; 7,1)	3'/5'	2'/6'
	3'/5'	130,14	+	7,33 (2H; d; 7,2)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
	4'	146,54	-	—————	—————	2'/6', 7'
	7'	21,99	+	2,44 (3H; s)	3'/5'	3'/5'
	1''	43,04	-	3,34-3,23 (1H; m); 3,14-3,02 (1H; m)	2''	2, 2''
2''	11,94	+	1,54 (3H; t; 7,2)	1''	1''	
DMSO- <i>d</i> ₆	1	195,64	-	—————	—————	2, 3, 2'/6'
	2	61,13	+	5,24 (1H; m)	3	3, 4, 1''
	3	23,01	-	2,10-1,97 (1H; m); 1,97-1,85 (1H; m)	2, 4	2, 4
	4	8,31	+	0,76 (3H; t; 7,5)	3	2, 3
	1'	131,44	-	—————	—————	3'/5'
	2'/6'	128,87	+	7,99 (2H; d; 7,9)	3'/5'	2'/6'
	3'/5'	129,75	+	7,42 (2H; d; 7,9)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
	4'	145,64	-	—————	—————	2'/6', 7'
	7'	21,28	+	2,41 (3H; s)	3'/5'	3'/5'
	1''	41,11	-	3,07-2,96 (1H; m); 2,96-2,85 (1H; m)	2''	2, 2''
2''	11,13	+	1,26 (3H; t; 7,2)	1''	1''	
	NH ₂	—————	9,33 (1H; brs); 9,03 (1H; brs)	—————	—————	

^aA atribuição dos prótons aos carbonos correspondentes foi baseada no HSQC; ^bPrótons com correlação em COSY com os δ ¹H da 4ª coluna; ^cPrótons com correlação em HMBC com os δ ¹³C da 2ª coluna.

Na Figura 3.23 apresenta-se a estrutura da catinona 4-MDMP (**3**) e na Tabela 3.16 os dados de RMN da sua caracterização completa em CDCl₃ e em DMSO-*d*₆. Os espectros de RMN obtidos em CDCl₃, apresentam-se no Anexo E (Figuras 6.88-6.93) e em DMSO-*d*₆ no Anexo F (Figuras 6.124-6.129).

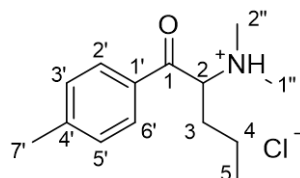


Figura 3.23. Estrutura da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorpentedrona (**3**).

Tabela 3.16. Dados de RMN ¹³C, ¹H, COSY e HMBC para a 4'-metil-*N,N*-dimetilnorpentedrona (**3**).

	Posição	δ ¹³ C	APT	δ ¹ H (integração; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)) ^a	COSY ^b	HMBC ^c
CDCl ₃	1	195,84	-	—	—	2, 3, 2'/6'
	2	63,83	+	5,04 (1H; t; 6,3)	3	3
	3	32,30	-	2,24-2,11 (1H; m); 2,02-1,89 (1H; m)	2, 4	2, 4, 5
	4	19,69	-	1,58-1,42 (1H; m); 1,37-1,20 (1H; m)	3, 5	2, 3, 5
	5	14,07	+	0,92 (3H; t; 6,8)	4	3, 4
	1'	133,49	-	—	—	3'/5'
	2'/6'	128,87	+	7,88 (2H; d; 7,2)	3'/5'	2'/6'
	3'/5'	130,33	+	7,35 (2H; d; 7,5)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
	4'	147,03	-	—	—	2'/6', 7'
	7'	21,99	+	2,45 (3H; s)	3'/5'	3'/5'
	1'' ^d	43,04	+	2,81 (3H; brs)	2''	—
	2'' ^d	37,80	+	3,03 (3H; brs)	1''	—
	NH	—	—	12,56 (1H; brs)	—	—
DMSO- <i>d</i> ₆	1	196,04	-	—	—	3, 2'/6'
	2	66,78	+	5,38 (1H; m)	3, NH	3, 4
	3	30,26	-	1,96-1,83 (2H; m)	2, 4	4, 5
	4	17,51	-	1,22-0,99 (2H; m)	3, 5	3, 5
	5	13,68	+	0,79 (3H; t; 7,2)	4	3, 4
	1'	132,39	-	—	—	3'/5'
	2'/6'	129,00	+	8,00 (2H; d; 7,9)	3'/5'	2'/6'
	3'/5'	129,88	+	7,44 (2H; d; 7,7)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
	4'	146,04	-	—	—	2'/6', 7'
	7'	21,34	+	2,42 (3H; s)	3'/5'	3'/5'
	1'' ^d	42,29	+	2,79 (3H; s)	2'', NH	—
	2'' ^d	40,76	+	2,86 (3H; s)	1'', NH	—
	NH	—	—	10,46 (1H; brs)	2, 1'', 2''	—

^aA atribuição dos prótons aos carbonos correspondentes foi baseada no HSQC; ^bPrótons com correlação em COSY com os δ ¹H da 4ª coluna; ^cPrótons com correlação em HMBC com os δ ¹³C da 2ª coluna; ^dAs atribuições ao par de sinais d poderão estar trocadas.

Na Figura 3.24 apresenta-se a estrutura da catinona 4-MNEP (4) e na Tabela 3.17 os dados de RMN da sua caracterização completa em CDCl₃ e em DMSO-*d*₆. Os espectros de RMN obtidos em CDCl₃, apresentam-se no Anexo E (Figuras 6.94-6.99) e em DMSO-*d*₆ no Anexo F (Figuras 6.130-6.135).

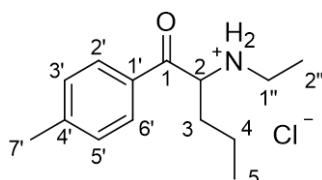


Figura 3.24. Estrutura da 4'-metil-*N*-etilnorpentedrona (4).

Tabela 3.17. Dados de RMN ¹³C, ¹H, COSY e HMBC para a 4'-metil-*N*-etilnorpentedrona (4).

	Posição	δ ¹³ C	APT	δ ¹ H (integração; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)) ^a	COSY ^b	HMBC ^c
CDCl ₃	1	194,61	-	—	—	2, 3, 2'/6'
	2	61,58	+	5,05 (1H; m)	3	3, 4, 1''
	3	33,07	-	2,36-2,23 (1H; m); 2,23-2,11 (1H; m)	2, 4	2, 4, 5
	4	18,41	-	1,54-1,39 (1H; m); 1,39-1,22 (1H; m)	3, 5	2, 3, 5
	5	13,98	+	0,85 (3H; t; 6,4)	4	3, 4
	1'	131,62	-	—	—	3'/5'
	2'/6'	129,10	+	7,90 (2H; d; 7,3)	3'/5'	2'/6'
	3'/5'	130,11	+	7,33 (2H; d; 7,3)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
	4'	146,47	-	—	—	2'/6', 7'
	7'	21,99	+	2,44 (3H; s)	3'/5'	3'/5'
	1''	42,97	-	3,33-3,20 (1H; m); 3,12-3,00 (1H; m)	2''	2, 2''
	2''	11,89	+	1,54 (3H; t; 6,3)	1''	1''
NH ₂	—	—	10,55 (1H; brs); 8,40 (1H; brs)	—	—	
DMSO- <i>d</i> ₆	1	195,88	-	—	—	2, 3, 2'/6'
	2	60,37	+	5,24 (1H; m)	3	3, 1''
	3	31,98	-	1,96-1,78 (2H; m)	2, 4	2, 4, 5
	4	17,21	-	1,36-1,21 (1H; m); 1,14-0,98 (1H; m)	3, 5	2, 3, 5
	5	13,71	+	0,77 (3H; t; 7,2)	4	3, 4
	1'	131,52	-	—	—	3'/5'
	2'/6'	128,93	+	7,98 (2H; d; 7,9)	3'/5'	2'/6'
	3'/5'	129,82	+	7,42 (2H; d; 7,9)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
	4'	145,73	-	—	—	2'/6', 7'
	7'	21,34	+	2,41 (3H; s)	3'/5'	3'/5'
	1''	41,19	-	3,07-2,95 (1H; m); 2,95-2,83 (1H; m)	2''	2, 2''
	2''	11,22	+	1,25 (3H; t; 7,0)	1''	1''
NH ₂	—	—	9,39 (1H; brs); 9,05 (1H; brs)	—	—	

^aA atribuição dos prótons aos carbonos correspondentes foi baseada no HSQC; ^bPrótons com correlação em COSY com os δ ¹H da 4^a coluna; ^cPrótons com correlação em HMBC com os δ ¹³C da 2^a coluna.

Como referido anteriormente, esta catinona foi já reportada ao EMCDDA, pelo que foi possível consultar os seus dados de RMN na literatura (Hamby, et al., 2015; Rojkiewicz, et al., 2018), apresentando-se na Tabela 3.18 e na Tabela 3.19 uma comparação entre esses dados e os obtidos no presente trabalho para os $\delta^{13}\text{C}$ e para os $\delta^1\text{H}$, respetivamente.

Tabela 3.18. Comparação dos $\delta^{13}\text{C}$ da 4^o-metil-N-etilnorpentedrona (4), em DMSO-*d*₆.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$		
	Sintetizada	Hamby et al., 2015	Rojkiewicz et al., 2018
1	195,88	196,1	196,26
2	60,37	60,6	60,72
3	31,98	32,2	32,36
4	17,21	17,5	17,70
5	13,71	14,0	11,56
1'	131,52	132,0	132,17
2'/6'	128,93	129,2	129,33
3'/5'	129,82	130,0	130,18
4'	145,73	145,8	145,93
7'	21,34	21,6	21,73
1''	41,19	41,4	41,59
2''	11,22	11,4	14,14

Tabela 3.19. Comparação dos $\delta^1\text{H}$ da 4^o-metil-N-etilnorpentedrona (4), em DMSO-*d*₆.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (integração; multiplicidade; <i>J</i> (Hz))		
	Sintetizada	Hamby et al., 2015	Rojkiewicz et al., 2018
2	5,24 (1H; brs)	5,24 (1H; m)	5,23 (1H; t; 5,2)
3	1,96-1,78 (2H; m)	1,94 (1H; m); 1,88 (1H; m)	1,98-1,82 (2H; m)
4	1,36-1,21 (1H; m); 1,14-0,98 (1H; m)	1,32 (1H; m); 1,08 (1H; m)	1,37-1,22 (1H; m); 1,34-1,01 (1H; m)
5	0,77 (3H; t; 7,2)	0,77 (3H; t; 7)	0,77 (3H; t; 7,3)
2'/6'	7,98 (2H; d; 7,9)	8,00 (2H; d; 8)	7,99 (2H; d; 8,2)
3'/5'	7,42 (2H; d; 7,9)	7,42 (2H; d; 8)	7,41 (2H; d; 8,0)
7'	2,41 (3H; s)	2,41 (3H; s)	2,87 (3H; s)
1''	3,07-2,95 (1H; m); 2,95-2,83 (1H; m)	3,01 (1H; m); 2,88 (1H; m)	3,06-2,97 (1H; m); 2,92-2,84 (1H; m)
2''	1,25 (3H; t; 7,0)	1,27 (3H; t; 7)	1,27 (3H; t; 7,2)
NH ₂	9,39 (1H, brs); 9,05 (1H, brs)	—————	9,74 (brs); 9,14 (brs)

Na Figura 3.25 apresenta-se a estrutura da catinona 4-MDMH (5) e na Tabela 3.20 os dados de RMN da sua caracterização completa em CDCl₃ e em DMSO-*d*₆. Os espectros de RMN obtidos em CDCl₃, apresentam-se no Anexo E (Figuras 6.100-6.105) e em DMSO-*d*₆ no Anexo F (Figuras 6.136-6.141).

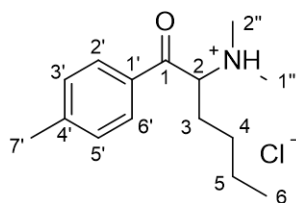


Figura 3.25. Estrutura da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorhexedrona (5).

Tabela 3.20. Dados de RMN ¹³C, ¹H, COSY e HMBC para a 4'-metil-*N,N*-dimetilnorhexedrona (5).

	Posição	δ ¹³ C	APT	δ ¹ H (integração; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)) ^a	COSY ^b	HMBC ^c
CDCl ₃	1	195,83	-	—	—	3, 2'/6'
	2	63,84	+	5,03 (1H; m)	3	3
	3	30,00	-	2,27-2,13 (1H; m); 2,05-1,92 (1H; m)	2, 4	2, 4, 5
	4	28,04	-	1,52-1,38 (1H; m); 1,27-1,13 (1H; m)	3	2, 5, 6
	5	22,63	-	1,38-1,27 (2H; m)	6	4, 6
	6	13,66	+	0,82 (3H; t; 6,5)	5	4, 5
	1'	133,53	-	—	—	3'/5'
	2'/6'	128,89	+	7,89 (2H; d; 7,3)	3'/5'	2'/6'
	3'/5'	130,34	+	7,35 (2H; d; 7,4)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
	4'	147,03	-	—	—	2'/6', 7'
	7'	21,99	+	2,45 (3H; s)	3'/5'	3'/5'
	1'' ^d	43,04	+	2,80 (3H; brs)	2''	—
	2'' ^d	37,82	+	3,03 (3H; brs)	1''	—
NH	—	—	12,53 (1H; brs)	—	—	
DMSO- <i>d</i> ₆	1	195,99	-	—	—	3, 2'/6'
	2	66,93	+	5,37 (1H; m)	3, NH	3
	3	27,93	-	1,98-1,85 (2H; m)	2, 4	4, 5
	4	25,89	-	1,14-0,95 (2H; m)	3	3, 5, 6
	5	21,85	-	1,29-1,14 (2H; m)	6	4, 6
	6	13,52	+	0,74 (3H; t; 7,0)	5	4, 5
	1'	132,30	-	—	—	3'/5'
	2'/6'	129,00	+	8,00 (2H; d; 7,6)	3'/5'	2'/6'
	3'/5'	129,91	+	7,44 (2H; d; 7,9)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
	4'	146,09	-	—	—	2'/6', 7'
	7'	21,35	+	2,42 (3H; s)	3'/5'	3'/5'
	1'' ^d	42,43	+	2,78 (3H; brs)	NH	—
	2'' ^d	40,75	+	2,86 (3H; brs)	NH	—
NH	—	—	10,37 (1H; brs)	2, 1'', 2''	—	

^aA atribuição dos prótons aos carbonos correspondentes foi baseada no HSQC; ^bPrótons com correlação em COSY com os δ ¹H da 4ª coluna; ^cPrótons com correlação em HMBC com os δ ¹³C da 2ª coluna; ^dAs atribuições ao par de sinais d poderão estar trocadas.

Na Figura 3.26 apresenta-se a estrutura da catinona 4-MDEB (6) e na Tabela 3.21 os dados de RMN da sua caracterização completa em CDCl₃ e em DMSO-*d*₆. Os espectros de RMN obtidos em CDCl₃, apresentam-se no Anexo E (Figuras 6.106-6.111) e em DMSO-*d*₆ no Anexo F (Figuras 6.142-6.147).

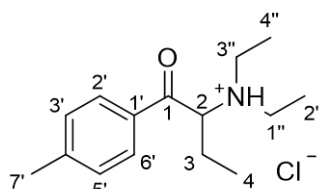


Figura 3.26. Estrutura da 4'-metil-*N,N*-dietilnorbufedrona (6).

Tabela 3.21. Dados de RMN ¹³C, ¹H, COSY e HMBC para a 4'-metil-*N,N*-dietilnorbufedrona (6).

	Posição	δ ¹³ C	APT	δ ¹ H (integração; multiplicidade; <i>J</i> (Hz)) ^a	COSY ^b	HMBC ^c
CDCl ₃	1	195,72	-	—	—	3, 2'/6'
	2	63,57	+	5,10 (1H; m)	3, NH	3, 4
	3	23,80	-	2,57-2,47 (1H; m); 2,14-1,99 (1H; m)	2, 4	4
	4	11,35	+	1,01 (3H; t; 6,7)	3	3
	1'	133,38	-	—	—	3'/5'
	2'/6'	128,92	+	7,89 (2H; d; 7,2)	3'/5'	2'/6'
	3'/5'	130,31	+	7,35 (2H; d; 7,2)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
	4'	146,95	-	—	—	2'/6', 7'
	7'	21,98	+	2,45 (3H; s)	3'/5'	3'/5'
	1'' ^d	48,21	-	3,43-3,29 (1H; m); 3,14-3,01 (1H; m)	2'', NH	2'', 3''
	2'' ^e	10,37	+	1,44 (3H; t; 6,4)	1''	1''
	3'' ^d	45,90	-	3,84-3,71 (1H; m); 3,57-3,43 (1H; m)	4'', NH	1'', 4''
	4'' ^e	11,86	+	1,57 (3H; t; 6,6)	3''	3''
NH	—	—	11,39 (1H; brs)	2, 1'', 3''	—	
DMSO- <i>d</i> ₆	1	195,73	-	—	—	3, 2'/6'
	2	65,13	+	5,36 (1H; m)	3, NH	3, 4, 3''
	3	21,62	-	2,06-1,89 (2H; m)	2, 4	2, 4
	4	8,57	+	0,73 (3H; t; 7,4)	3	2, 3
	1'	132,02	-	—	—	3'/5'
	2'/6'	129,17	+	8,08 (2H; d; 7,8)	3'/5'	2'/6'
	3'/5'	129,88	+	7,44 (2H; d; 7,8)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
	4'	146,22	-	—	—	2'/6', 7'
	7'	21,36	+	2,42 (3H; s)	3'/5'	3'/5'
	1'' ^d	46,54	-	3,23-3,09 (1H; m); 3,09-2,95 (1H; m)	2'', NH	2''
	2'' ^e	9,58	+	1,21 (3H; t; 7,1)	1''	1''
	3'' ^d	43,19	-	3,40-3,28 (1H; m); 3,23-3,09 (1H; m)	4'', NH	1'', 4''
	4'' ^e	7,64	+	1,28 (3H; t; 7,1)	3''	3''
NH	—	—	9,68 (1H; brs)	2, 1'', 3''	—	

^aA atribuição dos prótons aos carbonos correspondentes foi baseada no HSQC; ^bPrótons com correlação em COSY com os δ ¹H da 4ª coluna; ^cPrótons com correlação em HMBC com os δ ¹³C da 2ª coluna; ^{d,e}As atribuições ao par de sinais d e e poderão estar trocadas.

Das seis catinonas sintetizadas, apenas a 4-MNEP (**4**) já foi reportada ao EMCDDA (EMCDDA, 2014), apresentando dados de RMN na literatura, as restantes cinco não se encontram caracterizadas na literatura, estando duas disponíveis para venda na Cayman Chemical (a 4-MDMB, **1** e a 4-MNEB, **2**) e sendo as outras três (a 4-MDMP, **3**, a 4-MDMH, **5** e a 4-MDEB, **6**) novos compostos.

Todas as catinonas obtidas foram analisadas por GC-FID com o objetivo de verificar a sua pureza, apresentando-se os resultados na Tabela 3.22. Uma vez que os espectros de RMN das catinonas não mostraram sinais de impurezas e os resultados de GC-FID mostraram que as catinonas apresentavam uma pureza entre 94% e 97%, pôde concluir-se que os compostos sintetizados tinham uma pureza adequada para se proceder à validação de um método analítico para a sua deteção e quantificação.

Tabela 3.22. Determinação da pureza (%) das catinonas sintetizadas, por GC-FID.

Composto	Injeção 1 ^a	Injeção 2 ^a	Injeção 3 ^a	Injeção 4 ^a	Injeção 5 ^a	Pureza	DP	CV
4-MDMB (1)	95,35	97,21	97,10	95,91	95,84	96,28	0,83	0,86
4-MNEB (2)	95,41	95,44	94,45	97,77	97,61	96,14	1,47	1,53
4-MDMP (3)	96,60	96,18	97,88	98,58	96,23	97,09	1,08	1,11
4-MNEP (4)	93,42	96,31	97,55	96,55	96,76	96,12	1,58	1,64
4-MDMH (5)	93,97	95,55	95,45	93,61	93,71	94,46	0,96	1,02
4-MDEB (6)	95,27	94,85	97,34	96,61	96,63	96,14	1,04	1,08

^aPorcentagem da área do pico do analito relativamente à área total obtida nos cromatogramas.

3.3. Validação de um Método de Deteção e Quantificação de Catinonas em Sangue por GC-MS

No presente trabalho efetuou-se a validação de um método de deteção e quantificação das seis catinonas sintetizadas, em sangue, por GC-MS e recorrendo a SPE, apresentando-se de seguida os resultados obtidos.

Identificação e Quantificação dos Compostos em estudo

A identificação dos compostos em estudo foi efetuada em modo SIM analisando o seu tempo de retenção (t_R), o tempo de retenção relativo (t_{Rr}), a presença de três iões característicos e as intensidades relativas desses iões tendo por base os critérios de avaliação da WADA (WADA, 2010), desta forma foi necessário determinar o t_R de cada composto, selecionar os

três iões que iriam ser monitorizados e determinar as suas áreas relativas. Para tal, cada catinona em estudo foi analisada individualmente por GC-MS, sem recorrer a derivatização, em modo *full scan*, apresentando-se na Figura 3.27 o padrão de fragmentação previsto por EI para as catinonas estudadas e apresentando-se no Anexo G, da Figura 6.148 à 6.153, o padrão de fragmentação previsto por EI, o cromatograma e o espetro de massa obtidos para cada catinona.

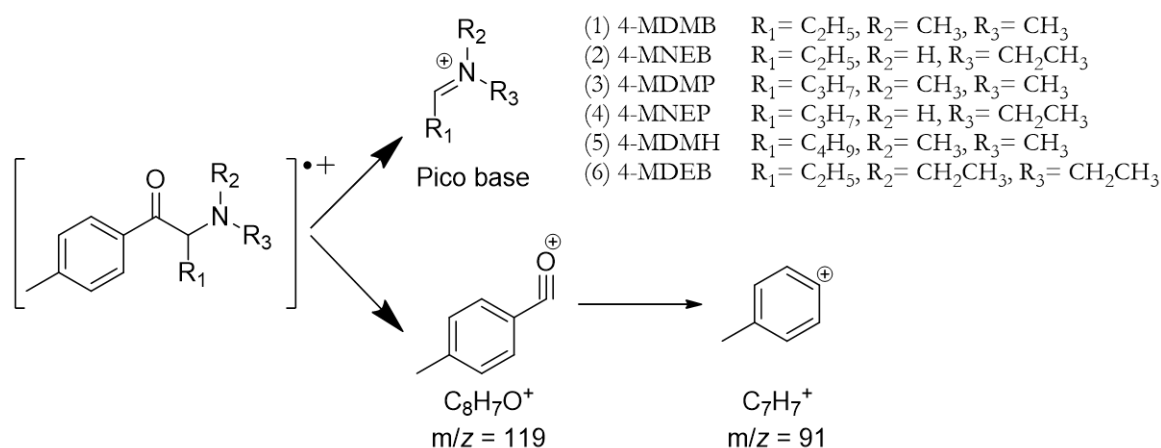


Figura 3.27. Fragmentações previstas por EI para as catinonas em estudo (Namera, et al., 2015).

Na Tabela 3.23 apresentam-se os tempos de retenção e os fragmentos iónicos monitorizados em modo SIM, para a análise por GC-MS, sem recorrer a derivatização, de cada catinona estudada e do padrão interno utilizado no processo de validação do método, sendo que se utilizou para a quantificação de cada catinona o fragmento correspondente ao seu pico base por ser sempre o mais intenso.

Tabela 3.23. Tempos de retenção e fragmentos iónicos utilizados na identificação dos compostos.

Composto	t _R (min)	Fragmentos iónicos (m/z)	
		Pico base	Outros picos
4-MDMB (1)	10,49	86	91, 119
4-MNEB (2)	10,73	86	91, 119
4-MDMP (3)	11,62	100	91, 119
4-MNEP (4)	11,89	100	91, 119
4-MDMH (5)	13,16	114	91, 119
4-MDEB (6)	12,14	114	91, 119
Cocaína-d ₃	19,12	—	185

Na Tabela 3.24 apresentam-se a título de exemplo os resultados obtidos na confirmação qualitativa das catinonas em estudo numa amostra de sangue branco fortificada com 10 ng/mL de cada catinona, utilizando como controlo uma amostra fortificada com 500 ng/mL, apresentando-se no Anexo G da Figura 6.154 à 6.168 um exemplo das folhas de cálculo utilizadas no SQTf do INMLCF para a confirmação qualitativa de compostos.

Tabela 3.24. Identificação das catinonas em estudo numa amostra de sangue branco fortificada.

		Iões (m/z)	Área Relativa (%)	Critério	Razão S/N	t_R catinona	Critério	t_{Rr}	Critério
4-MDMB (1)	Cont.	86	100,0						
		91	6,6	±5: 1,6-11,6	>3	10,48	±0,1: 10,38-10,58	0,548	±1%: 0,543-0,554
		119	3,1	±50%: 1,5-4,6					
	Amos.	86	100,0						
		91	5,3	Conforme	>3	10,48	Conforme	0,548	Conforme
		119	2,5	Conforme					
4-MNEB (2)	Cont.	86	100,0						
		91	7,7	±5: 2,7-12,7	>3	10,73	±0,1: 10,63-10,83	0,561	±1%: 0,556-0,567
		119	3,9	±50%: 1,9-5,8					
	Amos.	86	100,0						
		91	7,1	Conforme	>3	10,73	Conforme	0,561	Conforme
		119	3,9	Conforme					
4-MDMP (3)	Cont.	86	100,0						
		91	5,6	±5: 0,6-10,6	>3	11,62	±0,1: 11,52-11,72	0,608	±1%: 0,612-0,614
		119	2,6	±50%: 1,3-4,0					
	Amos.	86	100,0						
		91	6,0	Conforme	>3	11,62	Conforme	0,608	Conforme
		119	2,3	Conforme					
4-MNEP (4)	Cont.	86	100,0						
		91	7,1	±5: 2,1-12,1	>3	11,88	±0,1: 11,78-11,98	0,622	±1%: 0,615-0,628
		119	3,8	±50%: 1,9-5,8					
	Amos.	86	100,0						
		91	6,3	Conforme	>3	11,88	Conforme	0,622	Conforme
		119	4,6	Conforme					
4-MDMH (5)	Cont.	86	100,0						
		91	5,0	±5: 0,0-10,0	>3	13,16	±0,1: 13,06-13,26	0,688	±1%: 0,681-0,695
		119	2,6	±50%: 1,3-4,0					
	Amos.	86	100,0						
		91	5,1	Conforme	>3	13,16	Conforme	0,688	Conforme
		119	2,5	Conforme					
4-MDEB (6)	Cont.	86	100,0						
		91	5,3	±5: 0,3-10,3	>3	12,13	±0,1: 12,03-12,23	0,635	±1%: 0,628-0,641
		119	3,0	±50%: 1,5-4,6					
	Amos.	86	100,0						
		91	6,9	Conforme	>3	12,13	Conforme	0,635	Conforme
		119	3,5	Conforme					

A quantificação dos compostos em estudo foi efetuada por aplicação do método de padrão interno, no qual este é adicionado a cada amostra numa determinada concentração constante (250 ng/mL). A utilização do método de padrão interno é recomendada quando a preparação das amostras é composta por múltiplos passos, uma vez que a sua aplicação irá melhorar a precisão e exatidão do método através da minimização da variabilidade dos diversos passos de preparação das amostras. O padrão interno utilizado deve respeitar algumas condições: não deve estar presente naturalmente nas amostras; deve produzir um pico cromatograficamente bem resolvido; idealmente deve ser eluído após os analitos; deve estar disponível com grau de pureza elevado ou, se tal não for possível, as impurezas presentes não podem interferir com a análise pretendida; deve produzir uma resposta compatível com o detetor utilizado; e deve ter uma estrutura que possibilite características de extração, tempos de retenção, estabilidade e resposta do detetor semelhantes às dos analitos, o que normalmente se traduz em ser estruturalmente semelhante a estes. Idealmente, o melhor padrão interno a utilizar seria o equivalente deuterado do analito em estudo, no entanto, isso nem sempre é possível uma vez que tais compostos têm custo elevado e não existem análogos deuterados disponíveis comercialmente para todas as substâncias (Dolan, 2012). No caso do presente trabalho optou-se por utilizar cocaína- d_3 porque, de entre os padrões internos testados, este seria o mais semelhante aos analitos estudados já que, ao contrário da benzoilecgonina- d_3 , não sofre derivatização (com os reagentes derivatizantes utilizados).

Preparação das Amostras Biológicas

A preparação das amostras biológicas foi efetuada como descrito no subcapítulo 2.5, sendo que, relativamente ao pré-tratamento das amostras, a utilização de 8 mL de solução tampão de fosfato teve como propósito diluir a amostra e evitar a precipitação de componentes do sangue devido à mistura com acetonitrilo (solvente das soluções de trabalho das catinonas) e a posterior centrifugação das amostras tinha como objetivo provocar a sedimentação de componentes sólidos que, desta forma, não seriam transferidos para as colunas de extração, evitando a obstrução do enchimento das mesmas.

A utilização de colunas Oasis[®] do tipo MCX deveu-se ao facto de estas possuírem um mecanismo de retenção misto conseguido com um único copolímero orgânico constituído por grupos lipofílicos que proporcionam interações de fase reversa e por grupos aniónicos de ácido sulfúrico que permitem troca iónica, estando descritas como eficazes para a extração de compostos básicos de matrizes biológicas (Waters, 2008). O acondicionamento das colunas foi efetuado adicionando MeOH para remover interferentes e resíduos do processo de fabrico

e ativar o enchimento, seguido da adição de água desionizada para equilibrar o meio, uma vez que se trata de um solvente semelhante ao da amostra (solução aquosa de tampão de fosfato). Após a adição do sobrenadante das amostras centrifugadas foi novamente adicionada água desionizada, seguida da adição de HCl para protonar o grupo amina dos analitos e, dessa forma, ativar a troca iónica com as cargas negativas presentes no enchimento das colunas, depois foi adicionado MeOH para expulsar interferentes que ainda existissem na coluna, sem remover os analitos que estão intensamente adsorvidos, sendo finalmente adicionado hexano por ser um solvente altamente hidrofóbico que iria expulsar a água que ainda existisse na coluna. Por fim, foi adicionada uma solução básica (DCM/isopropanol/amónia) provocando a desionização e conseqüente eluição dos analitos.

Otimização do Método

O método analítico validado foi previamente otimizado em diversos aspetos nomeadamente o uso ou não de agentes de derivatização, o programa de temperaturas usado, o fluxo de hélio, o tipo de sangue a utilizar, a razão de *split* e ainda o solvente de lavagem das colunas de SPE.

O primeiro aspeto a avaliar foi a necessidade de derivatizar os compostos em estudo, sendo que, por um lado, um analito deve ser analisado na sua forma original uma vez que a sua conversão na forma derivatizada envolve um passo químico adicional que terá um custo associado e poderá dificultar a interpretação de resultados devido à introdução de impurezas e/ou incerteza associada à derivatização incompleta do analito, no entanto, por outro lado, o uso de agentes de derivatização é frequente na análise de compostos por GC-MS de modo a aumentar a sua volatilidade, melhorar a sua estabilidade, melhorar a separação cromatográfica ou alterar o espectro de massa por modificação do padrão de fragmentação, entre outros (Lin, et al., 2008). Em GC as reações de derivatização mais comuns são sililação (os hidrogénios ativos de grupos funcionais do analito são substituídos por grupos sililo), alquilação (os hidrogénios ativos de grupos funcionais do analito são substituídos por grupos alquilo) e acilação (o analito (nucleófilo) ataca o agente derivatizante (que contém um grupo de saída) através de uma reação de adição/eliminação nucleófila) (Hulshoff & Lingeman, 1984).

No presente trabalho avaliou-se o uso de agentes de derivatização que atuam por sililação, utilizando uma mistura de MSTFA/TMCS, e por acilação, utilizando MBTFA, tendo-se também testado não recorrer a derivatização, sendo que, de entre os compostos em estudo, apenas seria de esperar que as catinonas **2** e **4** fossem derivatizadas, uma vez que apenas estas apresentam hidrogénios ativos (-NH). Nas Figuras 3.28-3.30 apresentam-se os

cromatogramas obtidos para cada condição, sendo possível concluir que: quando se utiliza MSTFA/TMCS e uma elevada concentração de catinonas é possível identificar o pico de cada catinona, no entanto, quando se utiliza uma concentração mais baixa deixa de ser possível identificar os picos com certeza (Figura 3.28); quando se utiliza MBTFA e uma elevada concentração de catinonas os cromatogramas obtidos para as catinonas **2** e **4** individualmente apresentam demasiados interferentes não sendo possível identificar o pico de nenhuma das catinonas (Figura 3.29); quando não se utiliza agente de derivatização, mesmo utilizando uma baixa concentração de catinonas, é possível identificar inequivocamente o pico correspondente a cada catinona (Figura 3.30), razão pela qual se decidiu não derivatizar os compostos em estudo.

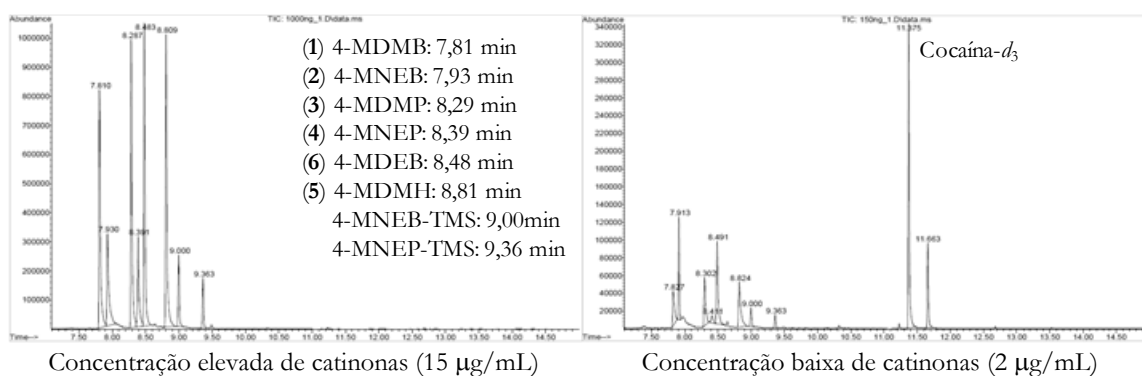


Figura 3.28. Cromatogramas da mistura de catinonas (1-6) obtidos com derivatização com MSTFA/TMCS.

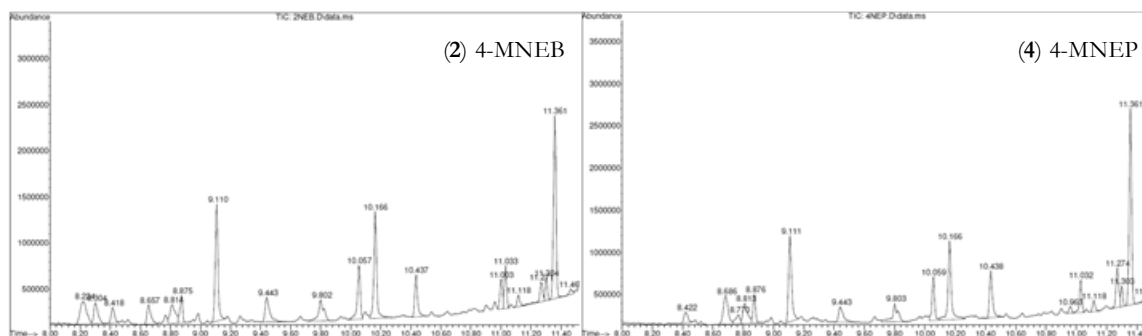


Figura 3.29. Cromatogramas das catinonas **2** e **4** (77 µg/mL) obtidos com derivatização com MBTFA.

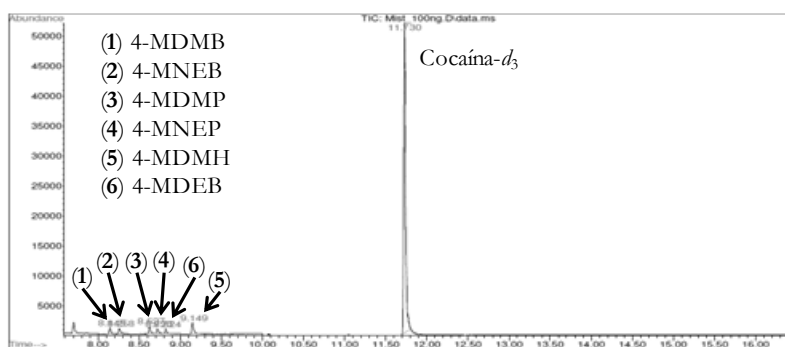


Figura 3.30. Cromatograma da mistura de catinonas (1-6, 1,5 µg/mL) obtido sem derivatização.

O segundo aspeto a otimizar foi o programa de temperaturas e o fluxo de hélio de modo a separar o melhor possível os picos das catinonas, desta forma foram testados vários programas de temperaturas apresentando-se na Figura 3.31 os cromatogramas obtidos utilizando o primeiro programa testado e o programa final, utilizado no processo de validação, e na Figura 3.32 os cromatogramas obtidos para cada fluxo de hélio testado, tendo-se utilizado o maior valor de fluxo por permitir a obtenção de menores tempos de retenção.

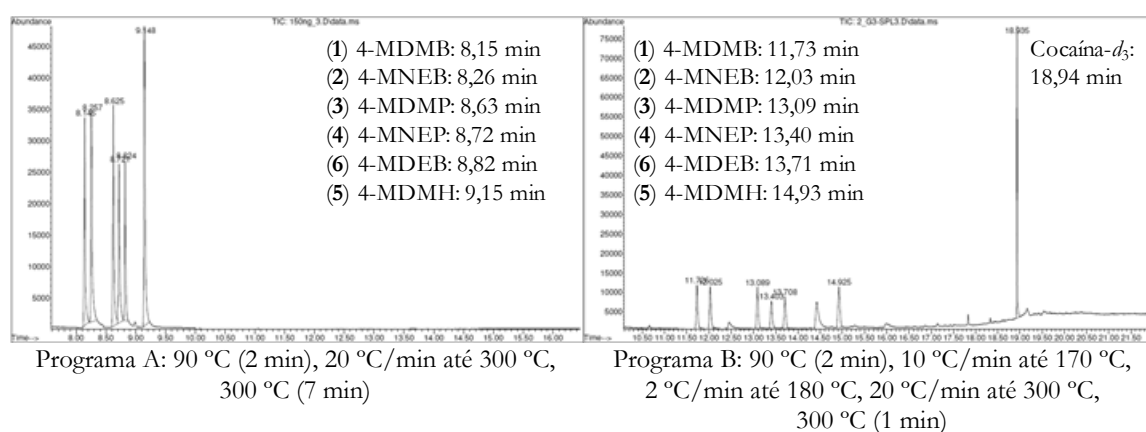


Figura 3.31. Cromatogramas da mistura de catinonas (1-6, 0,3 µg/mL) obtidos para diferentes programas de temperaturas (A e B).

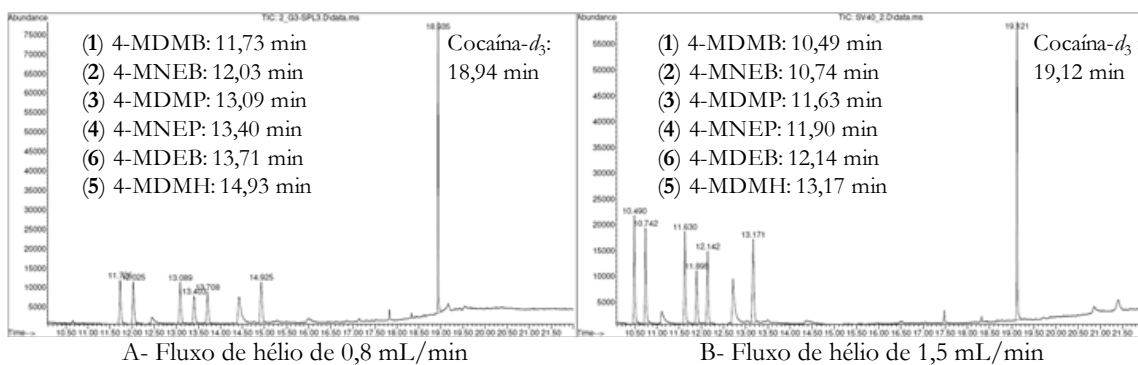


Figura 3.32. Cromatogramas da mistura de catinonas (1-6, 0,3 µg/mL) obtidos utilizando diferentes fluxo de hélio (A e B).

O terceiro aspeto a otimizar foi o tipo de sangue a utilizar no processo de validação, apresentando-se na Figura 3.33 os cromatogramas obtidos na análise de amostras de sangue cardíaco *post mortem* e sangue de vivo fortificadas com as catinonas em estudo, optando-se por utilizar sangue de vivo uma vez que apesar de conter dois picos adicionais estes não se encontram suficientemente próximos dos picos das catinonas para que impossibilitem a sua correta identificação. Por outro lado, a disponibilidade deste tipo de sangue é muito maior que

a do sangue *post mortem*, evitando-se assim a necessidade de fazer misturas com este sangue para utilizar durante todo o processo de validação.

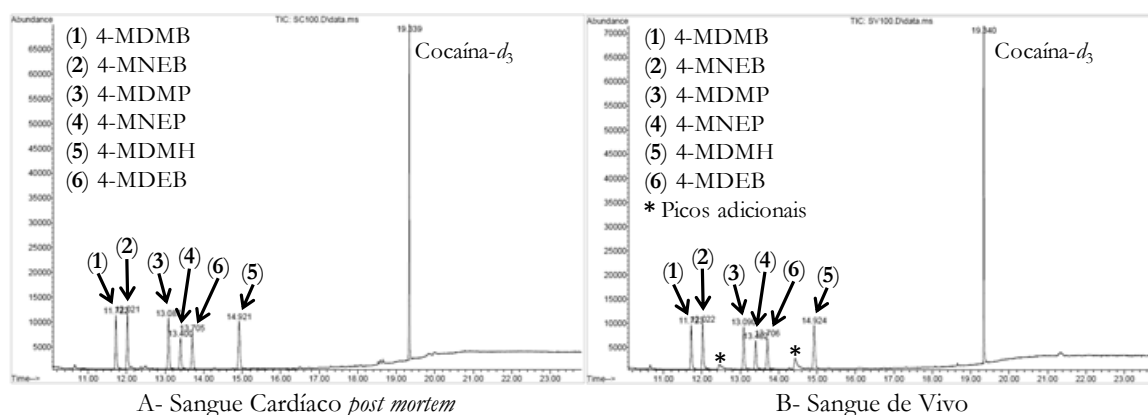


Figura 3.33. Cromatogramas da mistura de catinonas (1-6, 100 ng/mL de sangue) obtidos com diferentes tipos de sangue (A e B).

O quarto aspeto a otimizar foi a razão de *split* de modo a aumentar a sensibilidade do método, apresentando-se na Figura 3.34 uma sobreposição dos cromatogramas obtidos utilizando uma razão de *split* de 1:5, 1:3 ou o modo *splitless*, optando-se por utilizar uma razão de *split* de 1:3 uma vez que tal permitiu obter picos mais intensos, o que se irá refletir num aumento de sensibilidade do método.

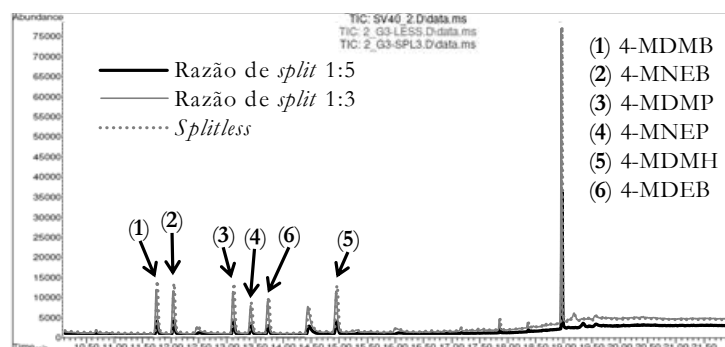


Figura 3.34. Sobreposição dos cromatogramas da mistura de catinonas (1-6, 0,3 µg/mL) obtidos com diferentes modos de injeção (razão de *split* de 1:5, 1:3 ou *splitless*).

O quinto e último aspeto a otimizar foi a escolha do solvente de lavagens das colunas de modo a utilizar o solvente que proporcionasse uma melhor eficiência de extração, apresentando-se na Figura 3.35 uma sobreposição dos cromatogramas obtidos utilizando cada um dos solventes testados e tendo-se verificado que não existia diferença significativa nos picos das catinonas, optando-se por utilizar MeOH uma vez que permitiu obter uma linha de base mais satisfatória.

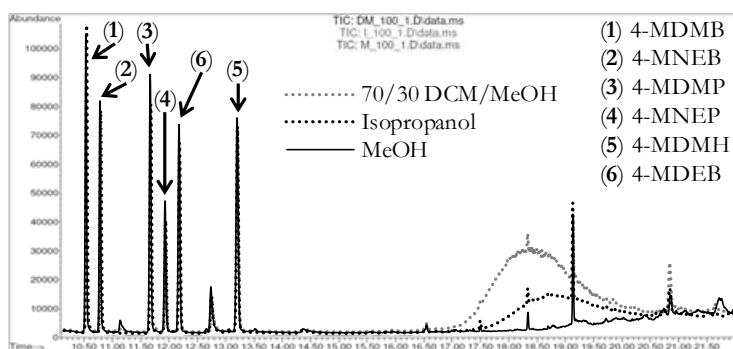


Figura 3.35. Sobreposição dos cromatogramas da mistura de catinonas (1-6, 100 ng/mL de sangue) obtidos com diferentes solventes de lavagem.

Validação do Método

Após a otimização do método analítico procedeu-se à sua validação, apresentando-se de seguida os resultados obtidos relativamente a cada um dos parâmetros avaliados.

Estudo de Seletividade

A avaliação da seletividade do método foi efetuada através da preparação de *pools* de sangue contendo amostras de sangue de quatro origens diferentes, que foram posteriormente analisados efetuando ou não a sua fortificação, sendo que a utilização de *pools* de sangue permitiu a análise de amostras com uma maior heterogeneidade, o que se reflete num estudo de seletividade mais completo. Deste modo, pretendeu-se avaliar a presença de sinais que pudessem interferir com os sinais dos compostos em estudo, bem como a percentagem de falsos positivos e falsos negativos.

O método otimizado foi aplicado na análise das amostras negativas e positivas, tendo-se verificado a ausência de analito para as 10 amostras que não foram fortificadas com as catinonas, e a presença e identificação de todos os compostos para as 10 amostras que foram fortificadas com as catinonas. Desta forma, o método analítico foi considerado seletivo, uma vez que se obteve 0% de falsos positivos e 0% de falsos negativos (cumprindo-se os critérios de validação de métodos do SQTF: 0% de falsos positivos e falsos negativos <10%).

Na Figura 3.36 apresenta-se, a título de exemplo, os cromatogramas obtidos para a *Pool* 1, quando não fortificado e quando fortificado com as catinonas (apresentando-se no Anexo H, da Figura 6.160 à 6.168 os cromatogramas obtidos para as restantes *pools* analisadas).

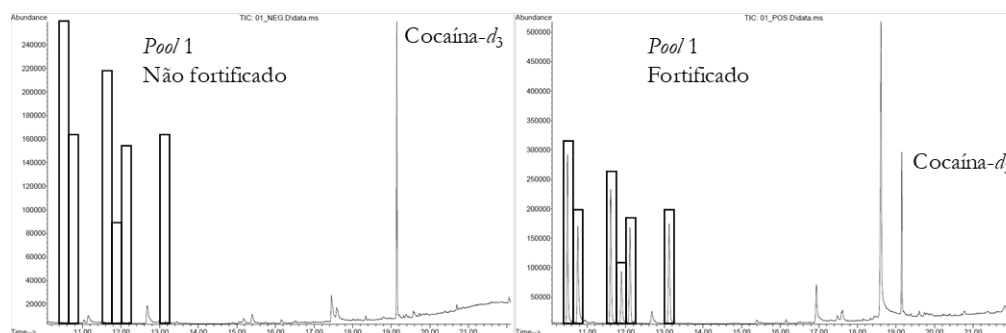


Figura 3.36. Cromatogramas obtidos para a *Pool 1*.

Eficiência do Processo de Extração (Recuperação)

A avaliação da eficiência da extração para cada catinona foi realizada para três gamas de trabalho, analisando três replicados para cada gama, fortificados antes e depois da extração. As amostras assim preparadas foram analisadas utilizando o método otimizado, tendo-se calculado a percentagem de recuperação por aplicação da Equação 2.1 do capítulo anterior e obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 3.25.

No Anexo I, da Figura 6.169 à 6.171 apresenta-se uma sobreposição dos cromatogramas obtidos para uma amostra fortificada antes da extração e uma depois da extração, para cada gama de trabalho.

Tabela 3.25. Resultados obtidos no estudo da recuperação ($n=3$).

Catinona	Fortificação ^a	Recuperação (%) ^b
4-MDMB (1)	25	80,9 ± 7,1
	100	88,2 ± 4,7
	500	81,6 ± 1,2
4-MNEB (2)	25	80,9 ± 6,1
	100	83,5 ± 2,1
	500	79,9 ± 1,9
4-MDMP (3)	25	76,9 ± 6,8
	100	82,6 ± 2,8
	500	80,1 ± 2,1
4-MNEB (4)	25	73,3 ± 5,7
	100	78,2 ± 1,5
	500	77,4 ± 2,2
4-MDMH (5)	25	77,3 ± 8,8
	100	80,8 ± 1,9
	500	78,4 ± 0,9
4-MDEB (6)	25	75,5 ± 9,7
	100	80,1 ± 2,8
	500	75,9 ± 5,2

^aConcentrações apresentadas em ng/mL;

^bValores médios ± desvio padrão

Uma vez que os valores médios de recuperação obtidos para cada catinona e cada gama de trabalho se encontram entre 73,3% e 88,2% e tendo em conta que, segundo os critérios de validação de métodos do SQTf, a recuperação deve encontrar-se entre 40% e 120%, pode concluir-se que o método extrativo utilizado apresenta uma eficiência adequada para todos os analitos, em todas as concentrações.

Limite de Detecção e Limite Inferior de Quantificação

O LOD de cada catinona corresponde à menor concentração na qual se verificarem valores de $S/N > 3$ e na qual se identificar o analito de acordo com os critérios da WADA (WADA, 2010). O estudo do LOD foi efetuado para as concentrações de 1, 2, 5 e 10 ng/mL, sendo possível observar o pico cromatográfico de cada catinona para todas as concentrações testadas (Figura 3.37); no entanto, apenas se verificou um valor de $S/N > 3$ para todos os iões monitorizados, particularmente para os iões de menor intensidade (m/z 91 e 119), e em todos os replicados para a concentração de 5 ng/mL, procedendo-se posteriormente à identificação inequívoca de cada catinona e estabelecendo-se, desta forma, um LOD de 5 ng/mL para todas as catinonas estudadas.

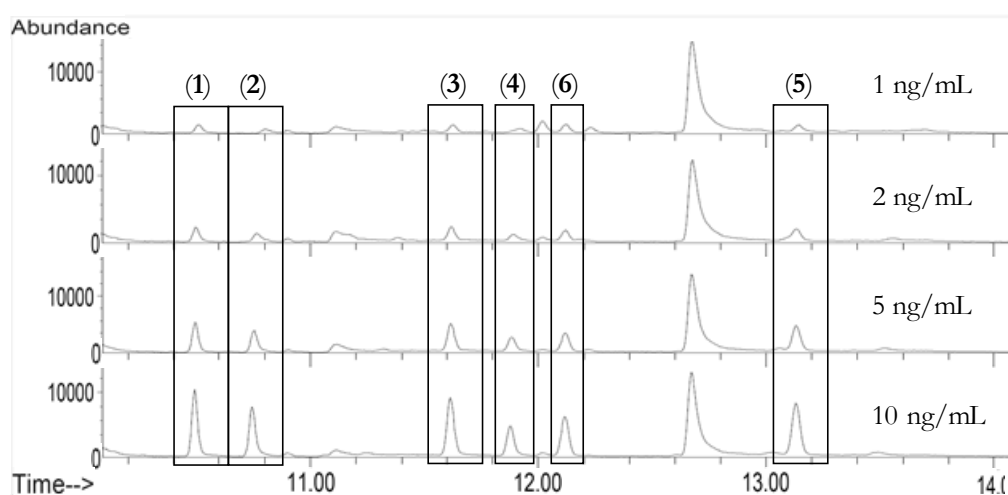


Figura 3.37. Comparação dos cromatogramas obtidos para o estudo do LOD.

O LLOQ de cada catinona corresponde à concentração do calibrador mais baixo no qual for possível identificar o analito de acordo com os critérios da WADA (WADA, 2010), quantificando-o com precisão e exatidão adequadas. Na Tabela 3.26 apresentam-se os valores de CV e ER obtidos para a concentração de 10 ng/mL aquando do estudo de precisão e exatidão *intraday*, verificando-se valores de $CV < 20\%$ e valores de ER entre $\pm 20\%$ da

concentração teórica, estabelecendo-se, desta forma, um LLOQ de 10 ng/mL para todas as catinonas estudadas.

Tabela 3.26. Resultados obtidos no estudo de precisão e exatidão *intraday* para uma concentração de 10 ng/mL.

Catinona	Concentração Medida^{a,b}	CV (%)	ER (%)
4-MDMB (1)	8,1 ± 1,2	14,3	-19,0
4-MNEB (2)	8,8 ± 0,9	10,4	-12,1
4-MDMP (3)	8,5 ± 1,1	12,7	-15,1
4-MNEB (4)	9,2 ± 0,9	10,1	-8,1
4-MDMH (5)	8,7 ± 1,1	12,3	-12,7
4-MDEB (6)	8,4 ± 1,2	14,5	-15,9

^aConcentrações apresentadas em ng/mL; ^bValores médios ± desvio padrão

Os valores de LOD e LLOQ encontrados na literatura para a detecção de catinonas, em sangue total, por GC-MS e recorrendo a SPE são de, respetivamente, 2, 5, 7, 10 e 25 ng/mL e de 5, 10, 25 e 100 ng/mL (deRoux & Dunn, 2017; Lee, et al., 2015; Liveri, et al., 2016; Margalho, et al., 2016; Wyman, et al., 2013), sendo que o LOD de 2 ng/mL foi conseguido para a pentedrona (Liveri, et al., 2016), o LOD e o LLOQ de 5 ng/mL para mefedrona, metcatinona e metedrona (Margalho, et al., 2016) e o LLOQ de 10 ng/mL para a MDPV (Wyman, et al., 2013). Ainda na literatura é possível encontrar valores de LOD e LLOQ inferiores, quando a detecção é efetuada, em sangue total, por GC-MS, mas recorrendo a LLE, verificando-se LOD de 0,3 ng/mL e LLOQ de 1 ng/mL para a 4'-clorometcatinona (Tomczak, et al., 2018) ou LOD de 1 ng/mL e LLOQ de 2 ng/mL para a α -PBP, α -PVP, MDPBP e MDPV (Namera, et al., 2013b). Relativamente à detecção de catinonas, em sangue total, por outras técnicas de análise, verifica-se que as técnicas que permitem atingir LOD e LLOQ mais baixos são as que recorrem a MS/MS, nomeadamente, LC/MS-MS com LLE (LOD de 0,0003 ng/mL e LLOQ de 0,01 ng/mL (Yamagishi, et al., 2018)) ou UHPLC-MS/MS com SPE (LOD de 0,02 ng/mL e LLOQ de 0,1 ng/mL (Zhang, et al., 2014)).

Desta forma, é possível concluir que o LOD e o LLOQ alcançados para o presente método (5 ng/mL e 10 ng/mL, respetivamente) se encontram na gama de valores reportados na literatura, tendo em conta a matriz biológica, técnica de análise e método de extração utilizados.

Avaliação do Fenômeno de Arrastamento (*Carry-over*)

O fenômeno de arrastamento consiste na presença de picos dos compostos analisados em amostras brancas injetadas após a análise de amostras de elevadas concentrações. Assim sendo, a avaliação deste fenômeno é extremamente importante uma vez que a sua existência pode afetar a precisão e exatidão do método analítico, principalmente para concentrações mais baixas, podendo mesmo levar à ocorrência de falsos positivos.

A avaliação do fenômeno de arrastamento foi efetuada através da análise de amostras brancas injetadas após o calibrador e o controlo mais altos ao longo do estudo de linearidade, não se tendo verificado fenómenos deste tipo (até 1000 ng/mL) uma vez que não foram detetados, nas amostras brancas, picos correspondentes às catinonas em estudo, como demonstrado na Figura 3.38.

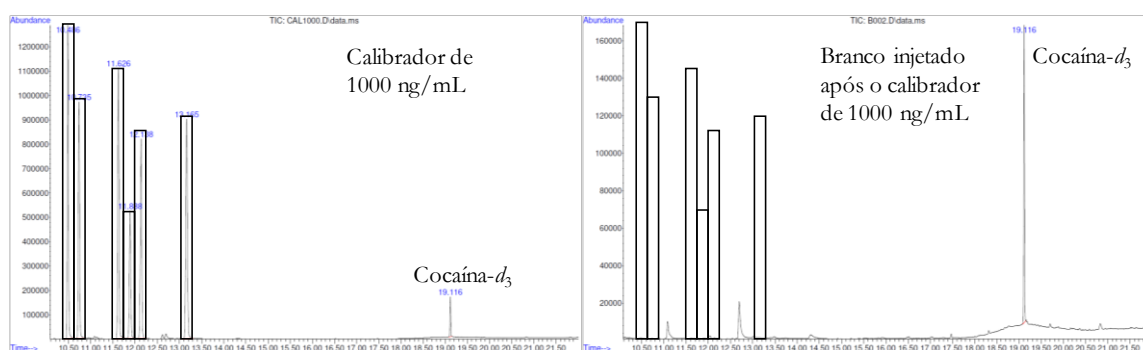


Figura 3.38. Cromatogramas obtidos para a avaliação do fenómeno de arrastamento (*carry-over*).

Linearidade e Modelo de Calibração

No estudo da linearidade aplicou-se o método dos mínimos quadrados ponderados, tendo-se selecionado o fator de ponderação $1/x^2$, uma vez que foi o que permitiu obter concentrações calculadas para cada calibrador mais próximas da concentração teórica, ou seja, foi o que permitiu obter um menor valor de ER.

Para além da escolha do fator de ponderação a utilizar, avaliou-se a linearidade para uma gama de concentrações de 10 a 1000 ng/mL, decidindo-se excluir o calibrador de 1000 ng/mL por forma a obter resultados mais lineares e um menor ER (melhorando-se a exatidão do método), como é possível verificar pela comparação das curvas de calibração obtidas incluindo ou não o calibrador de 1000 ng/mL apresentadas na Figura 3.39 para a 4-MDMB (**1**), a título de exemplo (apresentando-se no Anexo J, da Figura 6.172 à 6.176, uma comparação das curvas de calibração obtidas para as restantes catinonas).

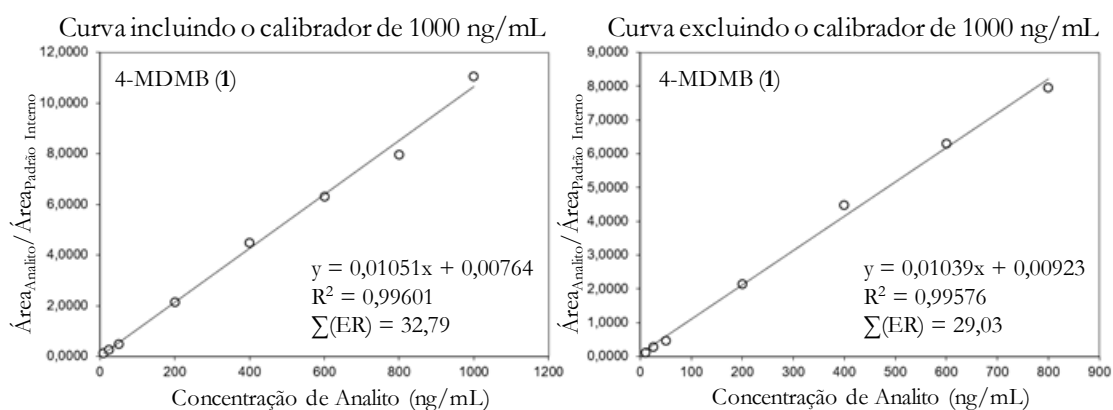


Figura 3.39. Comparação das curvas de calibração para a 4-MDMB (1) com e sem o calibrador a 1000 ng/mL.

Após a análise dos resultados obtidos para os cinco dias em que se efetuou o estudo de linearidade obtiveram-se curvas de calibração, para uma gama de concentrações de 10 a 800 ng/mL, com os valores médios de declive, interseção e R^2 apresentados na Tabela 3.27, verificando-se o cumprimento dos critérios de aceitação das curvas de calibração considerados pelo SQTf (valores de r e de R^2 superiores a 0,99).

Tabela 3.27. Dados de linearidade ($n=5$).

Catinona	Ponderação; Intervalo de linearidade ^a	Linearidade		R^2 ^b	LLOQ ^a	LOD ^a
		Declive ^b	Interseção ^b			
4-MDMB (1)	1/x ² ; 10-800	0,0128 ± 0,0018	-0,0012 ± 0,0176	0,9958 ± 0,0017	10	5
4-MNEB (2)	1/x ² ; 10-800	0,0093 ± 0,0011	-0,0100 ± 0,0086	0,9976 ± 0,0012	10	5
4-MDMP (3)	1/x ² ; 10-800	0,0119 ± 0,0013	-0,0078 ± 0,0102	0,9965 ± 0,0019	10	5
4-MNEP (4)	1/x ² ; 10-800	0,0056 ± 0,0005	-0,0073 ± 0,0038	0,9965 ± 0,0021	10	5
4-MDMH (5)	1/x ² ; 10-800	0,0120 ± 0,0013	-0,0108 ± 0,0095	0,9965 ± 0,0019	10	5
4-MDEB (6)	1/x ² ; 10-800	0,0094 ± 0,0010	-0,0029 ± 0,0091	0,9942 ± 0,0051	10	5

^aConcentrações apresentadas em ng/mL; ^bValores médios ± desvio padrão

Precisão e Exatidão *intraday* (repetibilidade) e *interday*

A precisão e exatidão foram avaliadas para amostras analisadas no mesmo dia (*intraday*) e para amostras analisadas em dias diferentes (*interday*) através do cálculo do CV e do ER, expressos em percentagem, utilizando, respetivamente, a Equação 2.2 e a Equação 2.3 do capítulo anterior e obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 3.28.

A análise dos resultados obtidos permitiu concluir que o método desenvolvido é preciso para todas as catinonas e para todas as concentrações estudadas, tanto para as amostras

analisadas no mesmo dia (*intraday*) como para as analisadas em dias diferentes (*interday*), uma vez que todos os valores de CV obtidos são <15% (ou <20% para o LLOQ) e é exato para todas as catinonas e para todas as concentrações estudadas, tanto para as amostras analisadas no mesmo dia (*intraday*) como para as analisadas em dias diferentes (*interday*), uma vez que todos os valores de ER obtidos se encontram entre $\pm 15\%$ (ou $\pm 20\%$ para o LLOQ) da concentração teórica.

Tabela 3.28. Resultados obtidos no estudo de precisão e exatidão *intraday* (repetibilidade, $n=6$) e *interday* ($n=5$).

Catinona	Fortificação ^a	<i>Intraday</i> ($n=6$)			<i>Interday</i> ($n=5$)		
		Conc. Medida ^{a,b}	CV (%)	ER (%)	Conc. Medida ^{a,b}	CV (%)	ER (%)
4-MDMB (1)	10	8,1 \pm 1,2	14,3	-19,0	10,1 \pm 0,4	3,5	0,6
	25	—	—	—	24,7 \pm 2,0	8,0	-1,3
	50	46,3 \pm 2,7	5,9	-7,5	49,4 \pm 2,9	5,9	-1,1
	200	187,6 \pm 14,7	7,8	-6,2	206,4 \pm 9,0	4,4	3,2
	400	—	—	—	415,6 \pm 21,9	5,3	3,9
	600	569,1 \pm 26,9	4,7	-5,1	590,2 \pm 22,6	3,8	-1,6
	800	745,7 \pm 27,0	3,6	-6,8	771,2 \pm 32,5	4,2	-3,6
4-MNEB (2)	10	8,8 \pm 0,9	10,4	-12,1	10,2 \pm 0,2	2,4	2,0
	25	—	—	—	24,1 \pm 1,2	5,2	-3,7
	50	49,0 \pm 2,7	5,5	-2,0	48,2 \pm 2,0	4,2	-3,5
	200	189,1 \pm 10,0	5,3	-5,5	202,5 \pm 5,1	2,5	1,2
	400	—	—	—	414,0 \pm 15,3	3,7	3,5
	600	577,6 \pm 23,9	4,1	-3,7	601,3 \pm 15,7	2,6	0,2
	800	815,6 \pm 27,9	3,4	1,9	801,9 \pm 22,1	2,8	0,2
4-MDMP (3)	10	8,5 \pm 1,1	12,7	-15,1	10,1 \pm 0,3	2,7	1,5
	25	—	—	—	24,4 \pm 1,7	6,9	-2,2
	50	45,7 \pm 3,7	8,1	-8,5	48,0 \pm 2,7	5,6	-4,0
	200	188,2 \pm 13,2	7,0	-5,9	204,7 \pm 6,6	3,2	2,3
	400	—	—	—	418,3 \pm 22,9	5,5	4,6
	600	602,5 \pm 35,3	5,9	0,4	596,6 \pm 11,3	1,9	-0,6
	800	763,3 \pm 36,7	4,8	-4,6	787,2 \pm 21,7	2,8	-1,6
4-MNEB (4)	10	9,2 \pm 0,9	10,1	-8,1	10,3 \pm 0,1	1,2	3,0
	25	—	—	—	23,8 \pm 0,7	3,0	-4,8
	50	46,9 \pm 2,6	5,5	-6,1	47,0 \pm 2,2	4,7	-6,0
	200	183,5 \pm 11,8	6,5	-8,3	198,1 \pm 5,7	2,9	-1,0
	400	—	—	—	417,6 \pm 20,6	4,9	4,4
	600	603,1 \pm 15,5	2,6	0,5	611,3 \pm 12,0	2,0	1,9
	800	803,7 \pm 28,6	3,6	0,5	819,7 \pm 29,2	3,6	2,5

^aConcentrações apresentadas em ng/mL; ^bValores médios \pm desvio padrão

Tabela 3.28. Continuação.

Catinona	Fortificação ^a	<i>Intraday (n=6)</i>			<i>Interday (n=5)</i>		
		Conc. Medida ^{a,b}	CV (%)	ER (%)	Conc. Medida ^{a,b}	CV (%)	ER (%)
4-MDMH (5)	10	8,7 ± 1,1	12,3	-12,7	10,3 ± 0,2	2,1	2,6
	25	—	—	—	23,9 ± 1,4	5,8	-4,4
	50	46,2 ± 2,2	4,8	-7,6	47,3 ± 2,1	4,5	-5,4
	200	194,8 ± 12,1	6,2	-2,6	203,6 ± 7,6	3,8	1,8
	400	—	—	—	415,3 ± 16,5	4,0	3,8
	600	590,2 ± 16,6	2,8	-1,6	602,7 ± 13,4	2,2	0,5
	800	760,1 ± 28,3	3,7	-5,0	808,4 ± 32,5	4,0	1,0
4-MDEB (6)	10	8,4 ± 1,2	14,5	-15,9	10,2 ± 0,39	3,9	2,1
	25	—	—	—	24,0 ± 2,6	10,9	-4,1
	50	43,2 ± 4,1	9,4	-13,6	48,2 ± 2,8	5,8	-3,6
	200	200,5 ± 8,8	4,4	0,2	206,7 ± 8,5	4,1	3,4
	400	—	—	—	417,4 ± 26,7	6,4	4,3
	600	596,6 ± 32,5	5,4	-0,6	599,1 ± 21,7	3,6	-0,1
	800	729,2 ± 38,0	5,2	-8,9	784,1 ± 31,8	4,1	-2,0

^aConcentrações apresentadas em ng/mL; ^bValores médios ± desvio padrão

Precisão Intermédia

A precisão intermédia foi avaliada utilizando os resultados obtidos para as amostras de controlo de cada dia de validação, tendo, desta forma, sido estudadas três gamas de trabalho, baixa (25 ng/mL), média (100 ng/mL) e alta (500 ng/mL), e tendo sido analisados três replicados para cada gama (n=15).

Os resultados obtidos foram utilizados para calcular o CV da Precisão Intermédia, segundo as equações apresentadas nas Tabelas 2.8 e 2.9 do capítulo anterior, calculando-se também o ER para cada gama de trabalho utilizando a Equação 2.3 do capítulo anterior e obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 3.29.

A análise dos resultados obtidos permitiu concluir que o método desenvolvido apresenta uma precisão intermédia e uma exatidão avaliada em condições de precisão intermédia adequadas, para todas as catinonas e para todas as concentrações estudadas, uma vez que todos os valores de CV_{SI} obtidos são <15% e todos os valores de ER obtidos se encontram entre ± 15% da concentração teórica.

Tabela 3.29. Resultados obtidos no estudo de precisão intermédia (*combined intra & interday*, $n=15$).

Catinona	Fortificação ^a	Precisão Intermédia ($n=15$)		
		Conc. Medida ^{a,b}	CV _{SI} (%)	ER (%)
4-MDMB (1)	25	23,6 ± 2,0	10,3	-5,4
	100	96,7 ± 9,0	9,6	-3,3
	500	483,6 ± 47,4	10,2	-3,3
4-MNEB (2)	25	25,6 ± 1,8	8,7	2,2
	100	105,4 ± 7,2	7,1	5,4
	500	547,6 ± 41,8	7,8	9,5
4-MDMP (3)	25	24,0 ± 2,0	10,5	-4,0
	100	98,5 ± 8,4	8,9	-1,5
	500	500,9 ± 42,8	8,7	0,2
4-MNEB (4)	25	24,5 ± 1,7	8,1	-1,9
	100	99,7 ± 6,0	6,1	-0,3
	500	530,0 ± 34,0	6,5	6,0
4-MDMH (5)	25	23,6 ± 1,9	10,7	-5,5
	100	96,0 ± 7,3	7,9	-4,0
	500	508,9 ± 41,0	8,2	1,8
4-MDEB (6)	25	23,2 ± 2,3	10,3	-7,3
	100	96,1 ± 10,0	10,8	-3,9
	500	489,2 ± 47,4	10,0	-2,2

^aConcentrações apresentadas em ng/mL; ^bValores médios ± desvio padrão

Robustez

O estudo da robustez do método analítico foi efetuado com o objetivo de avaliar o impacto das alterações que ocorrem naturalmente durante a validação de um método, tendo-se verificado que o método desenvolvido é robusto, uma vez que a resposta do método, avaliada com base nos resultados obtidos no estudo de precisão e exatidão, não foi afetada por alterações como mudança de *liner*, utilização de colunas de extração e de solventes de diferentes lotes, utilização de soluções de reagentes diferentes ou utilização de curvas de calibração diferentes.

Estudo de Estabilidade

A estabilidade das seis catinonas estudadas foi avaliada para três gamas de trabalho e cinco condições de armazenamento (descritas na secção ‘Estudo de Estabilidade’ do subcapítulo 2.5) tendo-se considerado um composto como estável quando a sua concentração na amostra a avaliar se encontrava incluída num intervalo de estabilidade definido como a concentração de uma amostra controlo ± 15%, apresentando-se os resultados obtidos na Tabela 3.30 e no Anexo K, da Figura 6.177 à 6.181 a sobreposição dos cromatogramas obtidos para uma amostra de controlo e cada uma das condições avaliadas.

Tabela 3.30. Resultados obtidos no estudo da estabilidade (n=3).

Catinona	3 ciclos de congelamento/descongelamento Frigorífico 1 semana												
	Reinjeção					Estável							
Fortificação ^a	Conc. Medida ^a	CV (%)	Intervalo de estabilidade	Estável	Conc. Medida ^a	CV (%)	Intervalo de estabilidade	Estável	Conc. Medida ^a	CV (%)	Intervalo de estabilidade	Estável	
4-MDMB (1)	25	22,7	8,8	19,8-26,8	✓	19,4	2,4	19,8-26,8	✗	17,4	5,8	19,1-25,9	✗
	100	81,6	3,2	77,0-104,1	✓	91,6	5,1	77,0-104,1	✓	84,8	3,4	76,5-103,5	✓
	500	404,3	5,9	378,2-511,7	✓	362,6	1,2	378,2-511,7	✗	352,4	11,	374,7-507,0	✗
4-MNEB (2)	25	23,6	6,3	21,5-29,1	✓	22,7	2,7	21,5-29,1	✓	23,8	3,9	22,3-30,1	✓
	100	90,9	5,2	84,2-113,9	✓	108,1	3,3	84,2-113,9	✓	107,5	4,3	87,2-118,0	✓
	500	477,4	5,1	443,8-600,5	✓	490,9	1,4	443,8-600,5	✓	502,0	9,2	441,9-597,8	✓
4-MDMP (3)	25	23,4	8,0	20,6-27,9	✓	15,7	2,0	20,6-27,9	✗	10,8	0,9	19,5-26,4	✗
	100	87,4	1,4	78,8-106,6	✓	76,6	3,3	78,8-106,6	✗	63,5	3,1	78,7-106,5	✗
	500	433,1	6,3	405,3-548,4	✓	268,8	3,1	405,3-548,4	✗	243,8	10,	390,7-528,6	✗
4-MNEP (4)	25	23,1	4,7	21,1-28,5	✓	20,6	2,5	21,1-28,5	✗	18,8	4,0	21,4-28,9	✗
	100	87,7	2,8	82,3-111,3	✓	97,7	5,2	82,3-111,3	✓	89,6	6,3	83,0-112,3	✓
	500	475,4	5,1	436,2-590,1	✓	416,1	2,8	436,2-590,1	✗	393,6	8,1	427,7-578,6	✗
4-MDMH (5)	25	22,5	7,1	19,9-26,9	✓	10,4	2,9	19,9-26,9	✗	d.	1,5	19,8-26,8	✗
	100	81,9	2,9	78,7-106,4	✓	46,5	7,4	78,7-106,4	✗	39,0	4,9	78,2-105,8	✗
	500	433,5	8,6	402,7-544,9	✓	158,3	3,3	402,7-544,9	✗	128,5	8,4	414,4-560,7	✗
4-MDEB (6)	25	23,0	8,1	19,2-26,0	✓	16,4	0,7	19,2-26,0	✗	12,2	1,7	18,0-24,4	✗
	100	84,2	2,7	77,3-104,5	✓	78,1	8,1	77,3-104,5	✓	71,8	3,2	74,8-101,2	✗
	500	418,4	7,2	385,2-521,1	✓	283,0	3,7	385,2-521,1	✗	263,2	9,0	376,7-509,6	✗

^aConcentrações apresentadas em ng/mL; **d.** - detetado, mas com concentração < LLOQ; **n.d.** - não detetado

Tabela 3.30. Continuação.

Catinona	Congelador 1 mês			Frigorífico 1 mês			
	Fortificação ^a	Conc. Medida ^a (%)	CV Intervalo de estabilidade	Estável	Conc. Medida ^a (%)	CV Intervalo de estabilidade	Estável
4-MDMB (1)	25	15,2	1,5 20,8-28,2	✗	12,1	5,6 20,8-28,2	✗
	100	79,9	13, 87,2-118,0	✗	79,6	2,6 87,2-118,0	✗
	500	354,7	10, 454,5-615,0	✗	400,0	13,0 454,5-615,0	✗
4-MNEB (2)	25	22,6	3,8 22,3-30,1	✓	19,0	7,4 22,3-30,1	✗
	100	105,0	11, 95,0-128,6	✓	95,5	4,7 95,0-128,6	✓
	500	529,8	9,8 500,0-676,5	✓	525,3	11,5 500,0-676,5	✓
4-MDMP (3)	25	d.	1,3 20,7-28,1	✗	n.d.	7,9 20,7-28,1	✗
	100	50,8	14, 90,0-121,8	✗	45,0	5,8 90,0-121,8	✗
	500	192,7	11, 453,4-613,4	✗	224,4	16,3 453,4-613,4	✗
4-MNEP (4)	25	18,6	4,4 21,1-28,5	✗	13,1	8,3 21,1-28,5	✗
	100	89,5	12, 88,7-120,0	✓	73,1	6,9 88,7-120,0	✗
	500	409,8	7,5 465,5-629,8	✗	343,5	13,9 465,5-629,8	✗
4-MDMH (5)	25	n.d.	1,5 20,6-27,9	✗	n.d.	6,5 20,6-27,9	✗
	100	23,9	11, 87,9-119,0	✗	20,0	1,6 87,9-119,0	✗
	500	84,3	15, 467,5-632,5	✗	87,9	10,4 467,5-632,5	✗
4-MDEB (6)	25	10,3	1,8 20,4-27,6	✗	n.d.	9,5 20,4-27,6	✗
	100	59,7	12, 88,1-119,2	✗	55,4	3,7 88,1-119,2	✗
	500	234,1	15, 446,9-604,6	✗	246,3	14,6 446,9-604,6	✗

^aConcentrações apresentadas em ng/mL; **d.** - detetado, mas com concentração < LLOQ; **n.d.** - não detetado

A análise dos resultados obtidos permitiu constatar que na reinjeção de *vials*, dois dias após a sua preparação, todas as catinonas se apresentaram estáveis. Relativamente às restantes condições, observou-se uma maior estabilidade para as amostras sujeitas a 3 ciclos de congelação/descongelação, seguida das amostras mantidas no frigorífico por 1 semana e das amostras congeladas por 1 mês, sendo que se verificou uma menor estabilidade para as amostras conservadas 1 mês no frigorífico. Desta forma, foi possível concluir que as catinonas não sofrem degradação após efetuado o processo de extração, no entanto a maioria sofre degradação quando mantidas na matriz biológica.

Relativamente a cada composto estudado (Figura 3.40), de uma forma geral, a catinona **2** apresentou-se como a mais estável (mantendo-se estável para todas as condições estudadas com exceção da amostra com concentração de 25 ng/mL conservada um mês no frigorífico). As catinonas **4** e **1** apresentaram-se menos estáveis que a **2**, demonstrando estabilidade idêntica entre si. A catinona **6** apresentou-se menos estável do que as anteriores, seguida da **3**, sendo a catinona **5** a mais instável. Adicionalmente, foi possível concluir que: mantendo o tipo de amina, a catinona apresenta-se mais estável quanto menor o tamanho da cadeia (a catinona **2** é mais estável que a **4**; e a catinona **1** é mais estável que a **3**, sendo esta mais estável que a **5**) e mantendo o tamanho da cadeia, a catinona apresenta-se mais estável se possuir uma amina secundária relativamente a uma amina terciária (a catinona **2** é mais estável que a **1** e a **6**; e a catinona **4** é mais estável que a **3**).

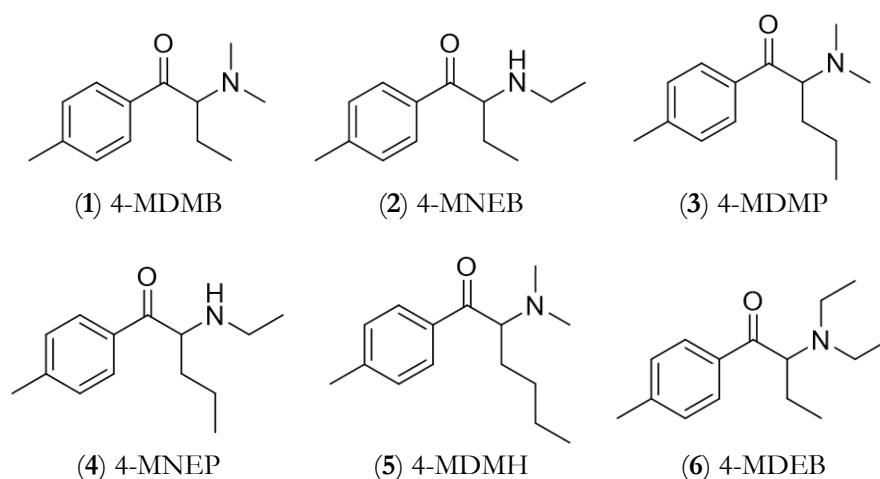


Figura 3.40. Estrutura das catinonas estudadas no presente trabalho.

Análise de Amostras Reais

Após efetuada a validação do método analítico, confirmando que este cumpre os objetivos desejados e que produz resultados de confiança, procedeu-se à sua aplicação para a análise de amostras reais. Para tal, selecionaram-se 6 amostras de sangue que tinham sido previamente analisadas no SQTf e cujo resultado se revelou positivo para anfetaminas (Tabela 2.10 do capítulo anterior), uma vez que os consumidores deste tipo de substâncias apresentam uma maior probabilidade de consumirem catinonas sintéticas, tendo em conta a semelhança dos efeitos provocados por estes dois grupos de substâncias psicoativas.

A análise dos resultados obtidos para cada amostra permitiu concluir que nenhuma contém qualquer das catinonas estudadas, como demonstrado pelos cromatogramas apresentados na Figura 3.41. Estes resultados podem ser explicados, por um lado, devido ao

facto de as amostras analisadas datarem de 2018 e 2019 e, tendo em conta que no estudo de estabilidade se constatou que as catinonas estudadas não são estáveis na matriz biológica durante longos períodos, é possível que tenha ocorrido a sua degradação e, por outro lado, devido ao facto de cinco das seis catinonas estudadas ainda não terem sido reportadas na Europa (até 2017), pelo que não era de esperar que se encontrassem em amostras reais, reforçando o carácter preventivo e a atitude proativa do presente trabalho.

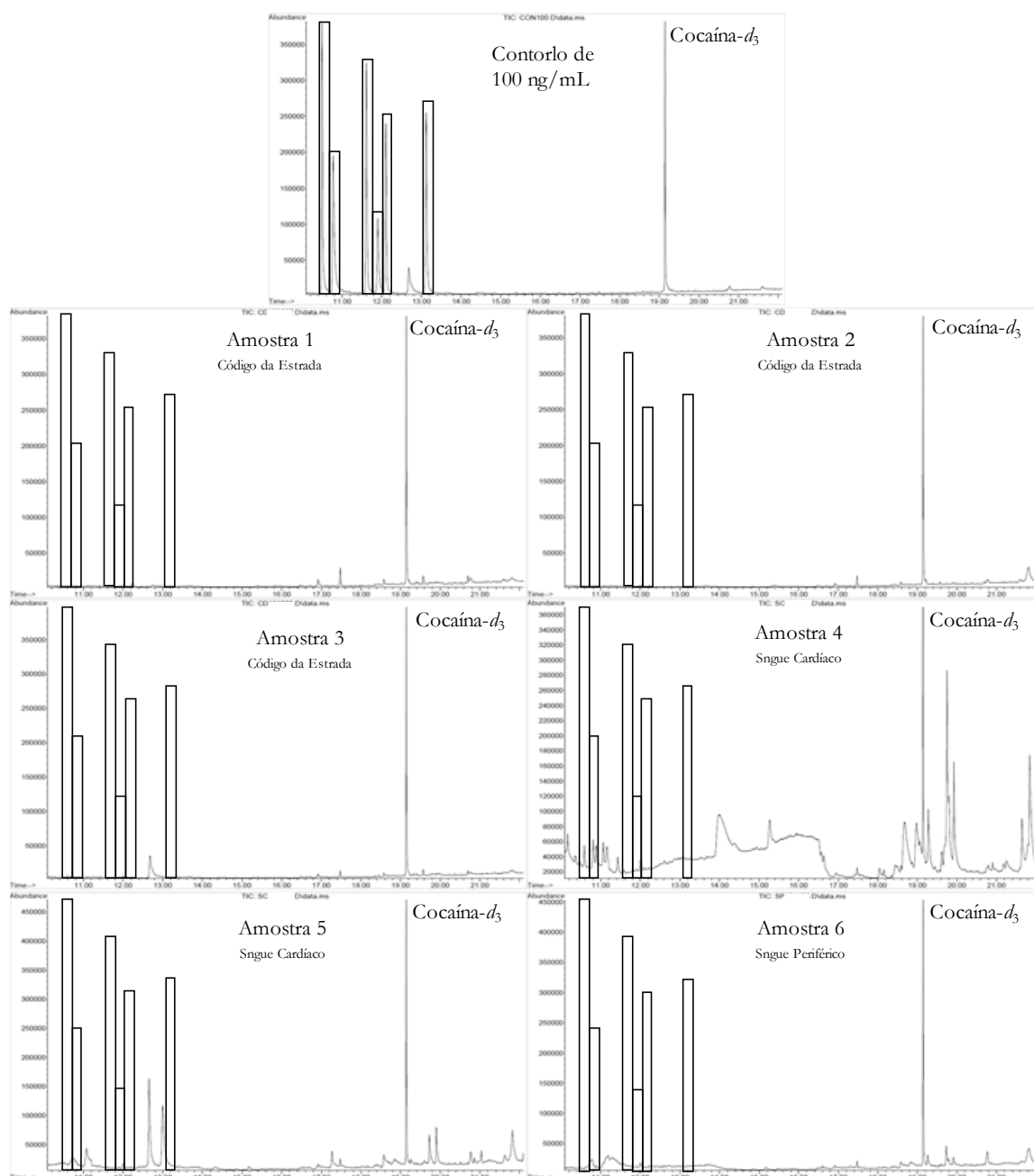


Figura 3.41. Cromatogramas obtidos para uma amostra controlo de 100 ng/mL e para as 6 amostras reais analisadas.

4. Conclusões

O primeiro objetivo desta dissertação foi a identificação de NSP em duas amostras de produtos apreendidos em Portugal, através de espectroscopia de RMN (^1H , ^{13}C APT, HSQC, COSY, HSQC-TOCSY e HMBC). As substâncias foram inequivocamente identificadas através da atribuição de todos os sinais observados nos espetros obtidos para cada substância identificada. Na Amostra 1, apresentada em forma de matriz vegetal, identificou-se, após a sua purificação por TLC preparativa, o canabinoide sintético 5F-ADB, que foi em 2018 adicionado à Convenção das Nações Unidas de 1971, passando a ser, desta forma, considerado como uma droga. Esta droga foi incluída no Decreto-Lei n.º 15/93 em fevereiro de 2019. Na Amostra 2, apresentada em forma de pó, identificou-se o derivado de fenciclidina 3-MeO-PCP, uma NSP abrangida pelo Decreto-Lei n.º 54/2013. Estas duas substâncias psicoativas são controladas em Portugal e provocam efeitos tóxicos letais.

O segundo objetivo deste trabalho foi a síntese de seis catinonas sintéticas: 4-MDMB (1), 4-MNEB (2), 4-MDMP (3), 4-MNEP (4), 4-MDMH (5) e 4-MDEB (6). As catinonas foram sintetizadas tendo por base um procedimento composto por três passos (formação da cetona, devidamente purificada por cromatografia em coluna, formação em meio ácido da respetiva α -bromocetona, utilizada sem nenhum tipo de purificação na formação da catinona pretendida na forma de cloridrato) e efetuou-se a sua caracterização por RMN, HRMS-ESI e GC-FID, tendo-se obtido entre 349 mg e 1,345 g de cada composto, com rendimentos globais entre 7% e 27% e pureza de 94%-97% (adequada para a utilização na validação de métodos analíticos). Das seis catinonas sintetizadas a 4-MDMP, a 4-MDMH e a 4-MDEB são compostos nunca reportados na literatura, a 4-MDMB e a 4-MNEB encontram-se disponíveis para venda na *Cayman Chemical* e a 4-MNEP foi reportada na Europa, encontrando-se caracterizada na literatura.

O último objetivo desta dissertação consistiu na validação de um método analítico para a deteção e quantificação por GC-MS e recorrendo a SPE, em sangue, das seis catinonas sintetizadas, para que a sua análise pudesse ser integrada na rotina laboratorial do SQTf. Antes de ser validado, o método foi otimizado obtendo-se uma separação, sensibilidade e extração adequadas. A identificação dos compostos foi realizada com base nos critérios da WADA, utilizando-se como padrão interno cocaína- d_3 , e a sua extração foi efetuada utilizando colunas de SPE com um mecanismo de retenção misto (Oasis[®] MCX). O método foi validado, utilizando amostras de sangue branco total, segundo os critérios da *International Conference on*

Harmonisation, da *Food and Drug Administration*, do *Scientific Working Group for Forensic Toxicology*, bem como os critérios internos do SQTf.

Durante a validação do método efetuou-se um estudo de seletividade, concluindo-se que o método analítico seria seletivo, e efetuou-se também uma avaliação da eficiência do processo de extração, obtendo-se recuperações entre 73,3% e 88,2%. Os limites de deteção e de quantificação foram determinados, obtendo-se respetivamente 5 e 10 ng/mL para todos os analitos. O método analítico foi linear entre 10 e 800 ng/mL, utilizando-se um fator de ponderação de $1/x^2$, devido à heterocedasticidade dos resultados, obtendo-se curvas de calibração com um R^2 superior a 0,99 para todos os analitos.

O método analítico apresentou-se preciso e exato uma vez que os resultados obtidos para CV e ER *intra* e *interday* se encontraram de acordo com os critérios considerados, bem como o CV e ER obtidos durante o estudo de precisão intermédia. A avaliação da existência de fenómenos de arrastamento e da robustez do método permitiram constatar a ausência de tais fenómenos e considerar o método como robusto. O estudo de estabilidade efetuado em função das condições de armazenamento (variando o tempo e a temperatura) permitiu concluir que a catinona mais estável foi a 4-MNEB, seguida da 4-MNEP, da 4-MDMB, da 4-MDEB, da 4-MDMP e, por fim, da 4-MDMH.

Desta forma, apresenta-se pela primeira vez a validação de um método analítico para a deteção e quantificação, em sangue total, das seis catinonas estudadas. O método validado foi aplicado na análise de amostras reais que tinham produzido resultados positivos para anfetaminas, não se revelando, no entanto, positivas para as catinonas em estudo. Este facto pode ser explicado uma vez que cinco das seis catinonas estudadas ainda não foram reportadas na Europa (até 2017), pelo que não seria de esperar que se encontrassem em amostras reais, reforçando o carácter preventivo e a atitude proativa do presente trabalho.

Relativamente a trabalhos futuros, poderá ser importante, por um lado, efetuar a validação de métodos de deteção e quantificação das catinonas estudadas noutras matrizes biológicas como a urina ou a saliva, dado que estas são colhidas de forma não invasiva ou, por outro lado, desenvolver métodos de análise para substâncias de outros grupos de NSP, nomeadamente canabinoides sintéticos, tendo em conta a sua elevada toxicidade e efeitos letais, como é o caso do 5F-ADB identificado neste trabalho.

Por fim, é fundamental salientar que a colaboração entre instituições é de extrema importância para a investigação sobre NSP, para que possa existir uma adequada monitorização e controlo das substâncias que se encontram a circular no mercado de drogas europeu e português, bem como de novas substâncias que poderão surgir a qualquer instante.

5. Referências

- Adamowicz, P. et al., 2016a. 3-Methylmethcathinone—Interpretation of Blood Concentrations Based on Analysis of 95 Cases. *Journal of Analytical Toxicology*, 40(4), pp. 272-276.
- Adamowicz, P. et al., 2016b. Blood concentrations of α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP) determined in 66 forensic samples. *Forensic Toxicology*, Volume 34, pp. 227-234.
- Adamowicz, P., Gil, D., Skulska, A. & Tokarczyk, B., 2013a. Analysis of MDPV in Blood—Determination and Interpretation. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 37, pp. 308-312.
- Adamowicz, P. & Hydzik, P., 2019. Fetal death associated with the use of 3,4-MDPHP and α -PHP. *Clinical Toxicology*, 52(2), pp. 112-116.
- Adamowicz, P. & Tokarczyk, B., 2016. Simple and rapid screening procedure for 143 new psychoactive substances by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, Volume 8, pp. 652-667.
- Adamowicz, P., Tokarczyk, B., Stanaszek, R. & Slopianka, M., 2013b. Fatal Mephedrone Intoxication—A Case Report. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(1), pp. 37-42.
- Adamowicz, P., Zuba, D. & Byrska, B., 2014. Fatal intoxication with 3-methyl-N-methylcathinone (3-MMC) and 5-(2-aminopropyl)benzofuran (5-APB). *Forensic Science International*, Volume 245, pp. 126-132.
- Aknouche, F., Guibert, E., Tessier, A. & Kintz, P., 2017. Presence of mephedrone and methylone in an attempted suicide: A surprising result where toxicological analyses have changed the initial conclusions. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 29(1), pp. 130-133.
- 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 Advances*, 6(84), pp. 80576-80584.
- Alremeithi, R. et al., 2018. Simultaneous Quantitative Determination of Synthetic Cathinone Enantiomers in Urine and Plasma Using GC-NCI-MS. *Journal of analytical methods in chemistry*, Volume 2018, p. 4396043.

- Al-Saffar, Y., Stephanson, N. N. & Beck, O., 2013. Multicomponent LC–MS/MS screening method for detection of new psychoactive drugs, legal highs, in urine—Experience from the Swedish population. *Journal of Chromatography B*, Volume 930, pp. 112-120.
- Alsenedi, K. A. & Morrison, C., 2018. Determination and long-term stability of twenty-nine cathinones and amphetamine-type stimulants (ATS) in urine using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Volume 1076, pp. 91-102.
- Amaratunga, P., Lemberg, B. L. & Lemberg, D., 2013. Quantitative Measurement of Synthetic Cathinones in Oral Fluid. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 37, pp. 622-628.
- Ambach, L., Redondo, A. H., König, S. & Weinmann, W., 2014. Rapid and simple LC-MS/MS screening of 64 novel psychoactive substances using dried blood spots. *Drug Testing and Analysis*, Volume 6, pp. 367-375.
- Ammann, D., McLaren, J. M., Gerostamoulos, D. & Beye, J., 2012. Detection and Quantification of New Designer Drugs in Human Blood: Part 2 - Designer Cathinones. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 36, pp. 381-389.
- Anizan, S. et al., 2014. 3,4-Methylenedioxypropylone (MDPV) and metabolites quantification in human and rat plasma by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, Volume 827, pp. 54-63.
- Arunotayanun, W. & Gibbons, S., 2012. Natural product ‘legal highs’. *Natural Product Reports*, 29(11), p. 1304–1316.
- Assembleia da República Portuguesa, 2000. Lei n.º 30/2000 de 29 de novembro. *Diário da República*, Série I-A(276), pp. 6829-6833.
- Assembleia Legislativa da R. Aut. da Madeira, 2012. Decreto Legislativo Regional n.º 28/2012/M. *Diário da República*, 1.ª série(207), pp. 6040-6046.
- Atherton, D., Dye, D., Robinson, C. A. & Beck, R., 2019. n-Ethyl Pentylone-Related Deaths in Alabama. *Journal of Forensic Sciences*, 64(1), pp. 304-305.
- Babor, T., Campbell, R., Room, R. & Saunders, J., 1994. *Lexicon of Alcohol and Drug Terms*. World Health Organization.
- Bäckberg, M., Lindeman, E., Beck, O. & Helander, A., 2015. Characteristics of analytically confirmed 3-MMC-related intoxications from the Swedish STRIDA project. *Clinical Toxicology*, 53(1), pp. 46-53.
- Bakota, E., Arndt, C., Romoser, A. A. & Wilson, S. K., 2016. Fatal Intoxication Involving 3-MeO-PCP: A Case Report and Validated Method. *Journal of Analytical Toxicology*, 40(7), pp. 504-510.
- Banister, S. D. et al., 2016. Pharmacology of Valinate and tert-Leucinate Synthetic Cannabinoids 5F-AMBICA, 5F-AMB, 5F-ADB, AMB-FUBINACA, MDMB-

- FUBINACA, MDMB-CHMICA, and Their Analogues. *ACS Chemical Neuroscience*, 7(9), p. 1241–1254.
- Barrios, L. et al., 2016. Death following ingestion of methyldone. *International Journal of Legal Medicine*, 130(2), pp. 381-385.
- Beck, O. et al., 2015. Intoxications involving MDPV in Sweden during 2010–2014: Results from the STRIDA project. *Clinical Toxicology*, 53(9), pp. 865-873.
- Bell, C., George, C., Kicman, A. T. & Traynor, A., 2011. Development of a rapid LC-MS/MS method for direct urinalysis of designer drugs. *Drug Testing and Analysis*, Volume 3, pp. 496-504.
- Bertol, E. et al., 2014. A mixed MDPV and benzodiazepine intoxication in a chronic drug abuser: Determination of MDPV metabolites by LC–HRMS and discussion of the case. *Forensic Science International*, Volume 243, pp. 149-155.
- Beyer, J., Peters, F. T., Kraemer, T. & Maurer, H. H., 2007. Detection and validated quantification of nine herbal phenalkylamines and methcathinone in human blood plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization. *Journal Mass Spectrometry*, Volume 42, pp. 150-160.
- Bogusz, M. J., Krüger, K.-D. & Maier, R.-D., 2000. Analysis of Underivatized Amphetamines and Related Phenethylamines with High-Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 24, pp. 77-84.
- Borovcová, L., Pauk, V. & Lemr, K., 2018. Analysis of new psychoactive substances in human urine by ultra-high performance supercritical fluid and liquid chromatography: Validation and comparison. *Journal of Separation Science*, 41(10), pp. 2288-2295.
- Boumba, V. A. et al., 2017. The analysis of 132 novel psychoactive substances in human hair using a single step extraction by tandem LC/MS. *Forensic Science International*, Volume 279, pp. 192-202.
- Brandt, S. D., King, . L. A. & Evans-Brown, M., 2014. The new drug phenomenon. *Drug Testing Analysis*, 6(7-8), p. 587–597.
- Bruice, P. Y., 2016. *Organic Chemistry*. 8^o ed. USA: Pearson Education.
- Castro, A. d. et al., 2014. Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of selected synthetic cathinones and two piperazines in oral fluid. Cross reactivity study with an on-site immunoassay device. *Journal of Chromatography A*, Volume 1374, pp. 93-101.

- Clayden, J., Greeves, N. & Warren, S., 2012. *Organic Chemistry*. 2^o ed. New York: Oxford University Press.
- Concheiro, M., Anizan, S., Ellefsen, K. & Huestis, M. A., 2013. Simultaneous quantification of 28 synthetic cathinones and metabolites in urine by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Volume 405, pp. 9437-9448.
- Concheiro, M., Castaneto, M., Kronstrand, R. & Huestisa, M. A., 2015. Simultaneous determination of 40 novel psychoactive stimulants in urine by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and library matching. *Journal of Chromatography A*, Volume 1397, pp. 32-42.
- Conselho da União Europeia, 2005. Decisão 2005/387/JAI do Conselho de 10 de Maio de 2005 relativa ao intercâmbio de informações, avaliação de riscos e controlo de novas substâncias psicoativas. *Jornal Oficial da União Europeia*, Volume L 127, pp. 32-37.
- Conselho da União Europeia, 2017. Diretiva (UE) 2017/2103 do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de novembro de 2017 que altera a Decisão-Quadro 2004/757/JAI do Conselho a fim de incluir novas substâncias psicoativas na definição de droga e revoga a Decisão 2005/387/JAI do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*, Volume L 305, pp. 12-18.
- Cosbey, S. H., Peters, K. L., Quinn, A. & Bentley, A., 2013. Mephedrone (Methylmethcathinone) in Toxicology Casework: A Northern Ireland Perspective. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 37, pp. 74-82.
- Costa, J. L. et al., 2019. Analytical quantification, intoxication case series, and pharmacological mechanism of action for N-ethylnorpentylone (N-ethylpentylone or ephylone). *Drug Testing and Analysis*, Volume 11, pp. 461-471.
- Couto, R. A. S. et al., 2018. The Analytical Challenge in the Determination of Cathinones, Key-Players in the Worldwide Phenomenon of Novel Psychoactive Substances. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48(5), pp. 372-390.
- Crew, 2017. *NPS at Crew Annual Report 2016-2017*, Edinburgh: Crew.
- De Paoli, G. et al., 2013. From the Street to the Laboratory: Analytical Profiles of Methoxetamine, 3-Methoxyeticyclidine and 3-Methoxyphencyclidine and their Determination in Three Biological Matrices. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(5), p. 277-283.

- deRoux, S. J. & Dunn, W. A., 2017. “Bath Salts” the New York City Medical Examiner Experience: A 3-Year Retrospective Examiner Experience: A 3-Year Retrospective. *Journal of Forensic Sciences*, 62(3), pp. 695-699.
- Derungs, A. et al., 2011. Sympathomimetic toxicity in a case of analytically confirmed recreational use of naphyrone (naphthylpyrovalerone). *Clinical Toxicology*, Volume 49, pp. 691-693.
- Dickson, A. J., Vorce, S. P., Levine, B. & Past, M. R., 2010. Multiple-Drug Toxicity Caused by the Coadministration of 4-Methylmethcathinone (Mephedrone) and Heroin. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 34, pp. 162-168.
- Diestelmann, M. et al., 2018. MDPV in forensic routine cases: Psychotic and aggressive behavior in relation to plasma concentrations. *Forensic Science International*, Volume 283, pp. 72-84.
- Dolan, J. W., 2012. When Should an Internal Standard Be Used?. *LCGC North America*, 30(6), p. 474-480.
- Ellefsen, K. N., Concheiro, M. & Huestis, M. A., 2016. Synthetic cathinone pharmacokinetics, analytical methods, and toxicological findings from human performance and postmortem cases. *Drug Metabolism Reviews*, 48(2), pp. 237-265.
- Ellefsen, K. N. et al., 2015. Quantification of methylone and metabolites in rat and human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, 33(2), pp. 202-212.
- EMCDDA, 2006. *Monitoring New Drugs*. Luxemburgo: Office for Official Publications of the European Communities.
- EMCDDA, 2014. *EMCDDA–Europol 2014 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA*, Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- EMCDDA, 2017. *Perspetivas sobre drogas. Os canabinoides sintéticos na Europa.*, Lisboa: EMCDDA.
- EMCDDA, 2018a. *Fentanils and synthetic cannabinoids: driving greater complexity into the drug situation. An update from the EU Early Warning System*, Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- EMCDDA, 2018b. *Relatório Europeu sobre Drogas 2018: Tendências e evoluções*, Luxemburgo: Serviço das Publicações da União Europeia.
- EMCDDA, 2018c. *Report on the risk assessment of methyl 2-([1-(5-fluoropentyl)-1H-indazole-3-carbonyl]amino)-3,3-dimethylbutanoate (5F-MDMB-PINACA; 5F-ADB) in the framework of the Council Decision on new psychoactive substances*, Luxembourg: Publications Office of the European Union.

- Fattore, L. & Fratta, W., 2011. Beyond THC: the new generation of cannabinoid designer drugs. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5(60), pp. 1-12.
- FDA, 2018. *Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. [Online] Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry> [Acedido em 6 junho 2019].
- Fernandez, M. d. M. R. et al., 2007. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Analysis of Multiple Hallucinogens, Chlorpheniramine, Ketamine, Ritalinic Acid, and Metabolites, in Urine. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 31, pp. 497-504.
- Ferreira, B. et al., 2019. The novel psychoactive substance 3-methylmethcathinone (3-MMC or metaphedrone): A review. *Forensic Science International*, Volume 295, pp. 54-63.
- Freni, F. et al., 2019. A multi-analyte LC-MS/MS method for screening and quantification of 16 synthetic cathinones in hair: Application to postmortem cases. *Forensic Science International*, Volume 298, pp. 115-120.
- Frison, G. et al., 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*, Volume 265, pp. 131-137.
- Fulmer, G. R. et al., 2010. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics*, 29(9), p. 2176-2179.
- Gaspar, H. et al., 2018. Proactive response to tackle the threat of emerging drugs: Synthesis and toxicity evaluation of new cathinones. *Forensic Science International*, Volume 290, p. 146-156.
- Gerace, E. et al., 2014. Toxicological findings in a fatal multidrug intoxication involving mephedrone. *Forensic Science International*, Volume 243, pp. 68-73.
- Gil, D. et al., 2013. Analysis of 4-MEC in biological and non-biological material—Three case reports. *Forensic Science International*, Volume 228, pp. e11-e15.
- Giné, C. V., Espinosa, I. F. & Vilamala, M. V., 2014. New psychoactive substances as adulterants of controlled drugs. A worrying phenomenon?. *Drug Testing and Analysis*, Volume 6, pp. 819-824.

- Glicksberg, L., Bryand, K. & Kerrigan, S., 2016. Identification and quantification of synthetic cathinones in blood and urine using liquid chromatography-quadrupole/time of flight (LC-Q/TOF) mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Volume 1035, pp. 91-103.
- Gottlieb, H. E., Kotlyar, V. & Nudelman, A., 1997. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry*, 62(21), pp. 7512-7515.
- Grapp, M., Kaufmann, C. & Ebbecke, M., 2017. Toxicological investigation of forensic cases related to the designer drug 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV): Detection, quantification and studies on human metabolism by GC-MS. *Forensic Science International*, Volume 273, pp. 1-9.
- Griffiths, A., Johnston, M. & Hadley, L., 2016. MDPV in Queensland Drivers. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 48(2), pp. 222-229.
- Guale, F. et al., 2013. Validation of LC-TOF-MS screening for drugs, metabolites, and collateral compounds in forensic toxicology specimens. *Journal of analytical toxicology*, 37(1), pp. 17-24.
- Hagan, K. S. & Reidy, L., 2015. Detection of synthetic cathinones in victims of sexual assault. *Forensic Science International*, Volume 257, pp. 71-75.
- Hambuchen, M. D., Hendrickson, H. P. & Owens, S. M., 2017. Chiral determination of 3,4-methylenedioxypyrovalerone enantiomers in rat serum. *Analytical Methods*, 9(4), pp. 609-617.
- Hamby, D. et al., 2015. Identification of 2-(ethylamino)-1-(4-methylphenyl)-1-pentanone (4-MEAP), a New “Legal High” Sold by an Internet Vendor as 4-Methyl Pentedrone. *Journal of Forensic Sciences*, 60(3), pp. 721-726.
- Hasegawa, K. et al., 2015. Identification and quantitation of 5-fluoro-ADB, one of the most dangerous synthetic cannabinoids, in the stomach contents and solid tissues of a human cadaver and in some herbal products. *Forensic Toxicology*, 33(1), pp. 112-121.
- Hong, W.-Y. et al., 2015. Determination of Synthetic Cathinones in Urine Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry Techniques. *Journal of Analytical Toxicology*, 40(1), pp. 12-16.
- Houck, M. M. & Siegel, J. A., 2015. *Fundamentals of Forensic Science*. 3^o ed. Oxford/Califórnia: Academic Press.
- Howlett, A. et al., 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors.. *Pharmacological Reviews*, 54(2), pp. 161-202.

- Hulshoff, A. & Lingeman, H., 1984. Derivatization reactions in the gas-liquid chromatographic analysis of drugs in biological fluids. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2(3/4), pp. 337-38.
- Hyde, J. F., Browning, E. & Adams, R., 1928. Synthetic Homologs of d,l-ephedrine. *Journal of the American Chemical Society*, 50(8), pp. 2287-2292.
- ICH, 2005. *International Council for Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* Q2(R1). [Online] Available at: <https://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/analytical-procedure-development-and-revision-of-q2r1-analytical-validation-copy-1.html> [Acedido em 6 junho 2019].
- Jamey, C., Kintz, P., Martrille, L. & Raul, J.-S., 2016. Fatal Combination with 3-Methylmethcathinone (3-MMC) and Gamma-Hydroxybutyric Acid (GHB). *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 40, pp. 546-552.
- Johnson, R. D. & Botch-Jones, S. R., 2013. The Stability of Four Designer Drugs: MDPV, Mephedrone, BZP and TFMPP in Three Biological Matrices under Various Storage Conditions. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 37, pp. 51-55.
- Kankaanpää, A. et al., 2004. Single-step procedure for gas chromatography–mass spectrometry screening and quantitative determination of amphetamine-type stimulants and related drugs in blood, serum, oral fluid and urine samples. *Journal of Chromatography B*, 810(1), pp. 57-68.
- Katz, D. P. et al., 2014. Synthetic cathinones: “A khat and mouse game”. *Toxicology Letters*, Volume 229, p. 349–356.
- Kikura-Hanajiri, R. et al., 2007. The disposition into hair of new designer drugs; methylone, MBDB and methcathinone. *Journal of Chromatography B*, Volume 855, pp. 121-126.
- Kim, J. Y. et al., 2007. Simultaneous determination of psychotropic phenylalkylamine derivatives in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 21, pp. 1705-1720.
- Kintz, P., 2017. Evidence of 2 Populations of Mephedrone Abusers by Hair Testing. *Current Neuropharmacology*, Volume 15, pp. 658-662.
- Kriikku, P., Wilhelm, L., Schwarz, O. & Rintatalo, J., 2011. New designer drug of abuse: 3,4-Methylenedioxypropylone (MDPV). Findings from apprehended drivers in Finland. *Forensic Science International*, Volume 210, pp. 195-200.

- Kudo, K. et al., 2015. A fatal case of poisoning related to new cathinone designer drugs, 4-methoxy PV8, PV9, and 4-methoxy PV9, and a dissociative agent, diphenidine. *Legal Medicine*, 17(5), pp. 421-426.
- Kusano, M. et al., 2018. Fatal intoxication by 5F-ADB and diphenidine: Detection, quantification, and investigation of their main metabolic pathways in humans by LC/MS/MS and LC/Q-TOFMS. *Drug Testing and Analysis*, 10(2), pp. 284-293.
- Langer, N. et al., 2016. Identification and quantification of synthetic cannabinoids in “spicelike” herbal mixtures: Update of the German situation for the spring of 2016. *Forensic Science International*, Volume 269, pp. 31-41.
- Lavado, E. et al., 2018. *Novas Substâncias Psicoativas em Portugal. Metodologia Trendspotter / Relatório Final, 2018*, Lisboa: Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências.
- Lee, D., Chronister, C. W., Hoyer, J. & Goldberger, B. A., 2015. Ethylone-Related Deaths: Toxicological Findings. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 39, pp. 567-571.
- Lehmann, S. et al., 2017. Determination of 74 new psychoactive substances in serum using automated in-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Volume 1064, p. 124–138.
- Lendoiro, E. et al., 2017. An LC-MS/MS methodological approach to the analysis of hair for amphetamine-type-stimulant (ATS) drugs, including selected synthetic cathinones and piperazines. *Drug Testing and Analysis*, 9(1), pp. 96-105.
- Lin, D.-L. et al., 2008. Chemical Derivatization for the Analysis of Drugs by GC-MS — A Conceptual Review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(1), pp. 1-10.
- Liveri, K., Constantinou, M. A., Afxentiou, M. & Kanari, P., 2016. A fatal intoxication related to MDPV and pentedrone combined with antipsychotic and antidepressant substances in Cyprus. *Forensic Science International*, Volume 265, pp. 160-165.
- Li, X. et al., 2014. Sensitive hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for rapid detection, quantification and confirmation of cathinone-derived designer drugs for doping control in equine plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28(2), pp. 217-229.
- Lusthof, K. J. et al., 2011. A case of extreme agitation and death after the use of mephedrone in The Netherlands. *Forensic Science International*, 206(1), pp. e93-e95.
- Maas, A., Wippich, C., Madea, B. & Hess, C., 2015. Driving under the influence of synthetic phenethylamines: a case series. *International Journal of Legal Medicine*, 129(5), pp. 997-1003.
- Marais, A. A. & Laurens, J. B., 2009. Rapid GC-MS confirmation of amphetamines in urine by extractive acylation. *Forensic Science International*, 183(1), pp. 78-86.

- Margalho, C. et al., 2016. Determination of “new psychoactive substances” in postmortem matrices using microwave derivatization and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Volume 1020, pp. 14-23.
- Marinetti, L. J. & Antonides, H. M., 2013. Analysis of Synthetic Cathinones Commonly Found in Bath Salts in Human Performance and Postmortem Toxicology: Method Development, Drug Distribution and Interpretation of Results. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 37, pp. 135-146.
- Martin, M. et al., 2012. Evidence of mephedrone chronic abuse through hair analysis using GC/MS. *Forensic Science International*, Volume 218, pp. 44-48.
- Maskell, P. D., Paoli, G. D., Seneviratne, C. & Pounder, D. J., 2011. Mephedrone (4-Methylmethcathinone)-Related Deaths. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 35, pp. 188-191.
- Matsuta, S. et al., 2015. Metabolism of the designer drug α -pyrrolidinobutiophenone (α -PBP) in humans: Identification and quantification of the phase I metabolites in urine. *Forensic Science International*, Volume 249, pp. 181-188.
- Mayer, M. et al., 2013. Simultaneous Determination of 4-Substituted Cathinones (4-MMC, 4-MEC and 4-FMC) in Human Urine by HPLC–DAD. *Journal of Chromatographic Science*, 51(9), pp. 861-866.
- McDermott, S. D., Power, J. D., Kavanagh, P. & O’Brien, J., 2011. The analysis of substituted cathinones. Part 2: An investigation into the phenylacetone based isomers of 4-methylmethcathinone and N-ethylcathinone.. *Forensic Science International*, 212(1-3), pp. 13-21.
- Meetani, M. A., Alremeithi, R. H. & Mousa, M. K., 2019. Enantioseparation of Synthetic Cathinones Enantiomers with Tertiary Amine Structure in Urine and Plasma. *Journal of Chromatographic Science*, 57(4), pp. 361-368.
- Meltzer, P. C., Butler, D., Deschamps, J. R. & K. Madras, B., 2006. 1-(4-Methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (Pyrovalerone) Analogues: A Promising Class of Monoamine Uptake Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(4), pp. 1420-1432.
- Mercieca, G., Odoardi, S., Cassar, M. & Strano Rossi, S., 2018. Rapid and simple procedure for the determination of cathinones, amphetamine-like stimulants and other new psychoactive substances in blood and urine by GC–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 149, pp. 494-501.
- Mercolini, L. & Protti, M., 2016. Biosampling strategies for emerging drugs of abuse: towards the future of toxicological and forensic analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 130, pp. 202-219.

- Mercolini, L. et al., 2016. LC–MS/MS and volumetric absorptive microsampling for quantitative bioanalysis of cathinone analogues in dried urine, plasma and oral fluid samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 123, pp. 186-194.
- 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 methyone in urine using gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Volume 397, pp. 1225-1233.
- Miller, B., Kim, J. & Concheiro, M., 2017. Stability of synthetic cathinones in oral fluid samples. *Forensic Science International*, Volume 274, pp. 13-21.
- Minakata, K. et al., 2015. Determination of new pyrrolidino cathinone derivatives, PVT, F-PVP, MPHP, PV8, PV9 and F-PV9, in human blood by MALDI-Q-TOF mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, Volume 33, pp. 148-154.
- Ministério da Justiça Português, 1993. Decreto-Lei n.º 15/93 de 22 de janeiro. *Diário da República*, Série I-A(18), pp. 234-252.
- Ministério da Saúde Português, 2013a. Decreto-Lei n.º 54/2013 de 17 de abril. *Diário da República*, 1.ª Série(75), pp. 2250-2254.
- Ministério da Saúde Português, 2013b. Portaria n.º 154/2013 de 17 de abril. *Diário da República*, 1.ª série(75), pp. 2254-2257.
- Mohamed, K., 2017. One-Step Derivatization-Extraction Method for Rapid Analysis of Eleven Amphetamines and Cathinones in Oral Fluid by GC–MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(7), pp. 639-645.
- Mohamed, K. M., Al-Hazmi, A. H., Alasiri, A. M. & Ali, M. E.-S., 2016. A GC–MS Method for Detection and Quantification of Cathine, Cathinone, Methcathinone and Ephedrine in Oral Fluid. *Journal of Chromatographic Science*, 54(8), pp. 1271-1276.
- Mohamed, K. M. & Bakdash, A., 2017. Comparison of 3 Derivatization Methods for the Analysis of Amphetamine-Related Drugs in Oral Fluid by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry Insights*, Volume 12, pp. 1-16.
- Molnár, B. et al., 2016. Structure-related new approach in the gas chromatography/mass spectrometry analysis of cathinone type synthetic drugs. *Journal of Chromatography A*, Volume 1477, pp. 70-75.
- Montesano, C. et al., 2017a. Multi-class analysis of new psychoactive substances and metabolites in hair by pressurized liquid extraction coupled to HPLC-HRMS. *Drug Testing and Analysis*, 9(5), pp. 798-807.

- Montesano, C. et al., 2017b. Application of a rapid μ -SPE clean-up for multiclass quantitative analysis of sixteen new psychoactive substances in whole blood by LC–MS/MS. *Talanta*, Volume 167, pp. 260-267.
- Namera, A. et al., 2015. Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones. *Forensic Toxicology*, Volume 33, pp. 175-194.
- Namera, A. et al., 2014. Time-course profile of urinary excretion of intravenously administered α -pyrrolidinovalerophenone and α -pyrrolidinobutiophenone in a human. *Forensic Toxicology*, 32(1), pp. 68-74.
- Namera, A. et al., 2013a. Simple segmental hair analysis for α -pyrrolidinophenone-type designer drugs by MonoSpin extraction for evaluation of abuse history. *Journal of Chromatography B*, Volume 942-943, pp. 15-20.
- Namera, A. et al., 2013b. A fatal case of 3,4-methylenedioxypropylvalerone poisoning: coexistence of α -pyrrolidinobutiophenone and α -pyrrolidinovalerophenone in blood and/or hair. *Forensic Toxicology*, Volume 31, pp. 338-343.
- Nash, C. et al., 2019. A Fatality Involving Furanylfentanyl and MMMP, with Presumptive Identification of Three MMMP Metabolites in Urine. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 43, pp. 291-298.
- Novellas, J. et al., 2015. Concentrations of MDPV in rat striatum correlate with the psychostimulant effect. *Journal of Psychopharmacology*, 29(11), pp. 1209-1218.
- O'Byrne, P. M., Kavanagh, P. V., McNamara, S. M. & Stokes, S. M., 2013. Screening of Stimulants Including Designer Drugs in Urine Using a Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry System. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(2), pp. 64-73.
- Odoardi, S., Fisichella, M., Romolo, F. S. & Strano-Rossi, S., 2015. High-throughput screening for new psychoactive substances (NPS) in whole blood by DLLME extraction and UHPLC–MS/MS analysis. *Journal of Chromatography B*, Volume 1000, pp. 57-68.
- Odoardi, S. et al., 2017. High-throughput screening for drugs of abuse and pharmaceutical drugs in hair by liquid-chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). *Microchemical Journal*, Volume 133, pp. 302-310.
- Ojanperä, I. A., Heikman, P. K. & Rasanen, I. J., 2011. Urine Analysis of 3,4-Methylenedioxypropylvalerone in Opioid-Dependent Patients by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring*, 33(2), pp. 257-263.
- Olesti, E. et al., 2016. GC–MS Quantification Method for Mephedrone in Plasma and Urine: Application to Human Pharmacokinetics. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(2), pp. 100-106.

- Olesti, E. et al., 2017. Pharmacokinetics of Mephedrone and Its Metabolites in Human by LC-MS/MS. *The AAPS Journal*, 19(6), pp. 1767-1778.
- Pasin, D., Bidny, S. & Fu, S., 2015. Analysis of New Designer Drugs in Post-Mortem Blood Using High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 39(3), pp. 163-171.
- Paul, B. D. & Cole, K. A., 2001. Cathinone (Khat) and Methcathinone (CAT) in Urine Specimens: A Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Detection Procedure. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 25, pp. 525-530.
- Paul, M. et al., 2014. Analysis of new designer drugs and common drugs of abuse in urine by a combined targeted and untargeted LC-HR-QTOFMS approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(18), pp. 4425-4441.
- Pearson, J. M. et al., 2012. Three Fatal Intoxications Due to Methylone. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 36, pp. 444-451.
- Pedersen, A. J. et al., 2013. Screening for illicit and medicinal drugs in whole blood using fully automated SPE and ultra-high-performance liquid chromatography with TOF-MS with data-independent acquisition. *Journal of Separation Science*, 36(13), pp. 2081-2089.
- Peters, J. R., Keasling, R., Brown, S. D. & Pond, B. B., 2016. Quantification of Synthetic Cathinones in Rat Brain Using HILIC-ESI-MS/MS. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 40, pp. 718-725.
- Pieprzyca, E. et al., 2018. A two fatal cases of poisoning involving new cathinone derivative PV8. *Legal Medicine*, Volume 33, pp. 42-47.
- Response, 2015. *Analytical Report 3-MeO-PCP (C18H27NO)*, Slovenija: National Forensic Laboratory.
- Rojek, S. et al., 2012. "Legal highs"—Toxicity in the clinical and medico-legal aspect as exemplified by suicide with bk-MBDB administration. *Forensic Science International*, Volume 222, pp. e1-e6.
- Rojek, S., Kula, K., Maciów-Głąb, M. & Klys, M., 2016. New psychoactive substance α -PVP in a traffic accident case. *Forensic Toxicology*, 34(2), pp. 403-410.
- Rojkiewicz, M., Kuś, P., Joachim, K. & 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 Toxicology*, 36(1), pp. 141-150.

- Rosano, T. G., Ohouo, P. Y. & Wood, M., 2017. Screening with Quantification for 64 Drugs and Metabolites in Human Urine using UPLC–MS–MS Analysis and a Threshold Accurate Calibration. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(6), pp. 536-546.
- Rust, K. Y., Markus R. Baumgartner, M. R., Dally, A. M. & Kraemer, T., 2012. Prevalence of new psychoactive substances: A retrospective study in hair. *Drug Testing and Analysis*, Volume 4, pp. 402-408.
- Saito, T. et al., 2013. SPME–GC–MS analysis of α -pyrrolidinovalerophenone in blood in a fatal poisoning case. *Forensic Toxicology*, Volume 31, pp. 328-332.
- Salomone, A. et al., 2016. Determination of cathinones and other stimulant, psychedelic, and dissociative designer drugs in real hair samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(8), pp. 2035-2042.
- Santali, E. Y. et al., 2011. Synthesis, full chemical characterisation and development of validated methods for the quantification of (\pm)-4-methylmethcathinone (mephedrone): A new “legal high”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(2), pp. 246-255.
- Shaha, S. A. et al., 2012. Quantitative analysis of mephedrone using liquid chromatography tandem mass spectroscopy: Application to human hair. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 61, pp. 64-69.
- Shima, N. et al., 2015. Urinary excretion and metabolism of the α -pyrrolidinophenone designer drug 1-phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)octan-1-one (PV9) in humans. *Forensic Toxicology*, 33(32), pp. 279-294.
- Shima, N. et al., 2013. Urinary excretion and metabolism of the newly encountered designer drug 3,4-dimethylmethcathinone in humans. *Forensic Toxicology*, Volume 31, pp. 101-112.
- Shima, N. et al., 2014. Metabolism of the newly encountered designer drug α -pyrrolidinovalerophenone in humans: identification and quantitation of urinary metabolites. *Forensic Toxicology*, Volume 32, pp. 59-67.
- Shintani-Ishida, K., Kakiuchi, Y. & Ikegaya, H., 2016. Successful quantification of 4'-methyl- α -pyrrolidinohexanophenone (MPHP) in human urine using LC-TOF-MS in an autopsy case. *Forensic toxicology*, Volume 34, pp. 398-402.
- Shintani-Ishida, K. et al., 2015. Identification and quantification of 4'-methoxy- α -pyrrolidinobutiophenone (4-MeOPBP) in human plasma and urine using LC–TOF-MS in an autopsy case. *Forensic Toxicology*, 33(2), pp. 348-354.
- Smith, P. R. et al., 2016. Reporting Two Fatalities Associated with the Use of 4-Methylethcathinone (4-MEC) and a Review of the Literature. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 40, pp. 553-560.

- Solimini, R. et al., 2017. Hepatotoxicity associated to synthetic cannabinoids use. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21(1 Suppl), pp. 1-6.
- Sørensen, L. K., 2011. Determination of cathinones and related ephedrine in forensic whole-blood samples by liquid-chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Volume 2011, pp. 727-736.
- Sorribes-Soriano, A., Esteve-Turrillas, F. A. A. S., Amorós, P. & Herrero-Martínez, J. M., 2019. Amphetamine-type stimulants analysis in oral fluid based on molecularly imprinting extraction. *Analytica Chimica Acta*, Volume 1052, pp. 73-83.
- Springer, D., Fritschi, G. & Maurer, H. H., 2003a. Metabolism and toxicological detection of the new designer drug 3',4'-methylenedioxy- α -pyrrolidinopropiophenone studied in urine using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Volume 793, pp. 377-388.
- Springer, D., Fritschi, G. & Maurer, H. H., 2003b. Metabolism and toxicological detection of the new designer drug 4'-methoxy- α -pyrrolidinopropiophenone studied in rat urine using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Volume 793, pp. 331-342.
- Springer, D., Fritschi, G. & Maurer, H. H., 2003c. Metabolism of the new designer drug α -pyrrolidinopropiophenone (PPP) and the toxicological detection of PPP and 4'-methyl- α -pyrrolidinopropiophenone (MPPP) studied in rat urine using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Volume 796, pp. 253-266.
- Springer, D., Peters, F. T., Fritschi, G. & Maurer, H. H., 2002. Studies on the metabolism and toxicological detection of the new designer drug 4'-methyl- α -pyrrolidinopropiophenone in urine using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Volume 773, pp. 25-33.
- Springer, D., Peters, F. T., Fritschi, G. & Maurer, H. H., 2003d. New designer drug 4'-methyl- α -pyrrolidinohexanophenone: studies on its metabolism and toxicological detection in urine using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Volume 789, pp. 79-91.
- Strano-Rossi, S. et al., 2012. Ultra high performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry screening method for direct analysis of designer drugs, “spice” and stimulants in oral fluid. *Journal of Chromatography A*, Volume 1258, pp. 37-42.
- Strano-Rossi, S., Cadwallader, A. B., Torre, X. d. I. & Botrè, F., 2010. Toxicological determination and in vitro metabolism of the designer drug methylenedioxypropylone (MPDV) by gas chromatography/mass spectrometry and

- liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 24, pp. 2706-2714.
- Strano-Rossi, S. et al., 2014. Screening for new psychoactive substances in hair by ultrahigh performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Volume 1372, pp. 145-156.
- Sundström, M. et al., 2013. A high-sensitivity ultra-high performance liquid chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-HR-TOFMS) method for screening synthetic cannabinoids and other drugs of abuse in urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 4045(26), pp. 8463-8474.
- Švidrnoch, M. et al., 2014. Utilization of micellar electrokinetic chromatography–tandem mass spectrometry employed volatile micellar phase in the analysis of cathinone designer drugs. *Journal of Chromatography A*, Volume 1356, pp. 258-265.
- SWGTOX, 2013. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(7), pp. 452-474.
- Swortwood, M. J., Boland, D. M. & DeCaprio, A. P., 2013. Determination of 32 cathinone derivatives and other designer drugs in serum by comprehensive LC-QQQ-MS/MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Volume 405, pp. 1383-1397.
- Tang, M. H. et al., 2014. Simultaneous detection of 93 conventional and emerging drugs of abuse and their metabolites in urine by UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, Volume 969, pp. 272-284.
- Thakur, G. A., Nikas, S. P. & Makriyannis, A., 2005. CB1 cannabinoid receptor ligands. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 5(7), pp. 631-640.
- Tomczak, E. et al., 2018. Blood concentrations of a new psychoactive substance 4-chloromethcathinone (4-CMC) determined in 15 forensic cases. *Forensic Toxicology*, Volume 36, pp. 476-485.
- Torrance, H. & Cooper, G., 2010. The detection of mephedrone (4-methylmethcathinone) in 4 fatalities in Scotland. *Forensic Science International*, Volume 202, pp. e62-e63.
- UNODC, 2011. *Synthetic cannabinoids in herbal products*, Vienna: UNODC.
- UNODC, 2013. *The Challenge of New Psychoactive Substances. Global SMART Programme.*, Vienna: United Nations Publication.
- UNODC, 2017a. *Global Synthetic Drugs Assessment*, Vienna: United Nations.
- UNODC, 2017b. *World Drug Report 2017*, Vienna: United Nations.
- UNODC, 2018a. *NPS Substance Groups*. [Online] Available at:

- <https://www.unodc.org/LSS/SubstanceGroup/GroupsDashboard?testType=NPS>
[Acedido em 18 outubro 2018].
- UNODC, 2018b. *NPS Substance Groups: Synthetic cathinones*. [Online] Available at: <https://www.unodc.org/LSS/SubstanceGroup/Details/67b1ba69-1253-4ae9-bd93-fed1ae8e6802>
[Acedido em 18 novembro 2018].
- UNODC, 2018c. Understanding the synthetic drug market: the NPS factor. *Global SMART Update*, March 2018, Volume 19.
- UNODC, 2018d. *World Drug Report 2018*, Vienna: United Nations.
- Usui, K. et al., 2014. Quantitative analysis of 3,4-dimethylmethcathinone in blood and urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in a fatal case. *Legal Medicine*, Volume 16, pp. 222-226.
- Vaiano, F. et al., 2016. A novel screening method for 64 new psychoactive substances and 5 amphetamines in blood by LC–MS/MS and application to real cases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 129, pp. 441-449.
- Varma, A. et al., 2017. Misuse of 2-(ethylamino)-1-(4-methylphenyl)-1-pentanone (4-MEAP), a synthetic cathinone. *Clinical Toxicology*, 55(3), pp. 231-232.
- Vignali, C. et al., 2019. Distribution of the Synthetic Cathinone α -Pyrrolidinohexiophenone in Biological Specimens. *Journal of Analytical Toxicology*, 43(1), pp. e1-e6.
- WADA, L. C., 2010. *Identification Criteria for Qualitative Assays Incorporating Column Chromatography and Mass Spectrometry*. [Online] Available at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification%20Criteria%20for%20Qualitative%20Assays_May%2008%202010_EN.doc.pdf
[Acedido em 29 maio 2019].
- Wallach, J., Paoli, G. D., Adejare, A. & Brandt, S. D., 2014. Preparation and analytical characterization of 1-(1-phenylcyclohexyl)piperidine (PCP) and 1-(1-phenylcyclohexyl)pyrrolidine (PCPy) analogues. *Drug Testing and Analysis*, 6(7-8), pp. 633-650.
- Wang, C. C. et al., 2012. Rapid and Sensitive Analysis of 3,4-Methylenedioxypropylvalerone in Equine Plasma Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 36(5), pp. 327-333.
- Waters, 2008. *Oasis Sample Extraction Products Brochure*. [Online] Available at: <https://kinesis.co.uk/media/wysiwyg/knowledgebase/pdf/720001692en->

[New-Oasis-brochure.pdf](#)

[Acedido em 1 fevereiro 2019].

- Weng, T.-I. et al., 2019. Analytically confirmed 4-Methyl-N-ethylnorpentedrone (4-MEAP), a synthetic cathinone, in cases presenting to an emergency department. *Clinical Toxicology*.
- Wiergowski, M., Woźniak, M. K., Kata, M. & Biziuk, M., 2016. Determination of MDPBP in postmortem blood samples by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Monatshefte für chemie*, Volume 147, pp. 1415-1421.
- Wikström, M., Thelander, G., Nyström, I. & Kronstrand, R., 2010. Two Fatal Intoxications with the New Designer Drug Methedrone (4-Methoxymethcathinone). *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 34, pp. 594-598.
- Williams, M., Martin, J. & Galettis, P., 2017. A Validated Method for the Detection of 32 Bath Salts in Oral Fluid. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(8), pp. 659-669.
- Wohlfarth, A. & Weinmann, W., 2010. LC-MS/MS screening method for designer amphetamines, tryptamines, and piperazines in serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Volume 396, pp. 2403-2414.
- Wyman, J. F. et al., 2013. Postmortem Tissue Distribution of MDPV Following Lethal Intoxication by “Bath Salts”. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 37, pp. 182-185.
- Yamagishi, I. et al., 2018. A case of intoxication with a mixture of synthetic cannabinoids EAM-2201, AB-PINACA and AB-FUBINACA, and a synthetic cathinone α -PVP. *Legal Medicine*, Volume 35, pp. 44-49.
- Yonemitsu, K. et al., 2016. A fatal poisoning case by intravenous injection of “bath salts” containing acetyl fentanyl and 4-methoxy PV8. *Forensic Science International*, Volume 267, pp. e6-e9.
- Zaitsu, K. et al., 2009. Determination of the metabolites of the new designer drugs bk-MBDB and bk-MDEA in human urine. *Forensic Science International*, Volume 188, pp. 131-139.
- Zanda, M. T. & Fattore, L., 2017. Chapter 29 - Novel Psychoactive Substances: A New Behavioral and Mental Health Threat. Em: R. R. Watson & S. Zibadi, edits. *Addictive Substances and Neurological Disease*. USA/UK: Academic Press, pp. 341-353.
- Zhang, L. et al., 2014. Simultaneous determination of 12 illicit drugs in whole blood and urine by solid phase extraction and UPLC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, Volume 955-956, pp. 10-19.
- Zuba, D., Adamowicz, P. & Byrska, B., 2013. Detection of buphedrone in biological and non-biological material – Two case reports. *Forensic Science International*, Volume 227, pp. 15-20.

6. Anexos

Anexo A: Caracterização do composto 5F-ADB presente na Amostra 1

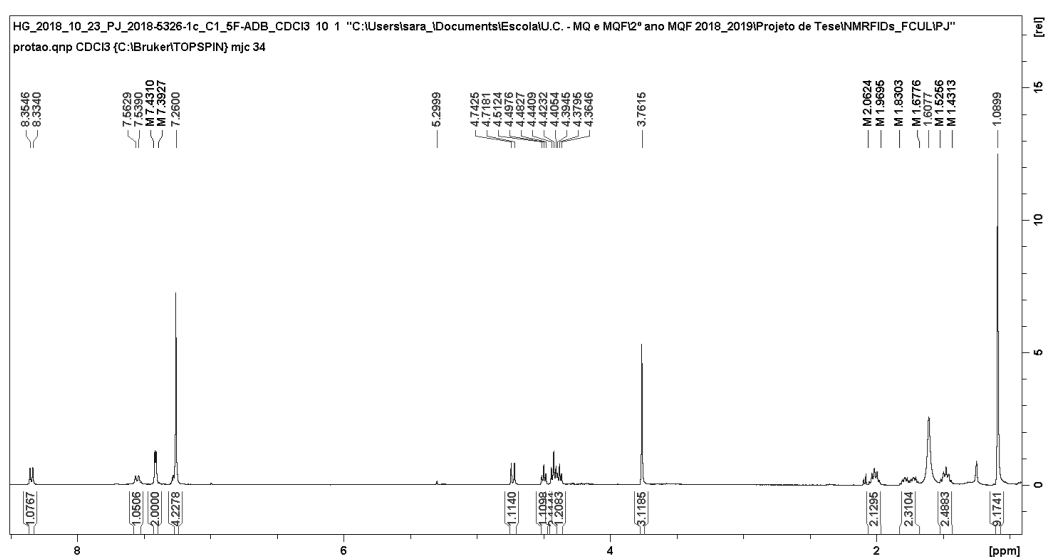


Figura 6.1. Espectro de RMN ^1H do 5F-ADB (Composto A), em CDCl_3 .

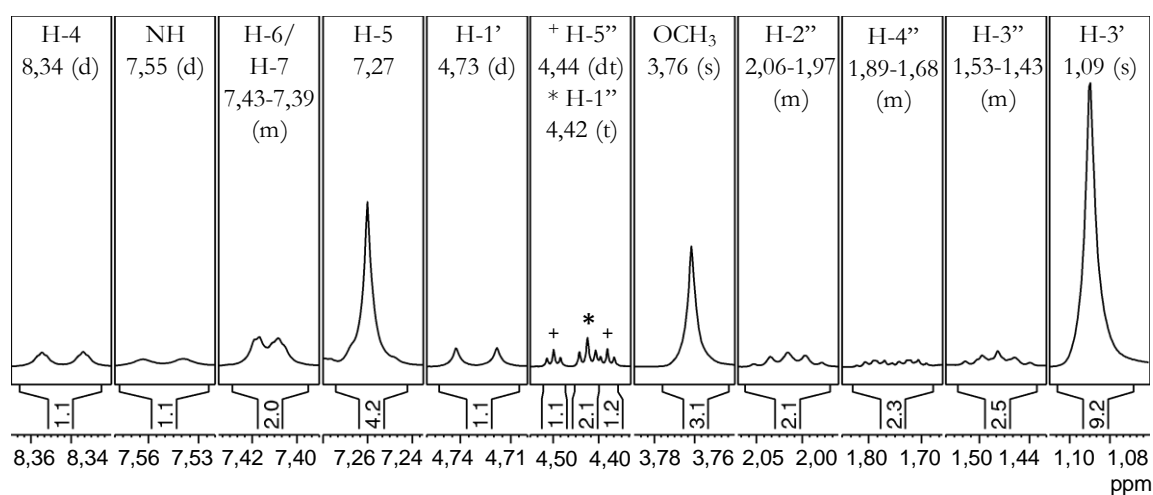


Figura 6.2. Espectro de RMN ^1H do 5F-ADB (Composto A), em CDCl_3 (ampliação).

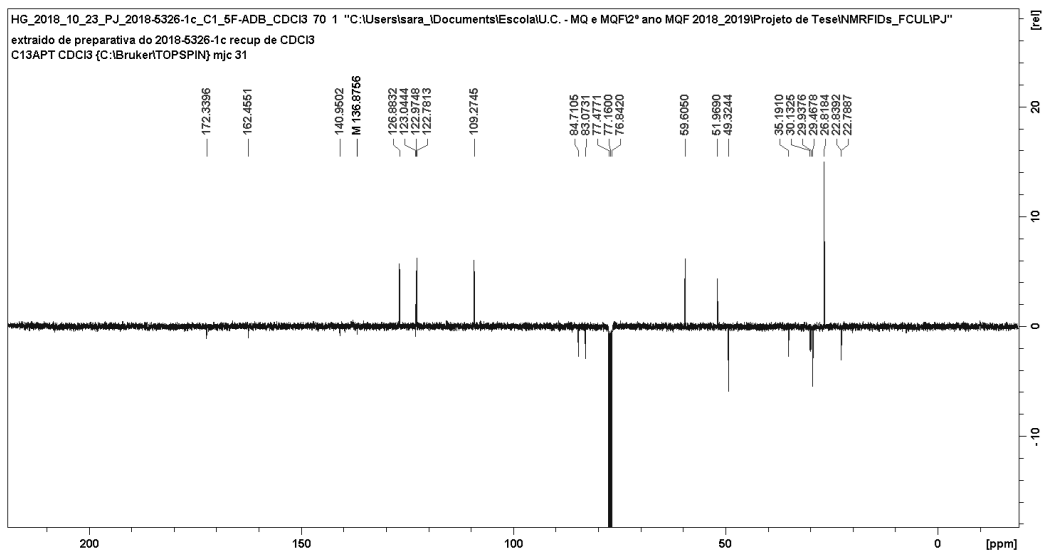


Figura 6.3. Espectro de RMN ^{13}C APT do 5F-ADB (Composto A), em CDCl_3 .

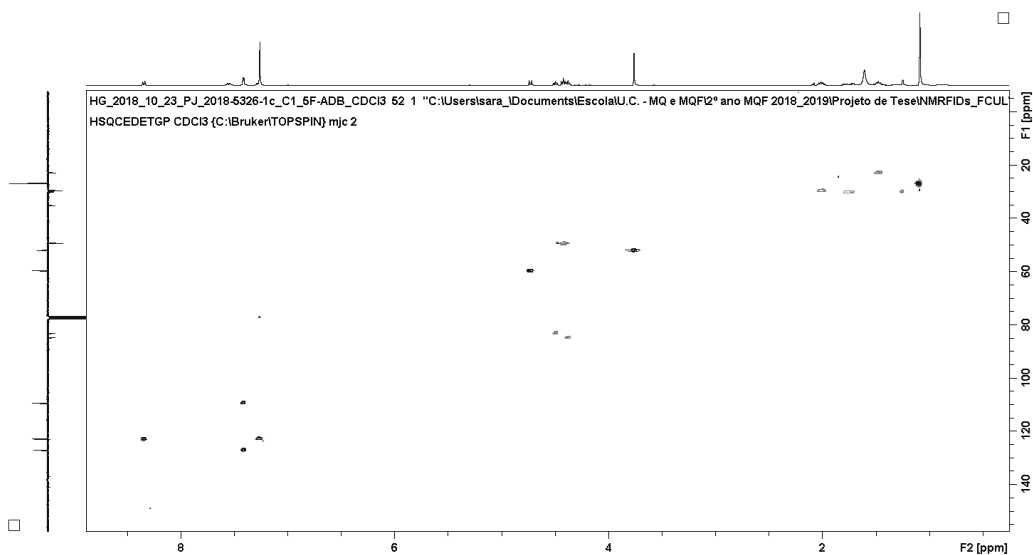


Figura 6.4. Espectro de HSQC do 5F-ADB (Composto A), em CDCl_3 .

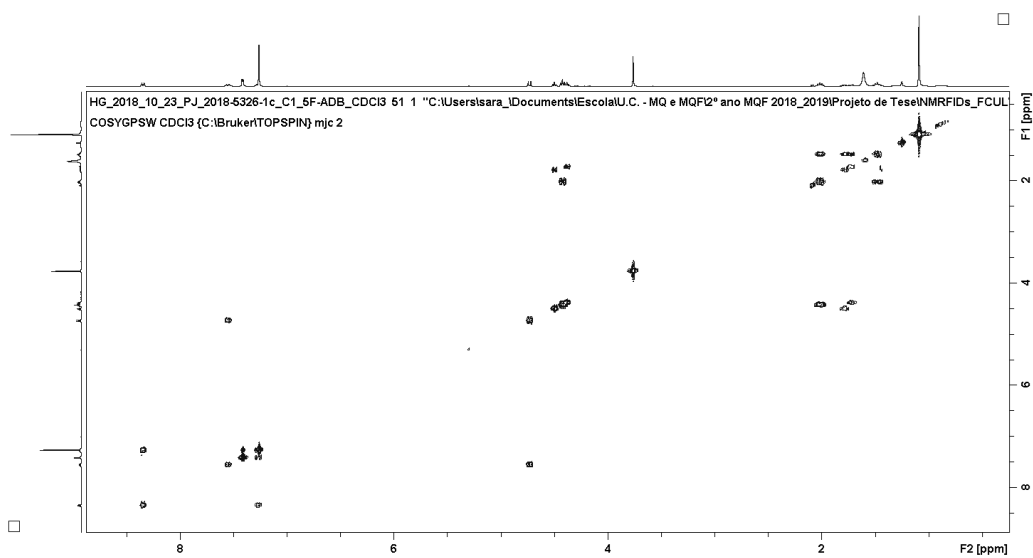


Figura 6.5. Espectro de COSY do 5F-ADB (Composto A), em CDCl_3 .

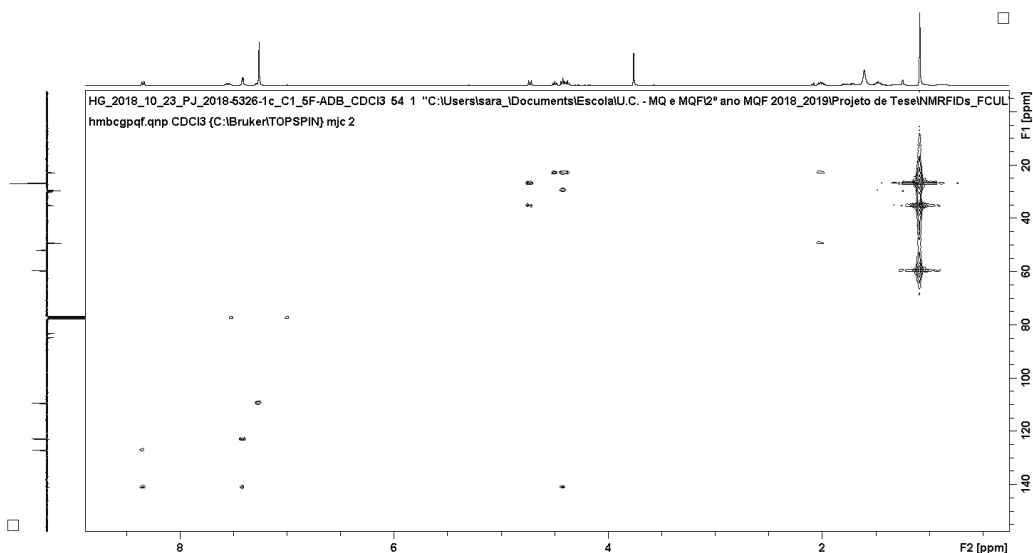


Figura 6.6. Espectro de HMBC do 5F-ADB (Composto A), em CDCl_3 .

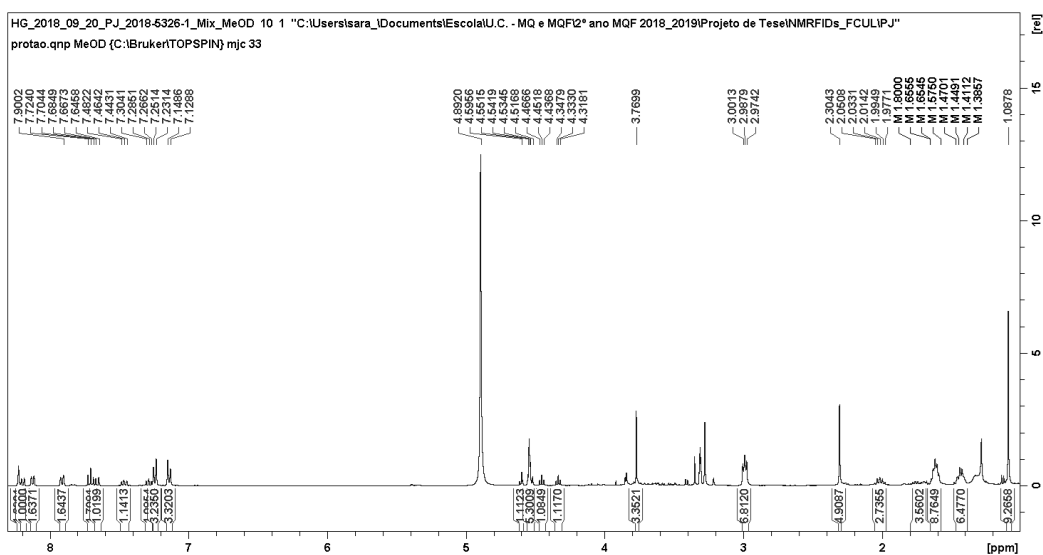


Figura 6.7. Espectro de RMN ^1H da Amostra 1, em MeOD.

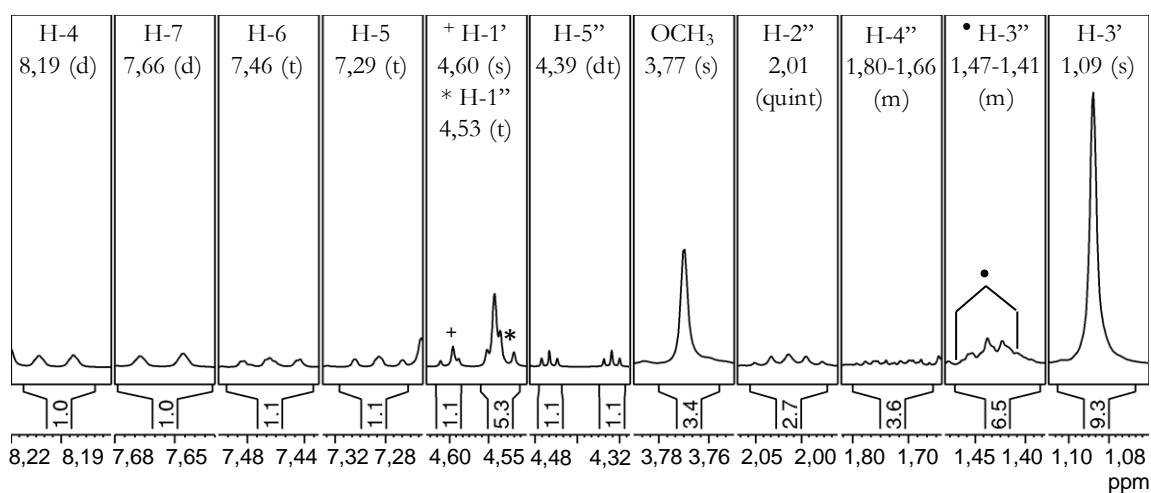


Figura 6.8. Espectro de RMN ^1H da Amostra 1, em MeOD (ampliação dos picos correspondentes ao 5F-ADB (Composto A)).

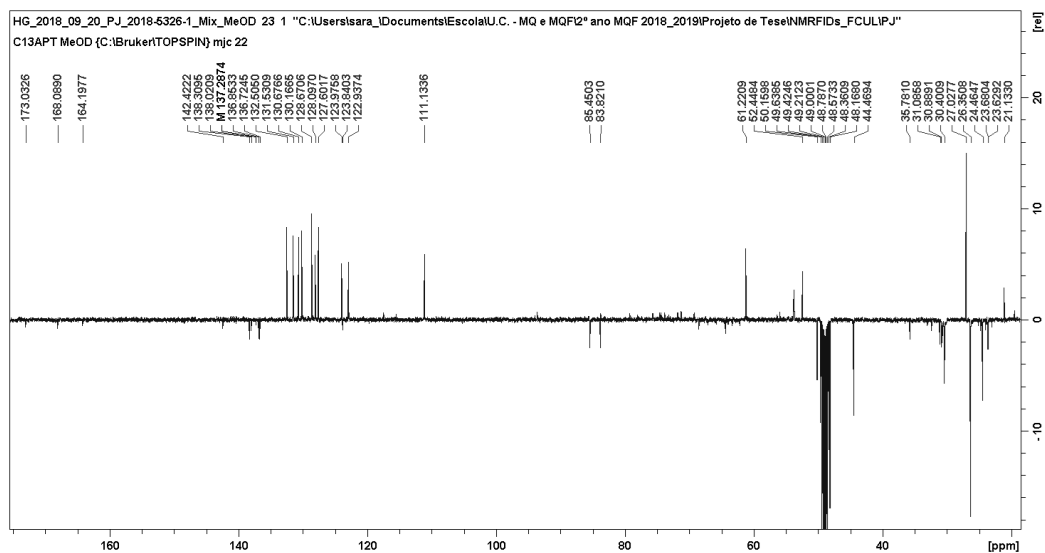


Figura 6.9. Espectro de RMN ^{13}C APT da Amostra 1, em MeOD.

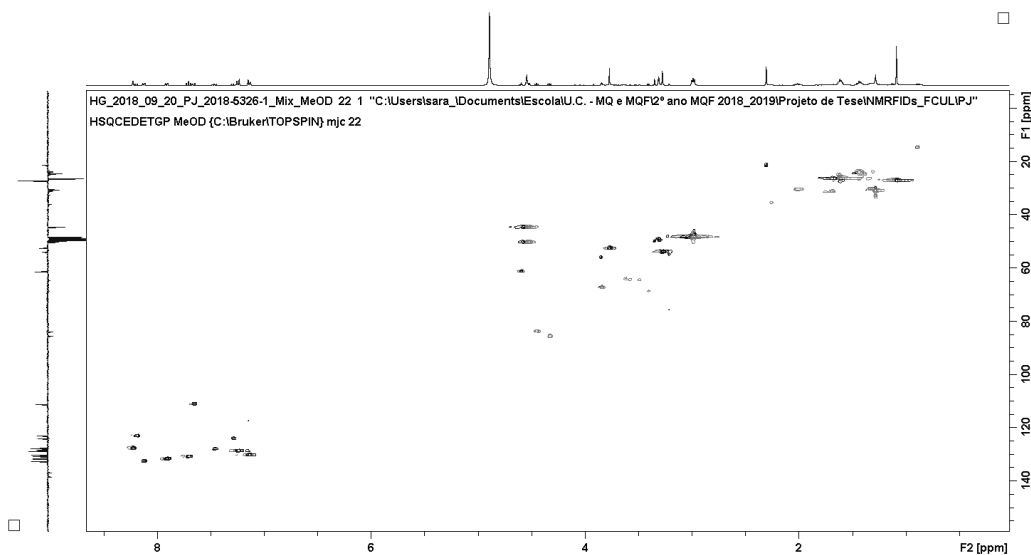


Figura 6.10. Espectro de HSQC da Amostra 1, em MeOD.

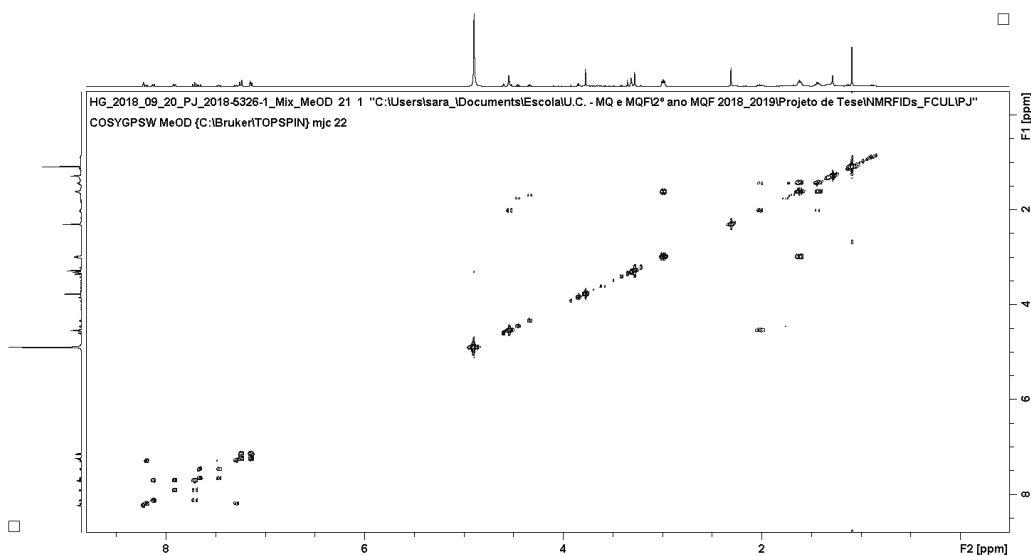


Figura 6.11. Espectro de COSY da Amostra 1, em MeOD.

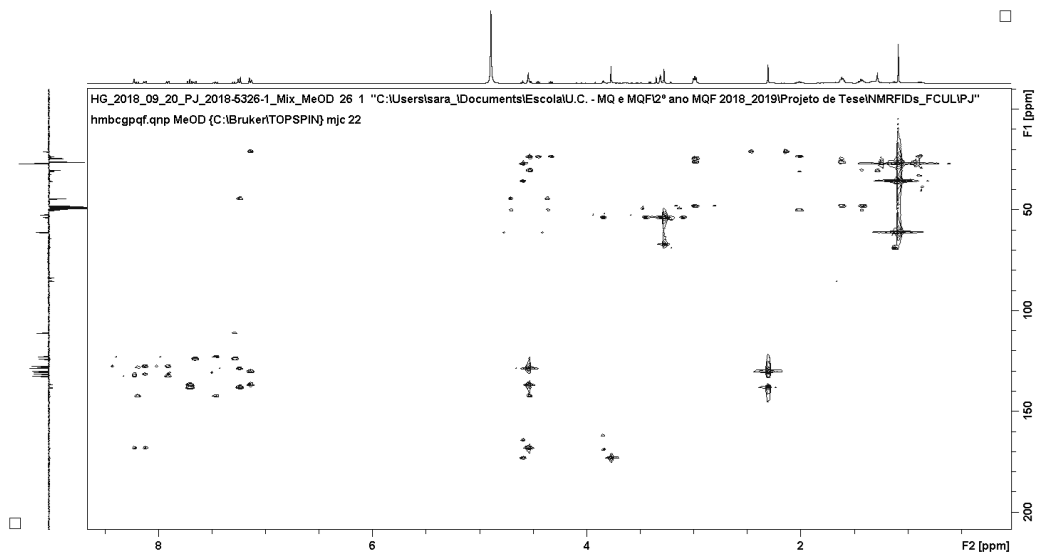


Figura 6.12. Espectro de HMBC da Amostra 1, em MeOD.

Anexo B: Caracterização do composto 3-MeO-PCP presente na Amostra 2

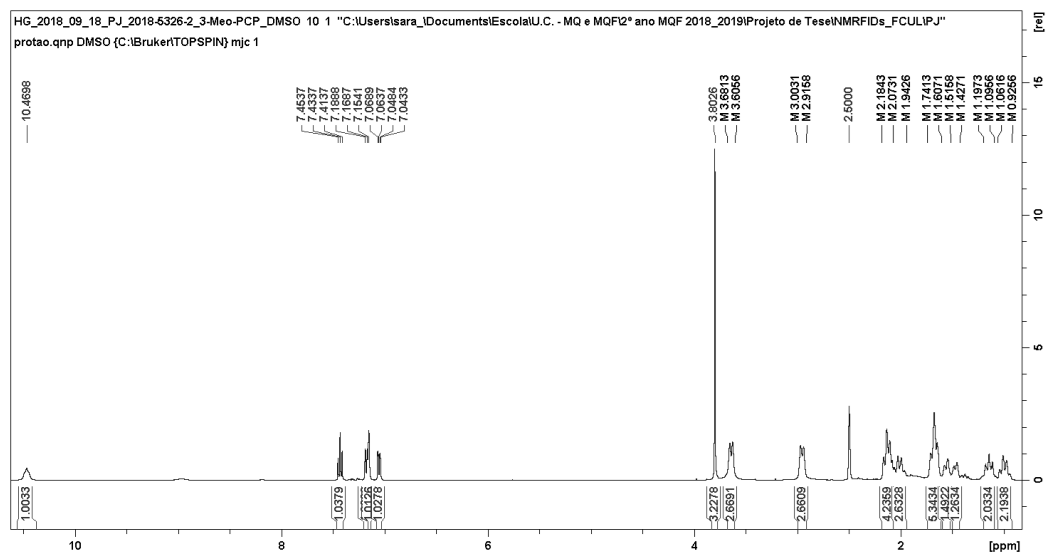


Figura 6.13. Espectro de RMN ^1H do 3-MeO-PCP, em $\text{DMSO}-d_6$.

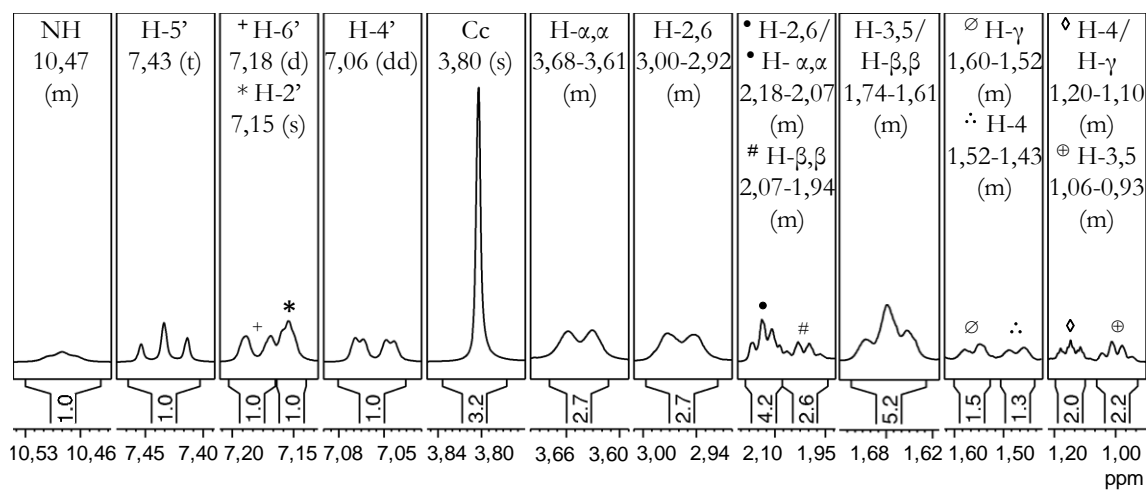


Figura 6.14. Espectro de RMN ^1H do 3-MeO-PCP, em $\text{DMSO}-d_6$ (ampliação).

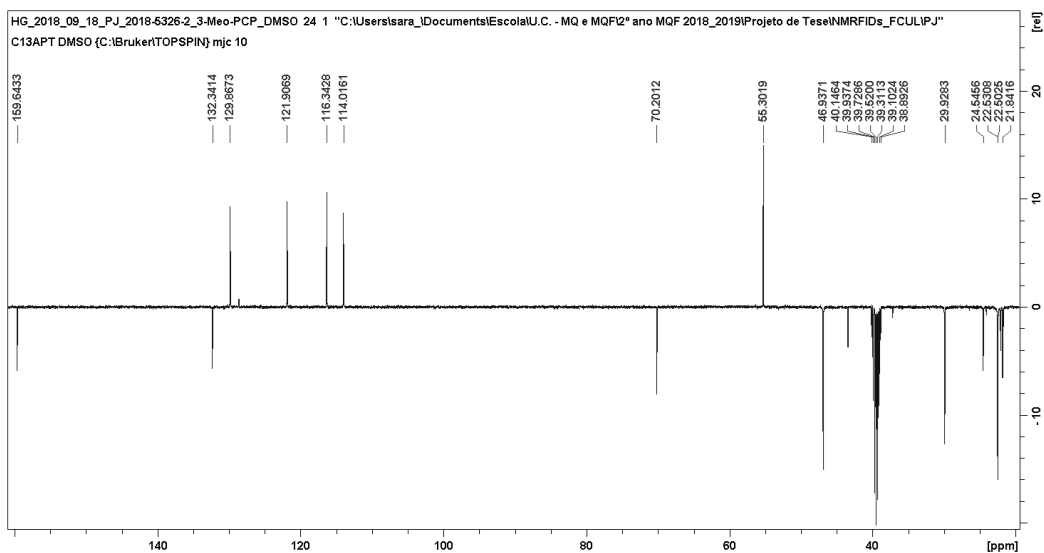


Figura 6.15. Espectro de RMN ^{13}C APT do 3-MeO-PCP, em $\text{DMSO}-d_6$.

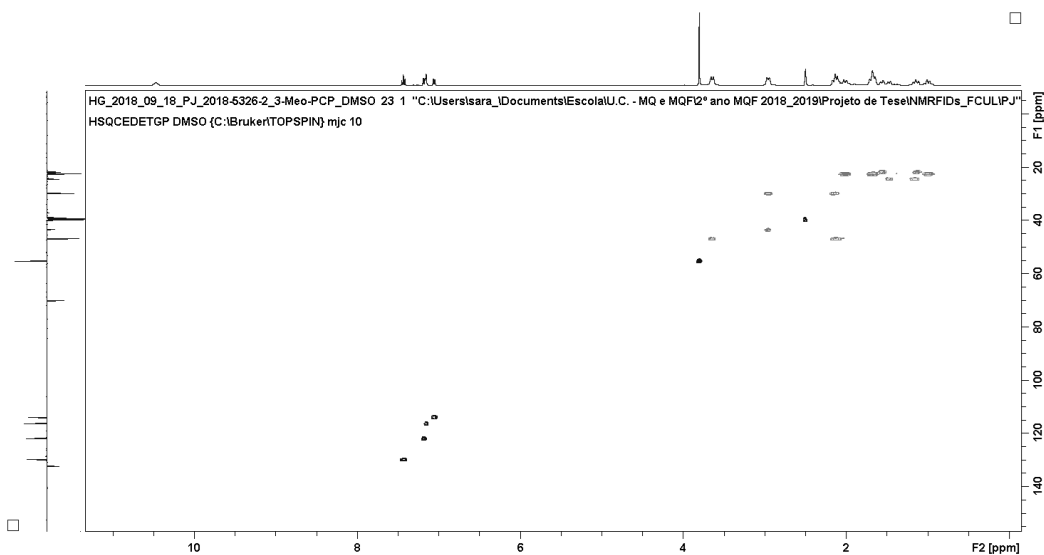


Figura 6.16. Espectro de HSQC do 3-MeO-PCP, em $\text{DMSO}-d_6$.

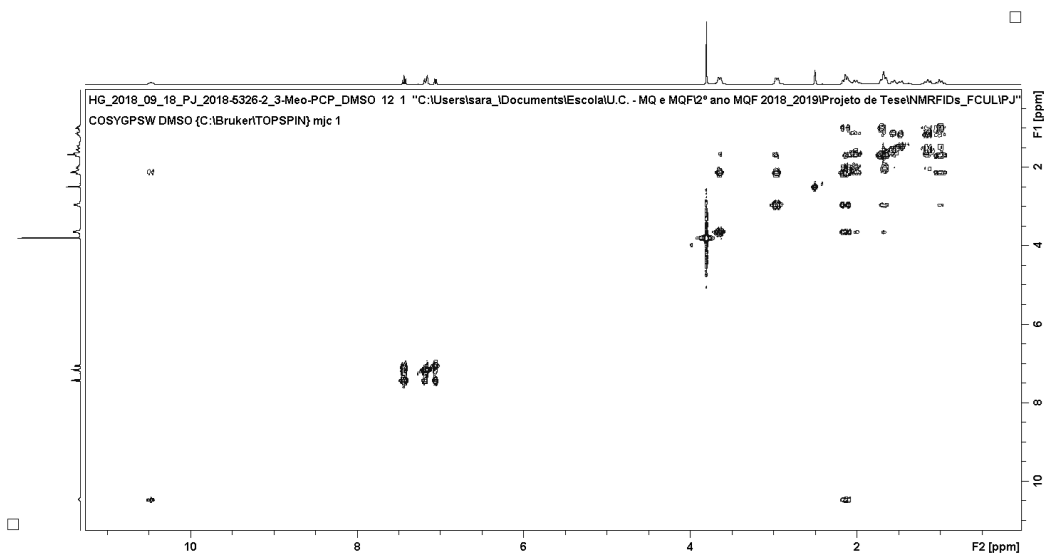


Figura 6.17. Espectro de COSY do 3-MeO-PCP, em $\text{DMSO}-d_6$.

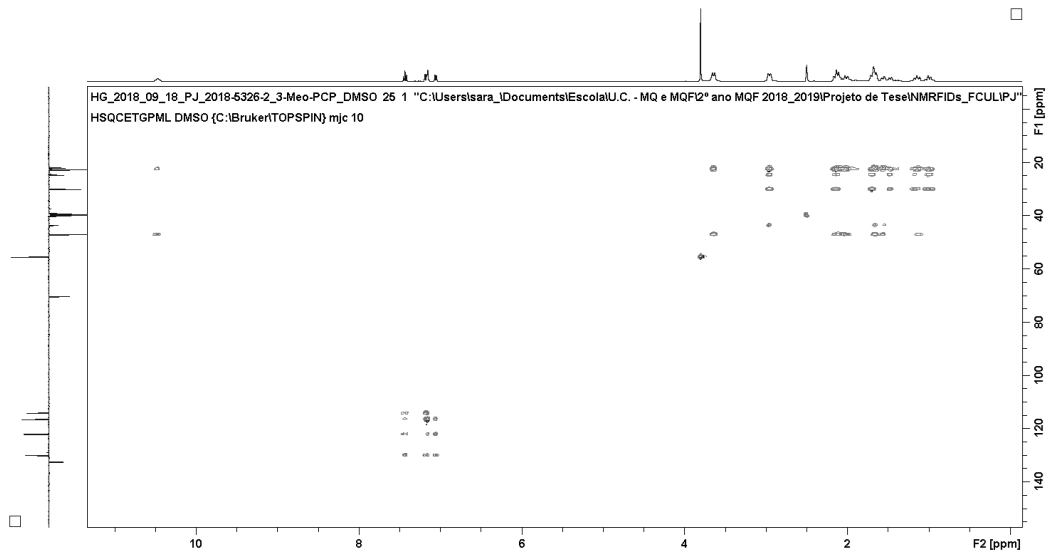


Figura 6.18. Espectro de HSQC-TOCSY do 3-MeO-PCP, em DMSO- d_6 .

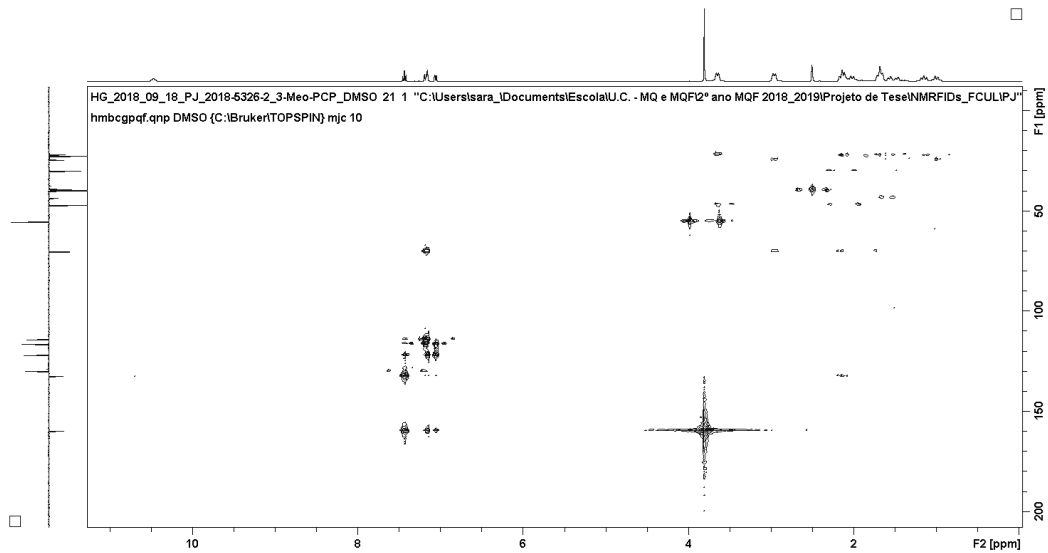


Figura 6.19. Espectro de HMBC do 3-MeO-PCP, em DMSO- d_6 .

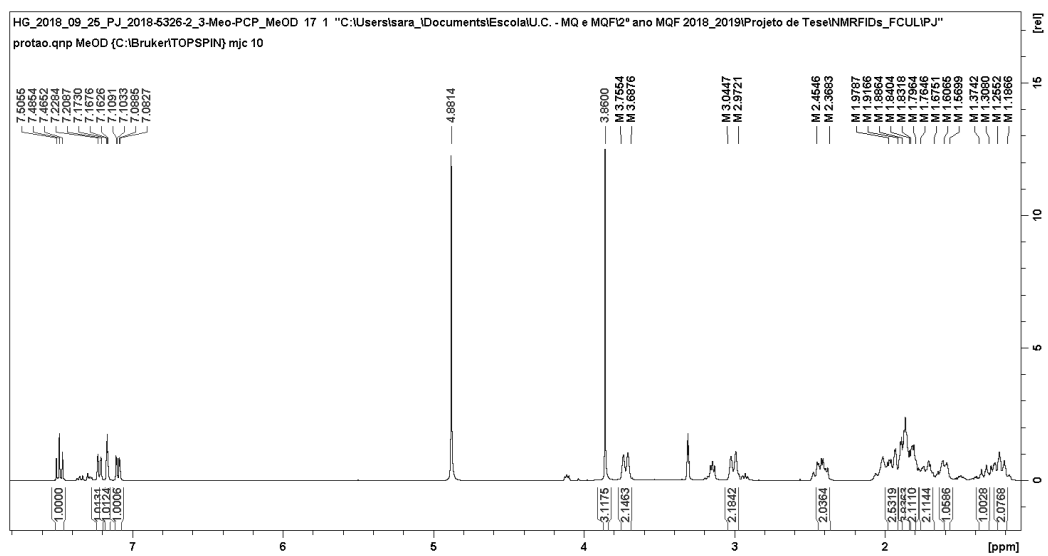


Figura 6.20. Espectro de RMN ^1H do 3-MeO-PCP, em MeOD.

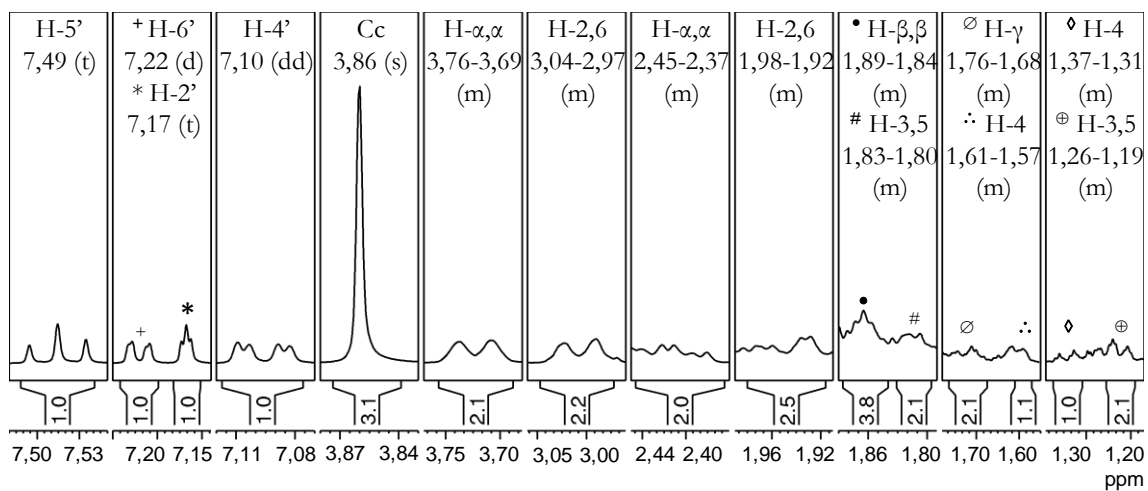


Figura 6.21. Espectro de RMN ^1H do 3-MeO-PCP, em MeOD (ampliação).

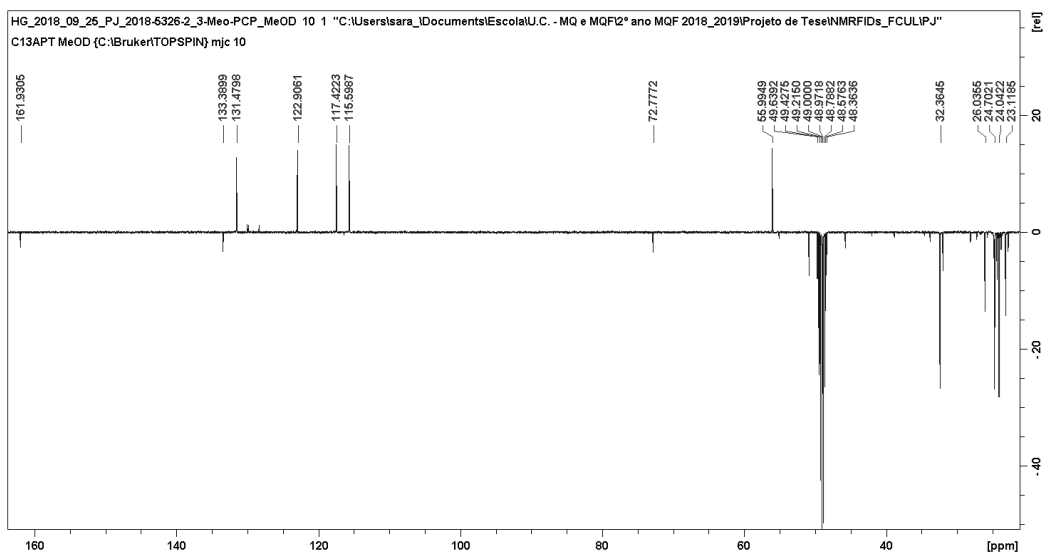


Figura 6.22. Espectro de RMN ^{13}C APT do 3-MeO-PCP, em MeOD.

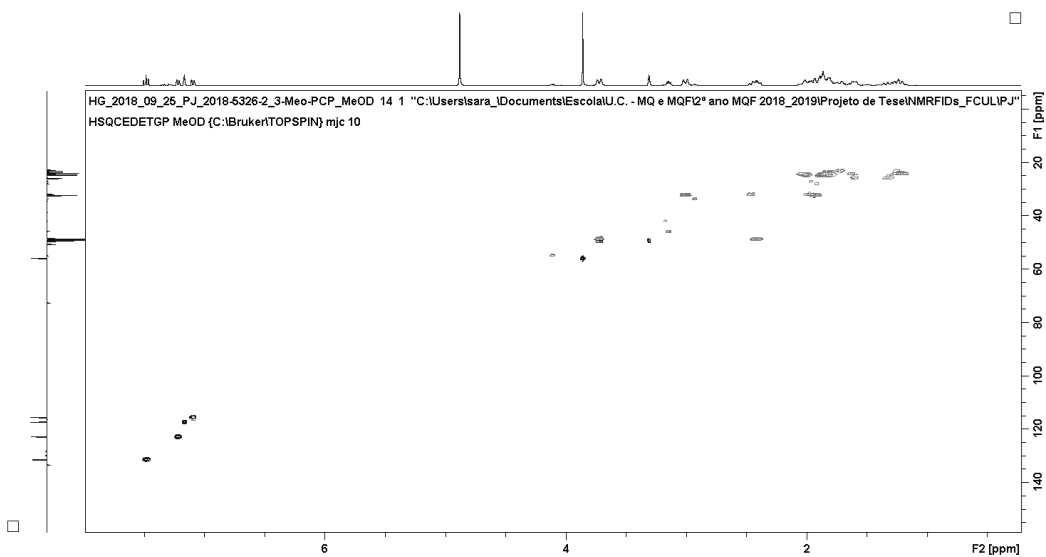


Figura 6.23. Espectro de HSQC do 3-MeO-PCP, em MeOD.

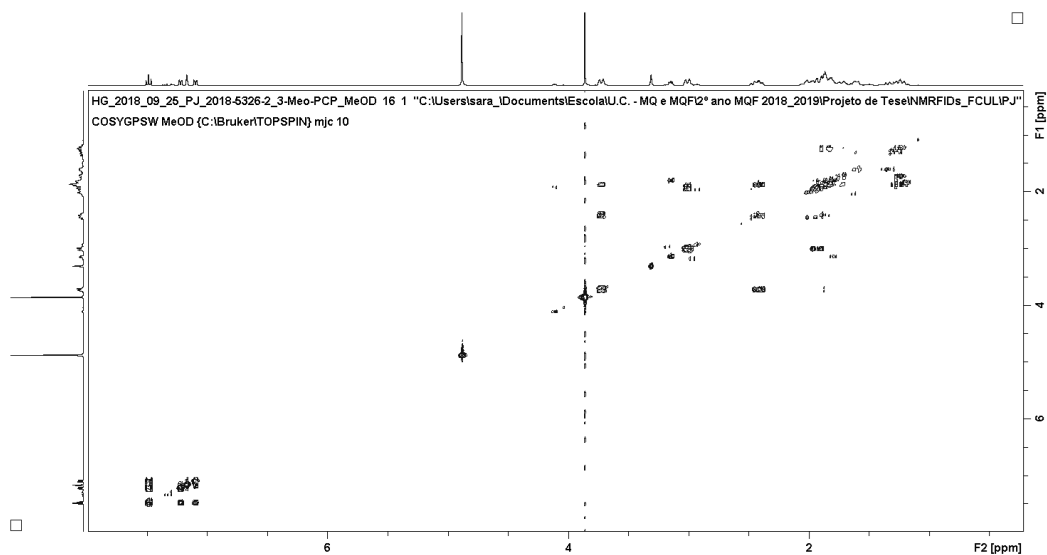


Figura 6.24. Espectro de COSY do 3-MeO-PCP, em MeOD.

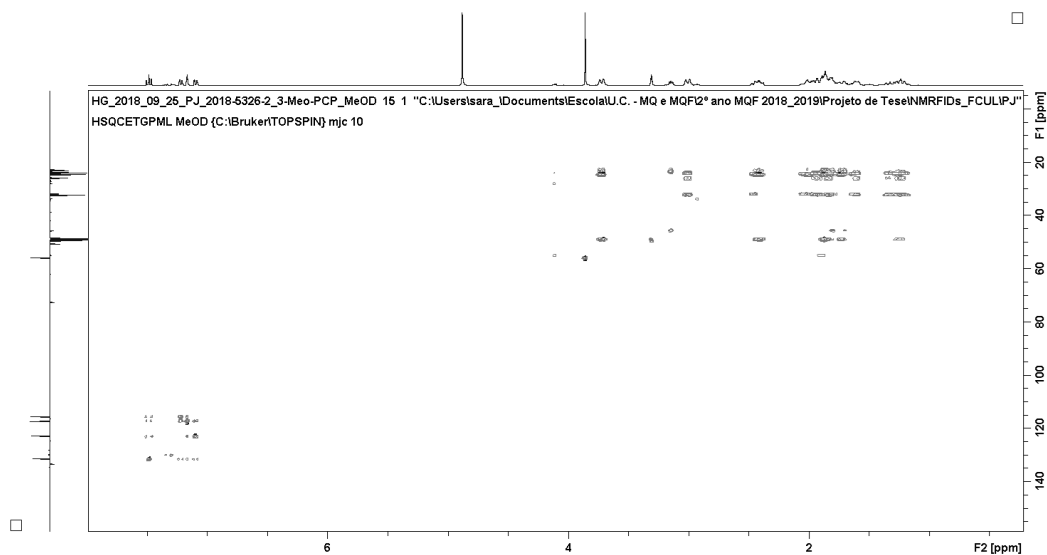


Figura 6.25. Espectro de HSQC-TOCSY do 3-MeO-PCP, em MeOD.

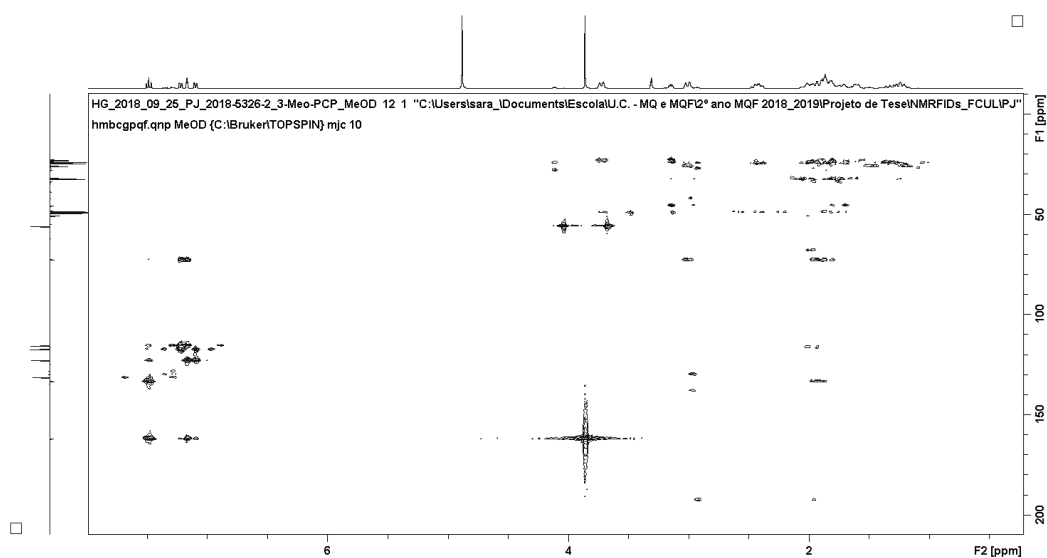


Figura 6.26. Espectro de HMBC do 3-MeO-PCP, em MeOD.

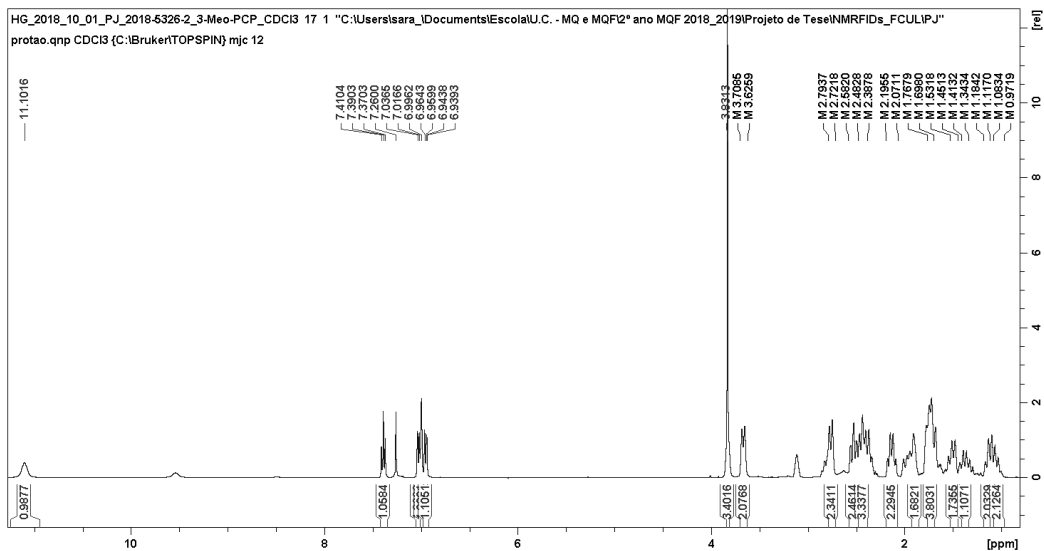


Figura 6.27. Espectro de RMN ^1H do 3-MeO-PCP, em CDCl_3 .

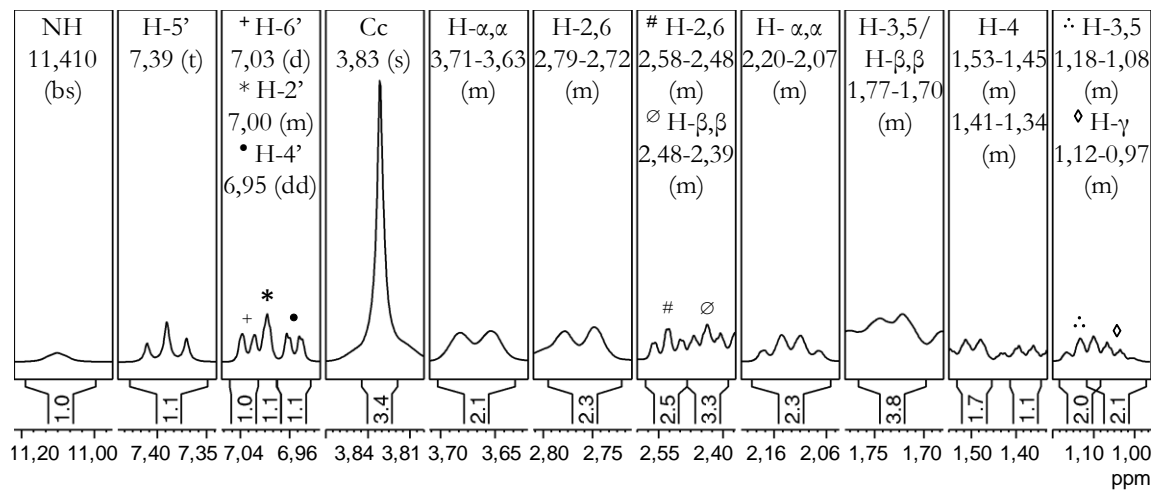


Figura 6.28. Espectro de RMN ^1H do 3-MeO-PCP, em CDCl_3 (ampliação).

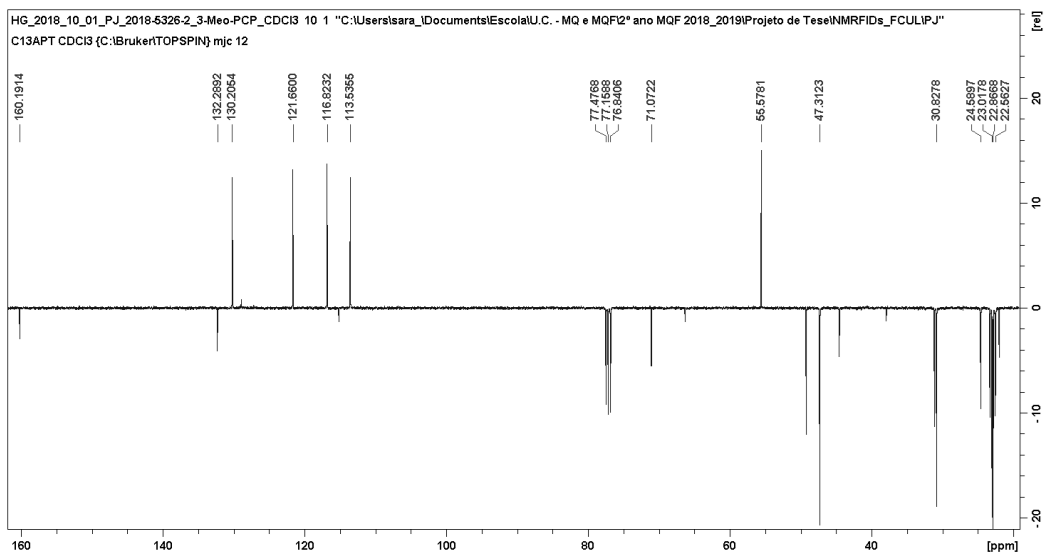


Figura 6.29. Espectro de RMN ^{13}C APT do 3-MeO-PCP, em CDCl_3 .

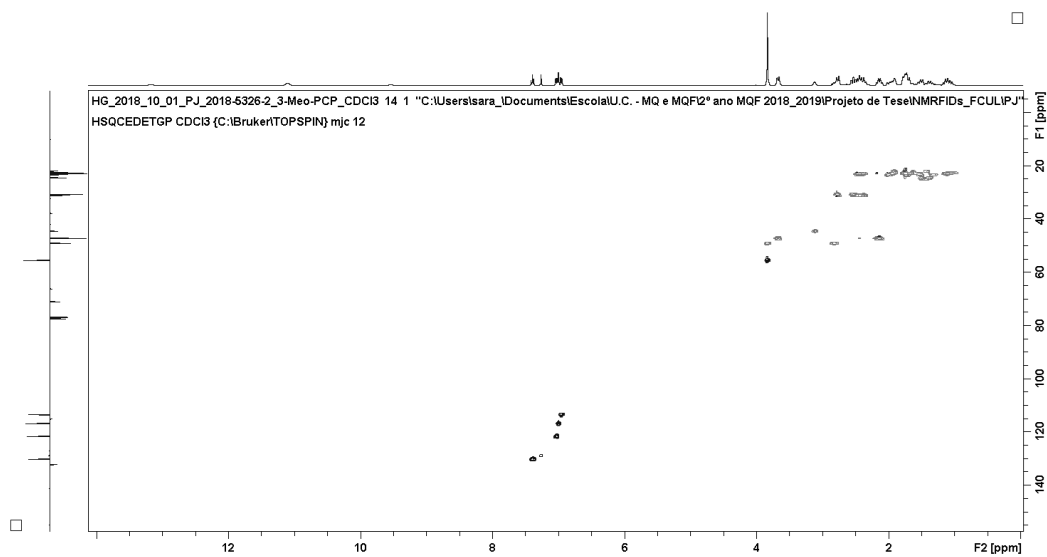


Figura 6.30. Espectro de HSQC do 3-MeO-PCP, em CDCl₃.

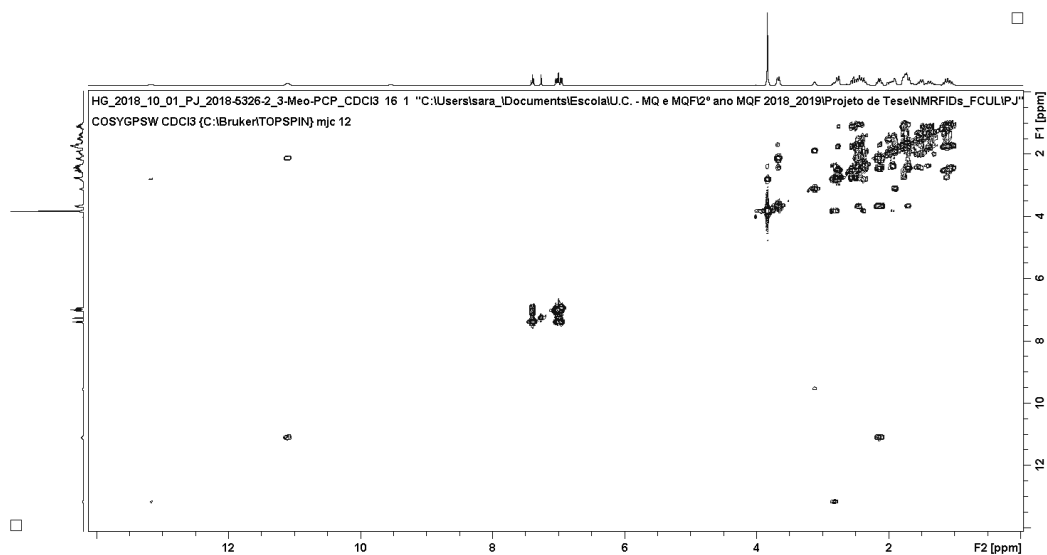


Figura 6.31. Espectro de COSY do 3-MeO-PCP, em CDCl₃.

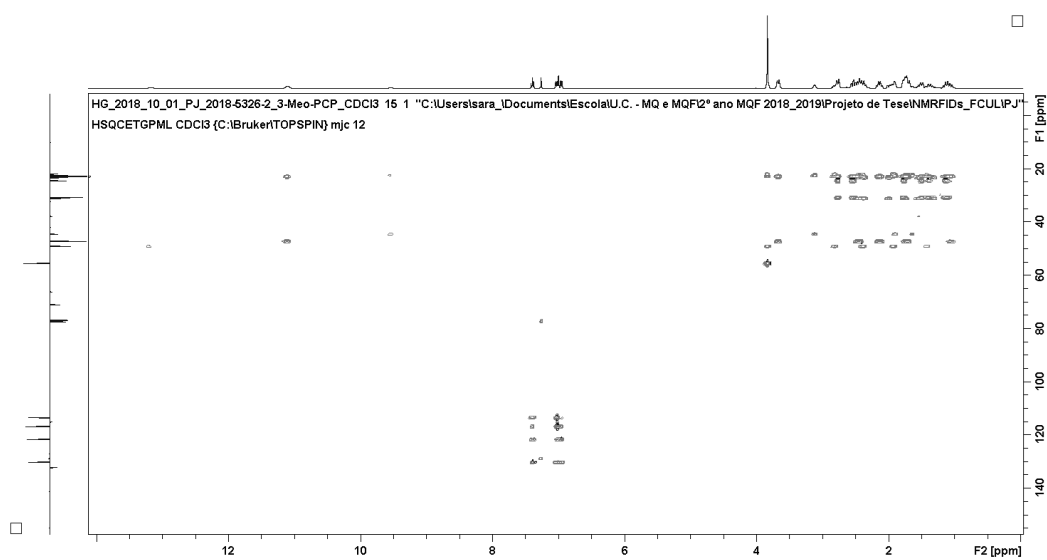


Figura 6.32. Espectro de HSQC-TOCSY do 3-MeO-PCP, em CDCl₃.

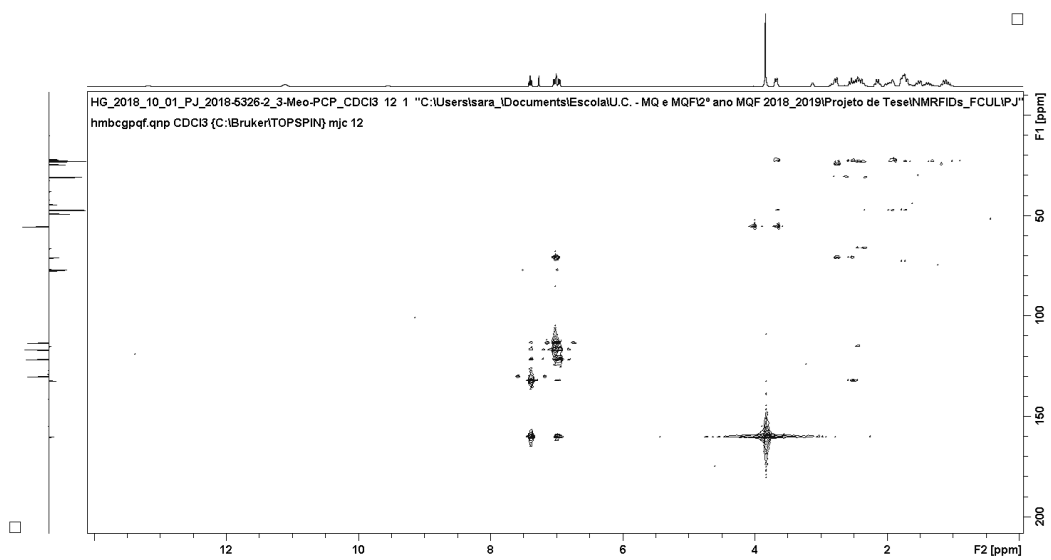


Figura 6.33. Espectro de HMBC do 3-MeO-PCP, em CDCl_3 .

Anexo C: Caracterização do *p*-tolunitrilo e das cetonas por RMN

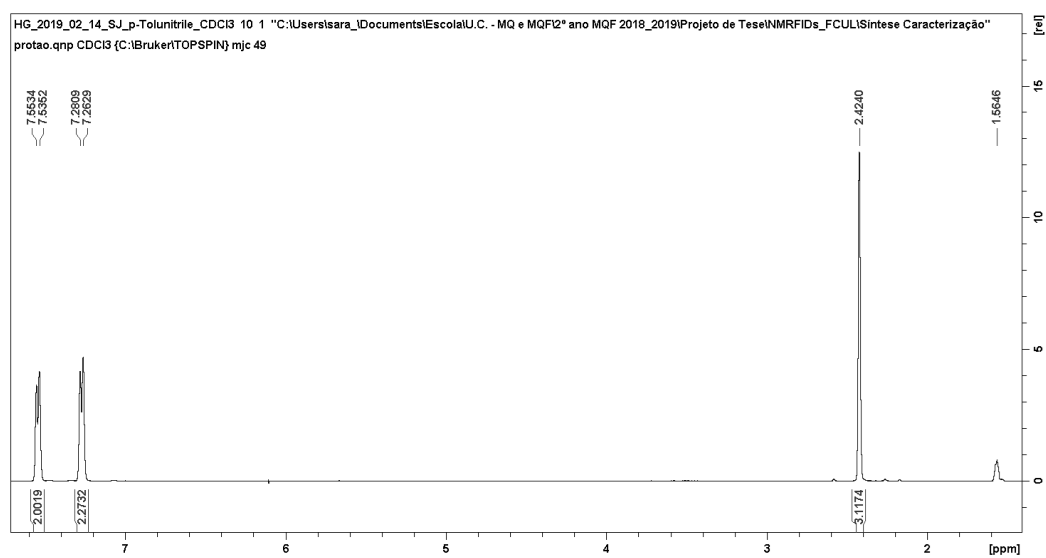


Figura 6.34. Espectro de RMN ^1H do *p*-tolunitrilo (7), em CDCl_3 .

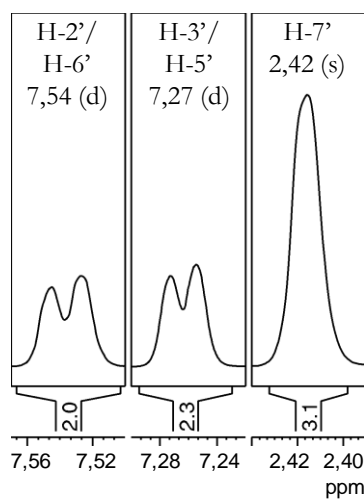


Figura 6.35. Espectro de RMN ^1H do *p*-tolunitrilo (7), em CDCl_3 (ampliação).

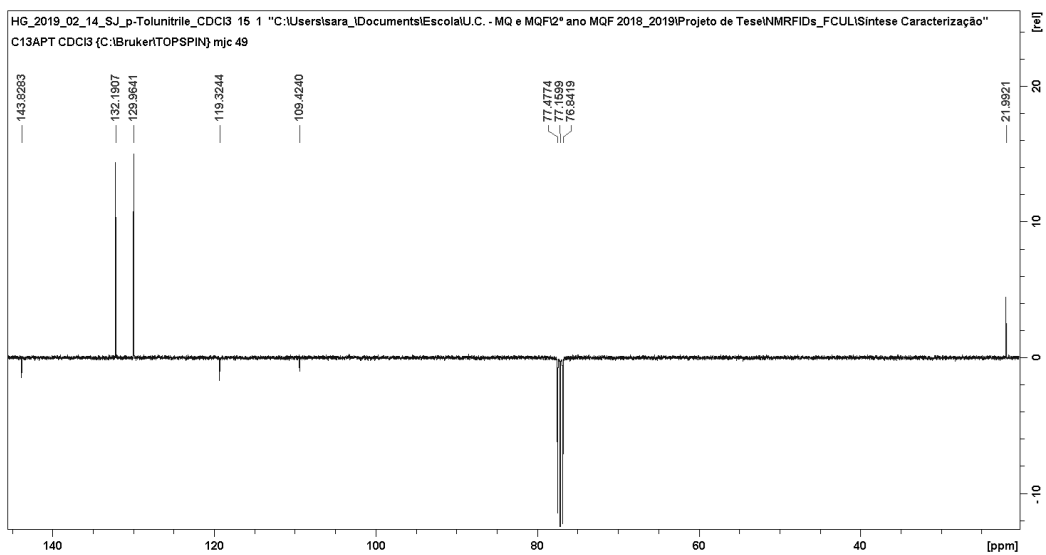


Figura 6.36. Espectro de RMN ^{13}C APT do *p*-tolunitrilo (7), em CDCl_3 .

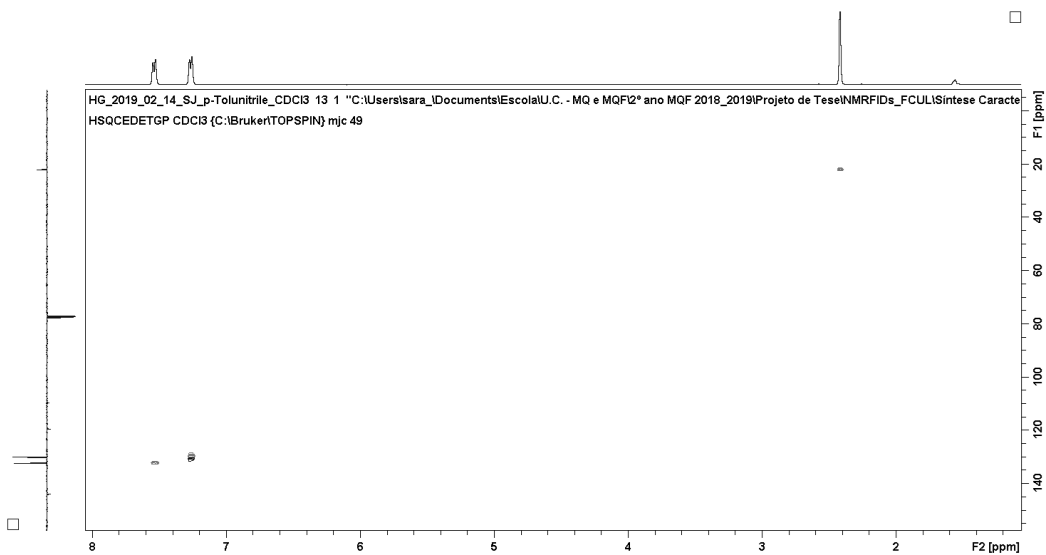


Figura 6.37. Espectro de HSQC do *p*-tolunitrilo (7), em CDCl_3 .

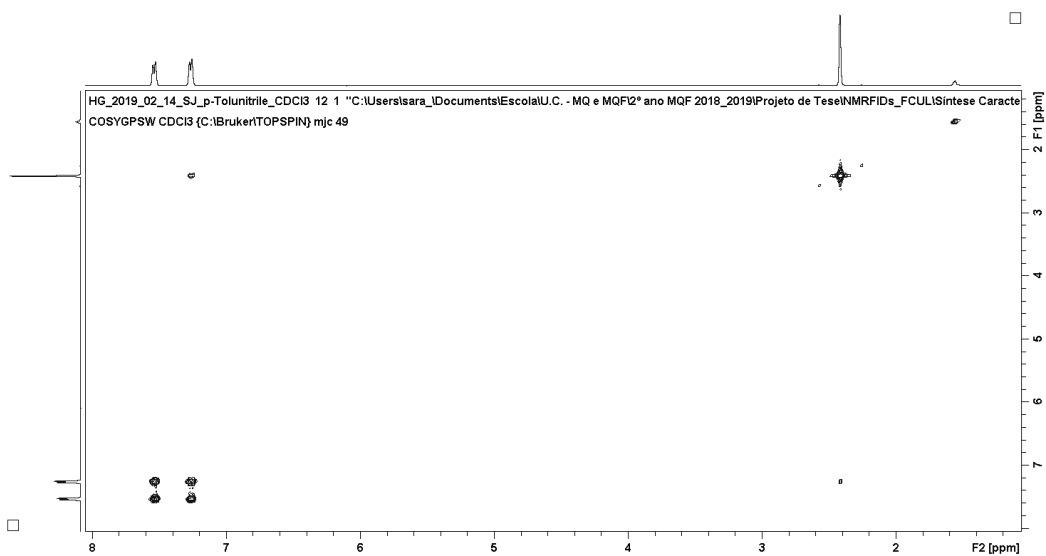


Figura 6.38. Espectro de COSY do *p*-tolunitrilo (7), em CDCl_3 .

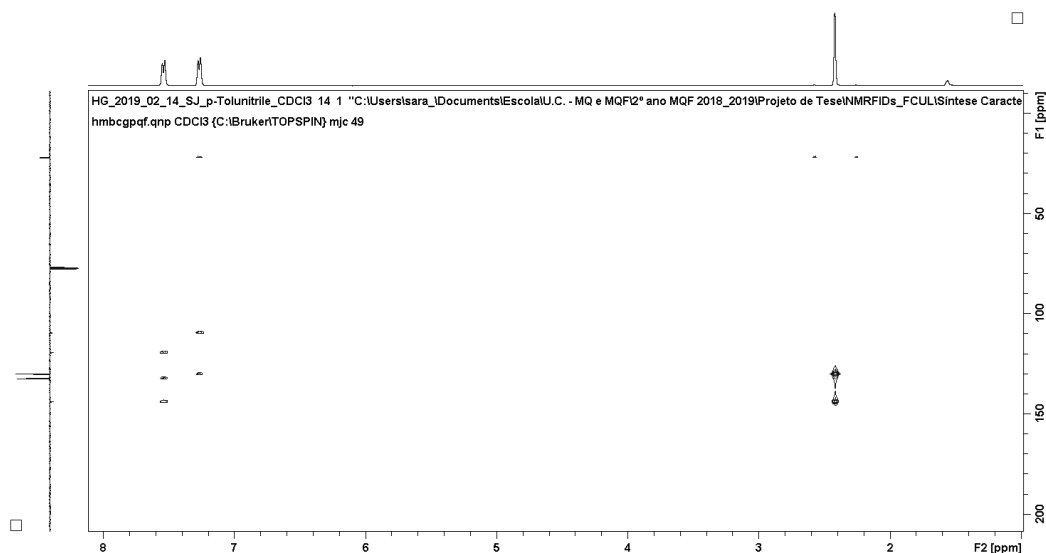


Figura 6.39. Espectro de HMBC do *p*-tolunitrilo (7), em CDCl₃.

Tabela 6.1. Dados de RMN ¹³C, ¹H, COSY e HMBC para o *p*-tolunitrilo (7), em CDCl₃.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	APT	$\delta^1\text{H}$ (integração; multiplicidade; J (Hz)) ^a	COSY ^b	HMBC ^c
1	119,32	-	————	————	2'/6'
1'	109,42	-	————	————	3'/5'
2'/6'	132,19	+	7,54 (2H; d; 7,3)	3'/5'	2'/6'
3'/5'	129,96	+	7,27 (2H; d; 7,2)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
4'	143,83	-	————	————	2'/6', 7'
7'	21,99	+	2,42 (3H, s)	3'/5'	3'/5'

^aA correspondência entre os carbonos e os prótons diretamente ligados foi baseada nas correlações de HSQC; ^bPrótons com correlação em COSY com os $\delta^1\text{H}$ da 4ª coluna; ^cPrótons com correlação em HMBC com os $\delta^{13}\text{C}$ da 2ª coluna.

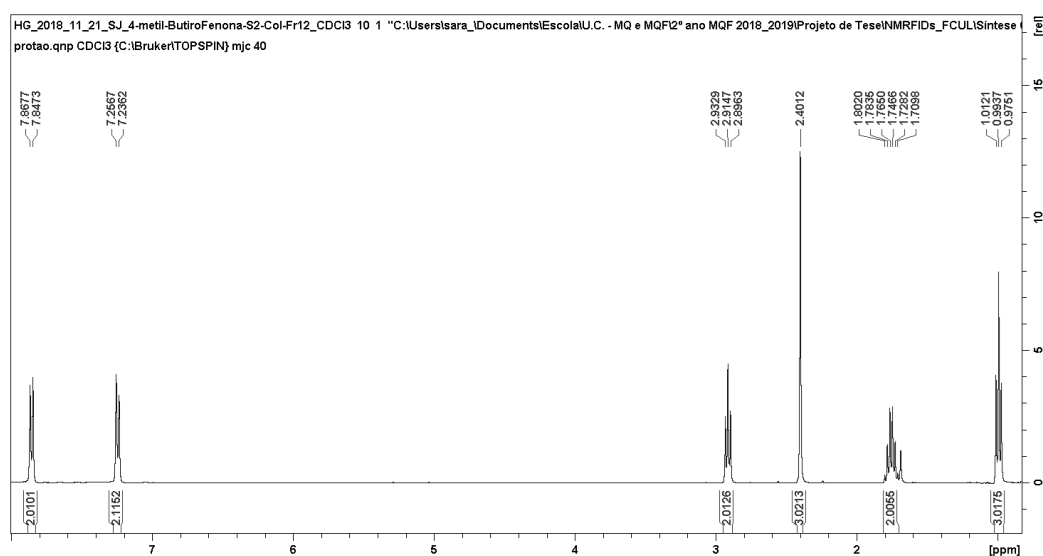


Figura 6.40. Espectro de RMN ¹H da 4'-metilbutirofenona (8), em CDCl₃.

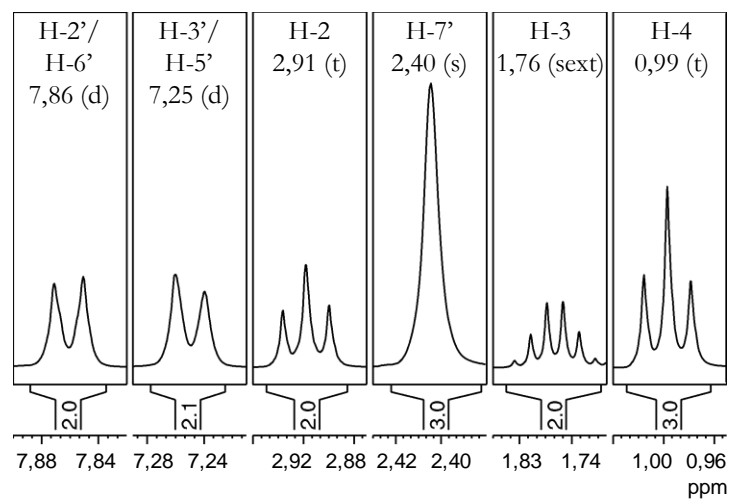


Figura 6.41. Espectro de RMN ^1H da 4'-metilbutirofenona (**8**), em CDCl_3 (ampliação).

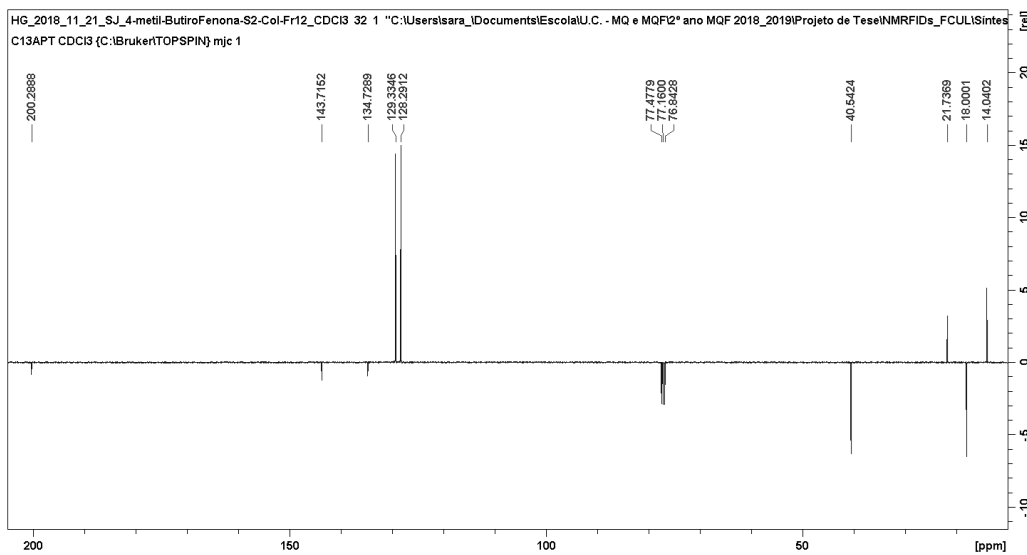


Figura 6.42. Espectro de RMN ^{13}C APT da 4'-metilbutirofenona (**8**), em CDCl_3 .

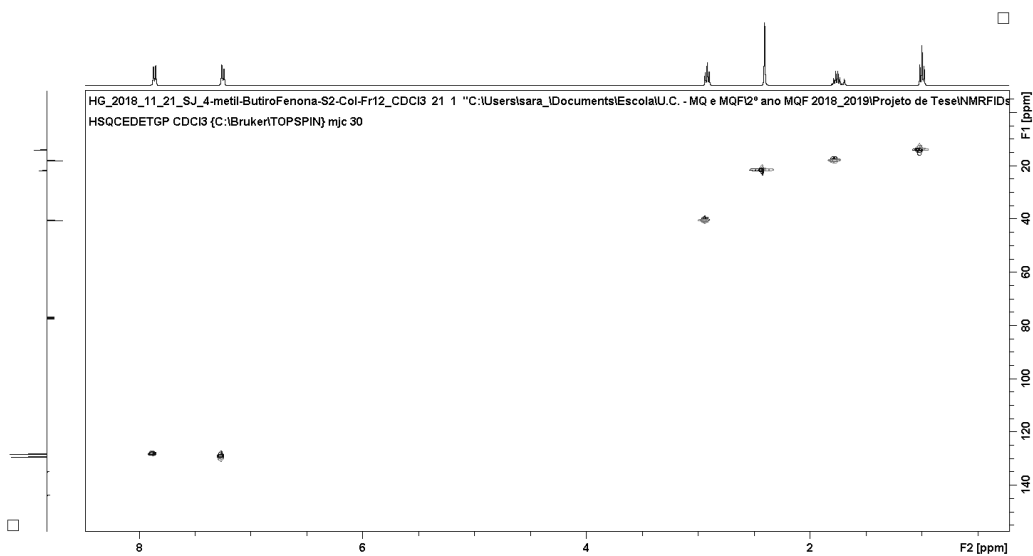


Figura 6.43. Espectro de HSQC da 4'-metilbutirofenona (**8**), em CDCl_3 .

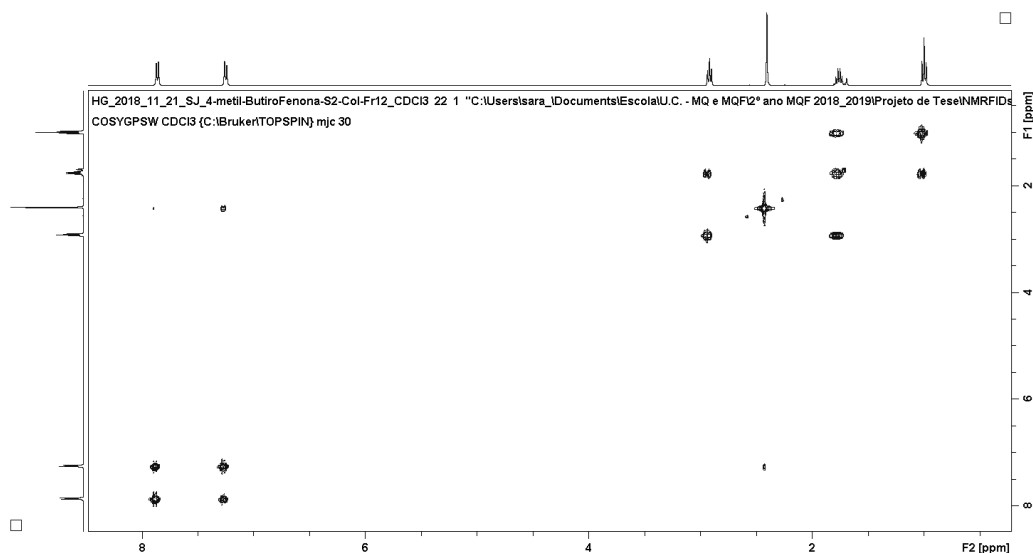


Figura 6.44. Espectro de COSY da 4'-metilbutirofenona (8), em CDCl₃.

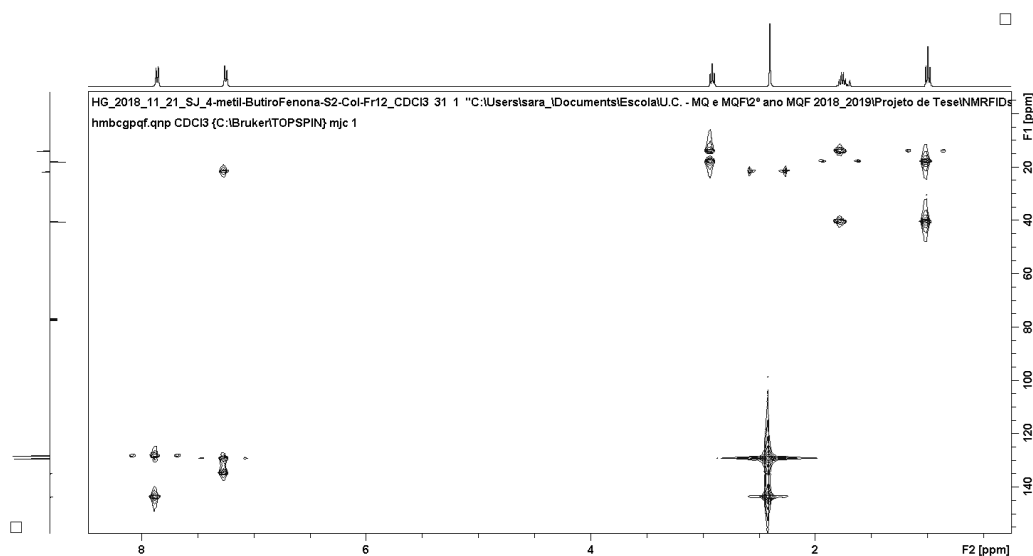


Figura 6.45. Espectro de HMBC da 4'-metilbutirofenona (8), em CDCl₃.

Tabela 6.2. Dados de RMN ¹³C, ¹H, COSY e HMBC para a 4'-metilbutirofenona (8), em CDCl₃.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	APT	$\delta^1\text{H}$ (integração; multiplicidade; J (Hz)) ^a	COSY ^b	HMBC ^c
1	200,29	-	—	—	2, 3, 2'/6'
2	40,54	-	2,91 (2H; t; 7,3)	3	3, 4
3	18,00	-	1,76 (2H; sext; 7,4)	2, 4	2, 4
4	14,04	+	0,99 (3H; t; 7,4)	3	2, 3
1'	134,73	-	—	—	3'/5'
2'/6'	128,29	+	7,86 (2H; d; 8,2)	3'/5'	2'/6'
3'/5'	129,33	+	7,25 (2H; d; 8,2)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
4'	143,72	-	—	—	2'/6', 7'
7'	21,74	+	2,40 (3H; s)	3'/5'	3'/5'

^aA correspondência entre os carbonos e os prótons diretamente ligados foi baseada nas correlações de HSQC; ^bPrótons com correlação em COSY com os $\delta^1\text{H}$ da 4ª coluna; ^cPrótons com correlação em HMBC com os $\delta^{13}\text{C}$ da 2ª coluna.

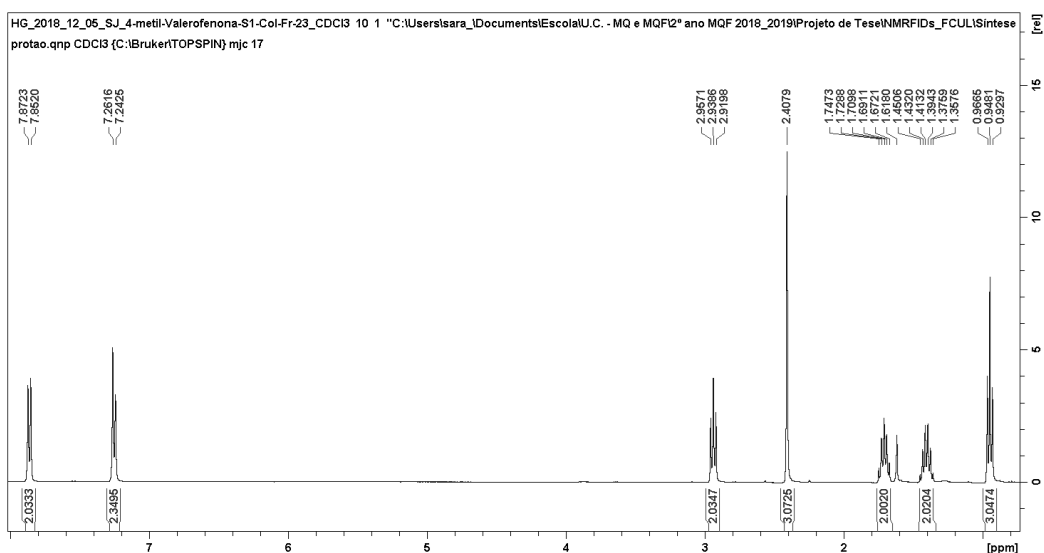


Figura 6.46. Espectro de RMN ^1H da 4'-metilvalerofenona (**9**), em CDCl_3 .

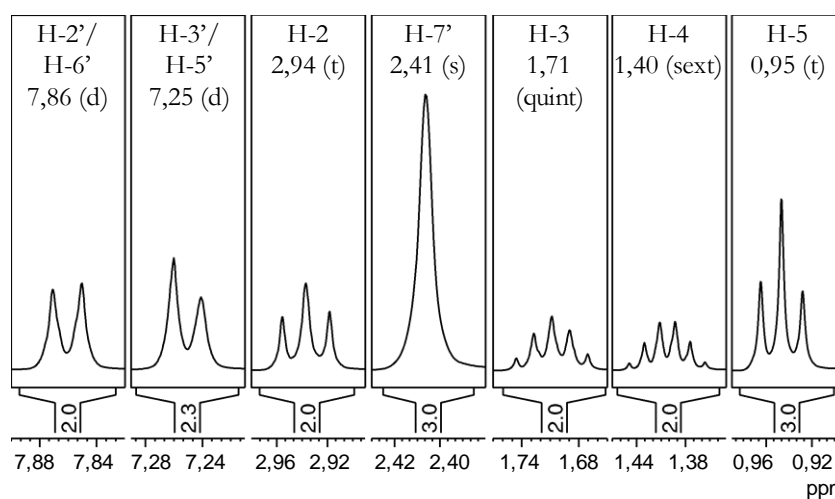


Figura 6.47. Espectro de RMN ^1H da 4'-metilvalerofenona (**9**), em CDCl_3 (ampliação).

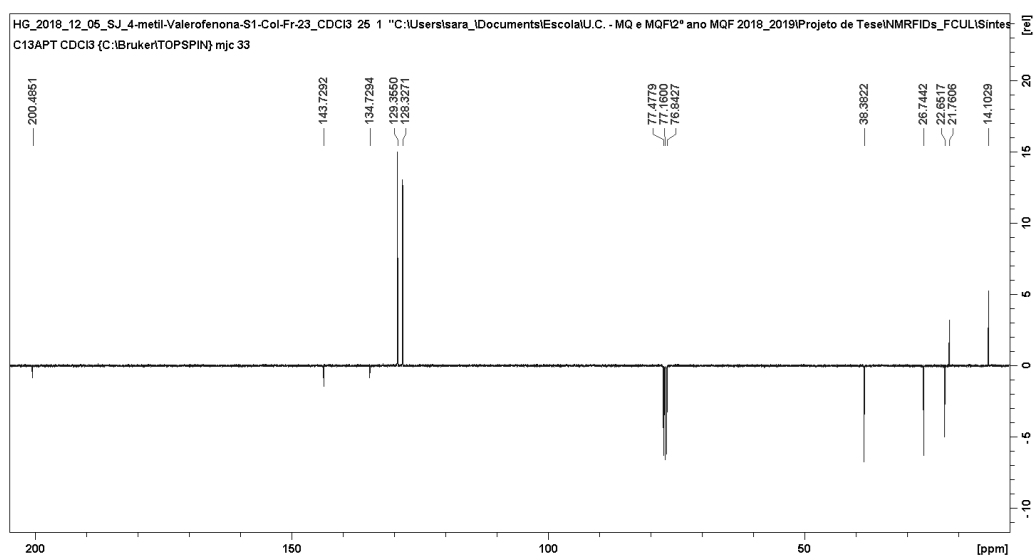


Figura 6.48. Espectro de RMN ^{13}C APT da 4'-metilvalerofenona (**9**), em CDCl_3 .

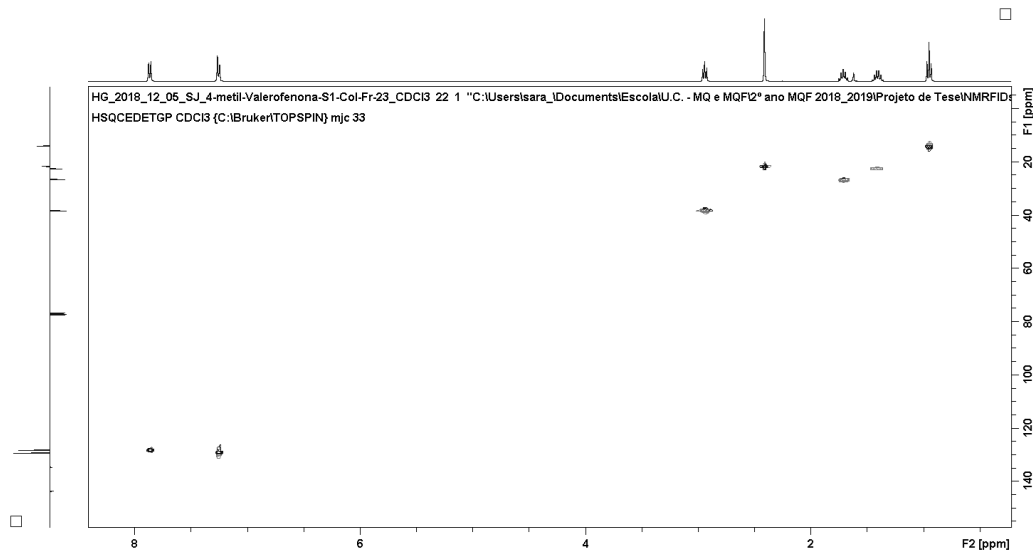


Figura 6.49. Espectro de HSQC da 4'-metilvalerofenona (9), em CDCl_3 .

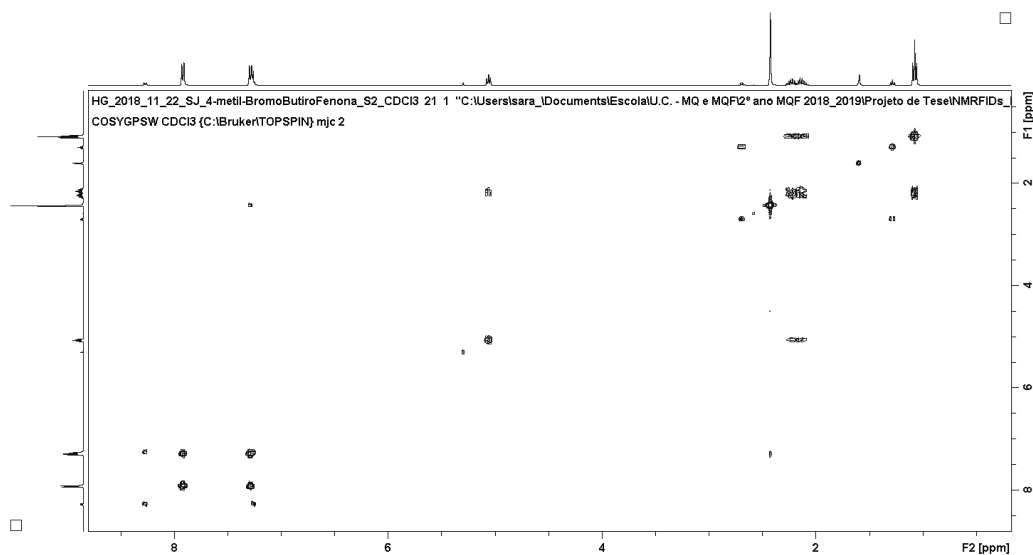


Figura 6.50. Espectro de COSY da 4'-metilvalerofenona (9), em CDCl_3 .

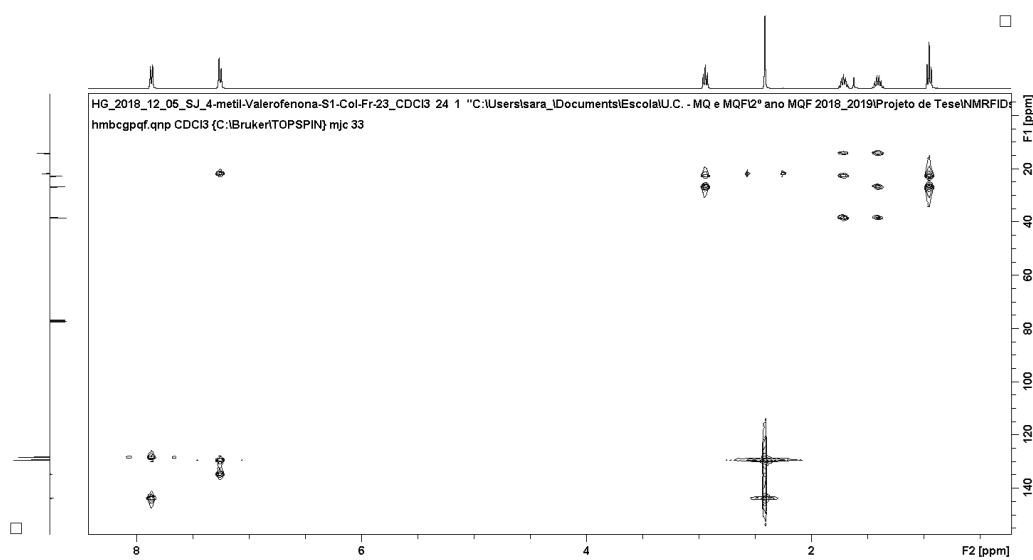


Figura 6.51. Espectro de HMBC da 4'-metilvalerofenona (9), em CDCl_3 .

Tabela 6.3. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metilvalerofenona (**9**), em CDCl_3 .

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	APT	$\delta^1\text{H}$ (integração; multiplicidade; J (Hz)) ^a	COSY ^b	HMBC ^c
1	200,49	-	—	—	2, 3, 2'/6'
2	38,38	-	2,94 (2H; t; 7,5)	3	3, 4
3	26,74	-	1,71 (2H; quint; 7,5)	2, 4	2, 4, 5
4	22,65	-	1,40 (2H; sext; 7,5)	3, 5	2, 3, 5
5	14,10	+	0,95 (3H; t; 7,4)	4	3, 4
1'	134,73	-	—	—	3'/5'
2'/6'	128,33	+	7,86 (2H; d; 8,1)	3'/5'	2'/6'
3'/5'	129,36	+	7,25 (2H; d; 7,6)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
4'	143,73	-	—	—	2'/6', 7'
7'	21,76	+	2,41 (3H; s)	3'/5'	3'/5'

^aA correspondência entre os carbonos e os prótons diretamente ligados foi baseada nas correlações de HSQC; ^bPrótons com correlação em COSY com os $\delta^1\text{H}$ da 4^a coluna; ^cPrótons com correlação em HMBC com os $\delta^{13}\text{C}$ da 2^a coluna.

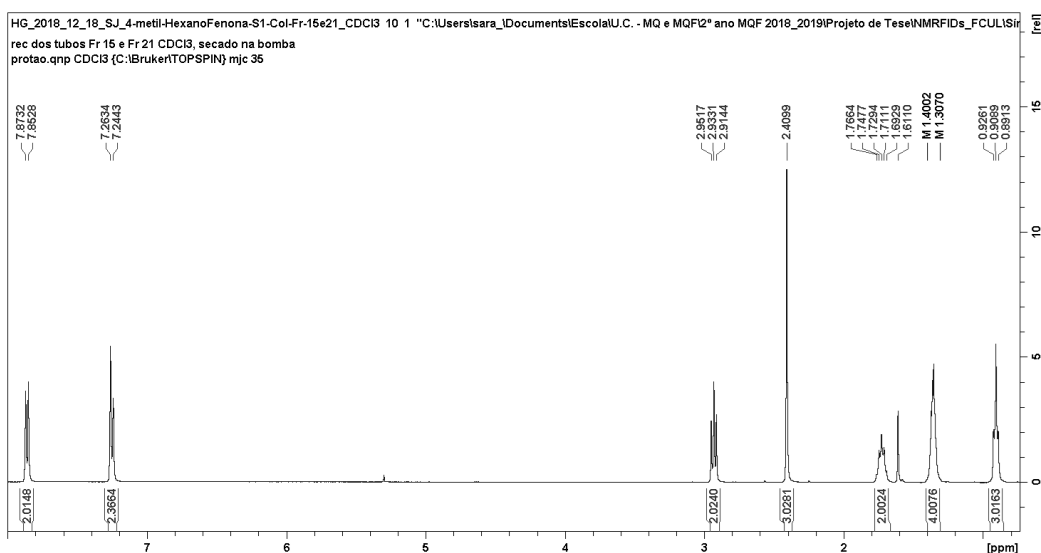


Figura 6.52. Espectro de RMN ^1H da 4'-metilhexanofenona (**10**), em CDCl_3 .

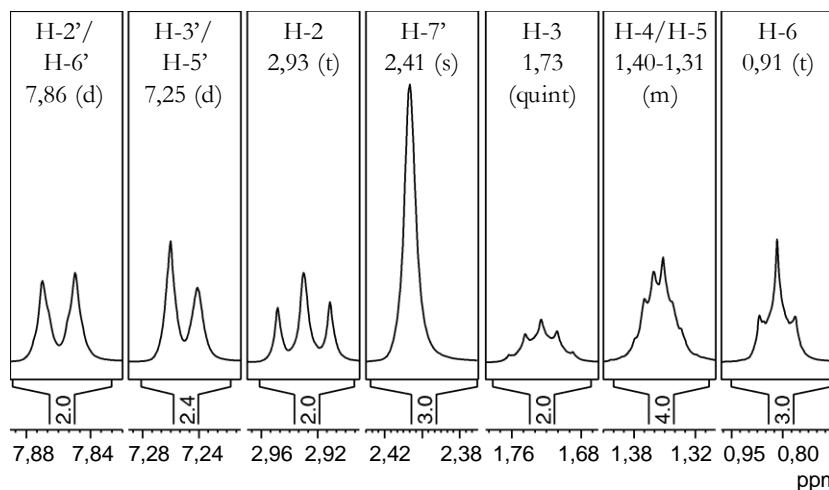


Figura 6.53. Espectro de RMN ^1H da 4'-metilhexanofenona (**10**), em CDCl_3 (ampliação).

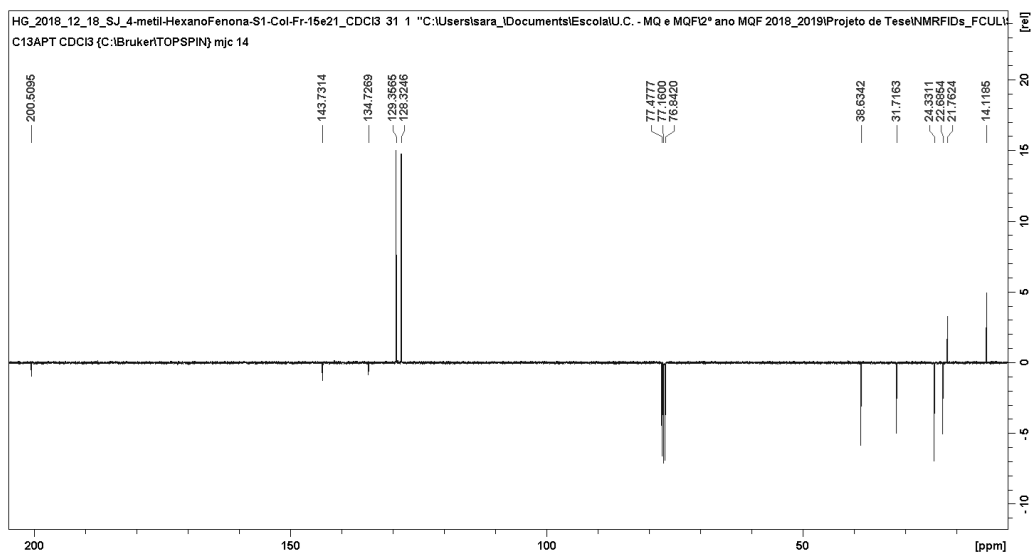


Figura 6.54. Espectro de RMN ^{13}C APT da 4'-metilhexanofenona (**10**), em CDCl_3 .

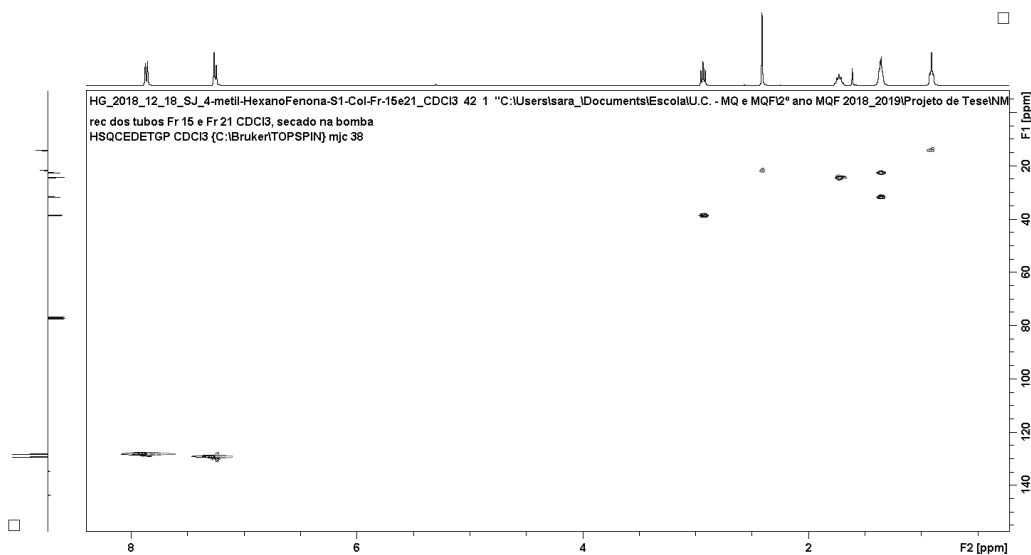


Figura 6.55. Espectro de HSQC da 4'-metilhexanofenona (**10**), em CDCl_3 .

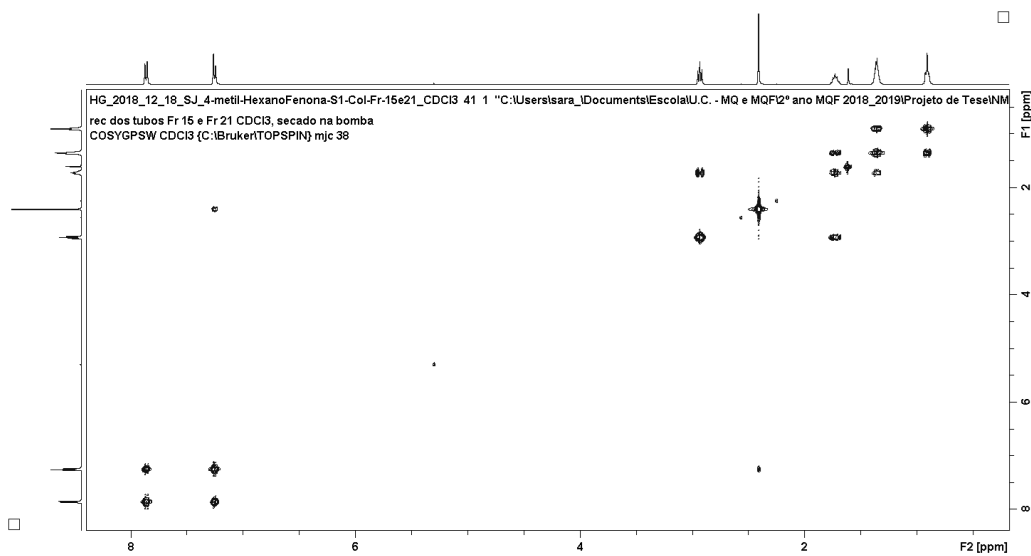


Figura 6.56. Espectro de COSY da 4'-metilhexanofenona (**10**), em CDCl_3 .

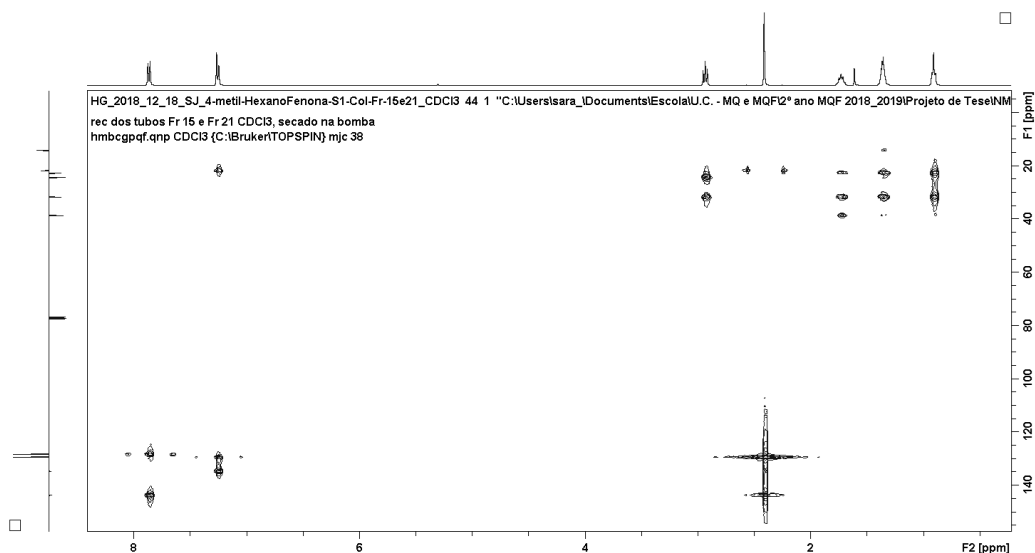


Figura 6.57. Espectro de HMBC da 4'-metilhexanofenona (**10**), em CDCl₃.

Tabela 6.4. Dados de RMN ¹³C, ¹H, COSY e HMBC para a 4'-metilhexanofenona (**10**), em CDCl₃.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	APT	$\delta^1\text{H}$ (integração; multiplicidade; J (Hz)) ^a	COSY ^b	HMBC ^c
1	200,51	-	—	—	2, 3, 2'/6'
2	38,63	-	2,93 (2H; t; 7,5)	3	3
3	24,33	-	1,73 (2H; m; 7,4)	2, 4	2
4	31,72	-	1,40-1,31 (2H; m)	3	2, 3, 5, 6
5	22,69	-	1,40-1,31 (2H; m)	6	3, 4, 6
6	14,12	+	0,91 (3H; t; 7,0)	5	4/5
1'	134,73	-	—	—	3'/5'
2'/6'	128,32	+	7,86 (2H; d; 8,2)	3'/5'	2'/6'
3'/5'	129,36	+	7,25 (2H; d; 7,6)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
4'	143,73	-	—	—	2'/6', 7'
7'	21,76	+	2,41 (3H; s)	3'/5'	3'/5'

^aA correspondência entre os carbonos e os prótons diretamente ligados foi baseada nas correlações de HSQC; ^bPrótons com correlação em COSY com os $\delta^1\text{H}$ da 4^a coluna; ^cPrótons com correlação em HMBC com os $\delta^{13}\text{C}$ da 2^a coluna.

Anexo D: Caracterização das bromocetonas por RMN

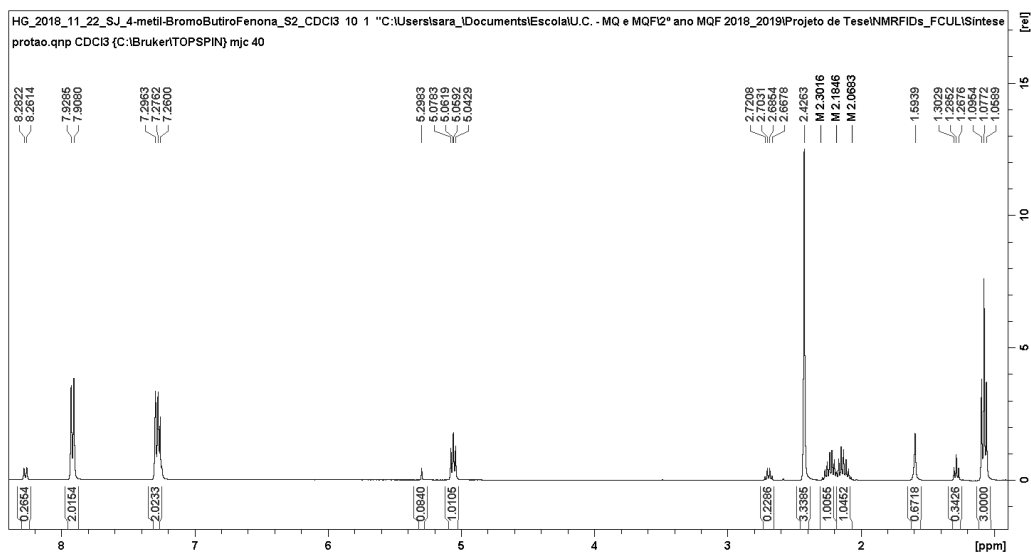


Figura 6.58. Espectro de RMN ^1H da 4'-metil-2-bromobutyrofenona (**11**), em CDCl_3 .

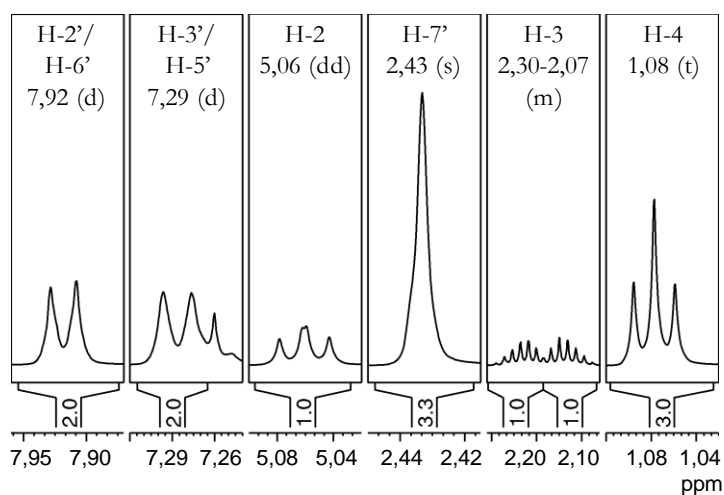


Figura 6.59. Espectro de RMN ^1H da 4'-metil-2-bromobutyrofenona (**11**), em CDCl_3 (ampliação).

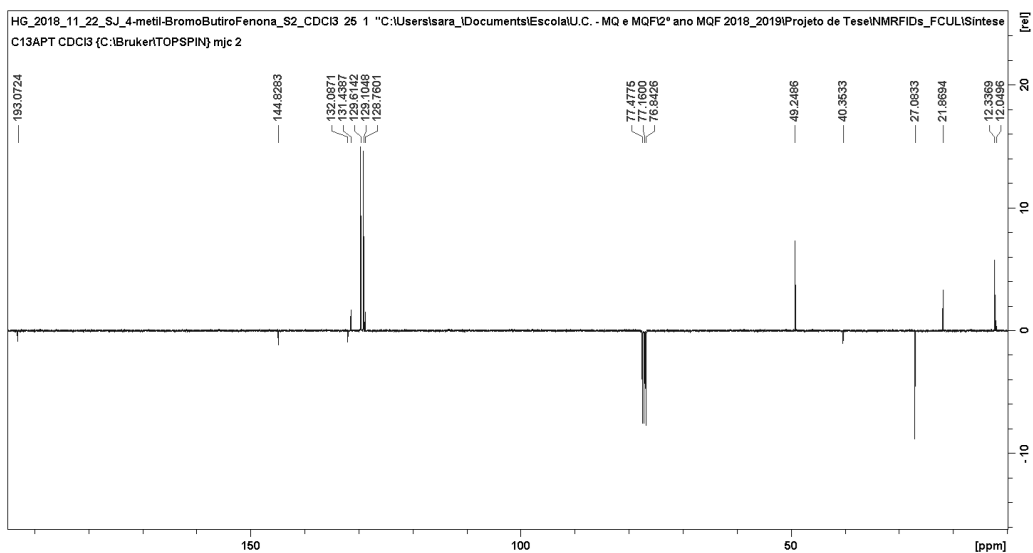


Figura 6.60. Espetro de RMN ^{13}C APT da 4'-metil-2-bromobutirofenona (**11**), em CDCl_3 .

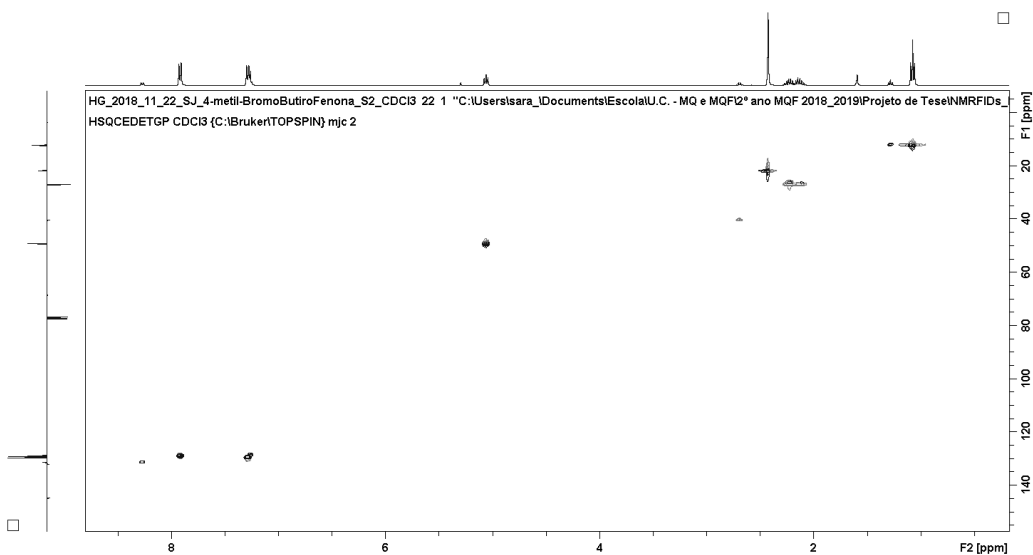


Figura 6.61. Espetro de HSQC da 4'-metil-2-bromobutirofenona (**11**), em CDCl_3 .

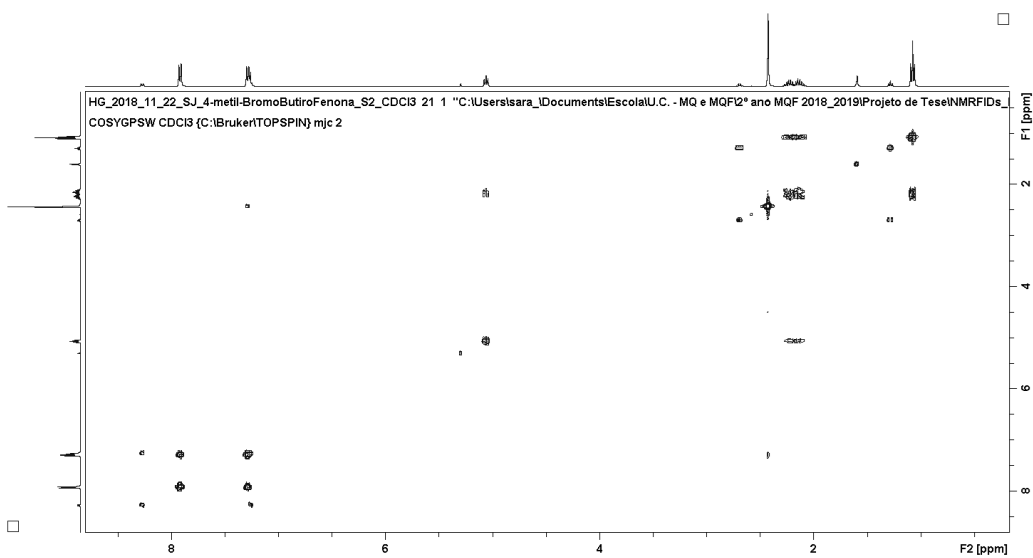


Figura 6.62. Espetro de COSY da 4'-metil-2-bromobutirofenona (**11**), em CDCl_3 .

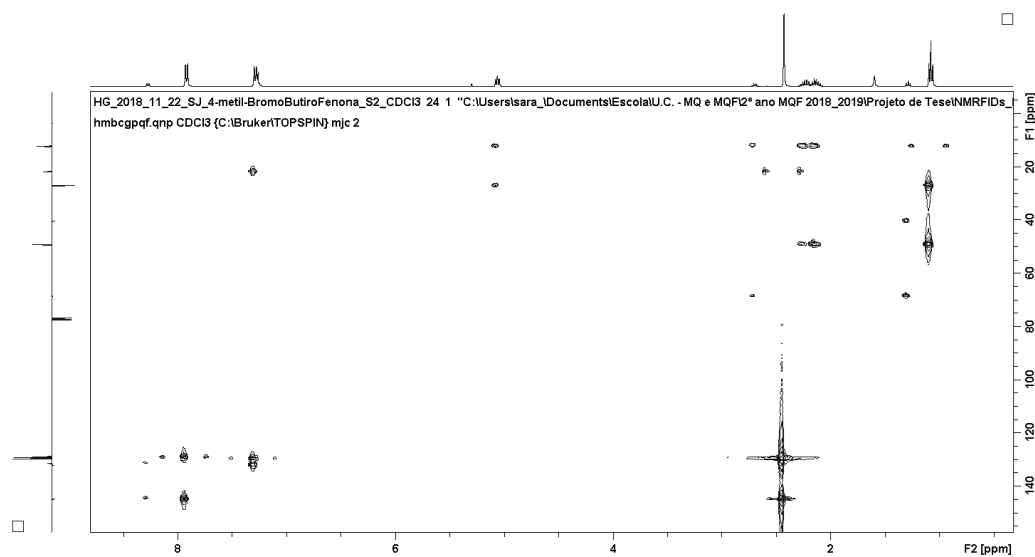


Figura 6.63. Espectro de HMBC da 4'-metil-2-bromobutirolfenona (**11**), em CDCl_3 .

Tabela 6.5. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metil-2-bromobutirolfenona (**11**), em CDCl_3 .

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	APT	$\delta^1\text{H}$ (integração; multiplicidade; J (Hz)) ^a	COSY ^b	HMBC ^c
1	193,07	-	—	—	2, 3, 2'/6'
2	49,25	+	5,06 (1H; dd; 7,6/6,5)	3	3, 4
3	27,08	-	2,30-2,07 (2H; m)	2, 4	2, 4
4	12,34	+	1,08 (3H; t; 7,3)	3	2, 3
1'	132,09	-	—	—	3'/5'
2'/6'	129,10	+	7,92 (2H; d; 8,2)	3'/5'	2'/6'
3'/5'	129,61	+	7,29 (2H; d; 8,0)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
4'	144,83	-	—	—	2'/6', 7'
7'	21,87	+	2,43 (3H; s)	3'/5'	3'/5'

^aA correspondência entre os carbonos e os prótons diretamente ligados foi baseada nas correlações de HSQC; ^bPrótons com correlação em COSY com os $\delta^1\text{H}$ da 4ª coluna; ^cPrótons com correlação em HMBC com os $\delta^{13}\text{C}$ da 2ª coluna.

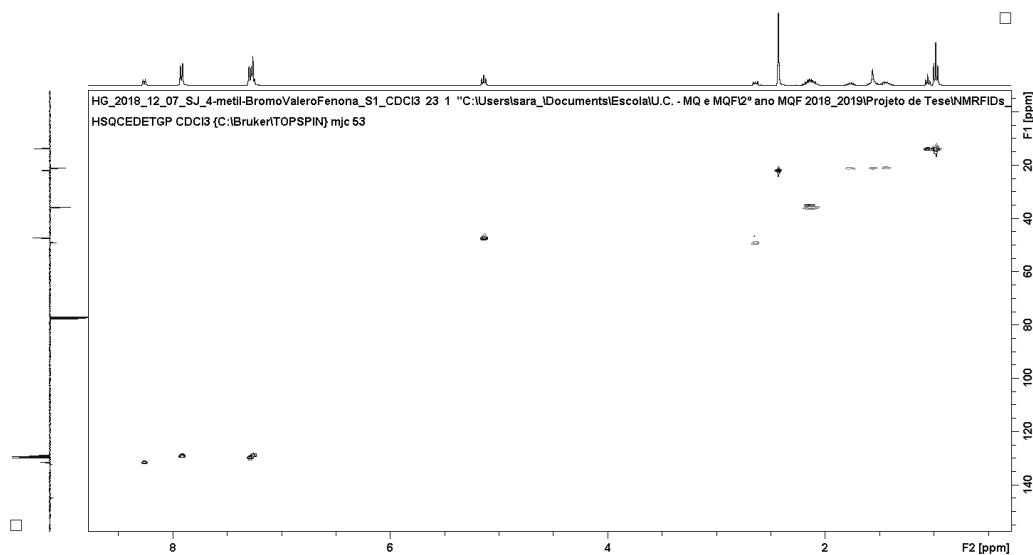


Figura 6.67. Espectro de HSQC da 4'-metil-2-bromovalerofenona (**12**), em CDCl₃.

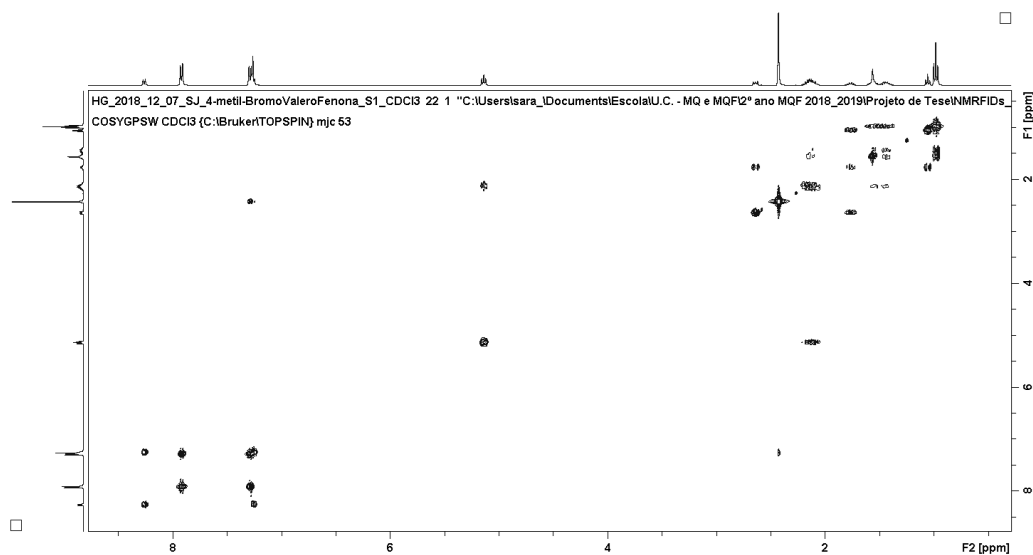


Figura 6.68. Espectro de COSY da 4'-metil-2-bromovalerofenona (**12**), em CDCl₃.

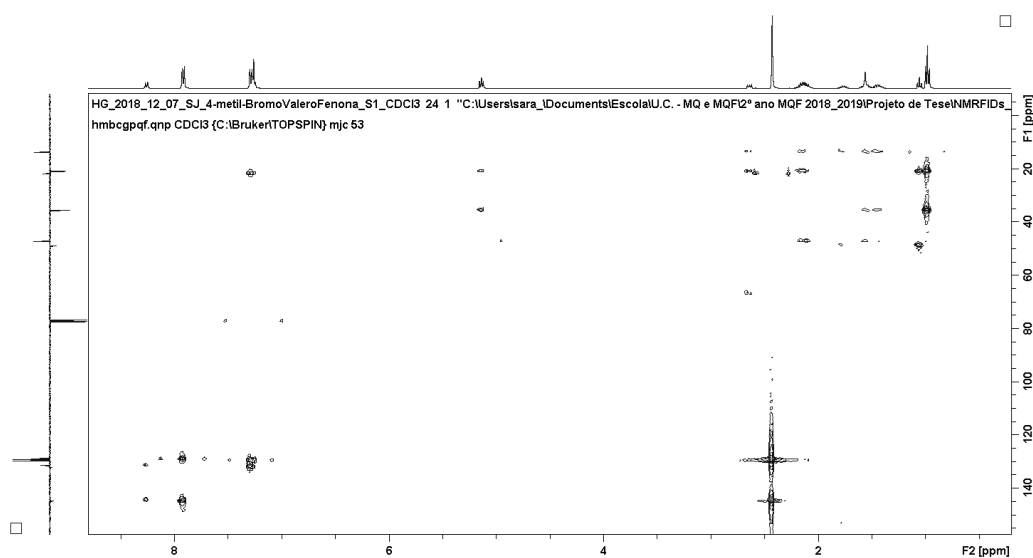


Figura 6.69. Espectro de HMBC da 4'-metil-2-bromovalerofenona (**12**), em CDCl₃.

Tabela 6.6. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metil-2-bromovalerofenona (**12**), em CDCl_3 .

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	APT	$\delta^1\text{H}$ (integração; multiplicidade; J (Hz)) ^a	COSY ^b	HMBC ^c
1	193,14	-	—	—	2, 3, 2'/6'
2	47,23	+	5,14 (1H; dd; 7,6/6,7)	3	3, 4
3	35,62	-	2,23-2,04 (2H; m)	2, 4	2, 4, 5
4	20,94	-	1,64-1,36 (2H; m)	3, 5	2, 3, 5
5	13,74	+	0,97 (3H; t; 7,4)	4	3, 4
1'	132,06	-	—	—	3'/5'
2'/6'	129,11	+	7,92 (2H; d; 8,2)	3'/5'	2'/6'
3'/5'	129,63	+	7,29 (2H; d; 8,0)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
4'	144,84	-	—	—	2'/6', 7'
7'	21,88	+	2,43 (3H; s)	3'/5'	3'/5'

^aA correspondência entre os carbonos e os prótons diretamente ligados foi baseada nas correlações de HSQC; ^bPrótons com correlação em COSY com os $\delta^1\text{H}$ da 4ª coluna; ^cPrótons com correlação em HMBC com os $\delta^{13}\text{C}$ da 2ª coluna.

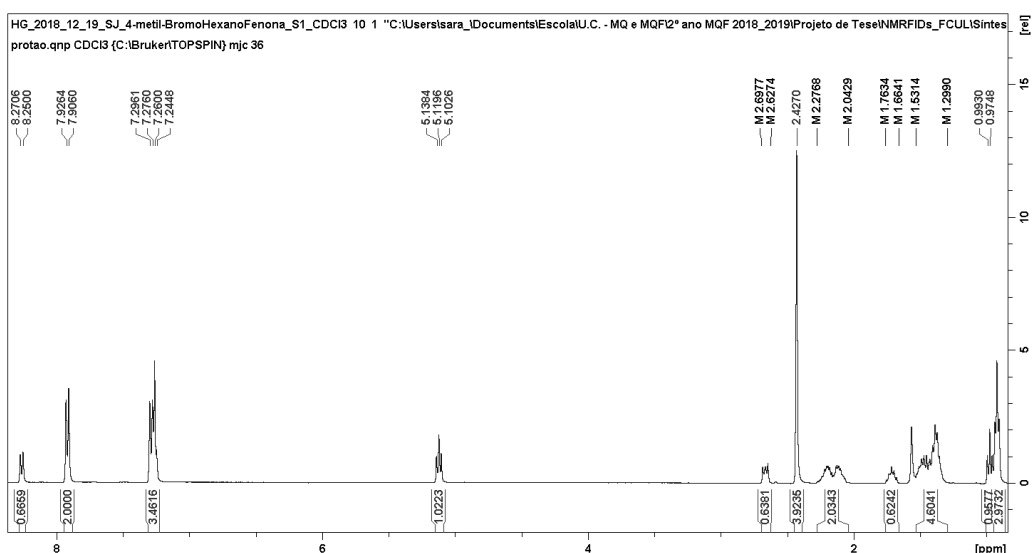


Figura 6.70. Espectro de RMN ^1H da 4'-metil-2-bromohexanofenona (**13**), em CDCl_3 .

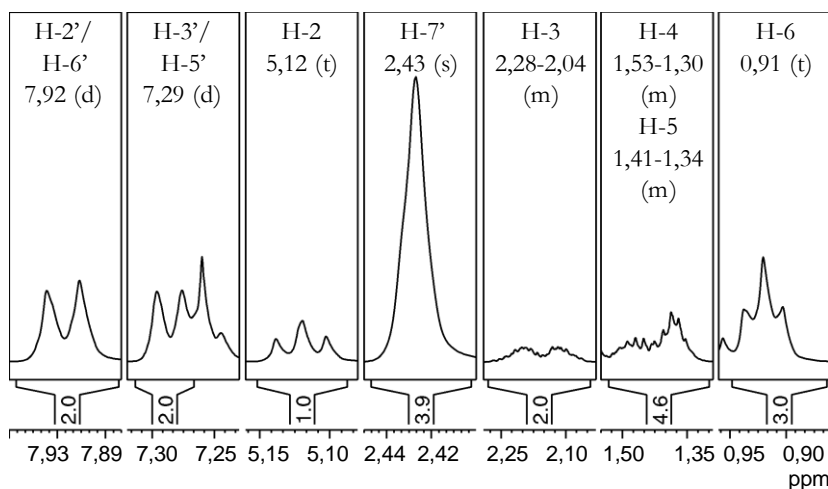


Figura 6.71. Espectro de RMN ^1H da 4'-metil-2-bromohexanofenona (**13**), em CDCl_3 (ampliação).

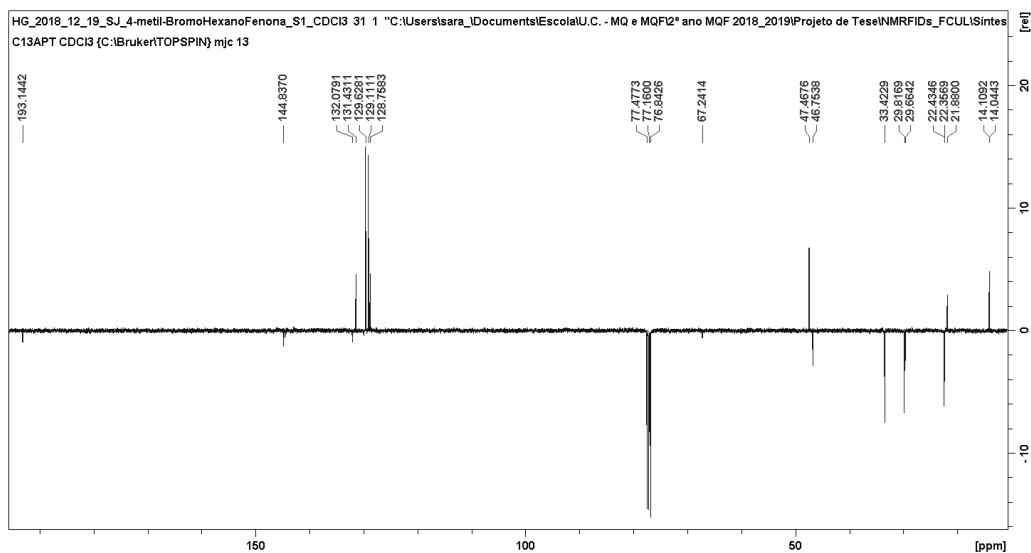


Figura 6.72. Espectro de RMN ^{13}C APT da 4^a-metil-2-bromohexanofenona (**13**), em CDCl_3 .

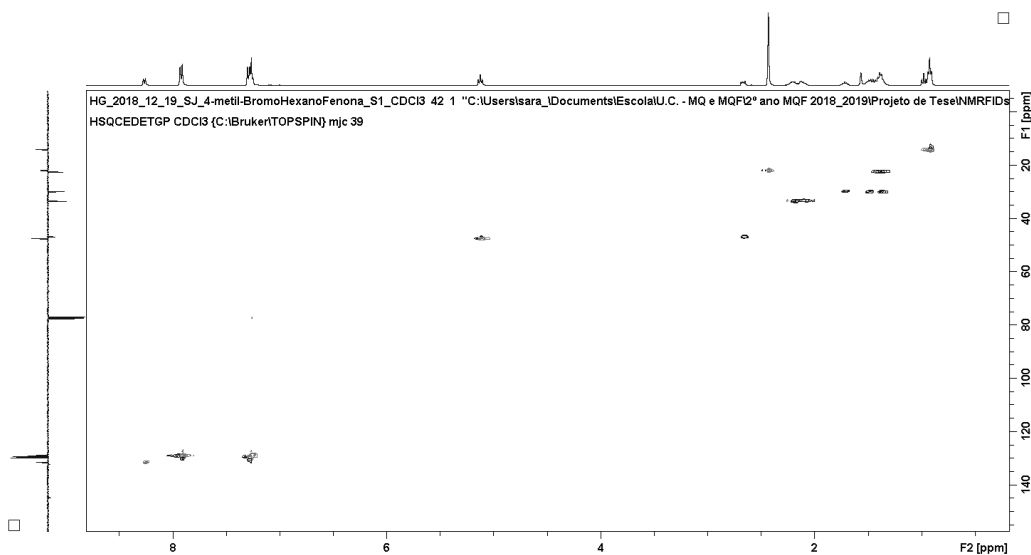


Figura 6.73. Espectro de HSQC da 4^a-metil-2-bromohexanofenona (**13**), em CDCl_3 .

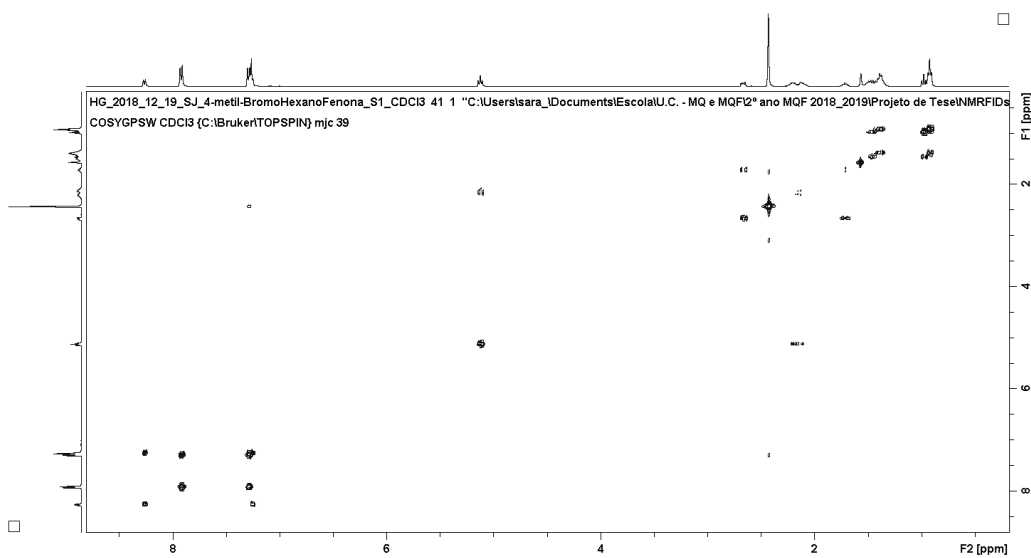


Figura 6.74. Espectro de COSY da 4^a-metil-2-bromohexanofenona (**13**), em CDCl_3 .

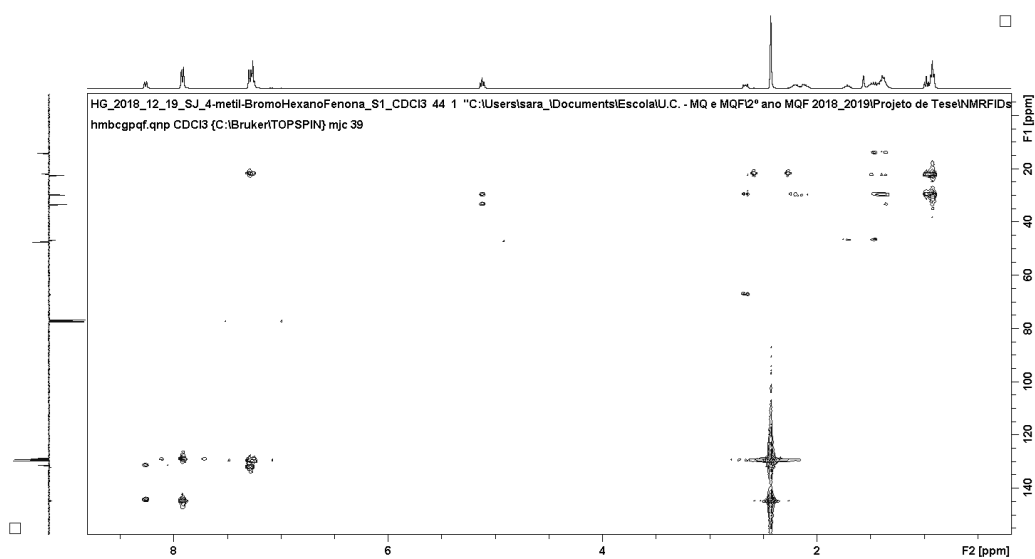


Figura 6.75. Espectro de HMBC da 4'-metil-2-bromohexanofenona (**13**), em CDCl_3 .

Tabela 6.7. Dados de RMN ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC para a 4'-metil-2-bromohexanofenona (**13**), em CDCl_3 .

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	APT	$\delta^1\text{H}$ (integração; multiplicidade; J (Hz)) ^a	COSY ^b	HMBC ^c
1	193,14	-	—	—	2, 2'/6'
2	47,47	+	5,12 (1H; t; 7,2)	3	—
3	33,42	-	2,28-2,04 (2H; m)	2, 4	2, 5
4	29,82	-	1,53-1,30 (2H; m)	3	2, 3, 5, 6
5	22,43	-	1,41-1,34 (2H; m)	6	4, 6
6	14,04	+	0,91 (3H; t; 6,9)	5	4, 5
1'	132,08	-	—	—	3'/5'
2'/6'	129,11	+	7,92 (2H; d; 8,2)	3'/5'	2'/6'
3'/5'	129,63	+	7,29 (2H; d; 8,0)	2'/6', 7'	3'/5', 7'
4'	144,84	-	—	—	2'/6', 7'
7'	21,88	+	2,43 (3H; s)	3'/5'	3'/5'

^aA correspondência entre os carbonos e os prótons diretamente ligados foi baseada nas correlações de HSQC; ^bPrótons com correlação em COSY com os $\delta^1\text{H}$ da 4ª coluna; ^cPrótons com correlação em HMBC com os $\delta^{13}\text{C}$ da 2ª coluna.

Anexo E: Caracterização das cationas por RMN, em CDCl_3

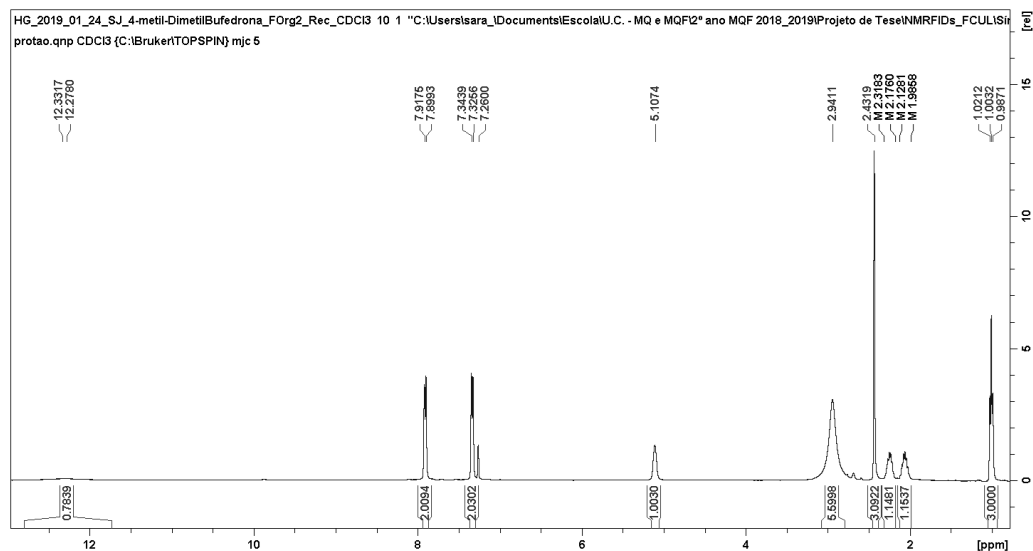


Figura 6.76. Espectro de RMN ^1H da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (**1**), em CDCl_3 .

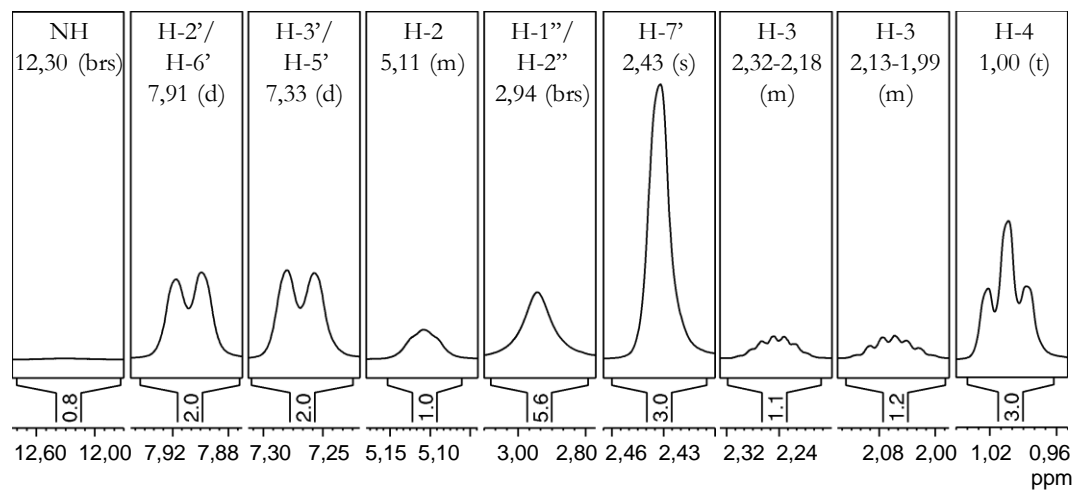


Figura 6.77. Espectro de RMN ^1H da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (**1**), em CDCl_3 (ampliação).

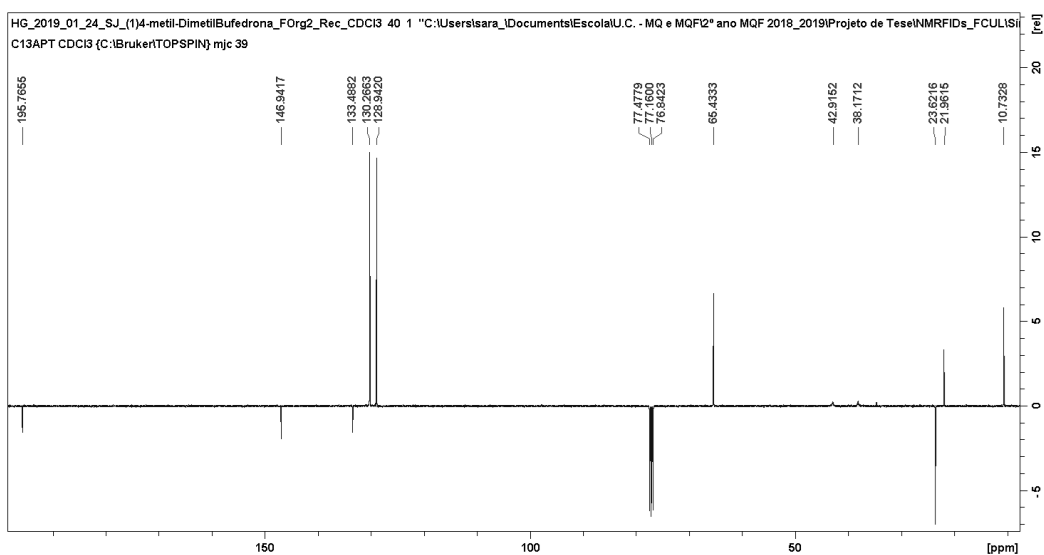


Figura 6.78. Espectro de RMN ^{13}C APT da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (**1**), em CDCl_3 .

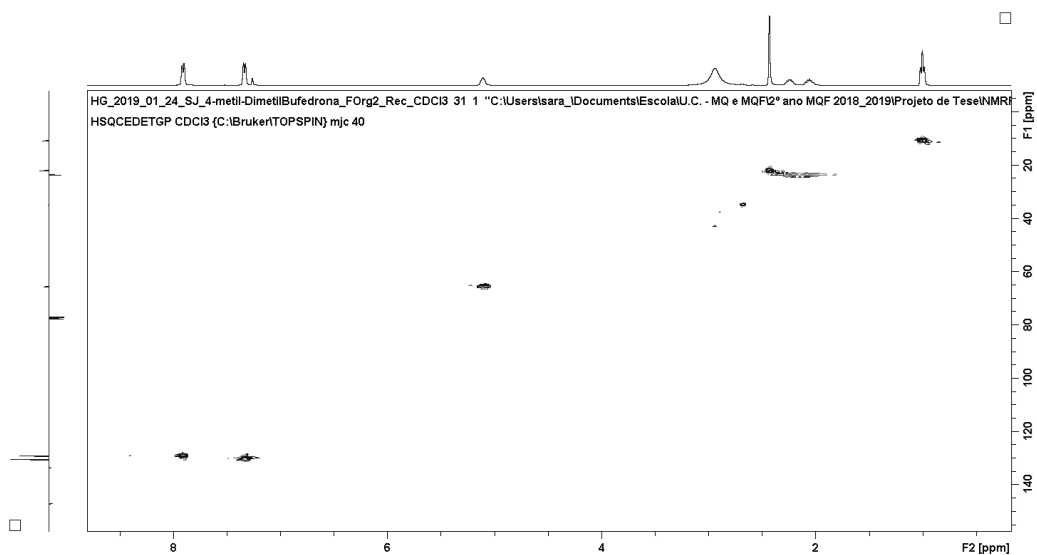


Figura 6.79. Espectro de HSQC da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (**1**), em CDCl_3 .

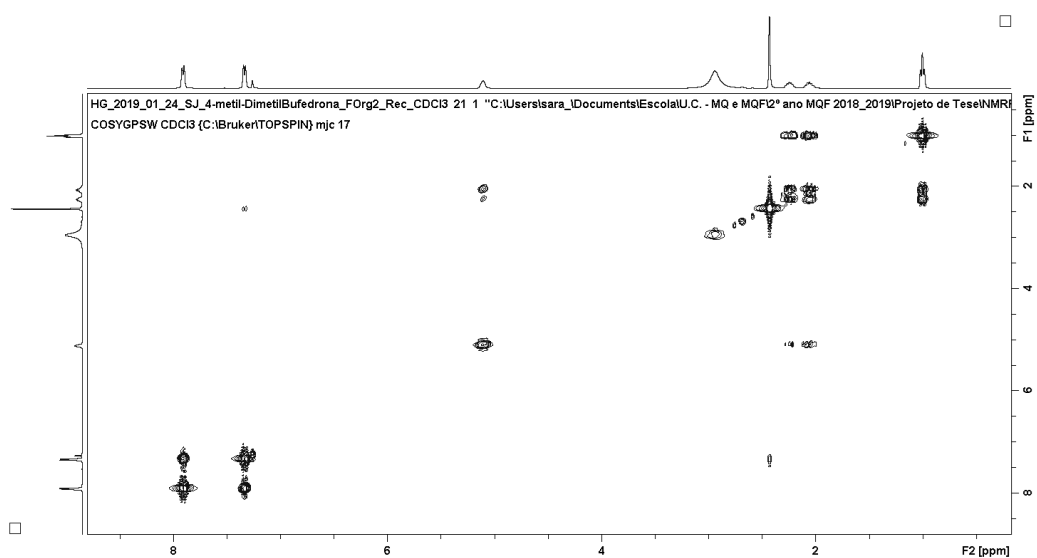


Figura 6.80. Espectro de COSY da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (**1**), em CDCl_3 .

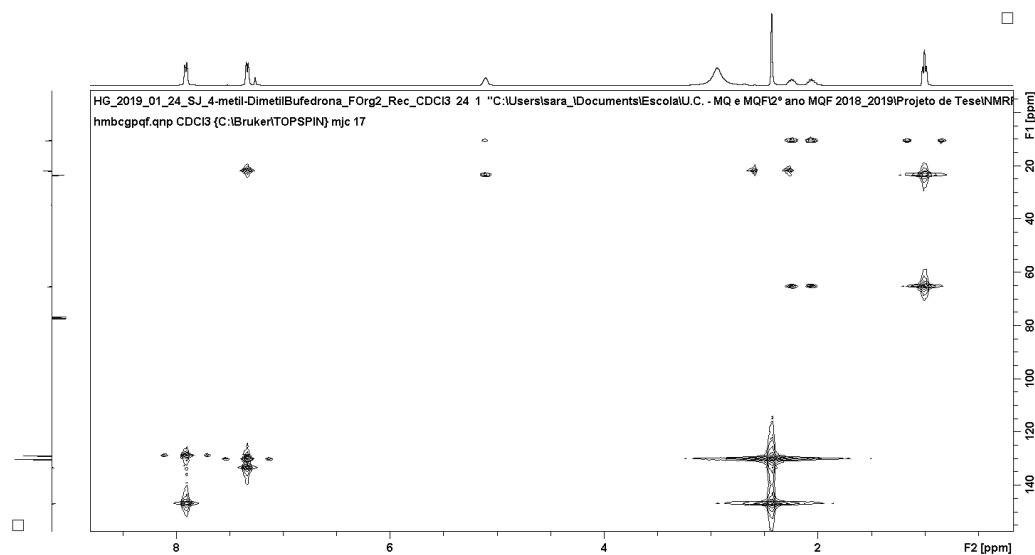


Figura 6.81. Espectro de HMBC da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (**1**), em CDCl_3 .

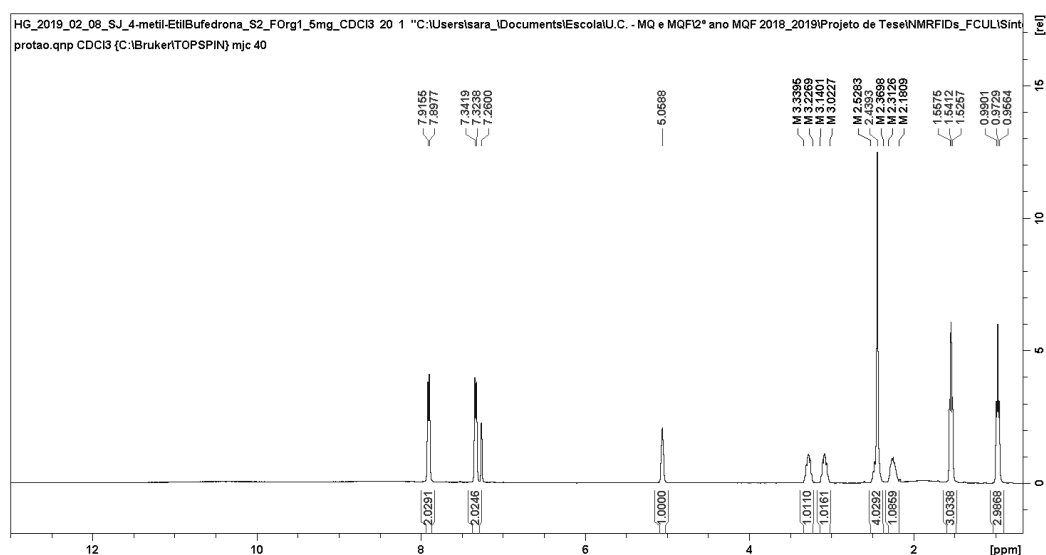


Figura 6.82. Espectro de RMN ^1H da 4'-metil-*N*-etilnorbufedrona (**2**), em CDCl_3 .

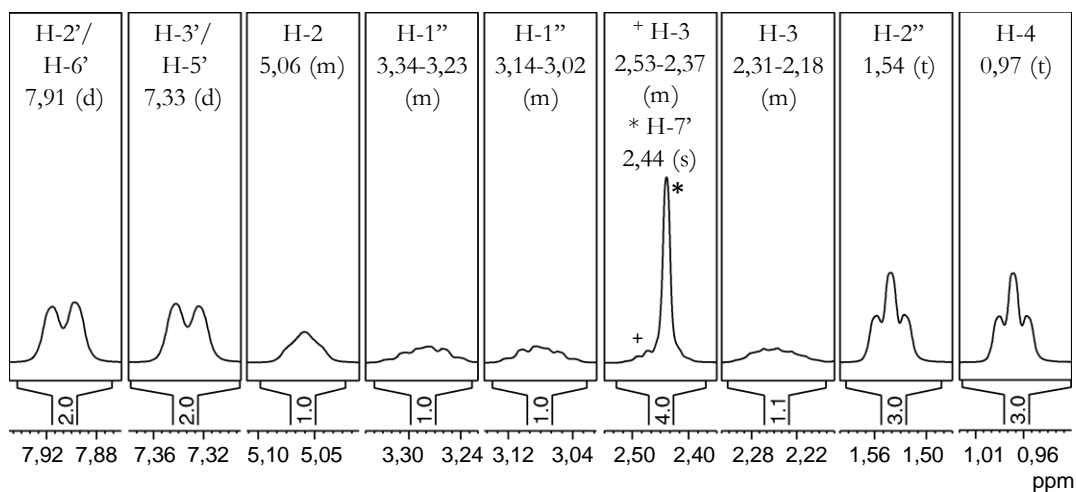


Figura 6.83. Espectro de RMN ^1H da 4'-metil-*N*-etilnorbufedrona (**2**), em CDCl_3 (ampliação).

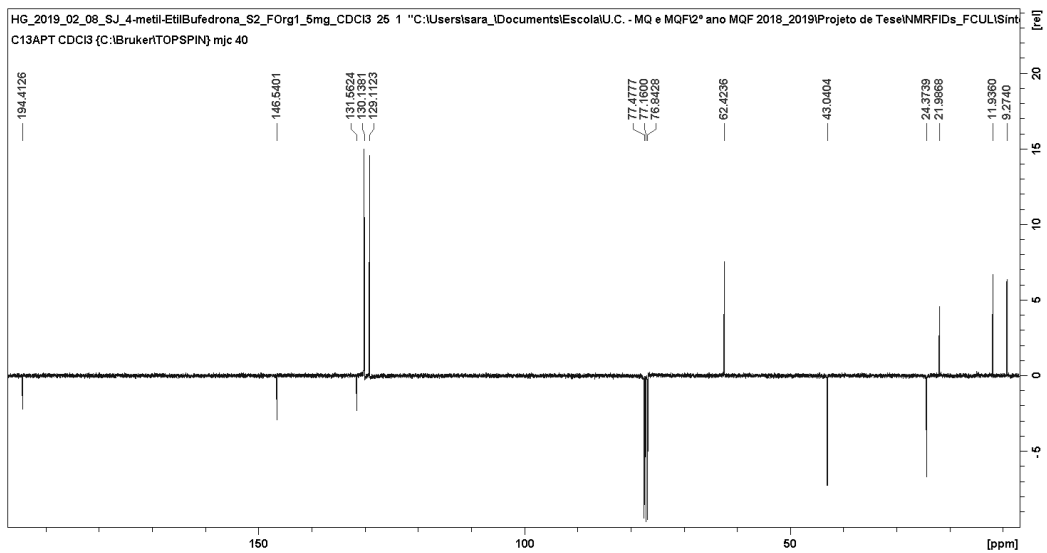


Figura 6.84. Espectro de RMN ^{13}C APT da 4'-metil-N-etilnorbufedrona (2), em CDCl_3 .

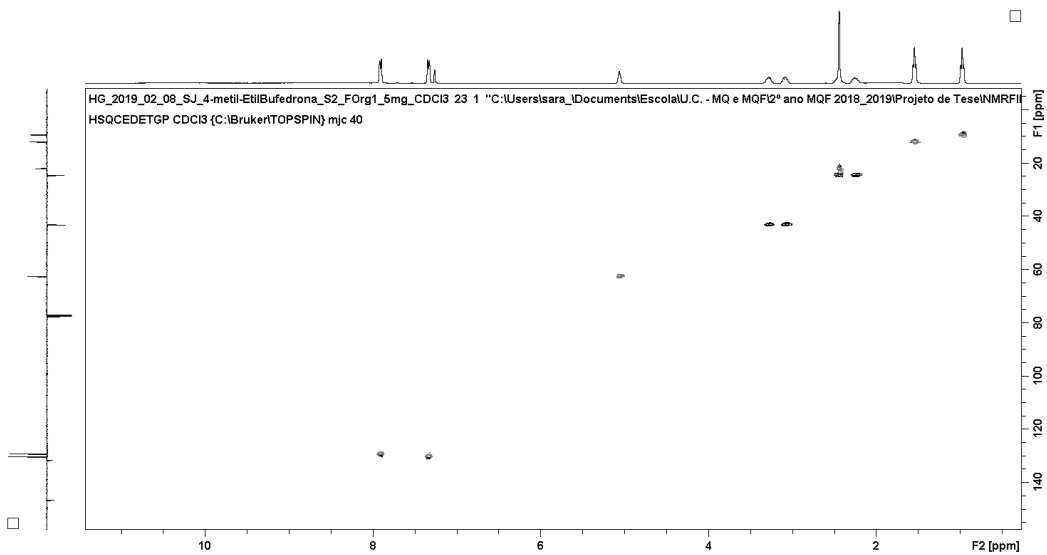


Figura 6.85. Espectro de RMN HSQC da 4'-metil-N-etilnorbufedrona (2), em CDCl_3 .

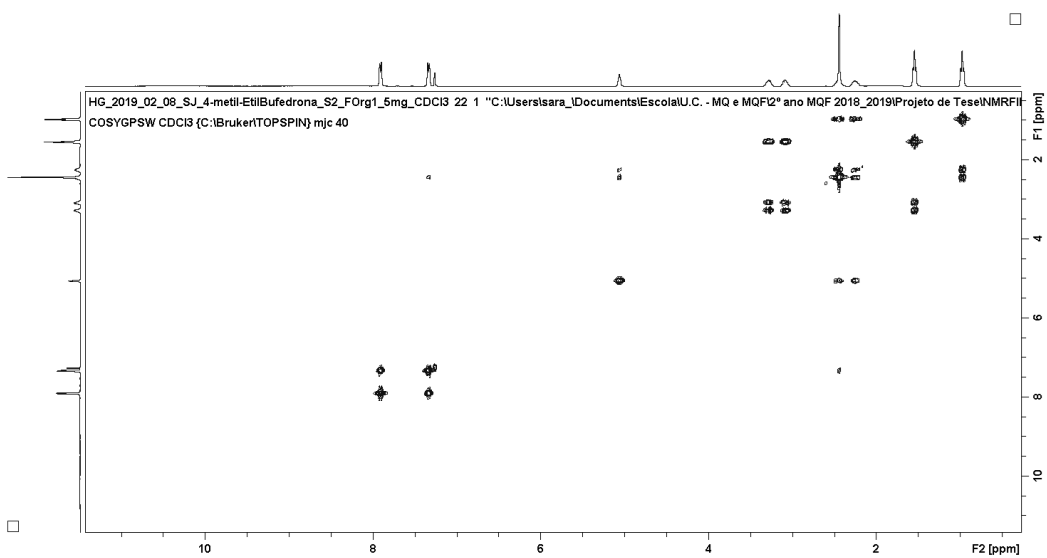


Figura 6.86. Espectro de RMN COSY da 4'-metil-N-etilnorbufedrona (2), em CDCl_3 .

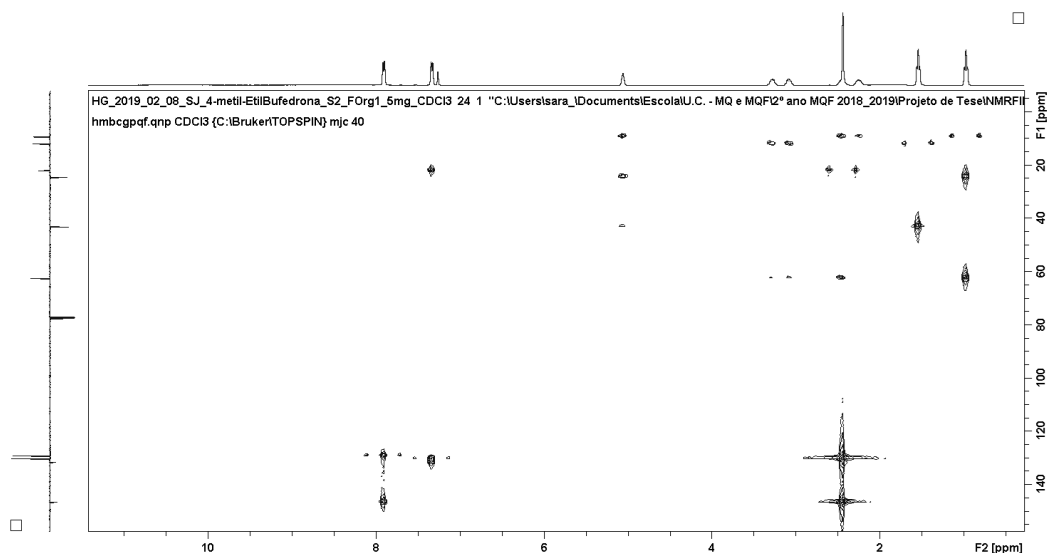


Figura 6.87. Espectro de RMN HMBC da 4'-metil-*N*-etilnorbufedrona (**2**), em CDCl_3 .

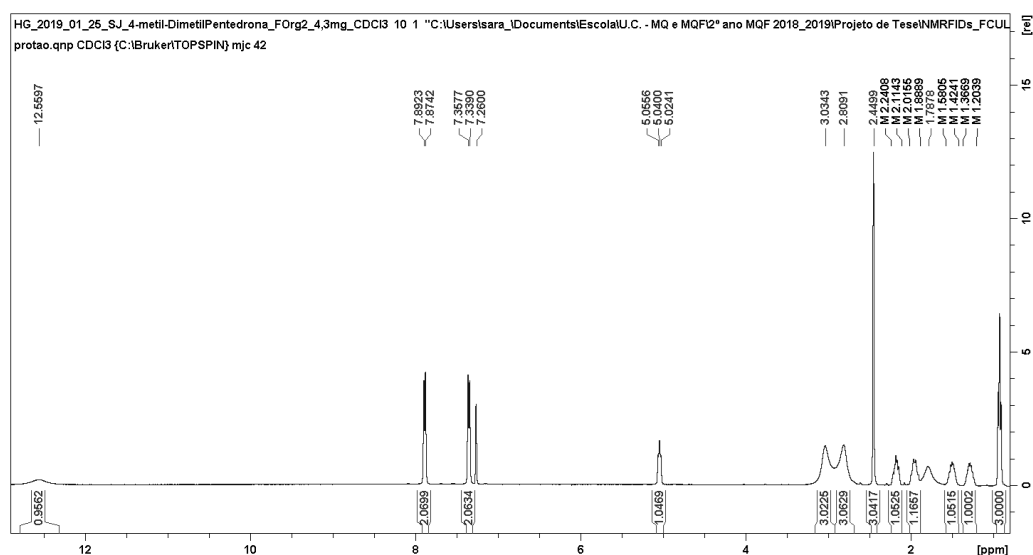


Figura 6.88. Espectro de RMN ^1H da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorpentadrona (**3**), em CDCl_3 .

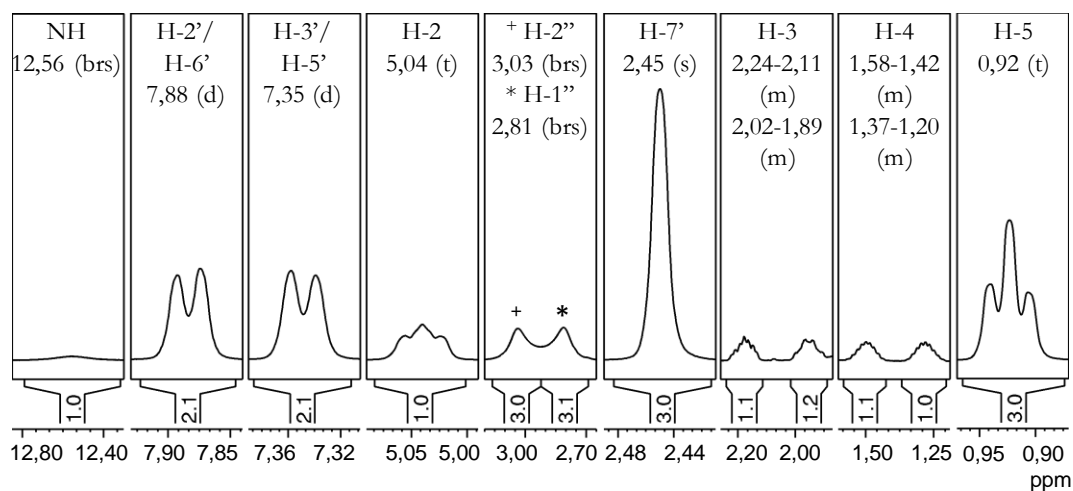


Figura 6.89. Espectro de RMN ^1H da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorpentadrona (**3**), em CDCl_3 (ampliação).

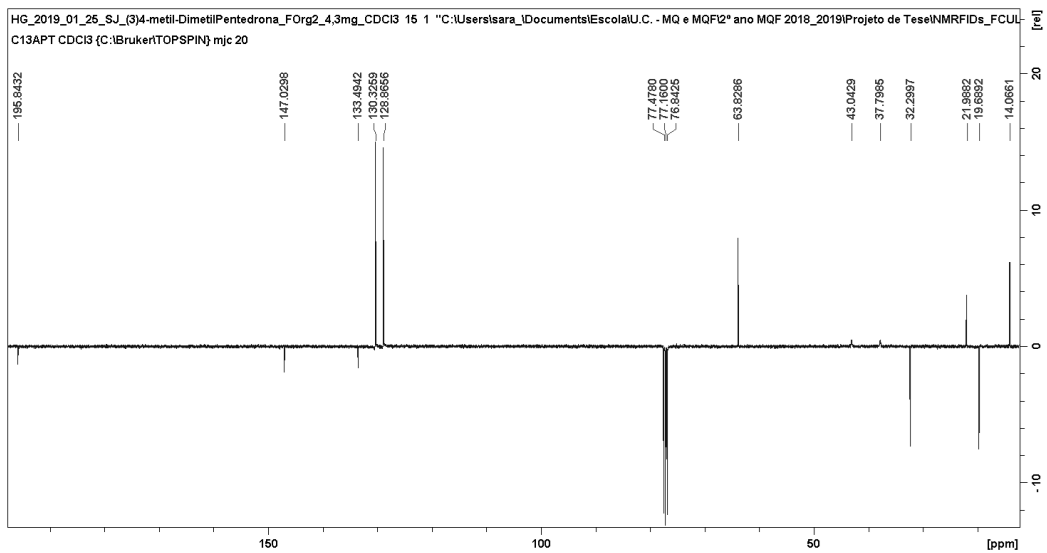


Figura 6.90. Espectro de RMN ^{13}C APT da 4'-metil-*N,N*-dimetilorpentedrona (**3**), em CDCl_3 .

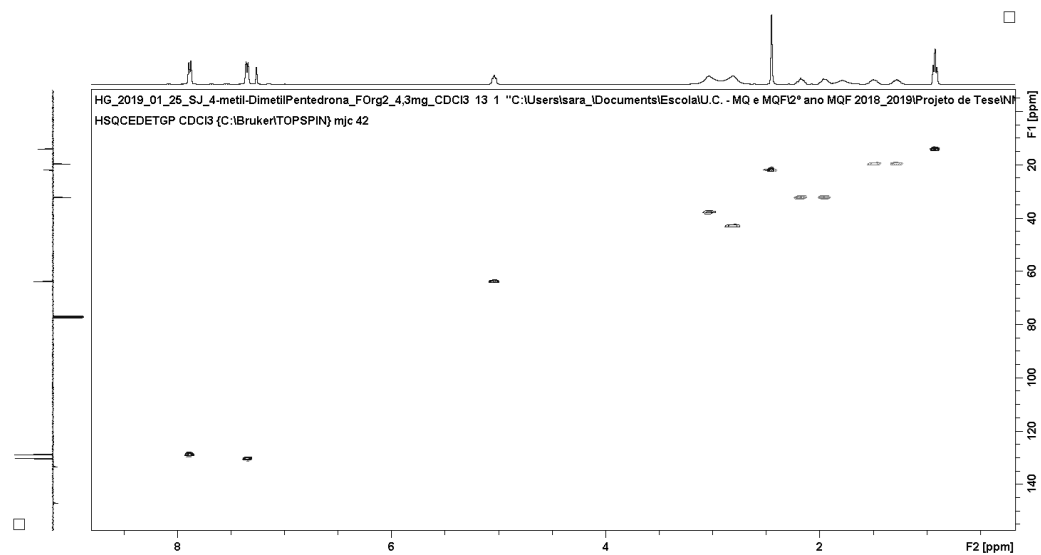


Figura 6.91. Espectro de HSQC da 4'-metil-*N,N*-dimetilorpentedrona (**3**), em CDCl_3 .

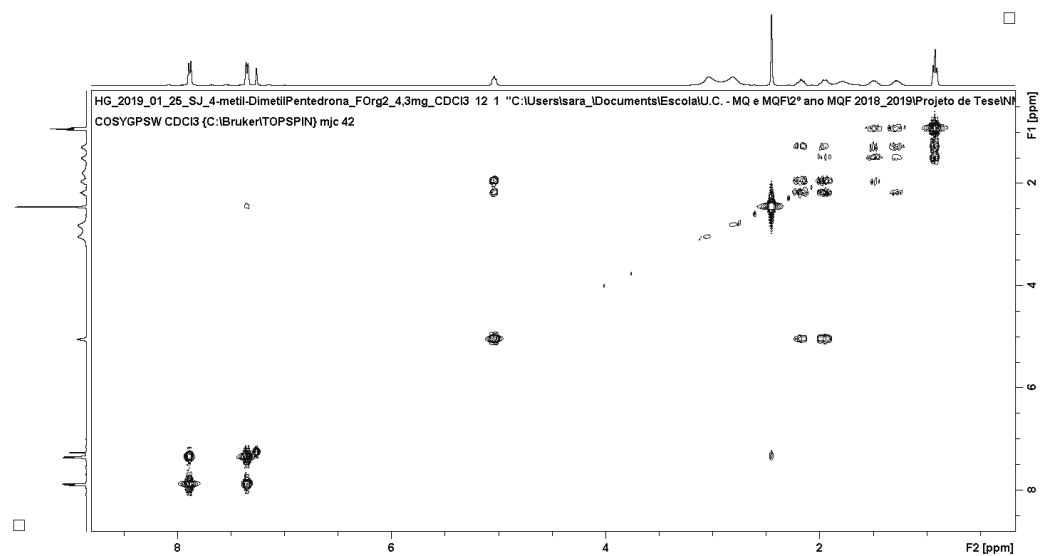


Figura 6.92. Espectro de COSY da 4'-metil-*N,N*-dimetilorpentedrona (**3**), em CDCl_3 .

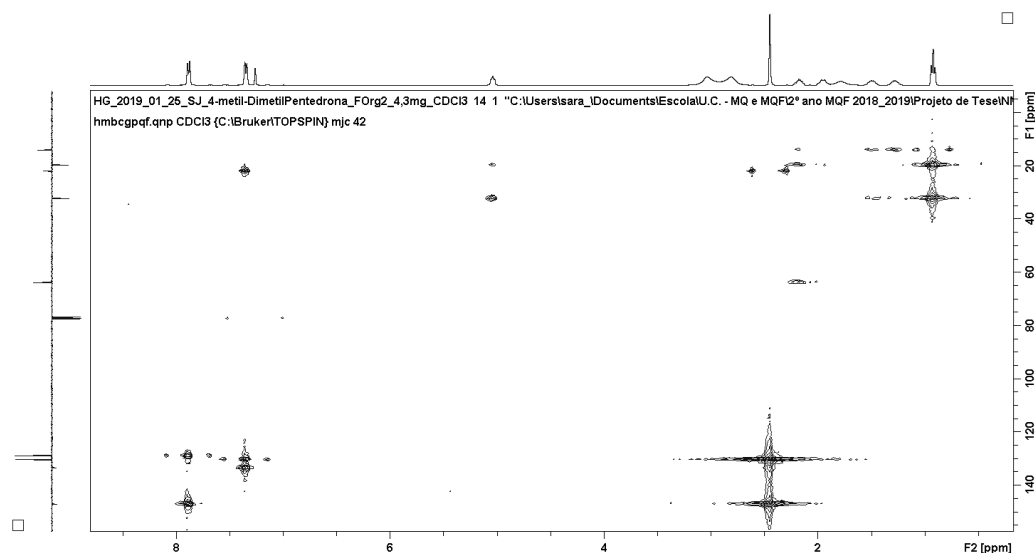


Figura 6.93. Espectro de HMBC da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorpentedrona (3), em CDCl_3 .

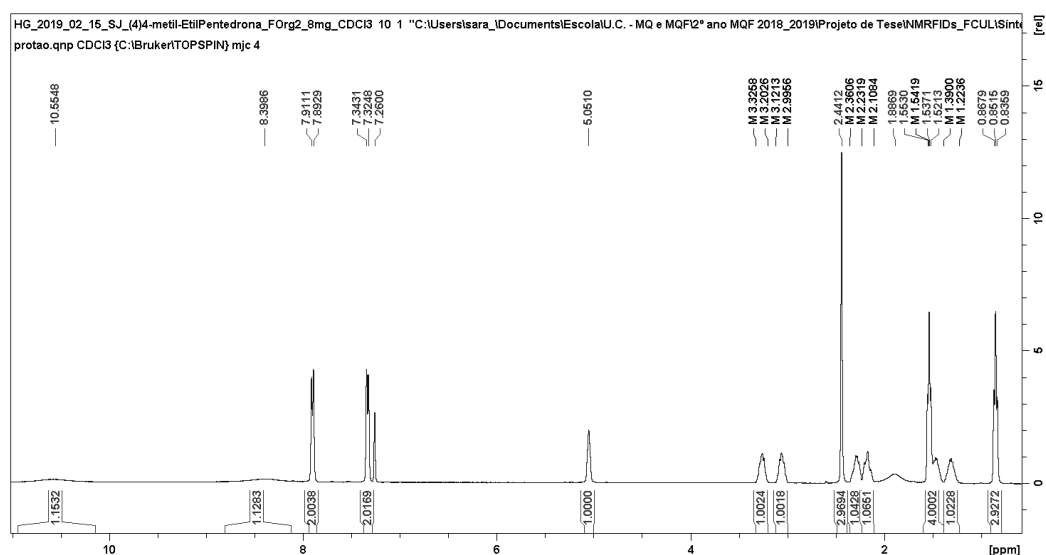


Figura 6.94. Espectro de RMN ^1H da 4'-metil-*N*-etilnorpentedrona (4), em CDCl_3 .

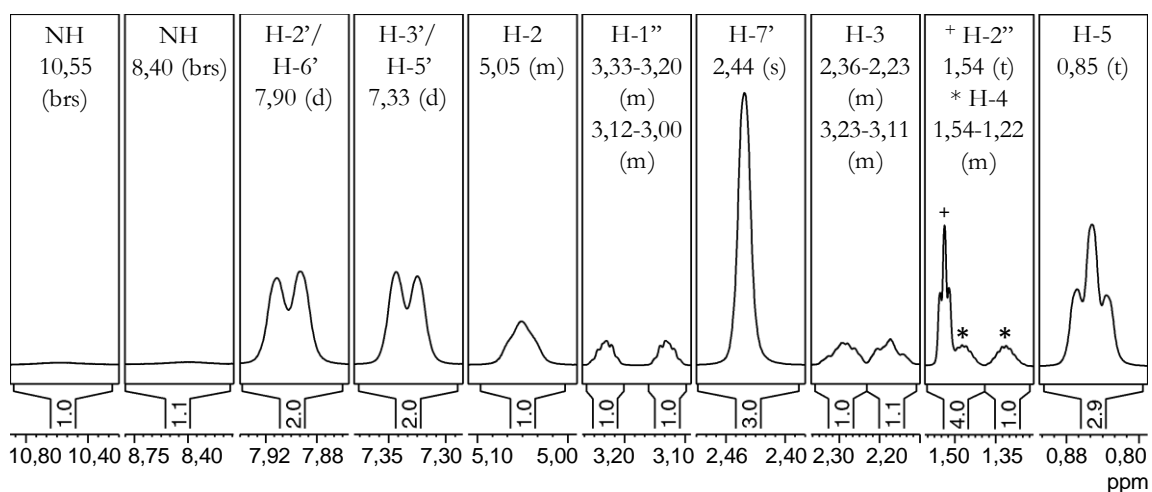


Figura 6.95. Espectro de RMN ^1H da 4'-metil-*N*-etilnorpentedrona (4), em CDCl_3 (ampliação).

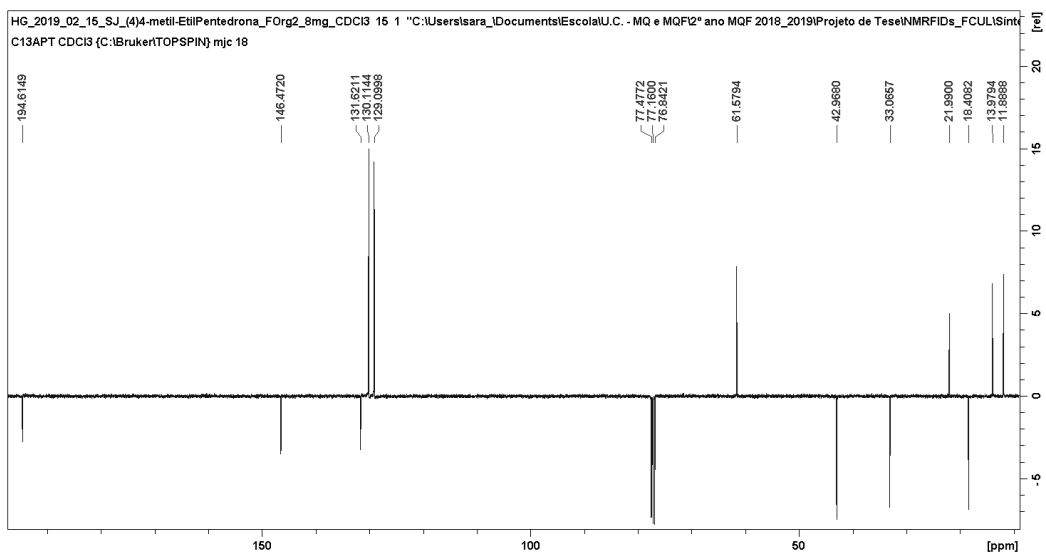


Figura 6.96. Espetro de RMN ^{13}C APT da 4'-metil-*N*-etilnorpentredona (4), em CDCl_3 .

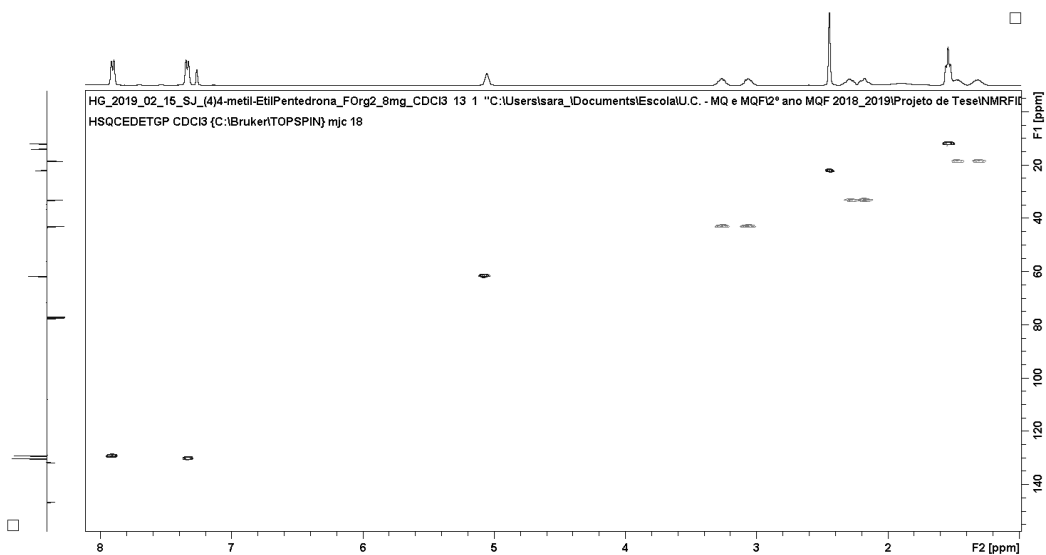


Figura 6.97. Espetro de HSQC da 4'-metil-*N*-etilnorpentredona (4), em CDCl_3 .

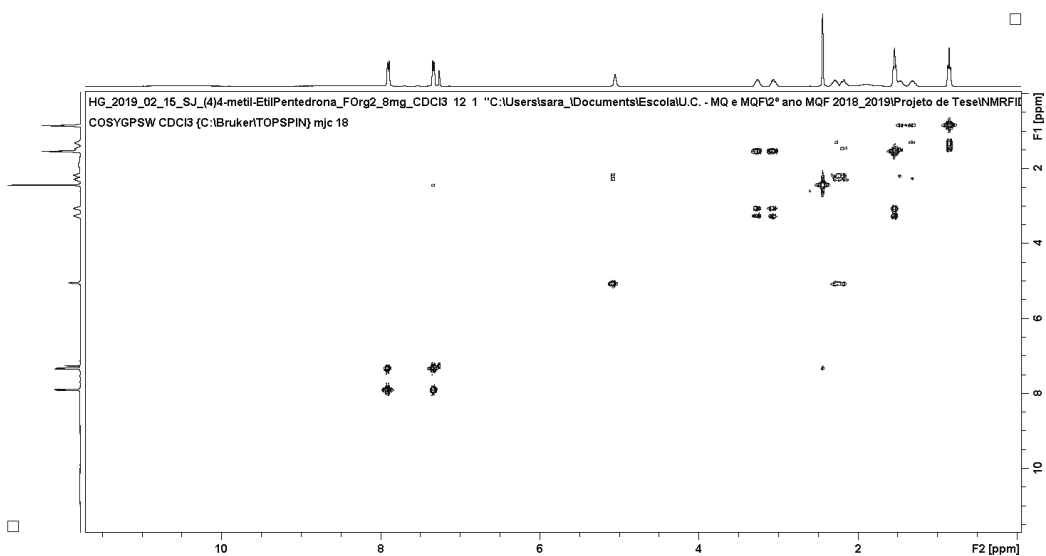


Figura 6.98. Espetro de COSY da 4'-metil-*N*-etilnorpentredona (4), em CDCl_3 .

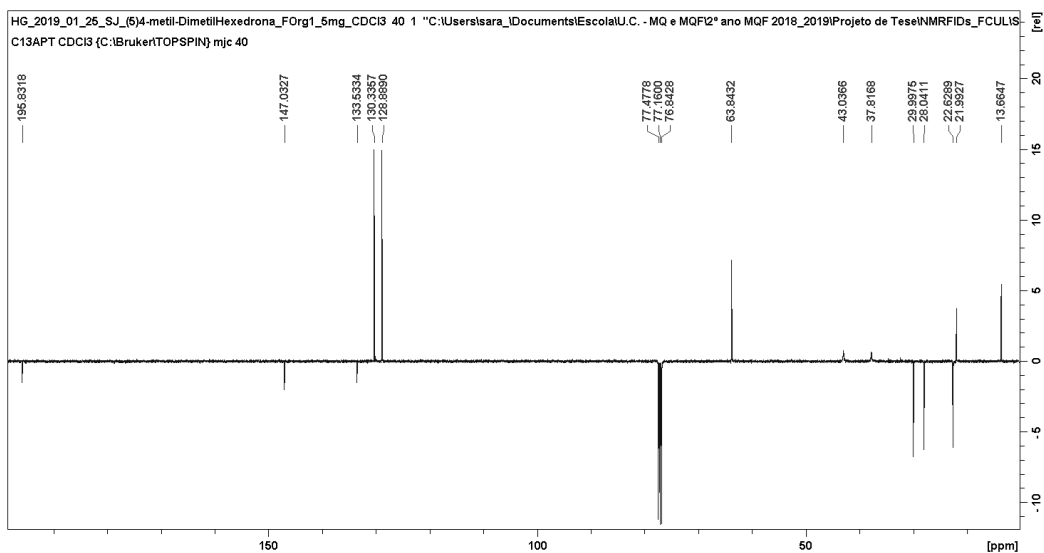


Figura 6.102. Espectro de RMN ^{13}C APT da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorhexedrona (5), em CDCl_3 .

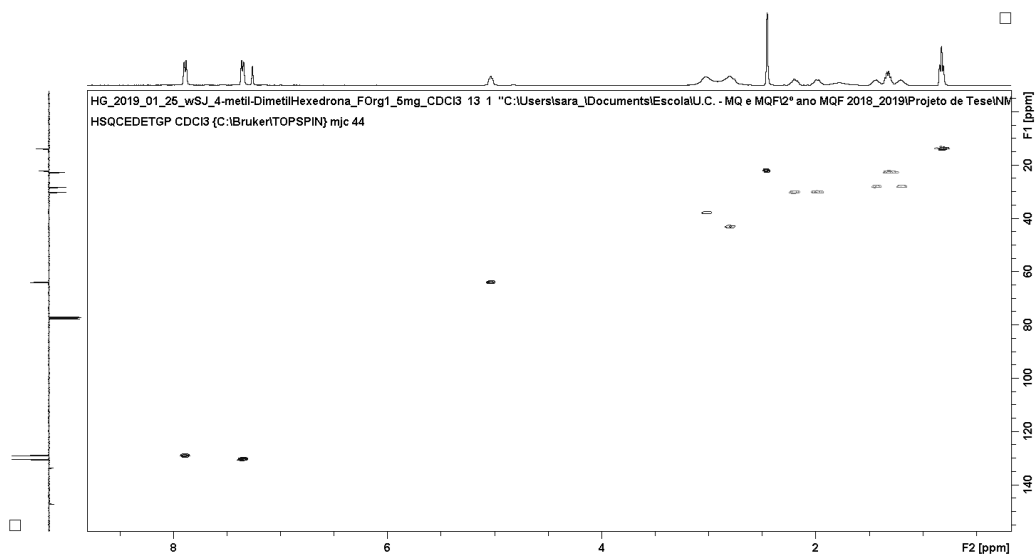


Figura 6.103. Espectro de HSQC da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorhexedrona (5), em CDCl_3 .

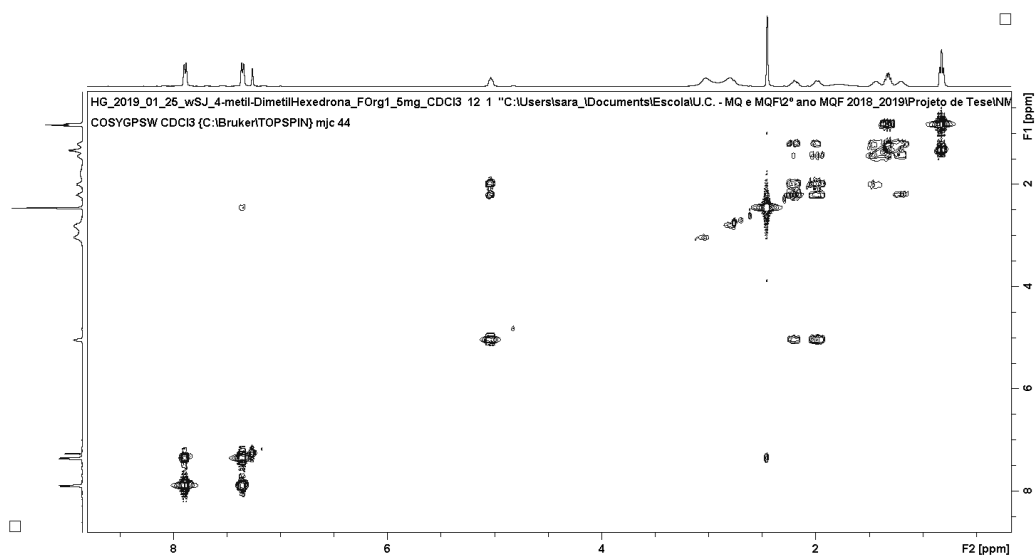


Figura 6.104. Espectro de COSY da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorhexedrona (5), em CDCl_3 .

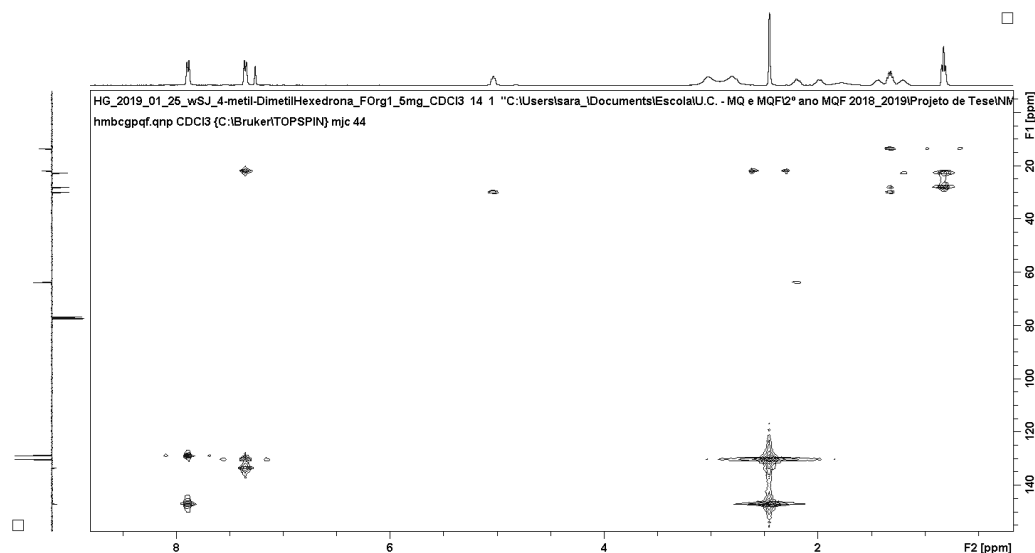


Figura 6.105. Espectro de HMBC da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorhexedrona (5), em CDCl_3 .

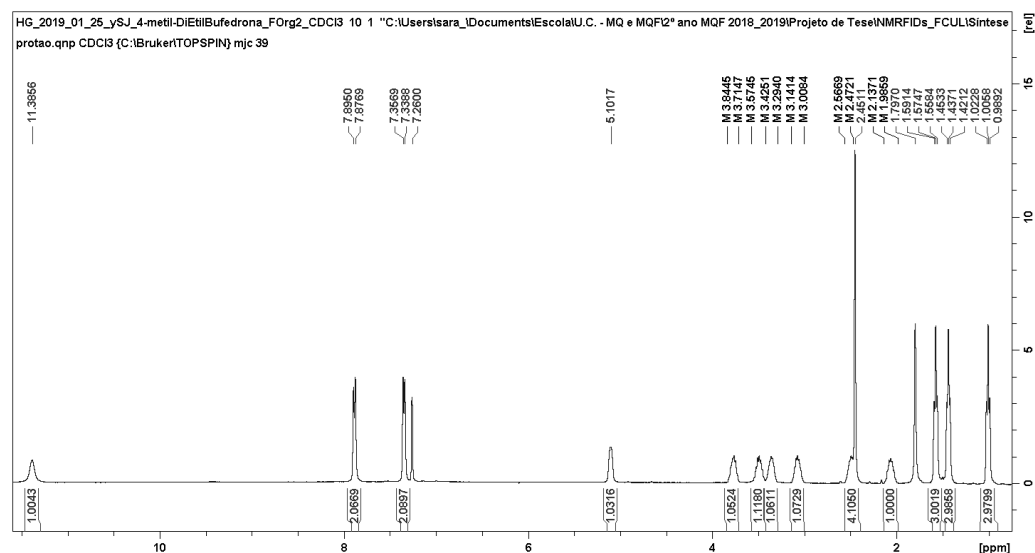


Figura 6.106. Espectro de RMN ^1H da 4'-metil-*N,N*-diethylnorbufedrona (6), em CDCl_3 .

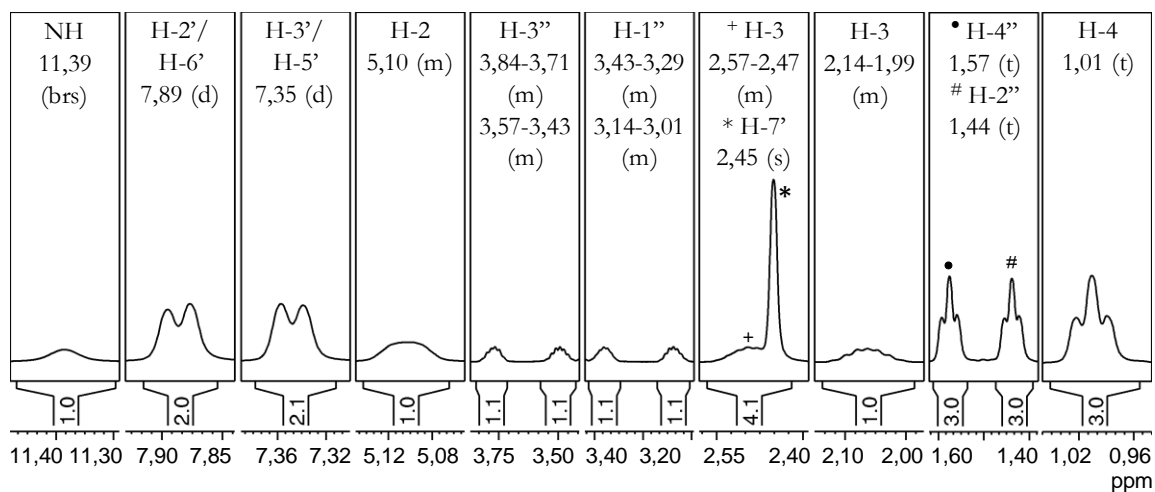


Figura 6.107. Espectro de RMN ^1H da 4'-metil-*N,N*-diethylnorbufedrona (6), em CDCl_3 (ampliação).

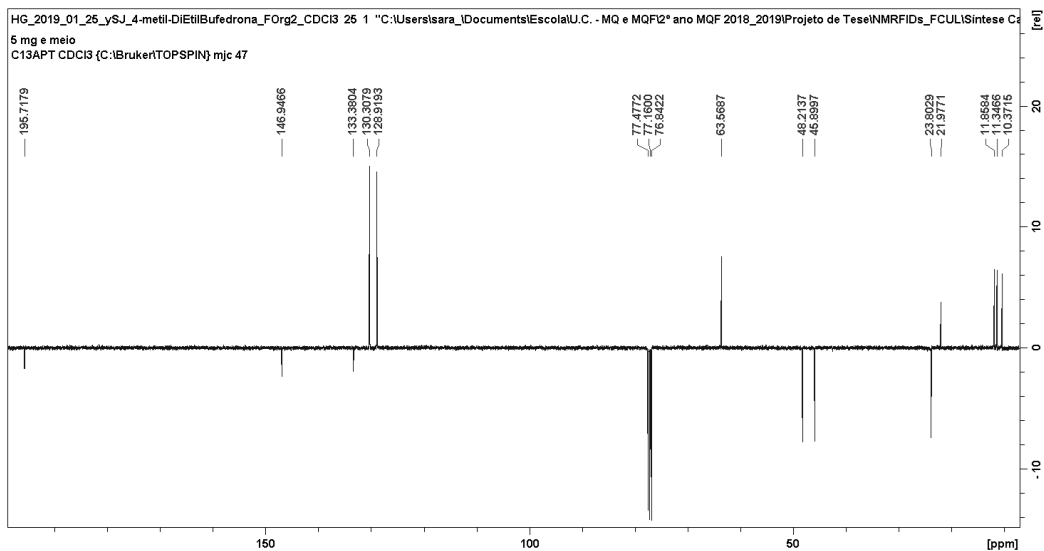


Figura 6.108. Espectro de RMN ^{13}C APT da 4'-metil-*N,N*-dietilnorbufedrona (**6**), em CDCl_3 .

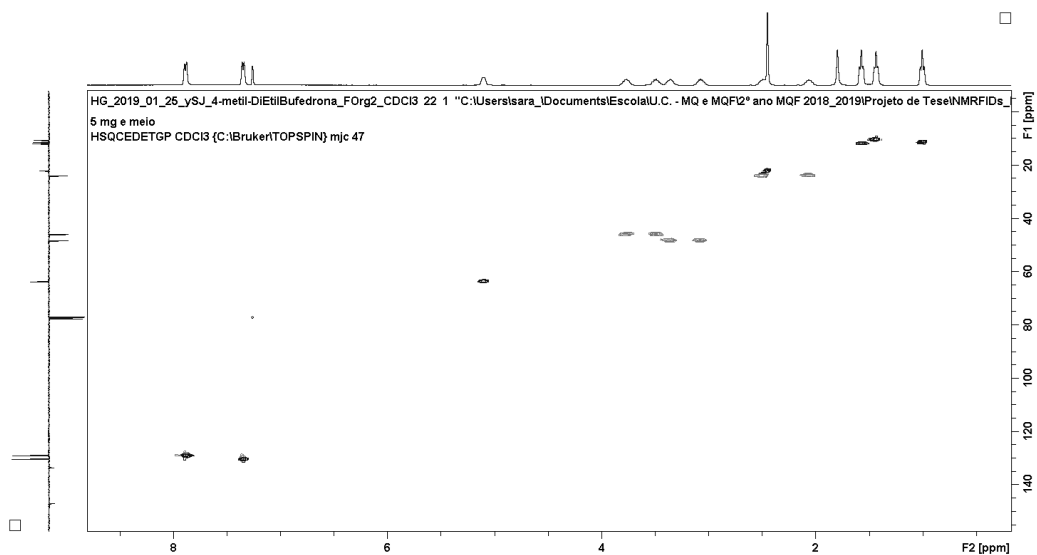


Figura 6.109. Espectro de HSQC da 4'-metil-*N,N*-dietilnorbufedrona (**6**), em CDCl_3 .

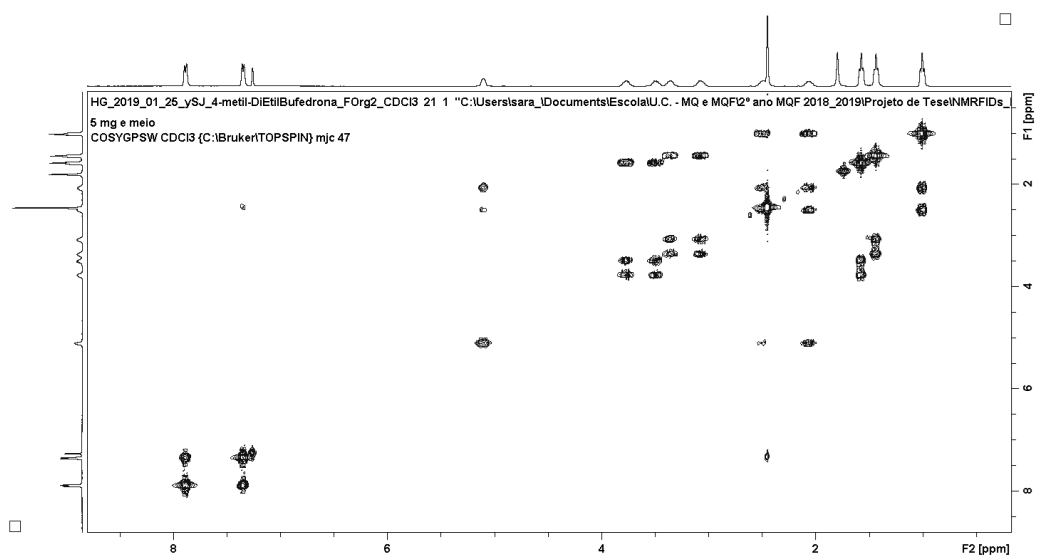


Figura 6.110. Espectro de COSY da 4'-metil-*N,N*-dietilnorbufedrona (**6**), em CDCl_3 .

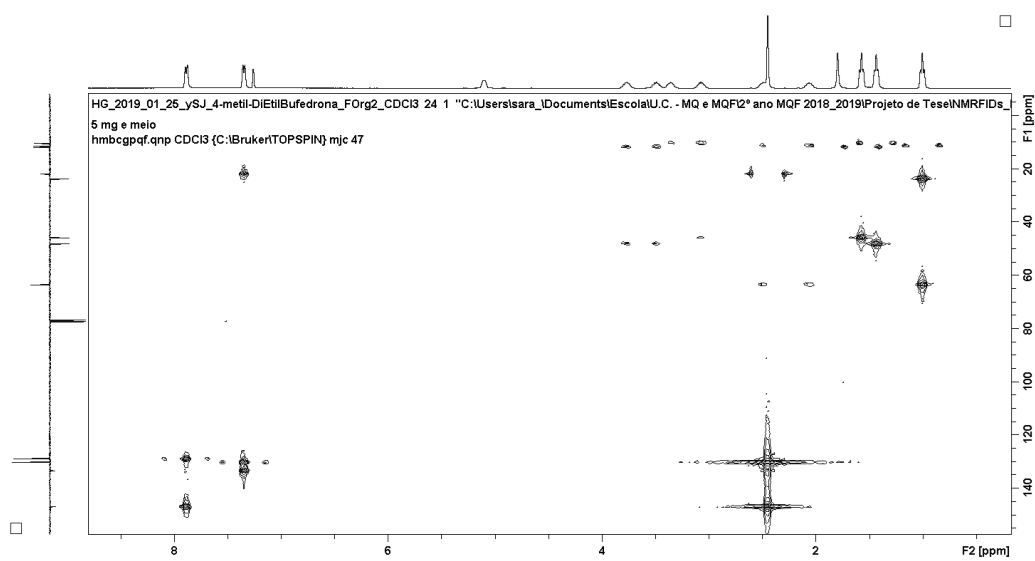


Figura 6.111. Espectro de HMBC da 4'-metil-*N,N*-dietilnorbufedrona (**6**), em CDCl₃.

Anexo F: Caracterização das catinonas por RMN, em DMSO-*d*₆

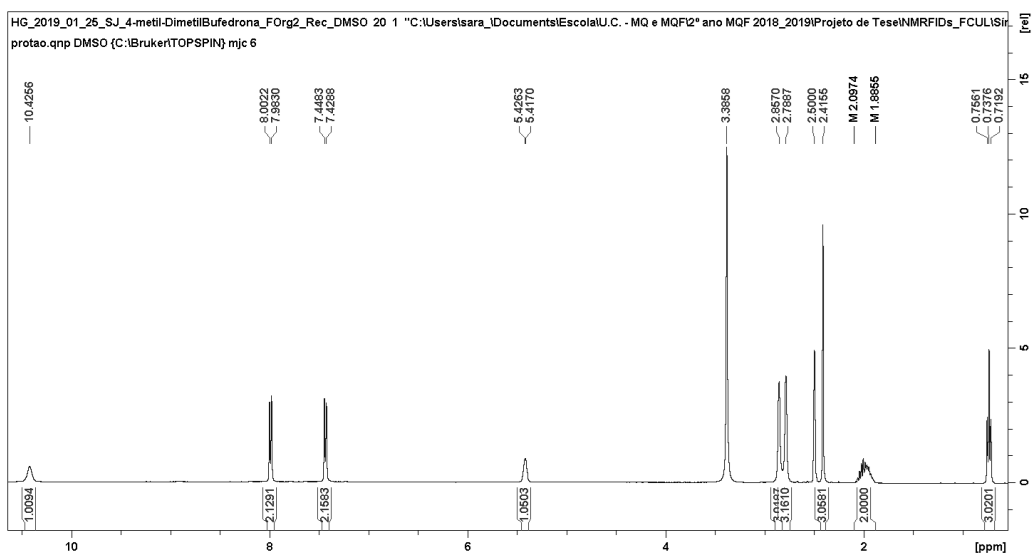


Figura 6.112. Espectro de RMN ¹H da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (**1**), em DMSO-*d*₆.

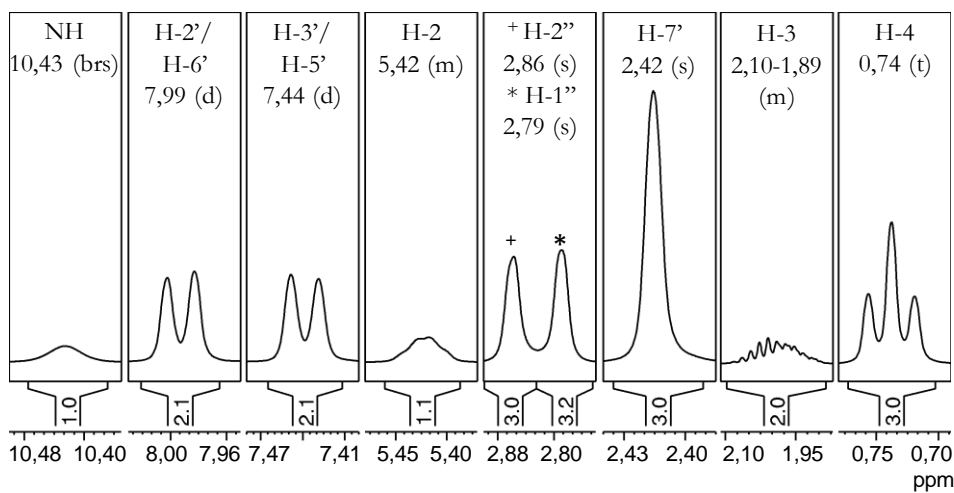


Figura 6.113. Espectro de RMN ¹H da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (**1**), em DMSO-*d*₆ (ampliação).

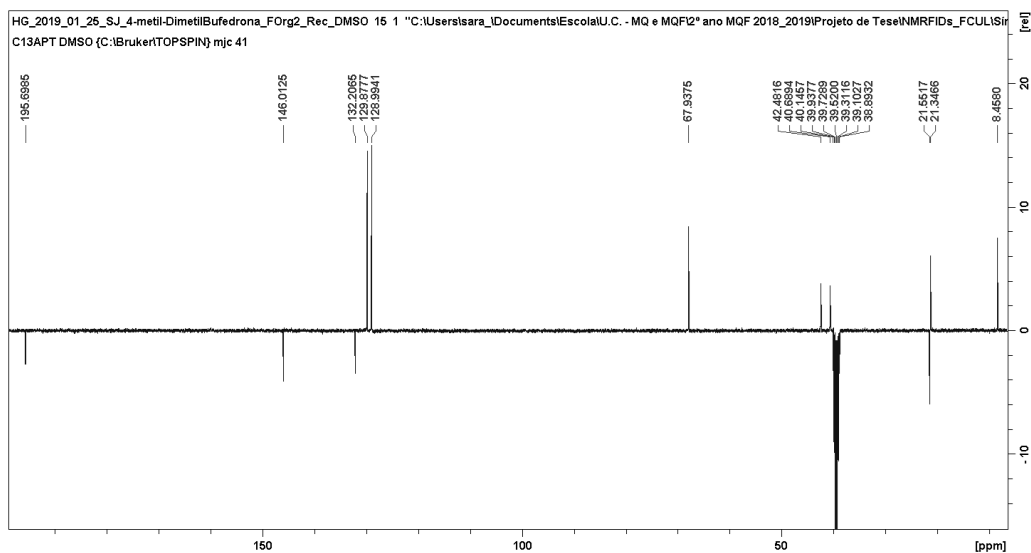


Figura 6.114. Espectro de RMN ^{13}C APT da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (**1**), em $\text{DMSO}-d_6$.

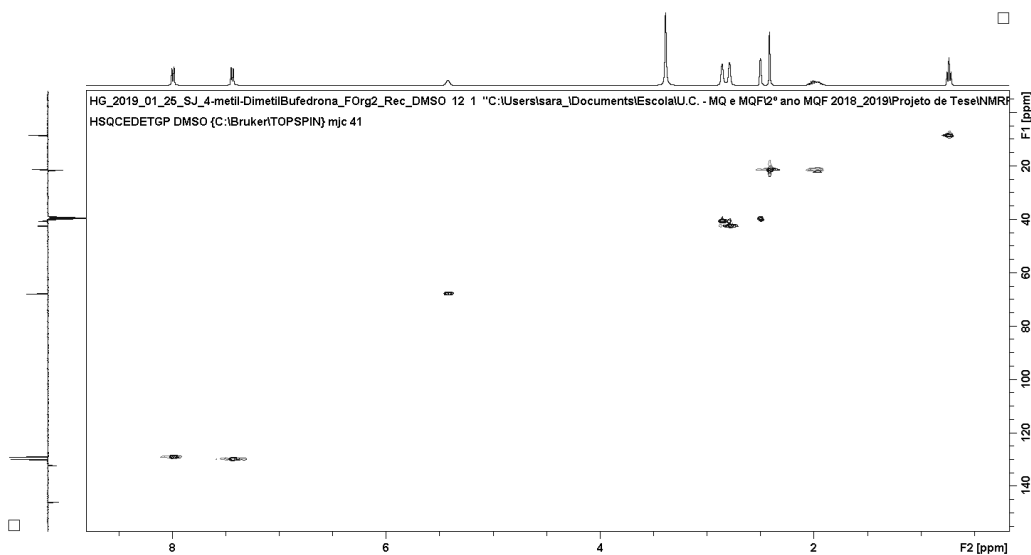


Figura 6.115. Espectro de HSQC da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (**1**), em $\text{DMSO}-d_6$.

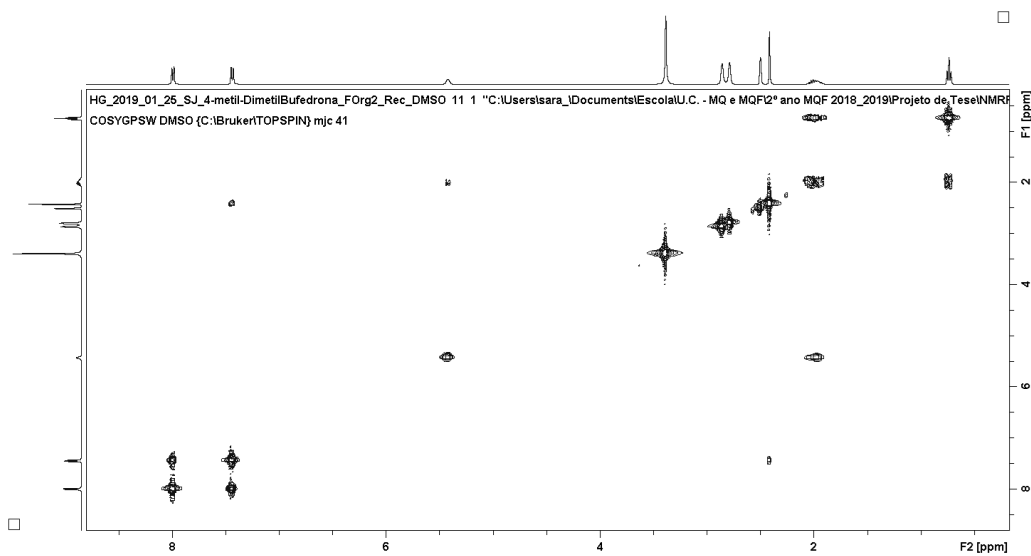


Figura 6.116. Espectro de COSY da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (**1**), em $\text{DMSO}-d_6$.

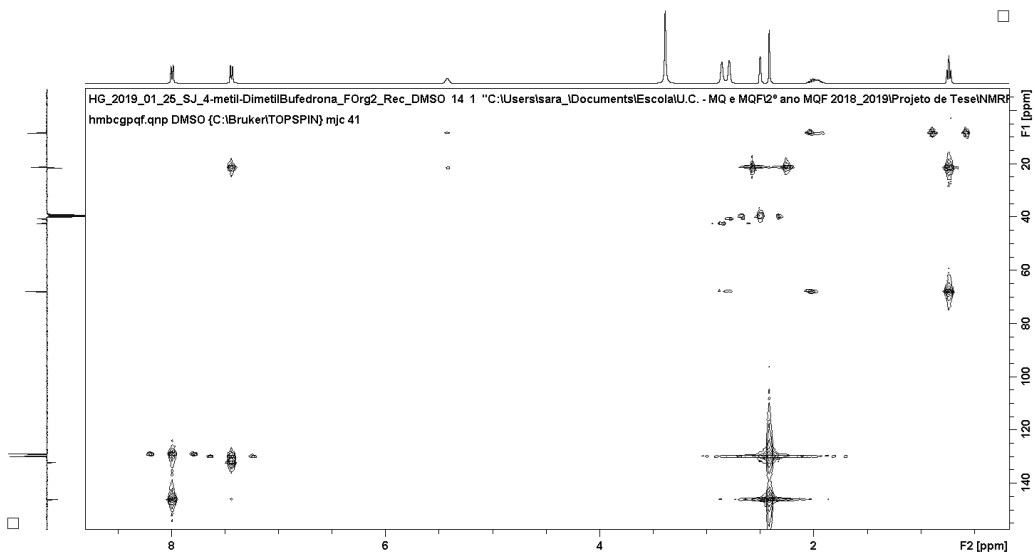


Figura 6.117. Espectro de HMBC da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorbufedrona (**1**), em DMSO-*d*₆.

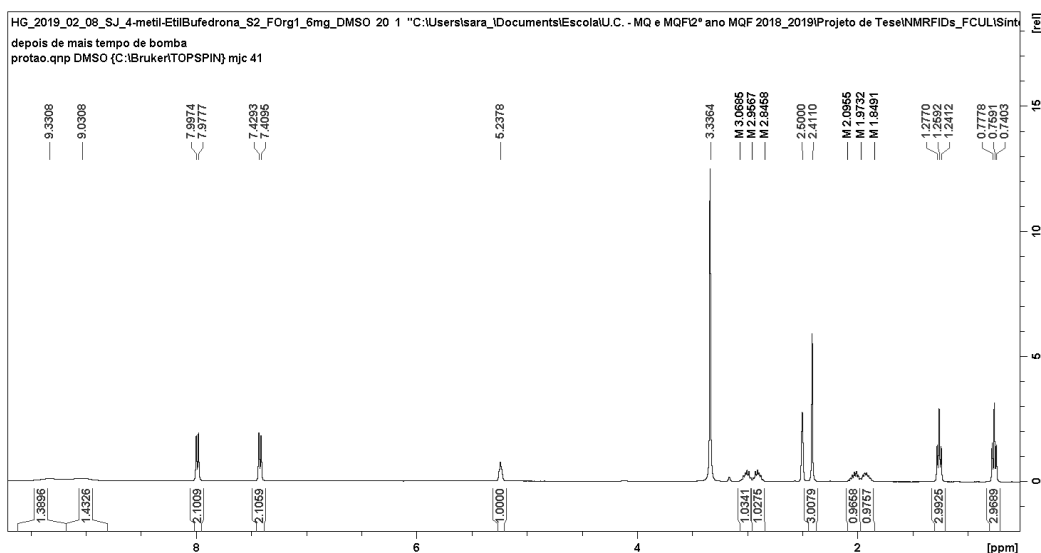


Figura 6.118. Espectro de RMN ¹H da 4'-metil-*N*-etilnorbufedrona (**2**), em DMSO-*d*₆.

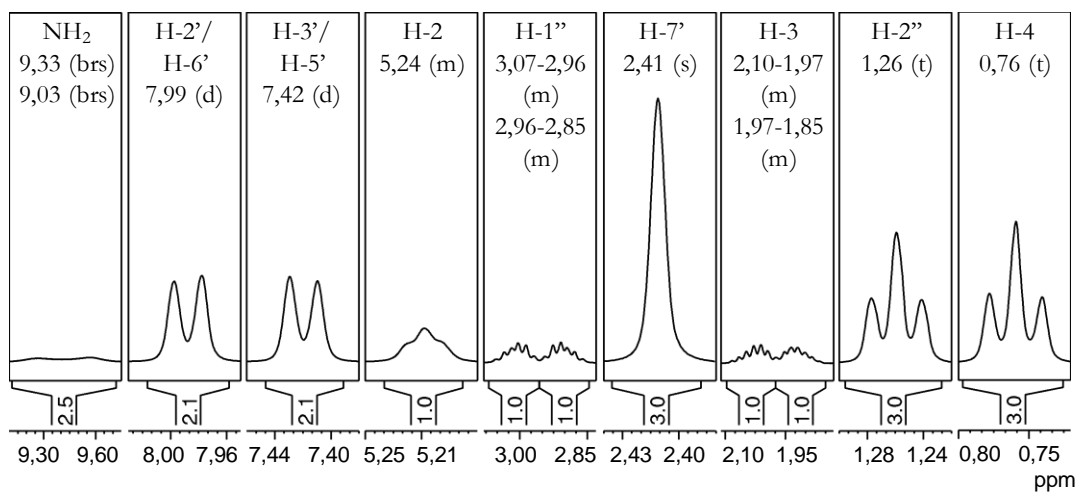


Figura 6.119. Espectro de RMN ¹H da 4'-metil-*N*-etilnorbufedrona (**2**), em DMSO-*d*₆ (ampliação).

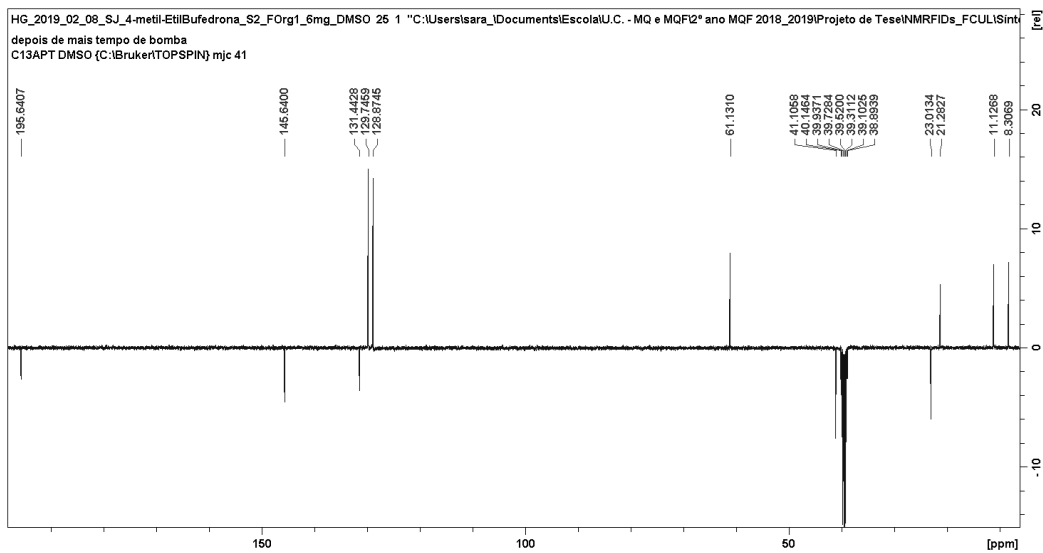


Figura 6.120. Espectro de RMN ^{13}C APT da 4'-metil-*N*-etilnorbufedrona (**2**), em $\text{DMSO}-d_6$.

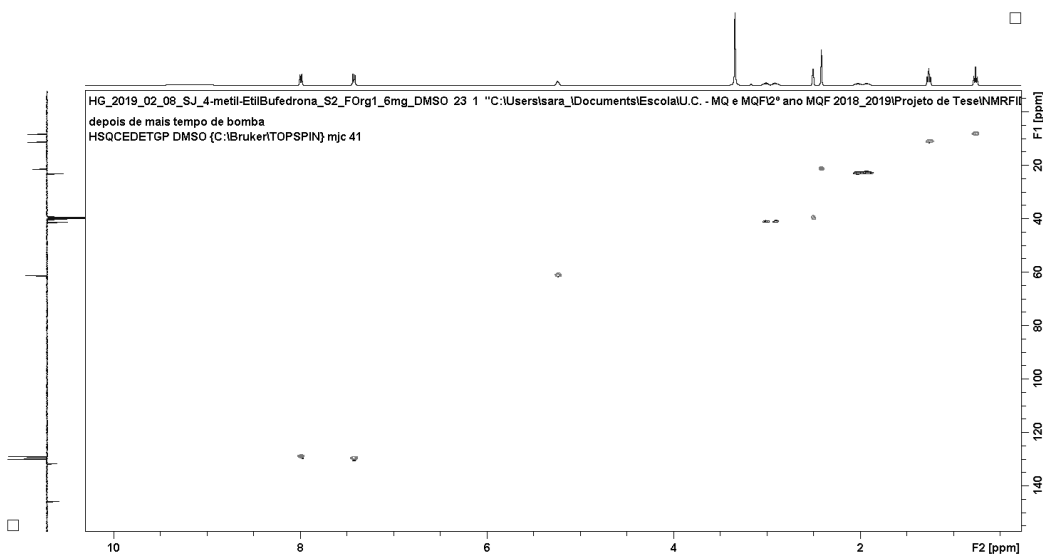


Figura 6.121. Espectro de HSQC da 4'-metil-*N*-etilnorbufedrona (**2**), em $\text{DMSO}-d_6$.

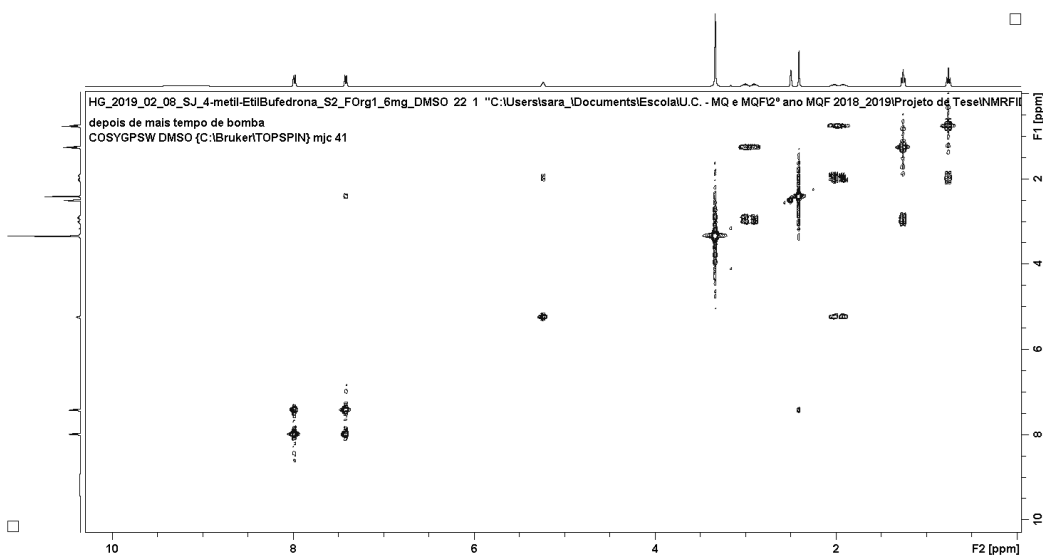


Figura 6.122. Espectro de COSY da 4'-metil-*N*-etilnorbufedrona (**2**), em $\text{DMSO}-d_6$.

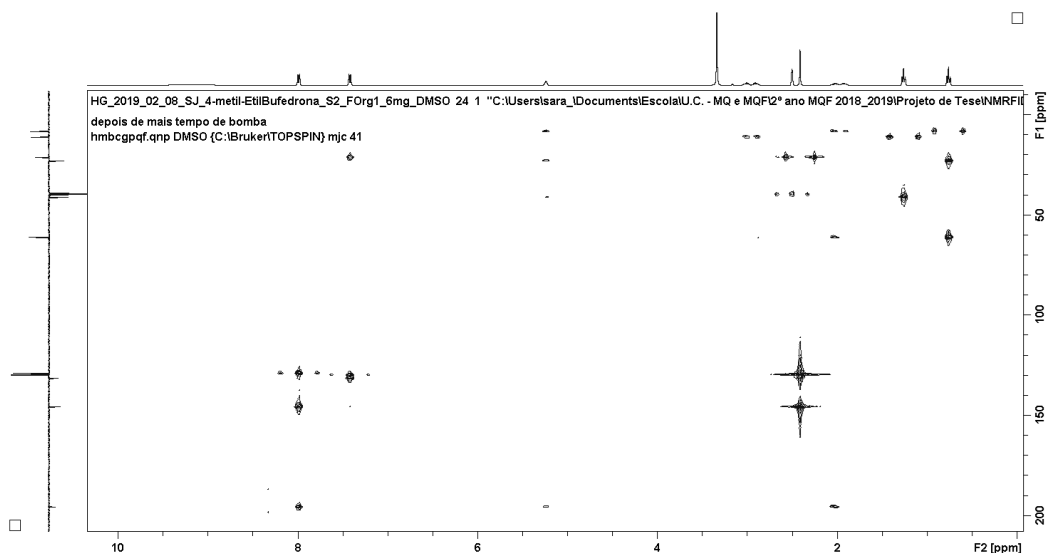


Figura 6.123. Espectro de HMBC da 4'-metil-*N*-etilnorbufedrona (**2**), em DMSO-*d*₆.

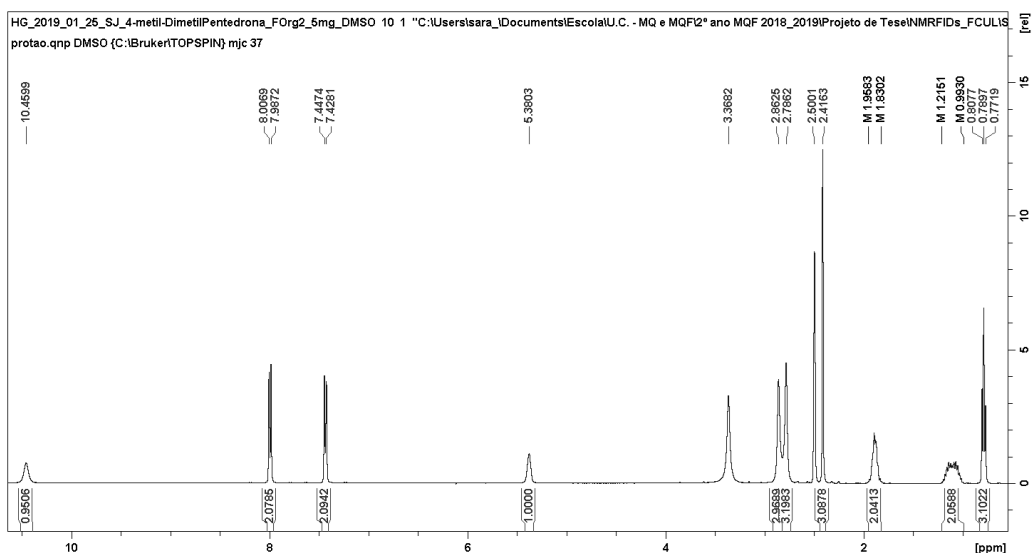


Figura 6.124. Espectro de RMN ¹H da 4'-metil-*N,N*-dimethylnorpentredona (**3**), em DMSO-*d*₆.

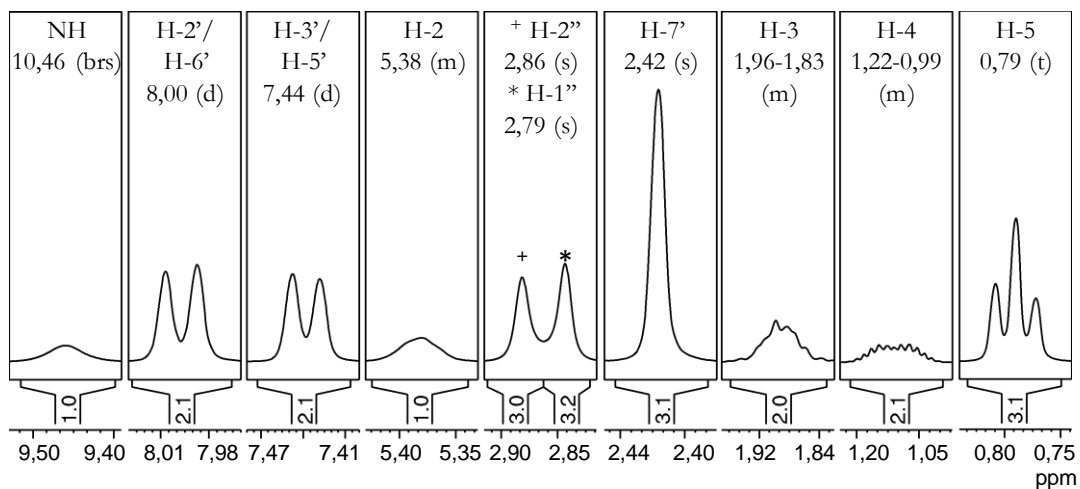


Figura 6.125. Espectro de RMN ¹H da 4'-metil-*N,N*-dimethylnorpentredona (**3**), em DMSO-*d*₆ (ampliação).

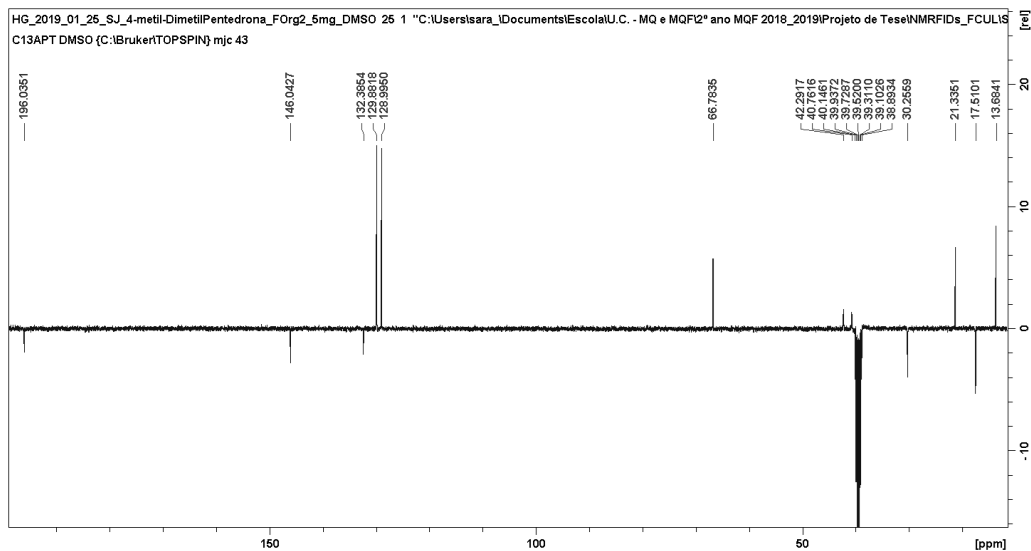


Figura 6.126. Espectro de RMN ^{13}C APT da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorpentedrona (**3**), em $\text{DMSO}-d_6$.

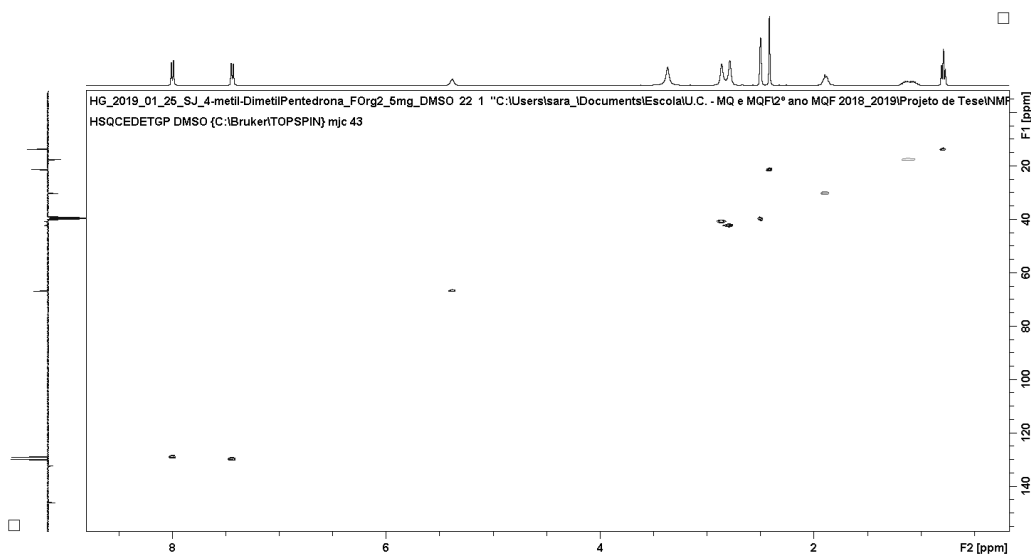


Figura 6.127. Espectro de HSQC da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorpentedrona (**3**), em $\text{DMSO}-d_6$.

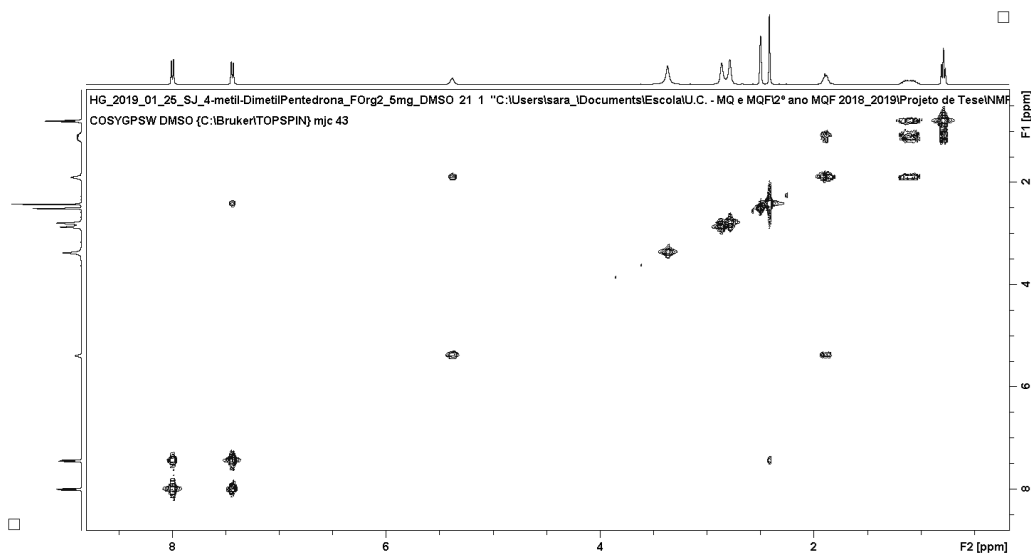


Figura 6.128. Espectro de COSY da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorpentedrona (**3**), em $\text{DMSO}-d_6$.

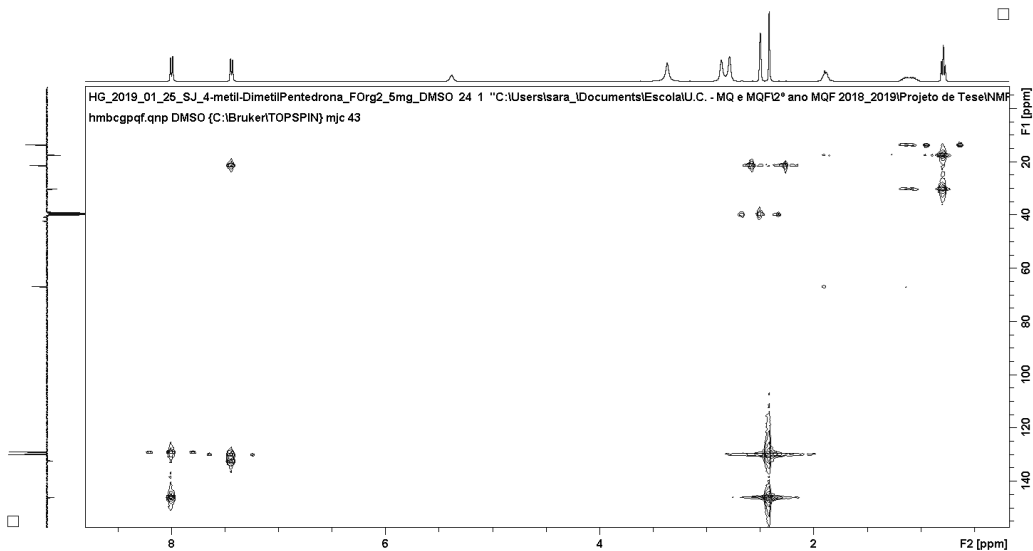


Figura 6.129. Espetro de HMBC da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorpentredona (3), em DMSO-*d*₆.

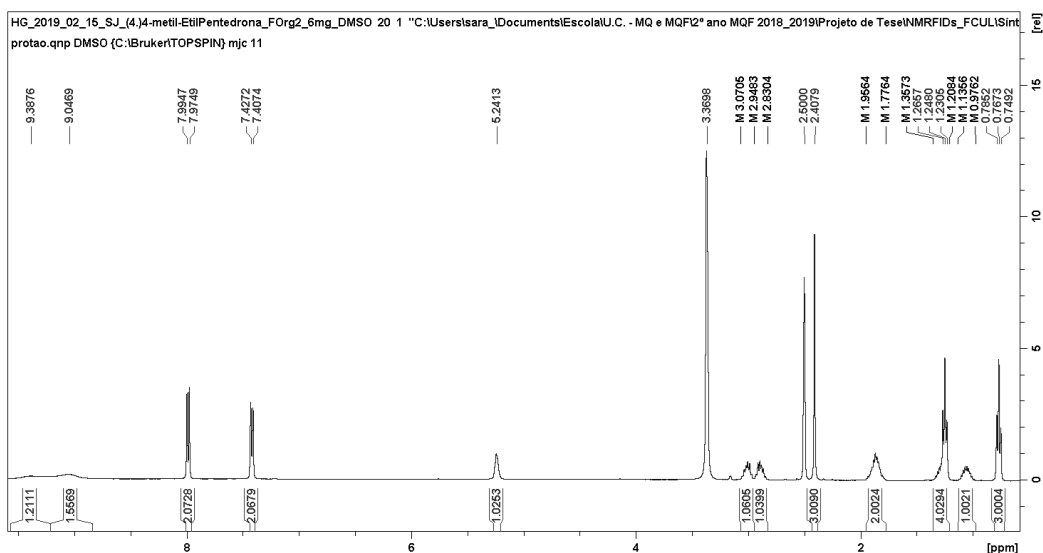


Figura 6.130. Espetro de RMN ¹H da 4'-metil-*N*-etilnorpentredona (4), em DMSO-*d*₆.

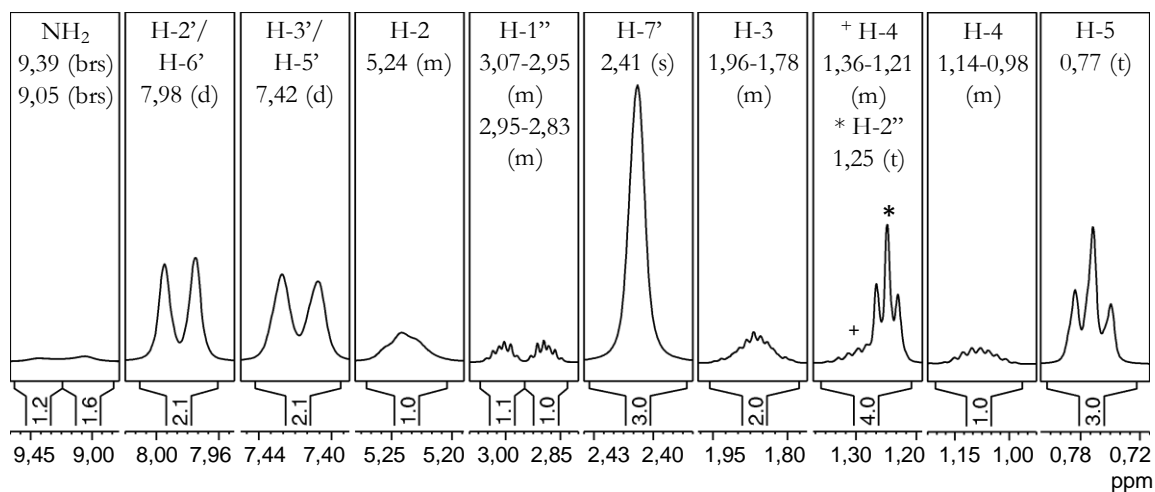


Figura 6.131. Espetro de RMN ¹H da 4'-metil-*N*-etilnorpentredona (4), em DMSO-*d*₆ (ampliação).

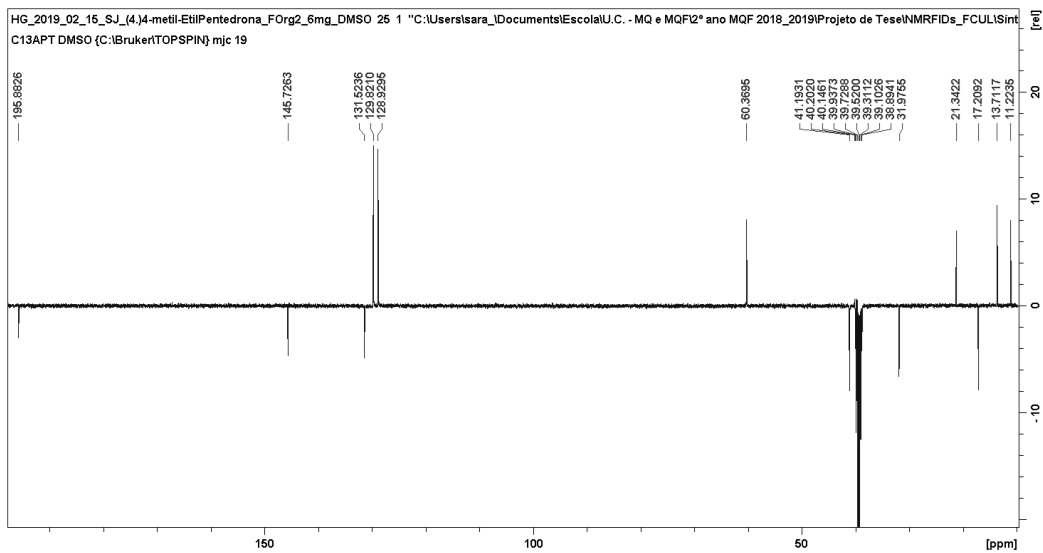


Figura 6.132. Espectro de RMN ^{13}C APT da 4'-metil-N-etilnorpentedrona (4), em DMSO- d_6 .

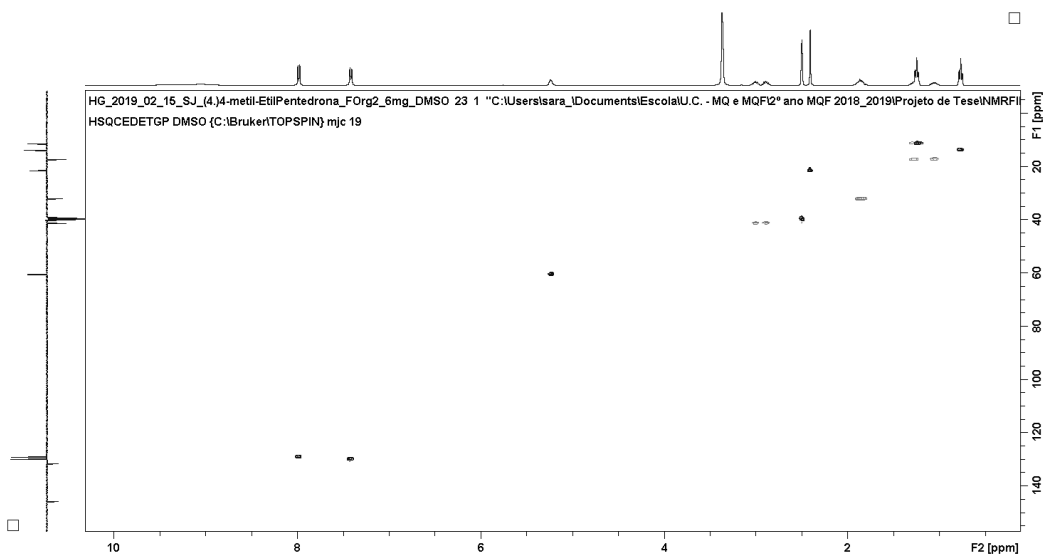


Figura 6.133. Espectro de HSQC da 4'-metil-N-etilnorpentedrona (4), em DMSO- d_6 .

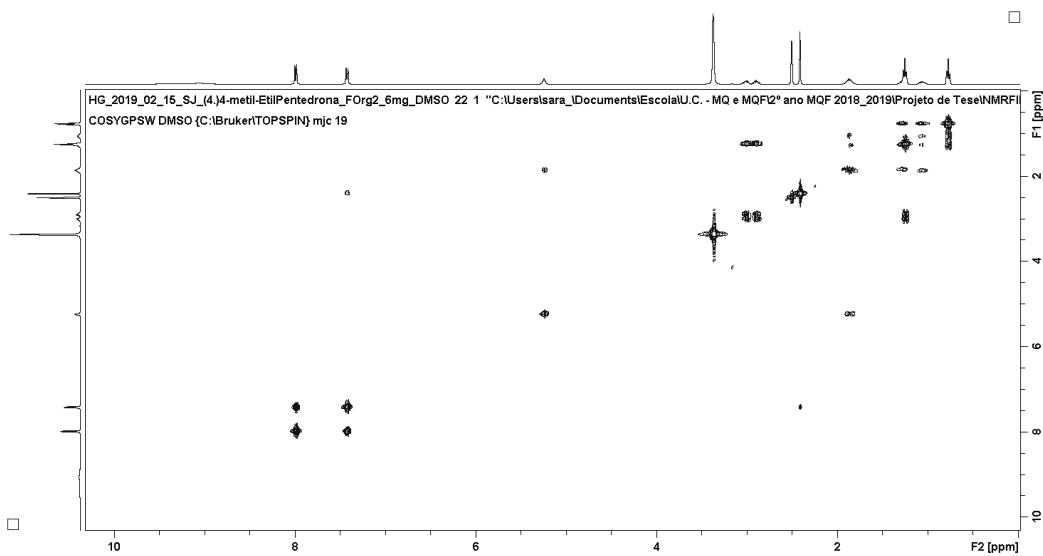


Figura 6.134. Espectro de COSY da 4'-metil-N-etilnorpentedrona (4), em DMSO- d_6 .

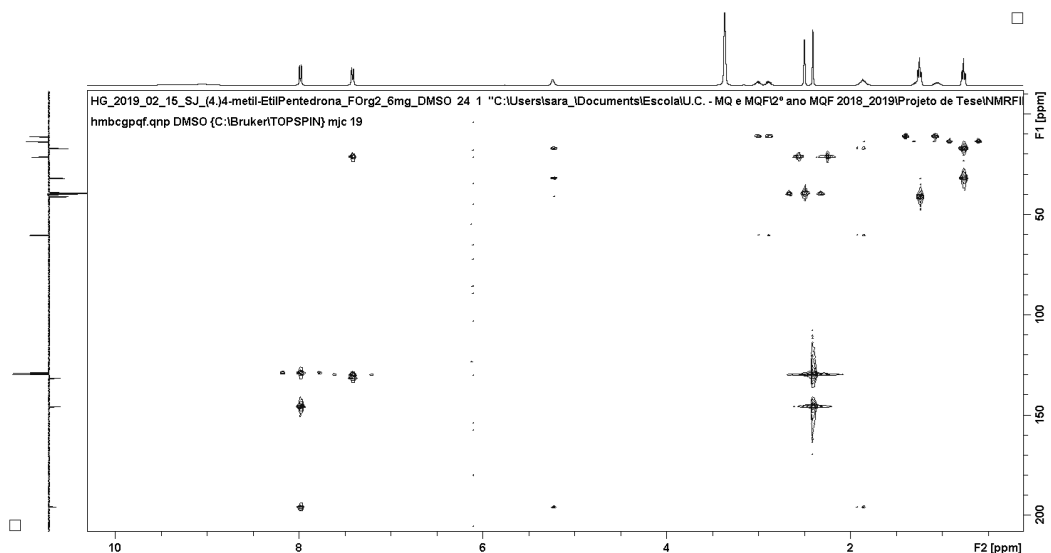


Figura 6.135. Espectro de HMBC da 4'-metil-N-etilnorpentredona (4), em DMSO-*d*₆.

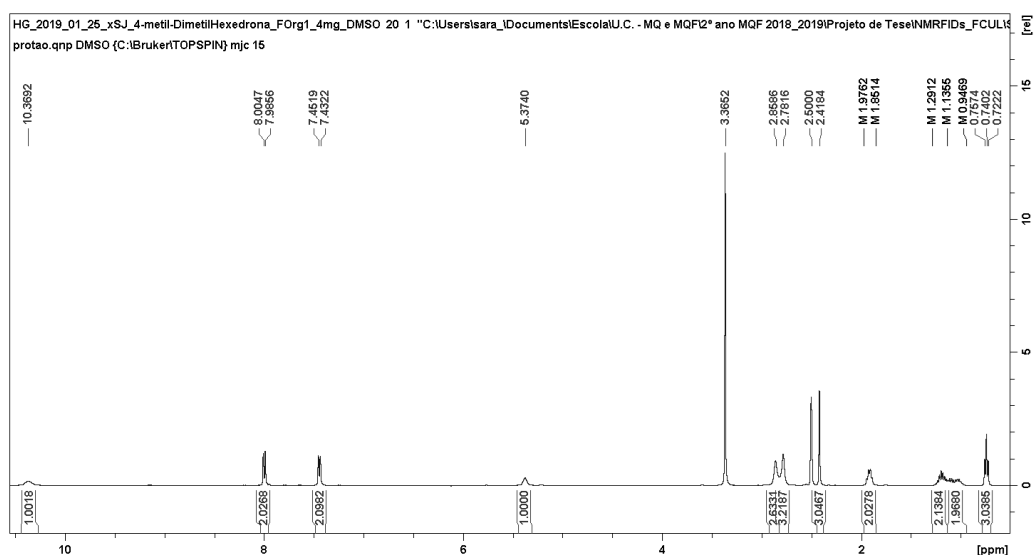


Figura 6.136. Espectro de RMN ¹H da 4'-metil-N,N-dimetilnorhexedrona (5), em DMSO-*d*₆.

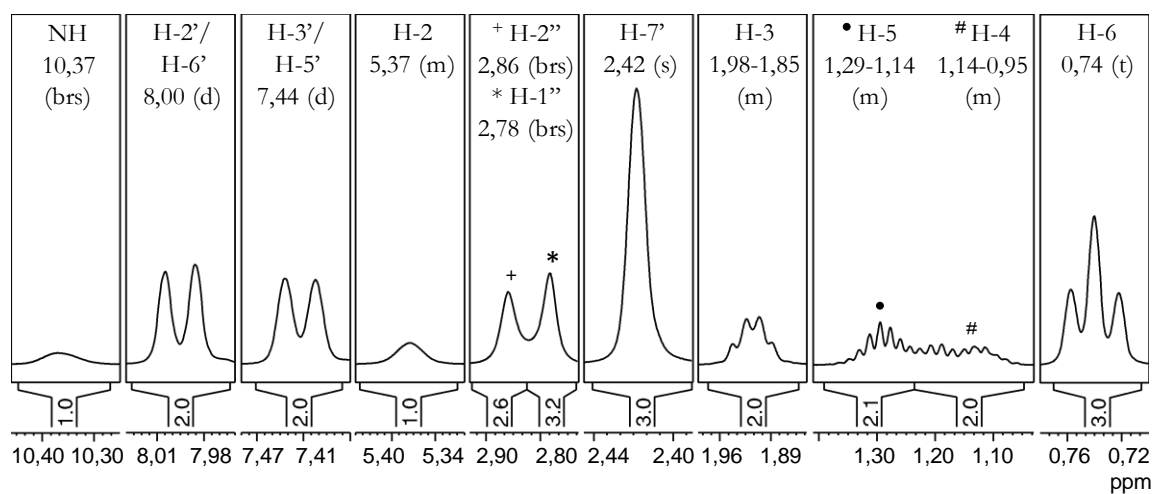


Figura 6.137. Espectro de RMN ¹H da 4'-metil-N,N-dimetilnorhexedrona (5), em DMSO-*d*₆ (ampliação).

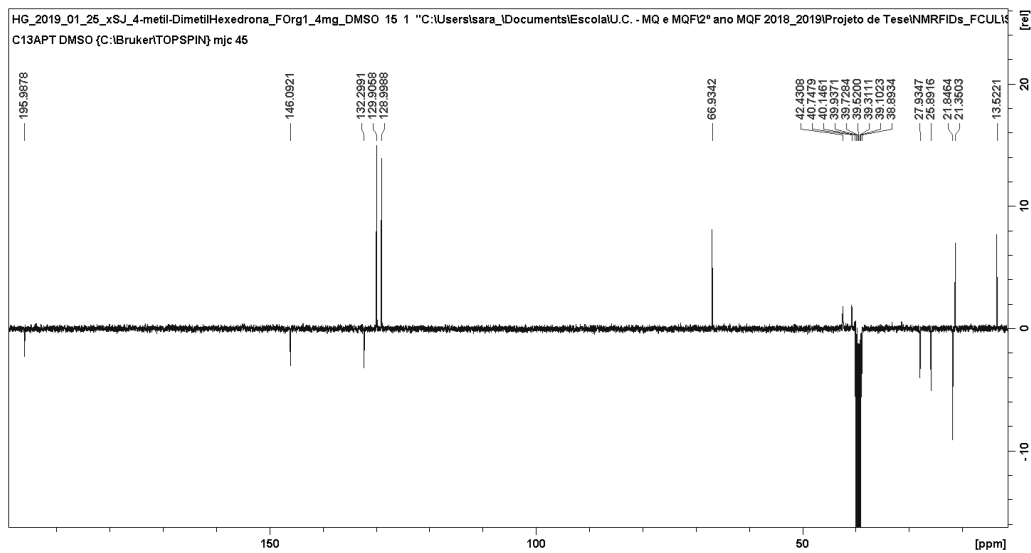


Figura 6.138. Espectro de RMN ^{13}C APT da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorhexedrona (5), em $\text{DMSO}-d_6$.

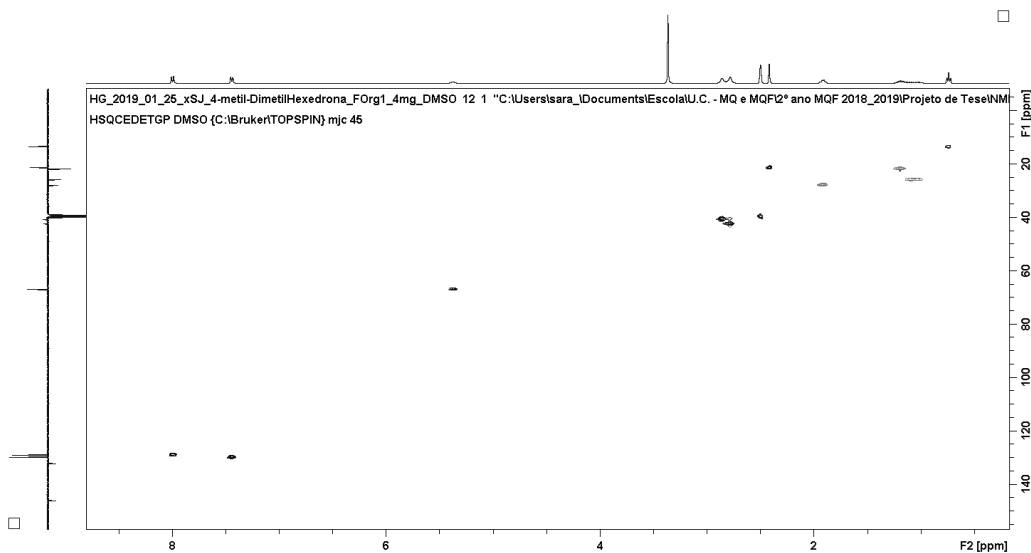


Figura 6.139. Espectro de HSQC da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorhexedrona (5), em $\text{DMSO}-d_6$.

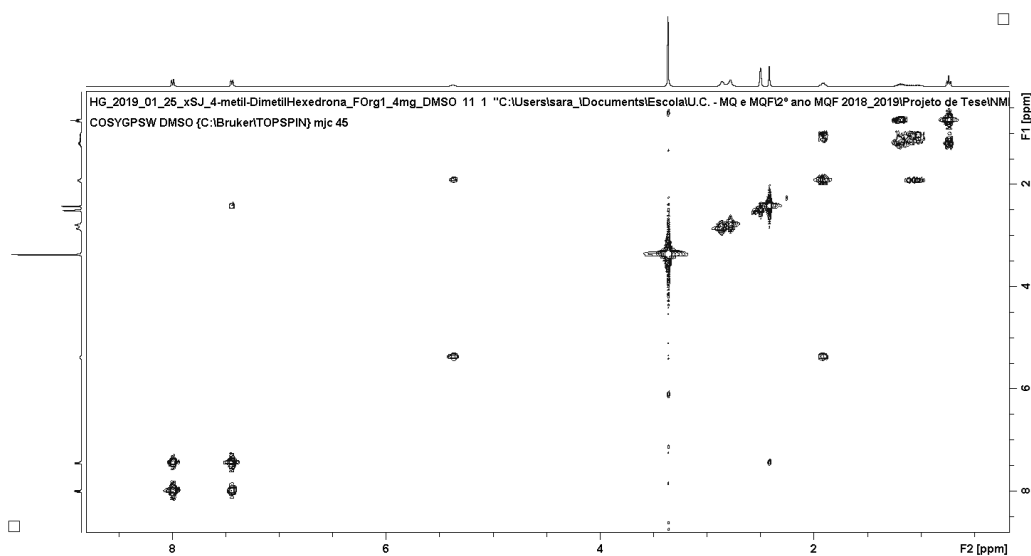


Figura 6.140. Espectro de COSY da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorhexedrona (5), em $\text{DMSO}-d_6$.

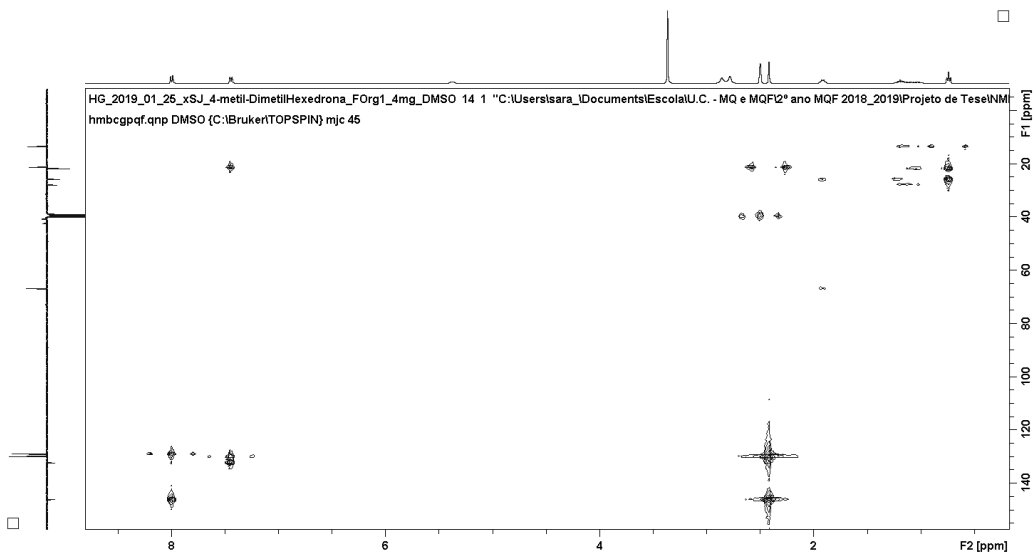


Figura 6.141. Espectro de HMBC da 4'-metil-*N,N*-dimetilnorhexedrona (5), em DMSO-*d*₆.

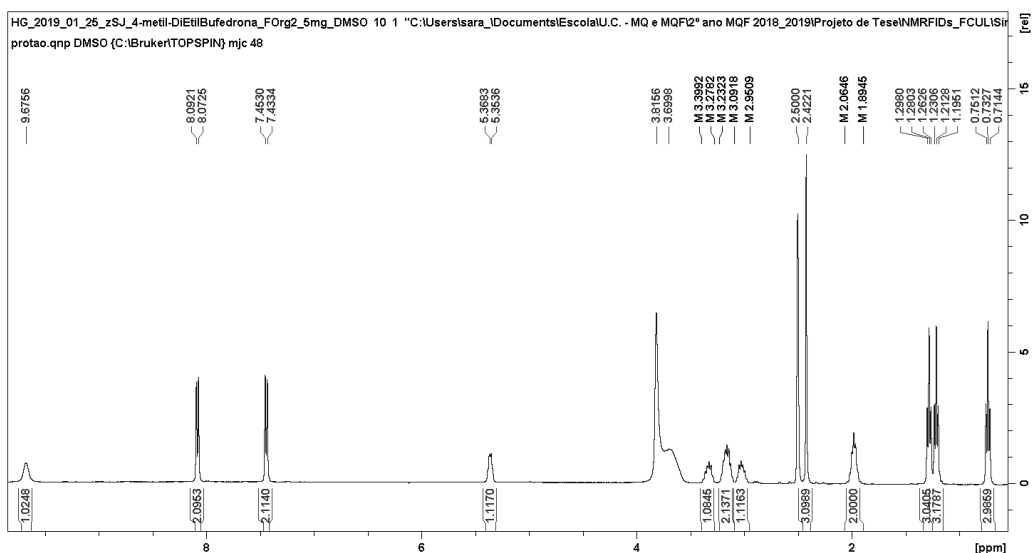


Figura 6.142. Espectro de RMN ¹H da 4'-metil-*N,N*-diethilnorbufedrona (6), em DMSO-*d*₆.

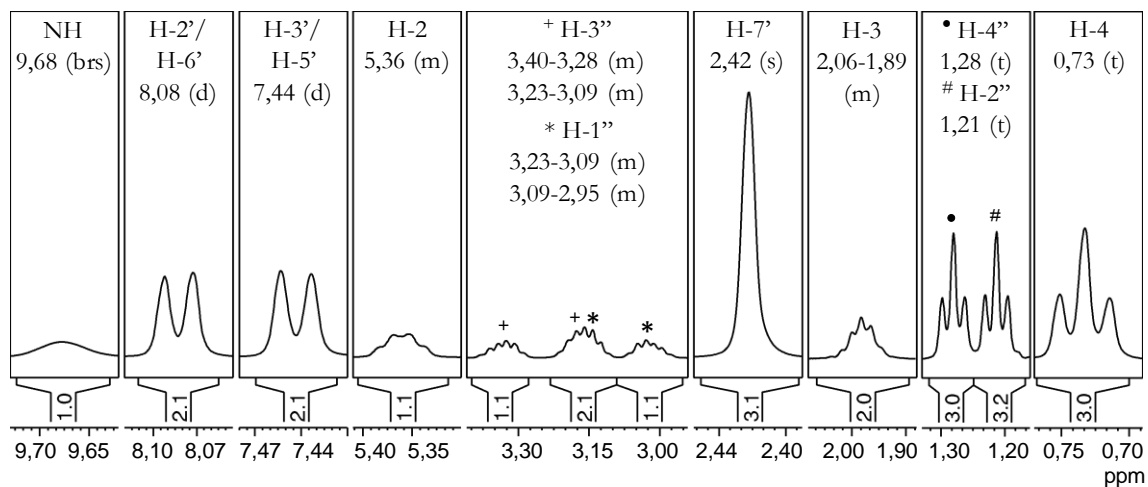


Figura 6.143. Espectro de RMN ¹H da 4'-metil-*N,N*-diethilnorbufedrona (6), em DMSO-*d*₆ (ampliação).

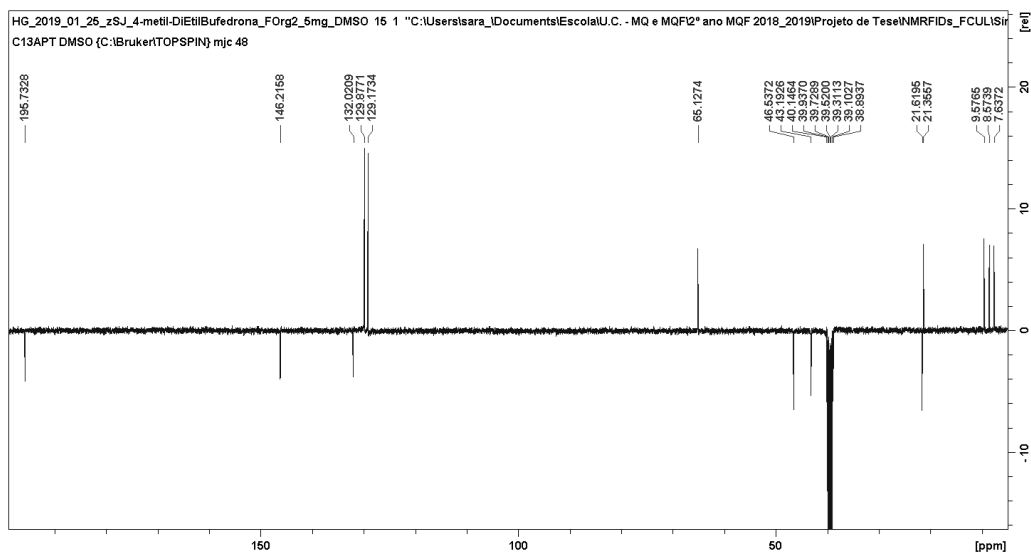


Figura 6.144. Espetro de RMN ^{13}C APT da 4'-metil-*N,N*-dietilnorbufedrona (**6**), em $\text{DMSO-}d_6$.

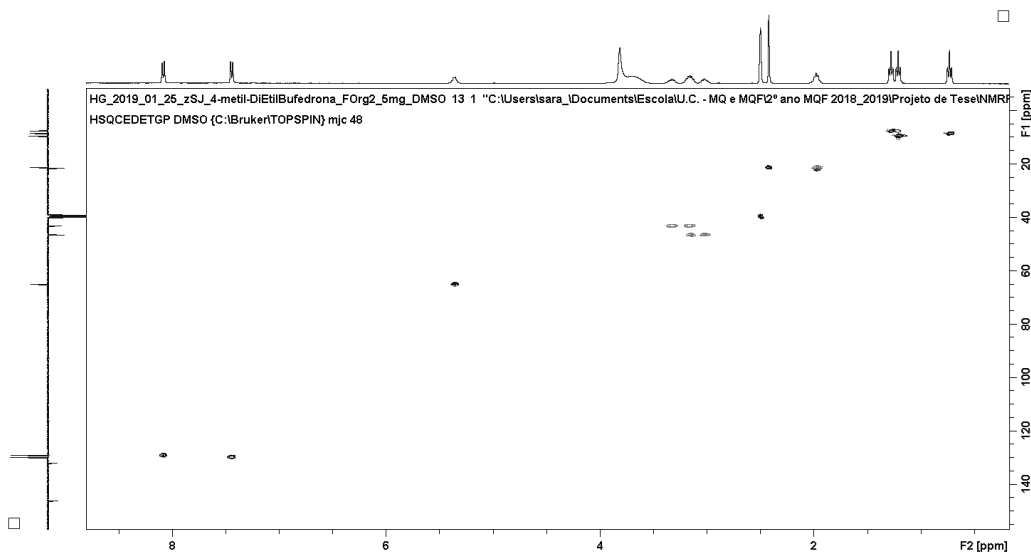


Figura 6.145. Espetro de HSQC da 4'-metil-*N,N*-dietilnorbufedrona (**6**), em $\text{DMSO-}d_6$.

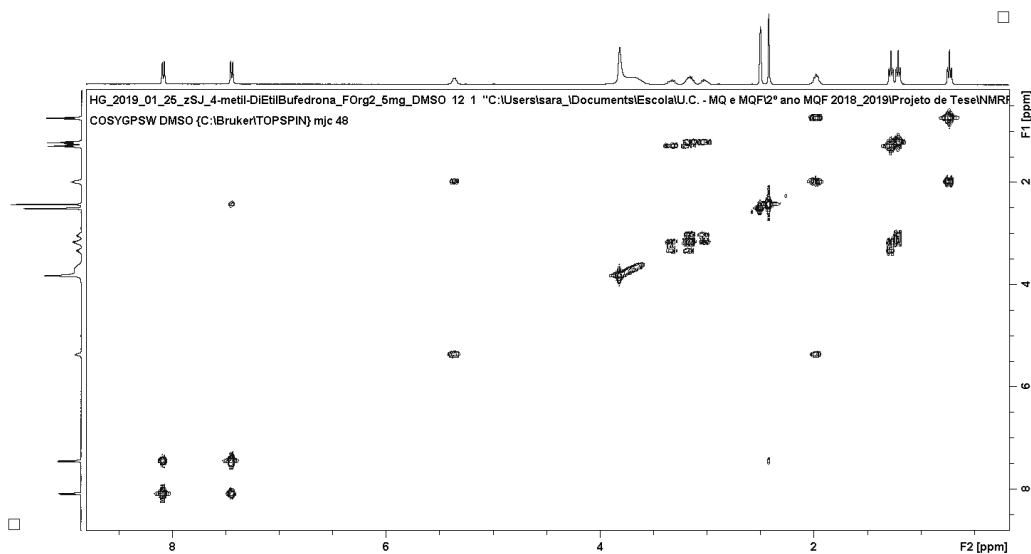


Figura 6.146. Espetro de COSY da 4'-metil-*N,N*-dietilnorbufedrona (**6**), em $\text{DMSO-}d_6$.

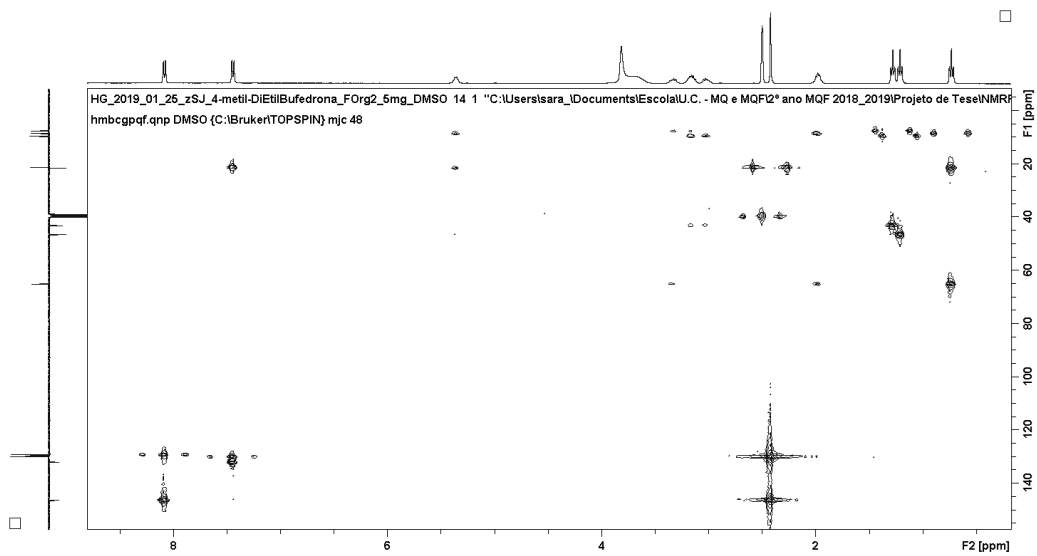


Figura 6.147. Espetro de HMBC da 4'-metil-*N,N*-diethynorbufedrona (**6**), em DMSO-*d*₆.

Anexo G: Identificação dos Compostos em estudo

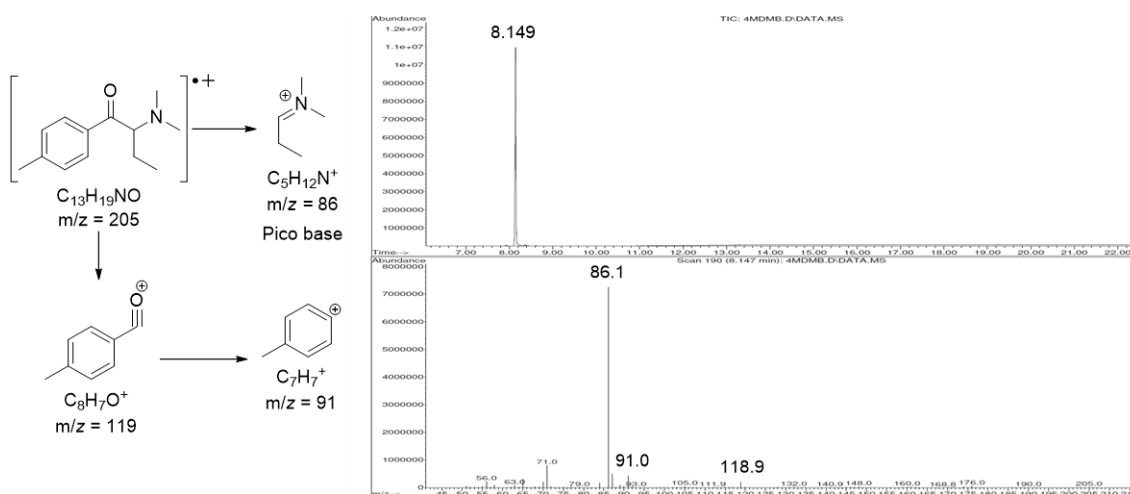


Figura 6.148. Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-MDMB (1).

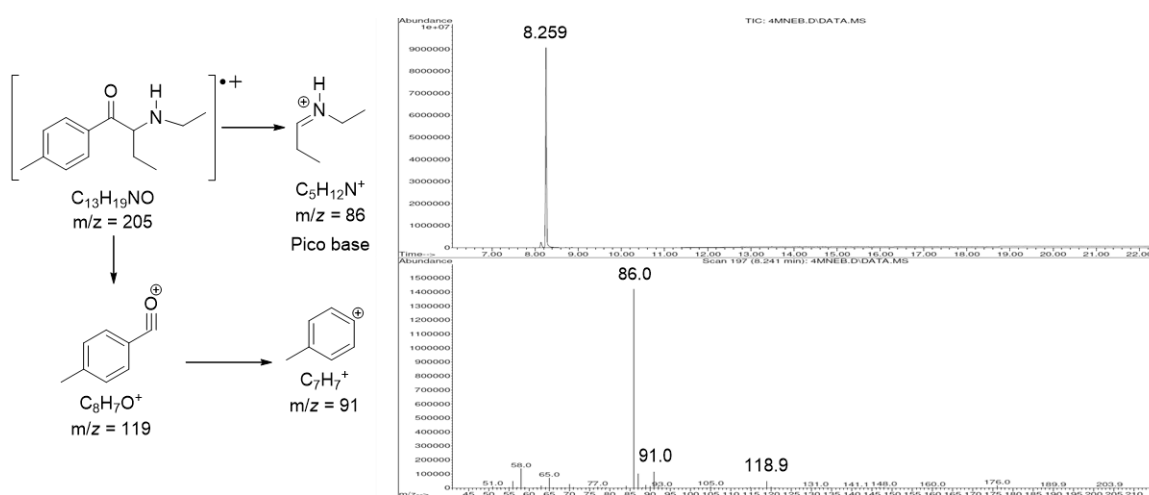


Figura 6.149. Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-MNEB (2).

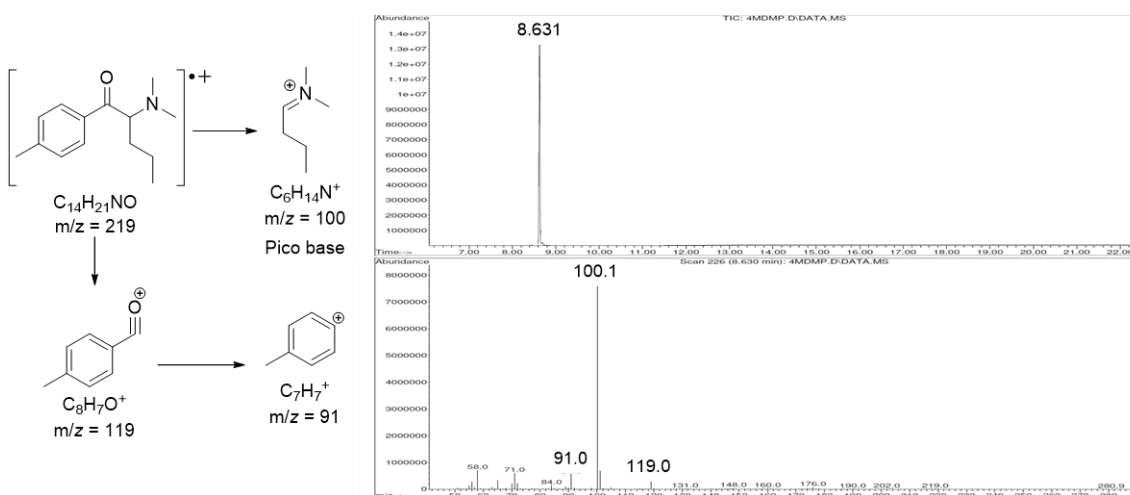


Figura 6.150. Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-MDMP (3).

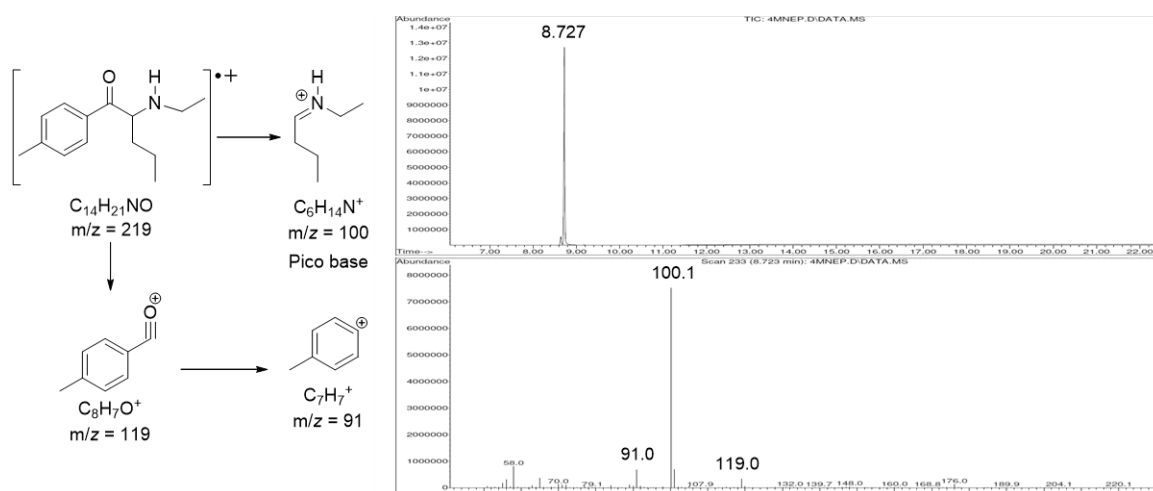


Figura 6.151. Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-MNEP (4).

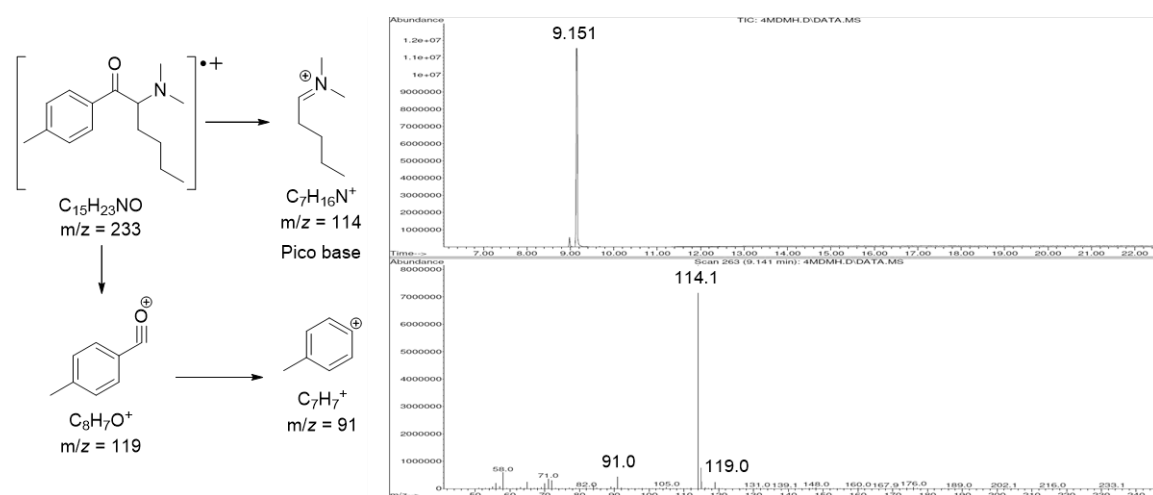


Figura 6.152. Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-MDMH (5).

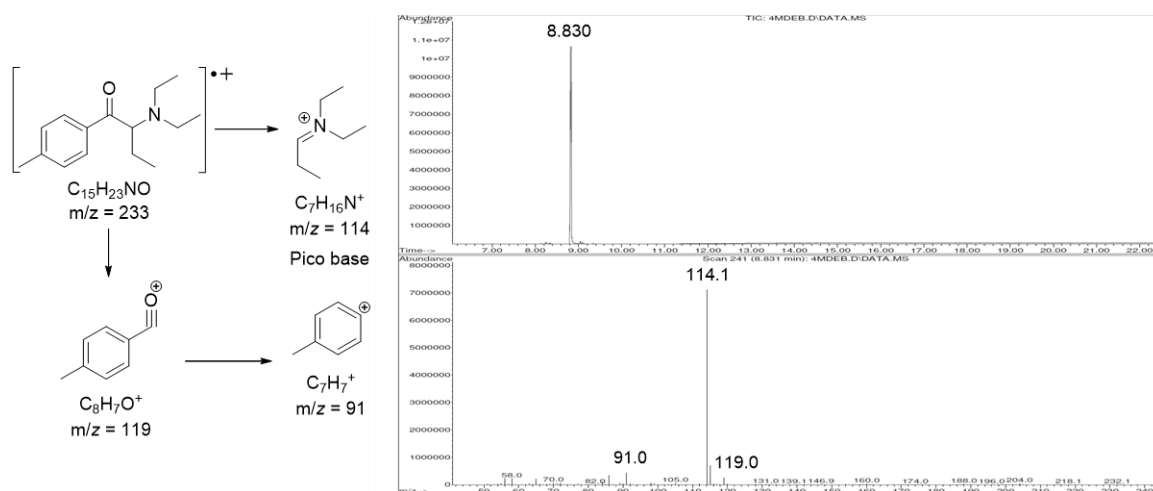


Figura 6.153. Fragmentações previstas por EI, cromatograma e espectro de massa da 4-MDEB (6).

INML INSTITUTO NACIONAL DE TOXICOLOGIA FORENSE		REGISTO				Pág. 1/1	
INML, IP • SUL		Confirmação Qualitativa					
Amostra:	CAL 10	Padrão Interno:	Cocaína-d3	Operador:	Sara		
Substância:	4-MDMB	Controlo:	500 1	Data:	04/05/2019		
Observações:							
Controlo: 500 1	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior	
1º lã	86	9187311	100,0%				
2º lã	91	608700	6,6%	5 abs.	1,8%	11,6%	
3º lã	119	280850	3,1%	50% rel.	1,5%	4,6%	
4º lã							
4-MDMB (t.r.) =	10,48			0,1 abs.	10,377	10,577	
Cocaína-d3 (t.r.) =	19,11	t.r.r. =	0,548	1% rel.	0,543	0,554	
Amostra: CAL 10	lão	Área	Área relativa	Conformidade			
1º lã	86	192042	100,0%	conforme			
2º lã	91	10135	5,3%	conforme			
3º lã	119	4798	2,5%	conforme			
4º lã							
4-MDMB (t.r.) =	10,48			conforme			
Cocaína-d3 (t.r.) =	19,12	t.r.r. =	0,548	conforme			

Gama %	Tolerância
> 50	10
25 - 50	20%
5 - < 25	5
< 5	50%
t.r.	menor (2% ou 0,1)
t.r.r.	1%

Controlo	Área
4-MDMB	9187311
Cocaína-d3	(ng/mL)
n.º lã:	1

Amostra	Área
4-MDMB	192042
Cocaína-d3	(ng/mL)
	#DIV/0!

Figura 6.154. Folha de cálculo utilizada para confirmação qualitativa: 4-MDMB (1).

INML INSTITUTO NACIONAL DE TOXICOLOGIA FORENSE		REGISTO				Pág. 1/1	
INML, IP • SUL		Confirmação Qualitativa					
Amostra:	CAL 10	Padrão Interno:	Cocaína-d3	Operador:	Sara		
Substância:	4-MNEB	Controlo:	500 1	Data:	04/05/2019		
Observações:							
Controlo: 500 1	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior	
1º lã	86	7478462	100,0%				
2º lã	91	574948	7,7%	5 abs.	2,7%	12,7%	
3º lã	119	288274	3,9%	50% rel.	1,9%	5,8%	
4º lã							
4-MNEB (t.r.) =	10,73			0,1 abs.	10,827	10,827	
Cocaína-d3 (t.r.) =	19,11	t.r.r. =	0,561	1% rel.	0,566	0,567	
Amostra: CAL 10	lão	Área	Área relativa	Conformidade			
1º lã	86	131251	100,0%	conforme			
2º lã	91	9300	7,1%	conforme			
3º lã	119	5097	3,9%	conforme			
4º lã							
4-MNEB (t.r.) =	10,73			conforme			
Cocaína-d3 (t.r.) =	19,12	t.r.r. =	0,561	conforme			

Gama %	Tolerância
> 50	10
25 - 50	20%
5 - < 25	5
< 5	50%
t.r.	menor (2% ou 0,1)
t.r.r.	1%

Controlo	Área
4-MNEB	7478462
Cocaína-d3	(ng/mL)
n.º lã:	1

Amostra	Área
4-MNEB	131251
Cocaína-d3	(ng/mL)
	#DIV/0!

Figura 6.155. Folha de cálculo utilizada para confirmação qualitativa: 4-MNEB (2).

INML INSTITUTO NACIONAL DE TOXICOLOGIA FORENSE		REGISTO				Pág. 1/1	
INML, IP • SUL		Confirmação Qualitativa					
Amostra:	CAL 10	Padrão Interno:	Cocaína-d3	Operador:	Sara		
Substância:	4-MDMP	Controlo:	500 1	Data:	04/05/2019		
Observações:							
Controlo: 500 1	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior	
1º lã	100	8964150	100,0%				
2º lã	91	497908	5,6%	5 abs.	0,6%	10,6%	
3º lã	119	236487	2,6%	50% rel.	1,3%	4,0%	
4º lã							
4-MDMP (t.r.) =	11,62			0,1 abs.	11,519	11,719	
Cocaína-d3 (t.r.) =	19,11	t.r.r. =	0,608	1% rel.	0,602	0,614	
Amostra: CAL 10	lão	Área	Área relativa	Conformidade			
1º lã	100	169673	100,0%	conforme			
2º lã	91	10131	6,0%	conforme			
3º lã	119	3846	2,3%	conforme			
4º lã							
4-MDMP (t.r.) =	11,62			conforme			
Cocaína-d3 (t.r.) =	19,12	t.r.r. =	0,608	conforme			

Gama %	Tolerância
> 50	10
25 - 50	20%
5 - < 25	5
< 5	50%
t.r.	menor (2% ou 0,1)
t.r.r.	1%

Controlo	Área
4-MDMP	8964150
Cocaína-d3	(ng/mL)
n.º lã:	1

Amostra	Área
4-MDMP	169673
Cocaína-d3	(ng/mL)
	#DIV/0!

Figura 6.156. Folha de cálculo utilizada para confirmação qualitativa: 4-MDMP (3).

INML
INSTITUTO NACIONAL DE
TOXICOLOGIA FORENSE

REGISTO

Pág. 1/1

INML, IP • SUL

TOXICOLOGIA FORENSE

Confirmação Qualitativa

Gama %	Tolerância
> 50	10
25 - 50	20%
5 - < 25	5
< 5	50%
t.r.	menor (2% ou 0,1)
t.r.r.	1%

Amostra: **CAL 10** Padrão Interno: Cocaína-d3 Operador: Sara
 Substância: **4-MNEP** Controle: 500 1 Data: 04/05/2019
 Observações:

Controlo: 500 1	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º lã	100	4293884	100,0%			
2º lã	91	303769	7,1%	5 abs.	2,1%	12,1%
3º lã	119	164602	3,8%	50% rel.	1,9%	5,8%
4º lã						
4-MNEP (t.r.) =	11,88			0,1 abs.	11,782	11,982
Cocaína-d3 (t.r.) =	19,11	t.r.r. =	0,622	1% rel.	0,615	0,628

Controlo	Área
4-MNEP	4293884
Cocaína-d3 (ng/mL)	
nº lã:	1

Amostra: CAL 10	lão	Área	Área relativa	Conformidade
1º lã	100	73457	100,0%	conforme
2º lã	91	4603	6,3%	conforme
3º lã	119	3362	4,6%	conforme
4º lã				
4-MNEP (t.r.) =	11,88			conforme
Cocaína-d3 (t.r.) =	19,12	t.r.r. =	0,622	conforme

Amostra	Área
4-MNEP	73457
Cocaína-d3 (ng/mL)	#DIV/0!

Figura 6.157. Folha de cálculo utilizada para confirmação qualitativa: 4-MNEP (4).

INML
INSTITUTO NACIONAL DE
TOXICOLOGIA FORENSE

REGISTO

Pág. 1/1

INML, IP • SUL

TOXICOLOGIA FORENSE

Confirmação Qualitativa

Gama %	Tolerância
> 50	10
25 - 50	20%
5 - < 25	5
< 5	50%
t.r.	menor (2% ou 0,1)
t.r.r.	1%

Amostra: **CAL 10** Padrão Interno: Cocaína-d3 Operador: Sara
 Substância: **4-MDMH** Controle: 500 1 Data: 04/05/2019
 Observações:

Controlo: 500 1	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º lã	114	8827340	100,0%			
2º lã	91	443436	5,0%	5 abs.	0,0%	10,0%
3º lã	119	232638	2,6%	50% rel.	1,3%	4,0%
4º lã						
4-MDMH (t.r.) =	13,16			0,1 abs.	13,057	13,257
Cocaína-d3 (t.r.) =	19,11	t.r.r. =	0,688	1% rel.	0,681	0,695

Controlo	Área
4-MDMH	8827340
Cocaína-d3 (ng/mL)	
nº lã:	1

Amostra: CAL 10	lão	Área	Área relativa	Conformidade
1º lã	114	166574	100,0%	conforme
2º lã	91	8427	5,1%	conforme
3º lã	119	4200	2,5%	conforme
4º lã				
4-MDMH (t.r.) =	13,16			conforme
Cocaína-d3 (t.r.) =	19,12	t.r.r. =	0,688	conforme

Amostra	Área
4-MDMH	166574
Cocaína-d3 (ng/mL)	#DIV/0!

Figura 6.158. Folha de cálculo utilizada para confirmação qualitativa: 4 MDMH (5).

INML
INSTITUTO NACIONAL DE
TOXICOLOGIA FORENSE

REGISTO

Pág. 1/1

INML, IP • SUL

TOXICOLOGIA FORENSE

Confirmação Qualitativa

Gama %	Tolerância
> 50	10
25 - 50	20%
5 - < 25	5
< 5	50%
t.r.	menor (2% ou 0,1)
t.r.r.	1%

Amostra: **CAL 10** Padrão Interno: Cocaína-d3 Operador: Sara
 Substância: **4-MDEB** Controle: 500 1 Data: 04/05/2019
 Observações:

Controlo: 500 1	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º lã	114	6935615	100,0%			
2º lã	91	367535	5,3%	5 abs.	0,3%	10,3%
3º lã	119	211074	3,0%	50% rel.	1,5%	4,8%
4º lã						
4-MDEB (t.r.) =	12,13			0,1 abs.	12,030	12,230
Cocaína-d3 (t.r.) =	19,11	t.r.r. =	0,635	1% rel.	0,628	0,641

Controlo	Área
4-MDEB	6935615
Cocaína-d3 (ng/mL)	
nº lã:	1

Amostra: CAL 10	lão	Área	Área relativa	Conformidade
1º lã	114	132105	100,0%	conforme
2º lã	91	9100	6,9%	conforme
3º lã	119	4564	3,5%	conforme
4º lã				
4-MDEB (t.r.) =	12,13			conforme
Cocaína-d3 (t.r.) =	19,12	t.r.r. =	0,635	conforme

Amostra	Área
4-MDEB	132105
Cocaína-d3 (ng/mL)	#DIV/0!

Figura 6.159. Folha de cálculo utilizada para confirmação qualitativa: 4-MDEB (6).

Anexo H: Estudo de Seletividade

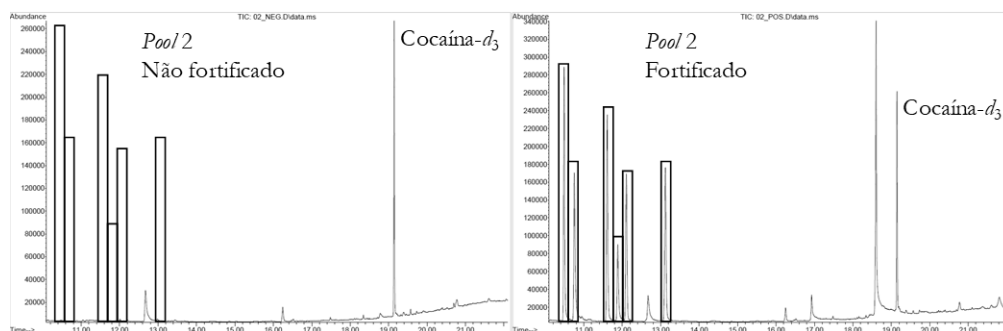


Figura 6.160. Cromatogramas obtidos para a Pool 2.

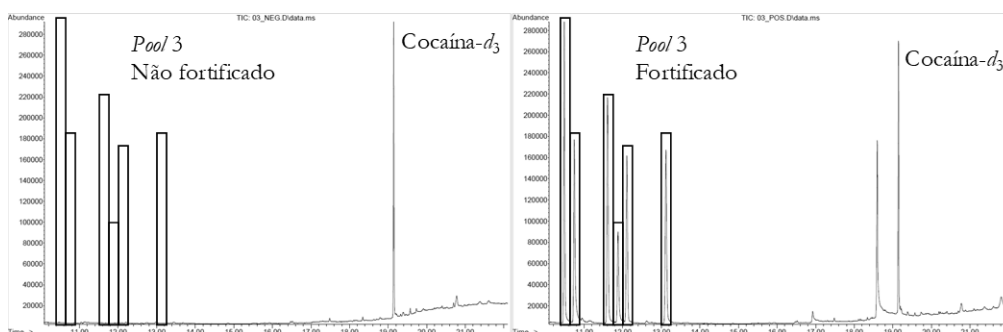


Figura 6.161. Cromatogramas obtidos para a Pool 3.

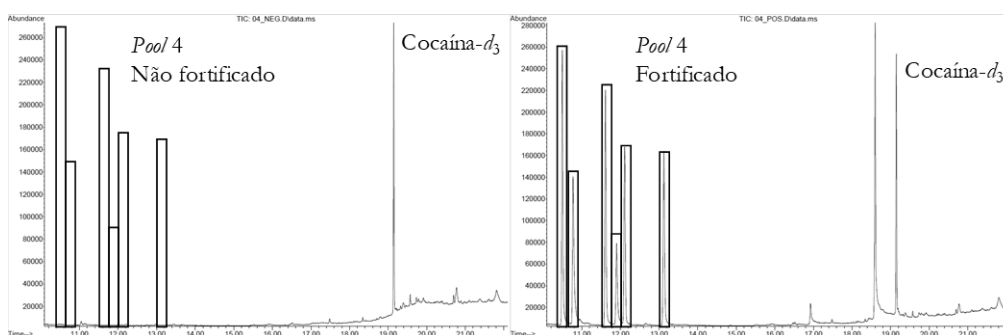


Figura 6.162. Cromatogramas obtidos para a Pool 4.

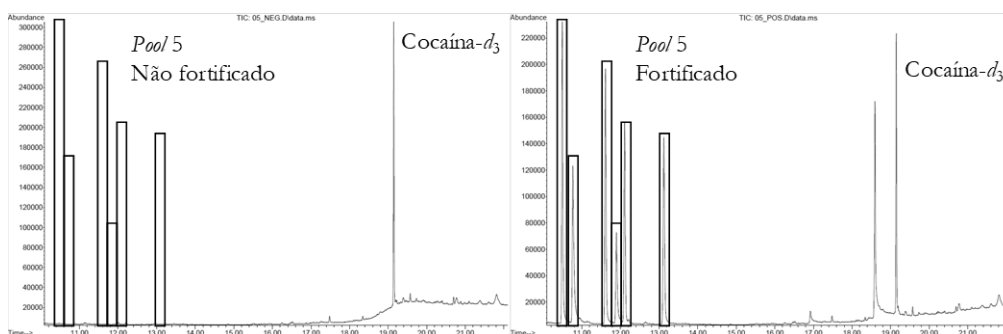


Figura 6.163. Cromatogramas obtidos para a Pool 5.

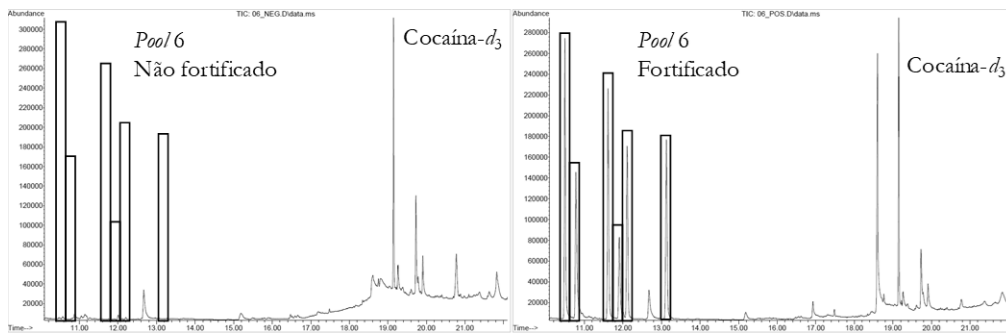


Figura 6.164. Cromatogramas obtidos para a *Pool 6*.

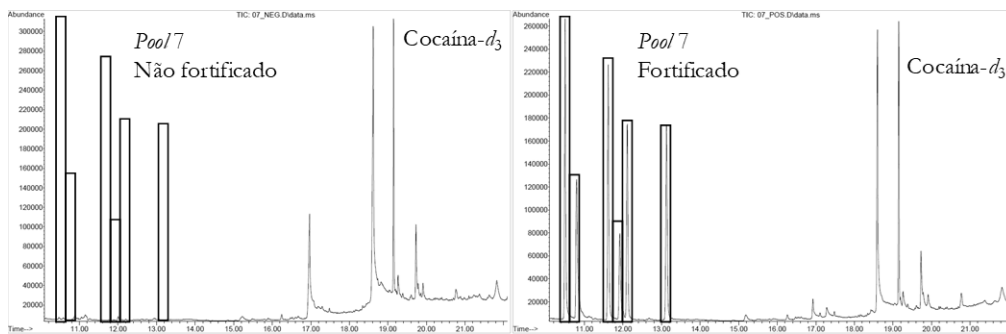


Figura 6.165. Cromatogramas obtidos para a *Pool 7*.

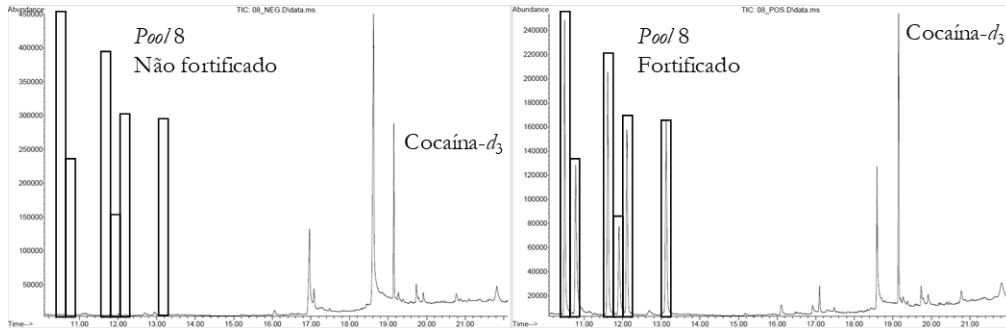


Figura 6.166. Cromatogramas obtidos para a *Pool 8*.

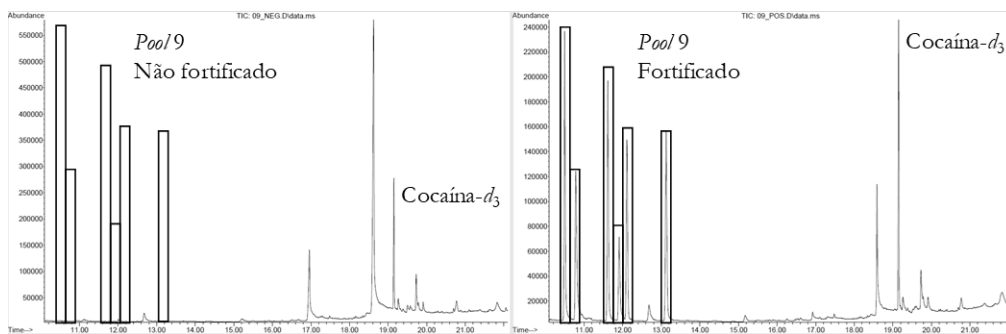


Figura 6.167. Cromatogramas obtidos para a *Pool 9*.

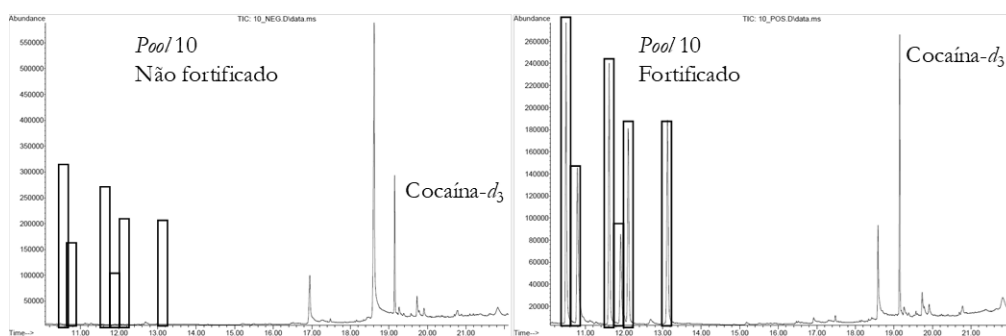


Figura 6.168. Cromatogramas obtidos para a *Pool 10*.

Anexo I: Eficiência do Processo de Extração

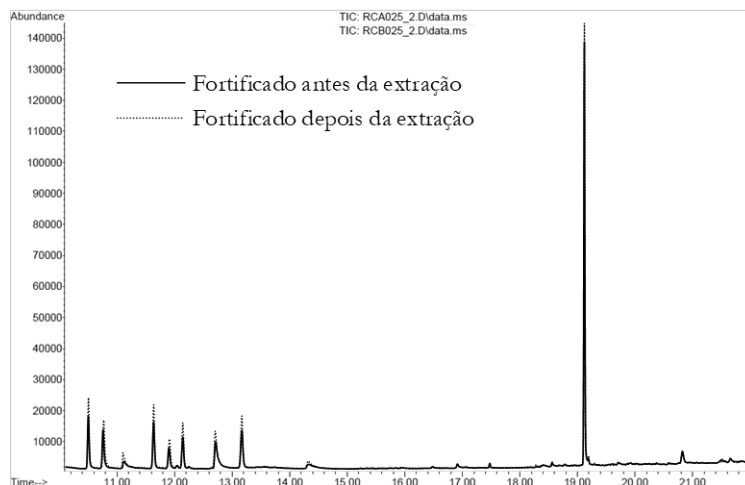


Figura 6.169. Sobreposição dos cromatogramas obtidos no estudo da recuperação para 25 ng/mL.

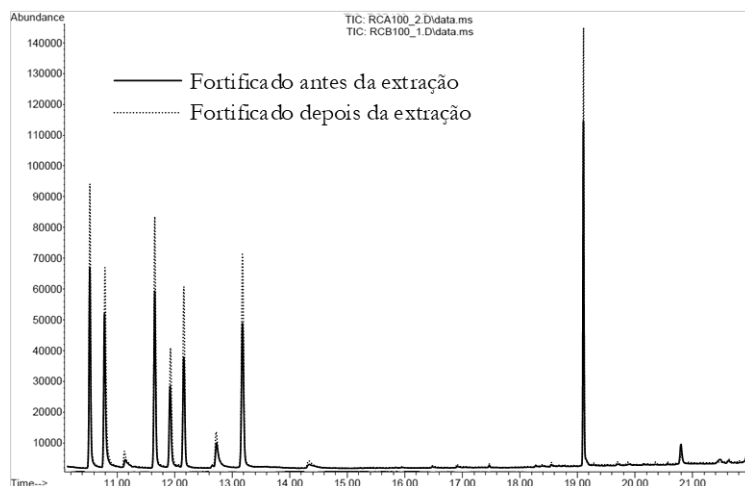


Figura 6.170. Sobreposição dos cromatogramas obtidos no estudo da recuperação para 100 ng/mL.

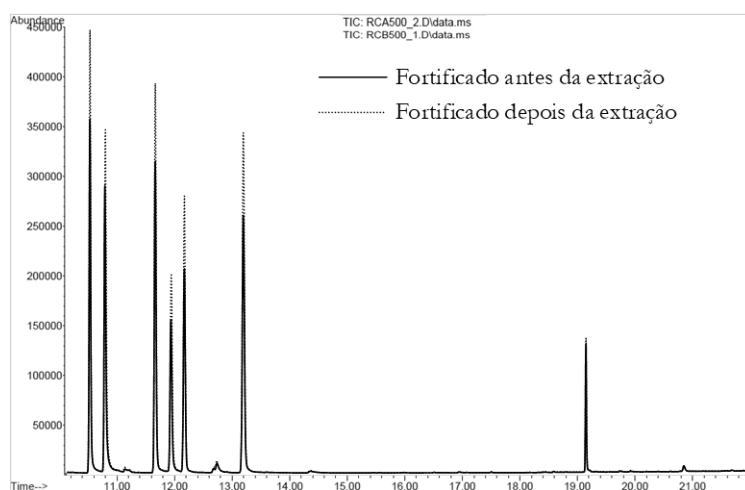


Figura 6.171. Sobreposição dos cromatogramas obtidos no estudo da recuperação para 500 ng/mL.

Anexo J: Linearidade e Modelo de Calibração

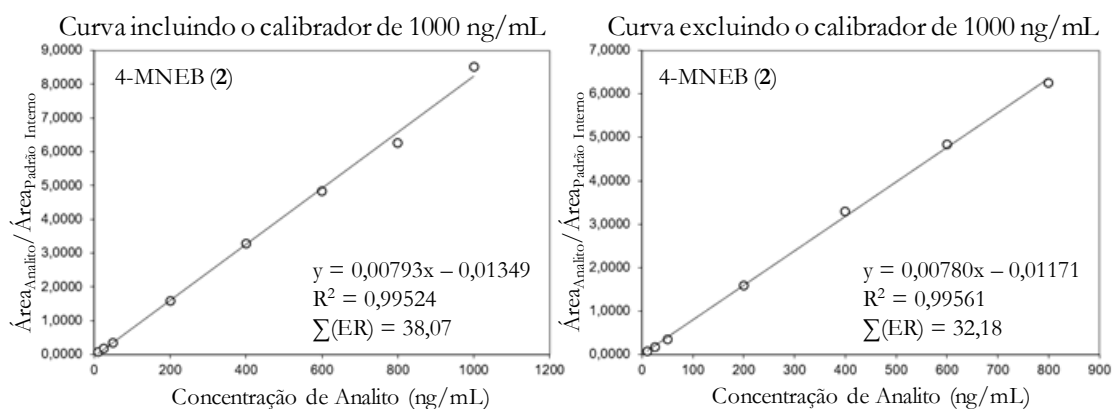


Figura 6.172. Comparação das curvas de calibração para a 4-MNEB (2) com e sem o calibrador a 1000 ng/mL.

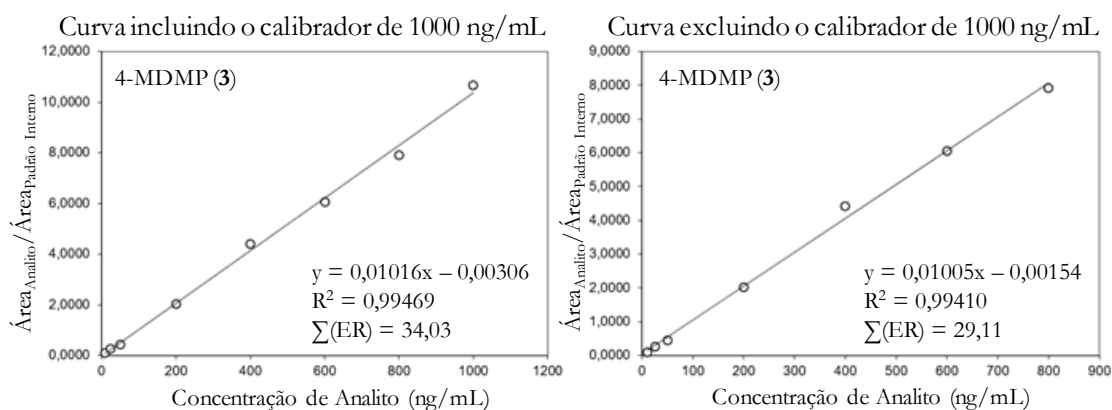


Figura 6.173. Comparação das curvas de calibração para a 4-MDMP (3) com e sem o calibrador a 1000 ng/mL.

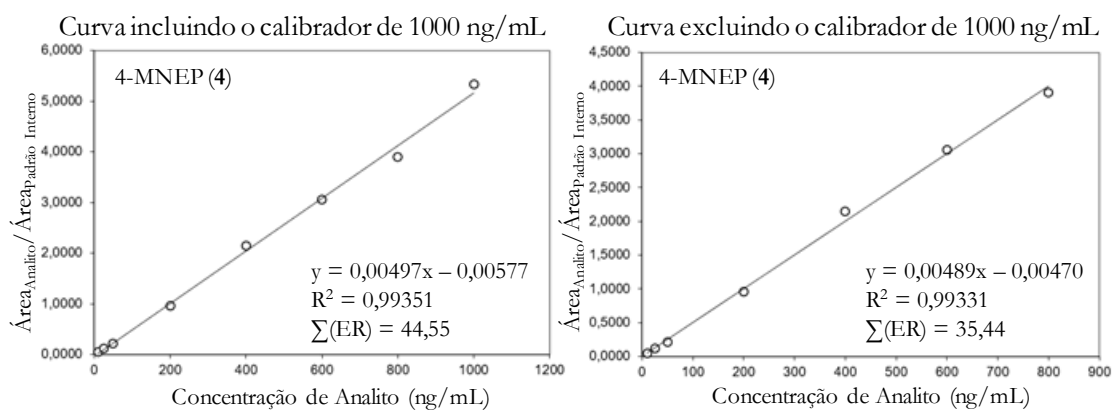


Figura 6.174. Comparação das curvas de calibração para a 4-MNEP (4) com e sem o calibrador a 1000 ng/mL.

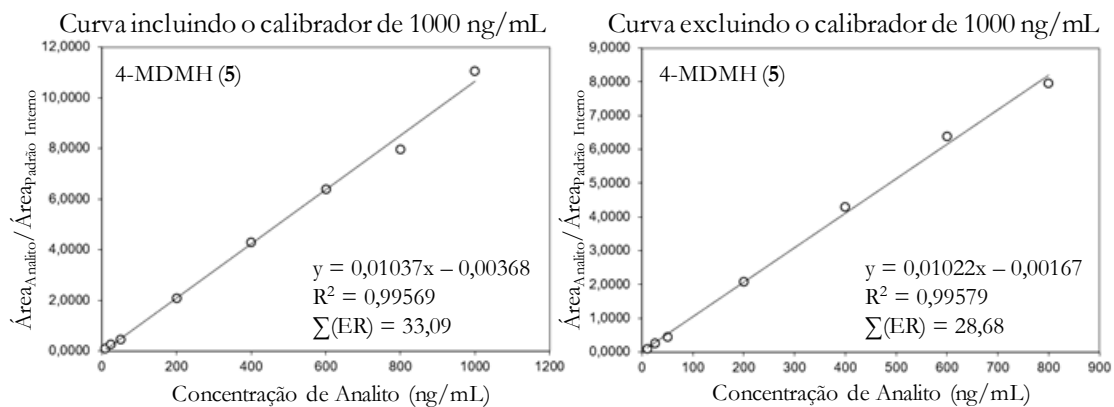


Figura 6.175. Comparação das curvas de calibração para a 4-MDMH (5) com e sem o calibrador a 1000 ng/mL.

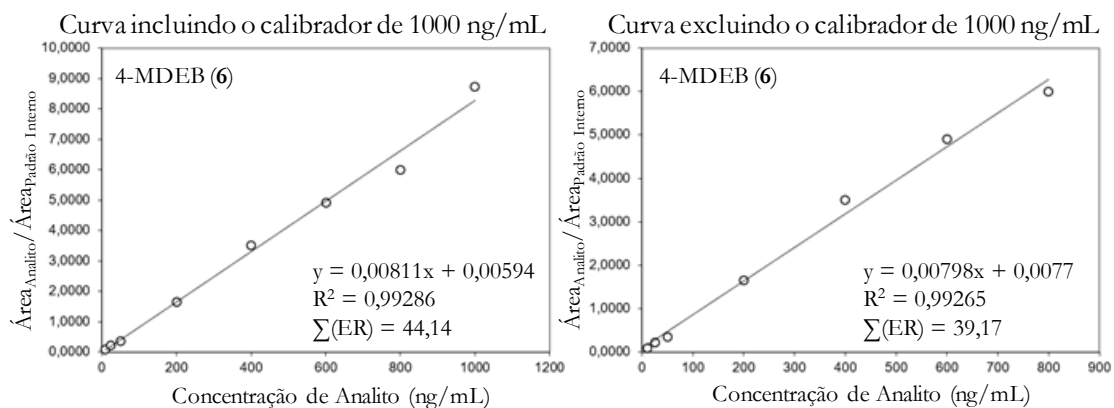


Figura 6.176. Comparação das curvas de calibração para a 4-MDEB (6) com e sem o calibrador a 1000 ng/mL.

Anexo K: Estudo de Estabilidade

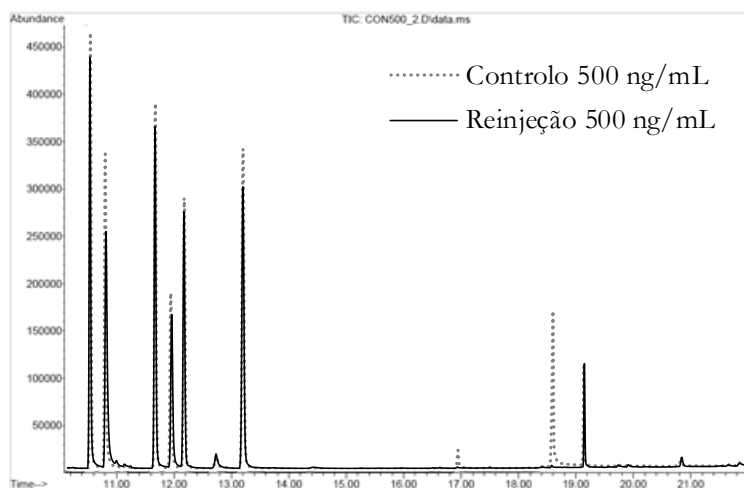


Figura 6.177. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para uma amostra analisada dois dias após a sua extração (reinjectão) e uma amostra de controlo.

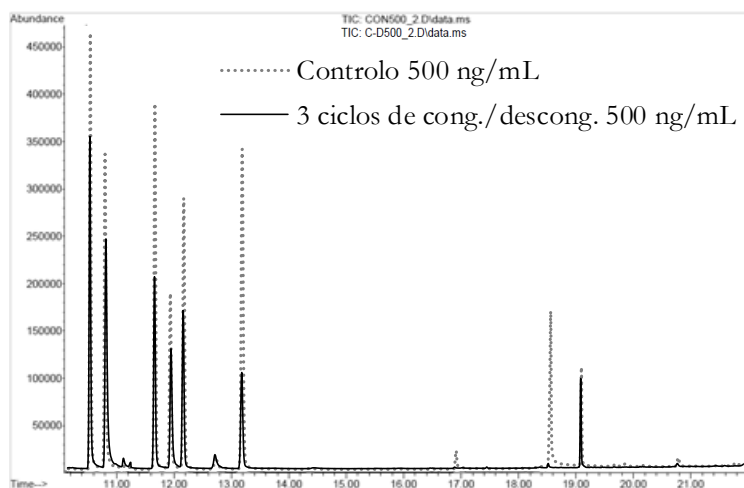


Figura 6.178. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para uma amostra analisada após três ciclos de congelação/descongelação e uma amostra de controlo.

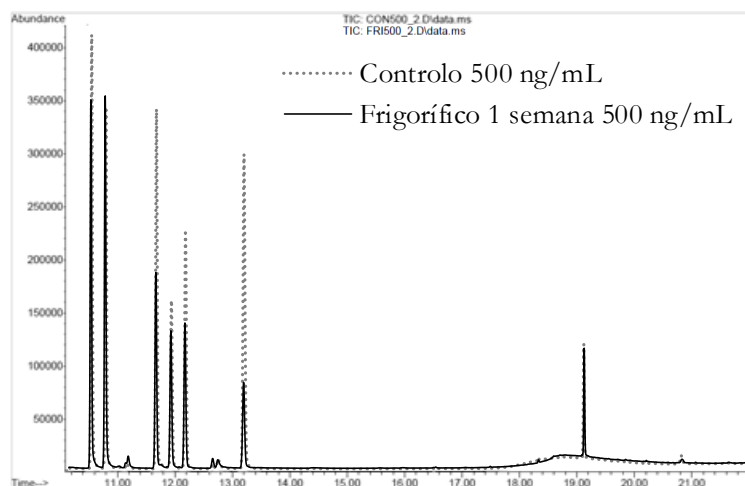


Figura 6.179. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para uma amostra analisada após 1 semana no frigorífico e uma amostra de controlo.

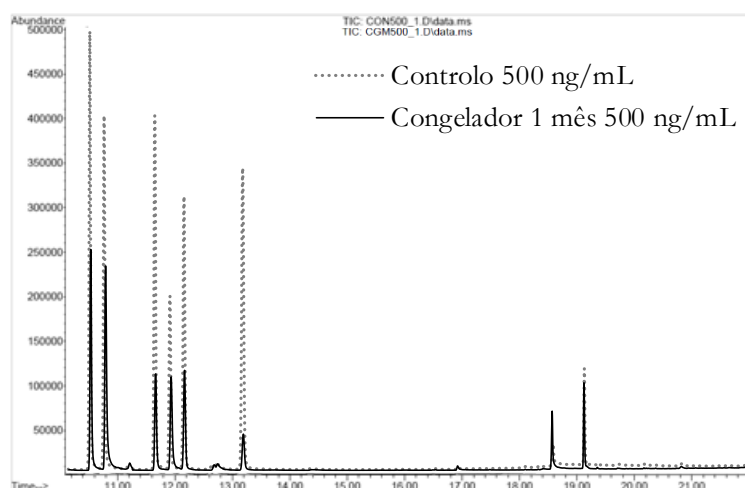


Figura 6.180. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para uma amostra analisada após 1 mês no congelador e uma amostra de controlo.

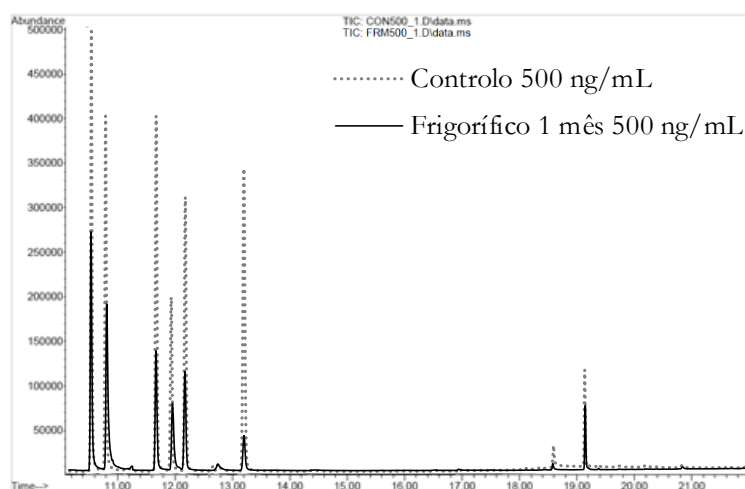


Figura 6.181. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para uma amostra analisada após 1 mês no frigorífico e uma amostra de controlo.