



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale
in
Biologia Molecolare e Applicata**

Studio del metabolismo *in vitro* della Nuova Sostanza

Psicoattiva 3-fluoro- α -pirrolidinopentiofenone

***In vitro* study of metabolism of New Psychoactive Substance**

3-fluoro- α -pyrrolidinopentiophenone

Tesi di Laurea Magistrale

di:

Diletta Berardinelli

Relatore

Chiar.mo Prof

Francesco Paolo Busardò

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2020/2021

Sommario

1. INTRODUZIONE	5
1.1 <i>Background</i>	5
1.2 <i>La diffusione delle NPS</i>	12
1.3 <i>Il controllo delle NPS</i>	19
1.4 <i>Allerta Precoce, Valutazione e Misure di Controllo</i>	20
1.5 <i>Sistema Nazionale di Allerta Precoce (SNAP) In Italia</i>	21
2 CLASSI DI NUOVE SOSTANZE PSICOATTIVE:	25
2.1 <i>I catinoni sintetici</i>	25
3 STUDIO DEL METABOLISMO DEL 3F-α-PVP	30
3.1 <i>Lo studio</i>	30
4 MATERIALI E METODI	31
4.1 <i>Sostanze chimiche e reagenti</i>	31
4.2 <i>Incubazione del 3F-α-PVP con epatociti</i>	32
4.3 <i>Preparazione dei campioni</i>	34
4.4 <i>Condizioni strumentali</i>	34
4.4.1 <i>Condizioni cromatografiche</i>	35
4.4.2 <i>Condizioni spettrometro di massa</i>	36
4.4.3 <i>Predizione in silico dei metaboliti</i>	40
4.4.4 <i>Analisi ed elaborazione dei dati</i>	43
5 RISULTATI E DISCUSSIONE	46
5.1 <i>Software di predizione in silico</i>	46
5.2 <i>Identificazione dei metaboliti del 3F-α-PVP</i>	59
5.3 <i>β-cheto riduzione</i>	63
5.4 <i>N-dealchilazione</i>	64
5.5 <i>Idrossilazione e ossidazione</i>	65
5.6 <i>Metaboliti di seconda generazioni</i>	69
5.7 <i>Metaboliti di fase II</i>	74
6 CONCLUSIONI	75

Capitolo Primo

1. INTRODUZIONE

1.1 Background

Una nuova sostanza psicoattiva (in inglese New Psychoactive substances o substance, comunemente abbreviate con l'acronimo NPS) è definita dall'Ufficio delle Nazioni Unite sulla Droga e sui Crimini (United Nation Office on Drugs and Crime, UNODC) come una sostanza di abuso, sia in forma pura che in preparazione, che non è controllata dalla Convenzione Unica sui Narcotici del 1961 o dalla Convenzione Unica sulle Sostanze Psicoattive del 1971, e che rappresenta un rischio per la salute pubblica paragonabile a quello delle sostanze elencate nella Convenzione suddetta. Il termine “nuovo” non si riferisce necessariamente a sostanze sintetizzate per la prima volta, ma piuttosto alla loro apparizione nel mercato illegale come sostanze con effetto psicotropo [1]. Infatti, alcune di esse iniziano ad entrare nel mercato illecito anche molti anni dopo la pubblicazione della loro sintesi, come nel caso di possibili sostanze farmacologicamente attive testate da industrie farmaceutiche come possibili medicinali che non raggiungono il mercato per i troppi effetti collaterali o i pochi effetti farmacologici, ma vengono poi che vengono poi deviati verso il mercato illegale o anche sostanze utilizzate come farmaci ma anche vendute illegalmente per i loro effetti psicoattivi. Alcuni recenti esempi di quest'ultima

possibilità sono: la ketamina, largamente utilizzata in ambito medico come anestetico e ad oggi abusata come allucinogeno dissociativo, analgesico o per terapie veterinarie sin dagli anni '70, oppure gli oppioidi come ossicodone e metadone che sono prescritti come coadiuvanti della terapia del dolore, ma abusati come analgesico-narcotici. [2–4]

Secondo la Convenzione Unica sui narcotici del 1961, *"il possesso, l'uso, il commercio, la distribuzione, l'importazione, l'esportazione, la fabbricazione e la produzione di sostanze stupefacenti sono consentiti limitatamente ai fini medici e scientifici"*. La Convenzione del 1971 stabilisce, in parte, gli stessi concetti della Convenzione Unica del 1961, ma sancisce un controllo internazionale meno rigoroso per le sostanze psicoattive. Le Convenzioni del 1961 e del 1971 hanno lo scopo di circoscrivere al campo medico e scientifico l'uso di sostanze con potenziale d'abuso.[5]

Le NPS sono conosciute sul mercato nero con varie terminologie quali “sballi legali”, “sali da bagno”, “prodotti chimici di ricerca” e “droghe sintetiche”. [1]

Nel 2020, il Sistema di Allerta precoce sulle NPS (Early Warning System, European Monitoring Centre for Drug and Drugs Addiction, EMCDDA) monitorava 830 NPS di cui 46 riportate per la prima volta. La maggior parte di queste sostanze è rappresentata da cannabinoidi e catinoni sintetici, rispettivamente 209 e 156. [6]

Le principali classi di NPS esistenti comprendono: cannabinoidi sintetici, feniletilamine, oppioidi, triptamine, benzodiazepine, piperazine, arylalkilamine, aminoindani, derivati ed estratti di piante e funghi, piperidine, pirrolidine e cationi sintetici.[7]

I **cannabinoidi sintetici** sono un gruppo di potenti composti psicoattivi che hanno la stessa capacità di legarsi ai recettori del tetraidrocannabinolo (THC).

Nel 2008 è stato identificato il primo cannabinoide sintetico, il JWH-018.[8]

I nomi con i quali vengono venduti sul mercato sono Spice, K2 o Mr. Happy. I principali effetti collaterali sono agitazione, irritabilità, confusione, allucinazioni fino ad arrivare a convulsioni.[9] Come recentemente riportato da Giorgetti et al. [10], dal 2019 si sono verificati 74 casi di morte per uso di cannabinoidi sintetici, da soli o in associazione ad altre sostanze, riguardanti vittime in un range di età compreso tra 14 e 61 anni.

Le **fenetilamine** sono una classe di sostanze con potenti effetti allucinogeni simili alle sostanze sotto il controllo internazionale, come l'LSD.[11] I nomi più utilizzati sono FLY per indicare i benzodifurani o DRAGONFLY. I principali effetti collaterali includono agitazione, tachicardia, midriasi, allucinazioni, convulsioni e scompensi renali ed epatici.[1]

Gli **oppioidi sintetici** sono narcotici analgesici con effetti simili agli oppioidi naturali (come per esempio la morfina) e analoghi del fentanyl e nuovi

composti non fentanilici sono inclusi in questa classe.[11] Legandosi ai recettori endogeni per gli oppioidi, producono un ampio spettro di effetti tra cui estrema felicità, nausea, costipazione, sedazione e soppressione centrale della respirazione, fino all'arresto respiratorio.[12] Gli oppioidi sintetici rappresentano un alto rischio di intossicazione per gli abusatori a causa della loro elevatissima potenza farmacologica. Infatti, bastano minime dosi per produrre effetti anche letali e piccolissime quantità ponderali possono corrispondere a migliaia di dosi. Tra il 2009 e il 2020 sono stati riportati 67 nuovi oppioidi sintetici inclusi 10 riportati nel 2020.[6]

Tra il 2017 e il 2020, numerosi sono i casi riportati in letteratura relativi a decessi a seguito dell'assunzione di fentanili. In Europa, i casi di intossicazioni fatali sono stati circa 250, la maggior parte riportati in Germania, Svezia e Norvegia. Un solo caso è stato riportato in Italia nel 2017 a seguito di un'intossicazione fatale con ocfentanil. Gli effetti collaterali più comuni sono tachicardia, ipertensione, insufficienza renale, respiratoria e in alcuni casi ipotermia. [13]

Le **nuove benzodiazepine** sono analoghi strutturali degli ansiolitici prescrittibili, come diazepam e alprazolam. Sono spesso vendute come versioni contraffatte dei medicinali o come la loro versione "legale".[6]

Sono una classe NPS fortemente controllata; infatti, nel 2019, sono stati riportati 240 sequestri (circa il 5% dei sequestri totali di NPS). L'EMCDDA sta attualmente monitorando 30 nuove benzodiazepine, di cui l'80% è stato riportato per la prima volta tra il 2014 e il 2020. Gli effetti principali causati da queste sostanze sono effetti ansiolitici e sedativi, rilassamento muscolare e attività anticonvulsiva .[14]

Le **triptamine** sono sostanze di origine naturale che vengono prodotte endogenamente da diversi organismi, come piante, funghi e animali. Se assunte hanno effetti psicoattivi allucinogeni. Le triptamine naturali includono anche serotonina, melatonina e bufotenina.[1] Il nuovo sviluppo di queste sostanze è associato a severe intossicazioni, alcune anche fatali. Infatti, casi di giovani ragazzi ospedalizzati a seguito di un'intossicazione sono stati riportati in letteratura. Allucinazioni e stato di agitazione sono stati spesso riportati come segni dell'intossicazione. In molti casi la morte è conseguenza dei comportamenti irrazionali e pericolosi dovuti all'assunzione di tali sostanze, piuttosto che di un'overdose.[15]

Le **piperazine** sono descritte come farmaci fallati, poiché alcuni di essi sono stati valutati come potenziali agenti terapeutici ma mai portati sul mercato. Sono vendute molto spesso come ecstasy e con altri nomi generici quali 'pep pills' 'social tonic' o 'party pills'. Le informazioni sugli effetti tossicologici

sono limitate. Esse agiscono come degli stimolanti con effetti dopaminergici, noradrenergici e serotoninergici. Sono presenti anche numerosi casi fatali associati alle piperazine presenti in Europa.[1].

Un altro gruppo di NPS apparse recentemente include sostanze simili alle **fenciclidine**. Sono apparse sul mercato per la prima volta in Europa nel 2010. Intossicazioni acute di PCP provocano effetti psicologici e comportamentali tipo anormalità fisiologiche e neurologiche lievi. [1]

Le **ketamine** sono derivate delle fenciclidine, ma controllate dalla convenzione. Condividono con le fenciclidine il meccanismo d'azione, mimando l'azione degli stessi neurotrasmettitori a livello del sistema nervoso centrale. Sono generalmente venduti come ecstasy nei mercati illeciti. Gli effetti collaterali più comuni sono tachicardia ed alterazione della pressione sanguigna.[1]

Un ampio gruppo è rappresentato dalle cosiddette NPS naturali che possono avere origine vegetale, fungina o animale, come ad esempio: **khat, kratom e *Salvia Divinorum***. **Khat** è una pianta tipica del Corno D'Africa e della Penisola Arabica. La masticazione di Khat è usata tipicamente dalle comunità che vivono in quelle aree. La consumazione di queste foglie provoca degli effetti psicoattivi risultanti dal rilascio di catinone e alcaloidi catini. Gli effetti

collaterali sono quelli di euforia, ipertermia, anoressia, aumento della respirazione, battito cardiaco e pressione sanguigna.[1]

Mitragyna speciosa Korth è un grande albero presente nelle regioni tropicali e sub tropicali del Sud Est Asiatico. Viene denominata in Thailand **Kratom** e contiene numerosi alcaloidi. E' uno stimolante del sistema nervoso centrale, a basse dosi viene usato per contrastare la fatica durante numerose ore di lavoro, mentre ad alte dosi ha un effetto sedativo e narcotico.[1]

La *Salvia divinorum* è una pianta psicoattiva indigena delle aree forestali in Oaxaca, Messico. È stata originariamente utilizzata per pratiche religiose e scopi medici. Viene venduta in semi o in foglie o sotto forma di estratto liquido. Studi effettuati su animali dimostrano un basso livello di tossicità e un basso potenziale di dipendenza.[1]

I **catinoni sintetici** sono derivati sintetici del catinone, alcaloide psicoattivo della pianta *Catha Edulis*. Tre le altre, mefedrone, pentedrone e metilone fanno parte di questa classe.[16] I catinoni sintetici provocano allucinazioni, aggressioni, confusione, depressione e in alcuni casi, pensieri suicidi. Secondo La Maida et al.[17] tra il 2017 e il 2020, sono stati riportati in letteratura e nei database dell'EMCDDA.147 casi di morte dovuta all'assunzione di catinoni sintetici. Tra questi, un caso di decesso è avvenuto in Italia: un uomo di 40 anni che aveva assunto 4-metiletiletinone. Generalmente queste NPS vengono

prodotte in laboratori clandestini da parte di organizzazioni criminali che sono in grado di cambiare il loro modus operandi per aggirare le leggi in vigore. Tali cambiamenti risultano essere uno dei principali motivi alla base della difficoltà di controllo di questo fenomeno.[17]

1.2 La diffusione delle NPS

Ad oggi, il fenomeno delle NPS ha dimensione globale, riguardando 126 Paesi di tutte le regioni del mondo che ogni anno riportano il ritrovamento di almeno una molecola. Fino a dicembre 2020, il Sistema di Allerta Precoce

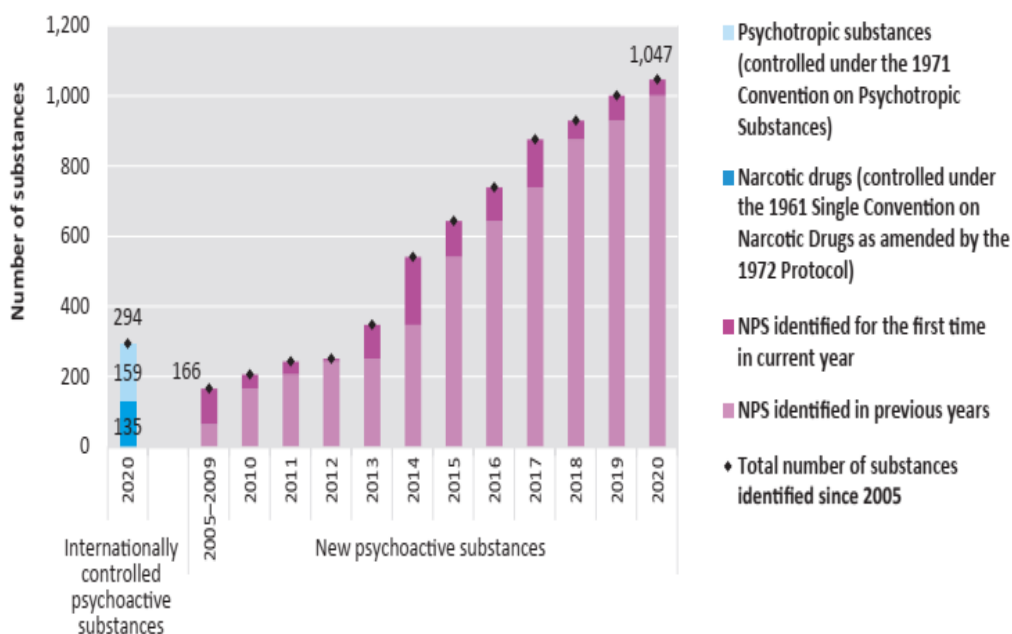


Figura 1: Numero di droghe controllate a livello internazionale nel 2020 e NPS identificate a livello globale, 2005-2020 (figura cumulativa), World Drug Report 2021, Booklet 2, Drug demand Drug supply

dell'UNODC (Early Warning Advisory, UNODC EWA) ha ricevuto 1047 segnalazioni da parte dei governi, laboratori di tossicologia forense e dalle

organizzazioni che fanno parte delle Nazioni Unite, un numero circa 3 volte superiore rispetto al numero delle sostanze poste sotto il controllo internazionale (Figura 1)[18].

Poiché le caratteristiche farmaco-tossicologiche di queste nuove sostanze non sono sperimentalmente determinate con studi clinici controllati come accade per le sostanze d'abuso classiche, i consumatori fanno da cavie dirette e spesso diffondono le proprie esperienze in forum specializzati su internet, riportando gli effetti percepiti sia positivi che negativi in maniera empirica. Ciò che invece non viene prontamente riportato sono le ospedalizzazioni dovute alle intossicazioni acute ed eventuali decessi. Pertanto i consumatori di NPS non sono realmente consapevoli delle conseguenze più gravi dell'uso di queste sostanze.[15,19–21] Le molecole di nuova sintesi, infatti, sono spesso analoghi strutturali di molecole psicoattive già conosciute che differiscono anche solo per un gruppo funzionale. La nuova struttura molecolare permette talvolta di eludere le restrizioni di legge, per cui tali sostanze al momento della loro uscita sul mercato possono risultare legali. Questo quindi comporta la presenza di un ampio numero di NPS, molto simili strutturalmente tra di loro che rende la loro identificazione estremamente impegnativa da parte dei laboratori di tossicologia.[1,11,22,23] A questo scopo, alcune nazioni quali Germania, Australia, Regno Unito e Stati Uniti, ma anche l'Italia per alcune classi quali i

catinoni e i cannabinoidi sintetici e i fentanili hanno adottato delle leggi cosiddette ‘leggi generiche’ o ‘leggi su molecole analoghe’ che permettono di porre sotto il sistema di controllo nazionale tutte quelle sostanze che risultano

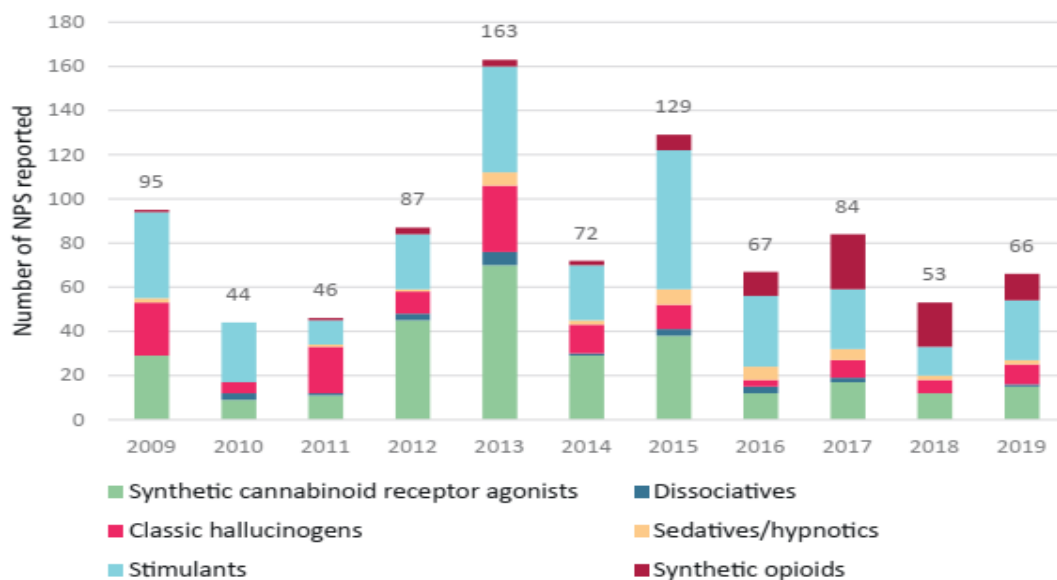


Figura 2: Numero di NPS riportate per la prima volta ogni anno a livello globale, 2009-2019, Early Warning Advisory sulle NPS, 2021

essere simili ad altre già controllate, in termini di struttura chimica ed effetto .

[18,24]

Nel 2019, 541 sostanze differenti sono state segnalate e identificate dagli stati membri dell'UNODC, di cui 71 identificate, per la prima volta (incluse 5 i cui effetti non sono stati determinati). (Figura 2)[18,25]

A seguito dell'adozione di nuove legislazioni da parte degli Stati Membri dell'UE, il numero di sostanze risulta essere in diminuzione rispetto alle 163 sostanze riportate nel 2013. E' inoltre importante notare che, nonostante il numero di NPS rimanga elevato, quest'ultime possono restare disponibili sul mercato illegale solo per un breve periodo di tempo prima di scomparire [18]. Infatti, 230 NPS precedentemente riportate non sono state più segnalate dal 2016. (Figura 3)[18]

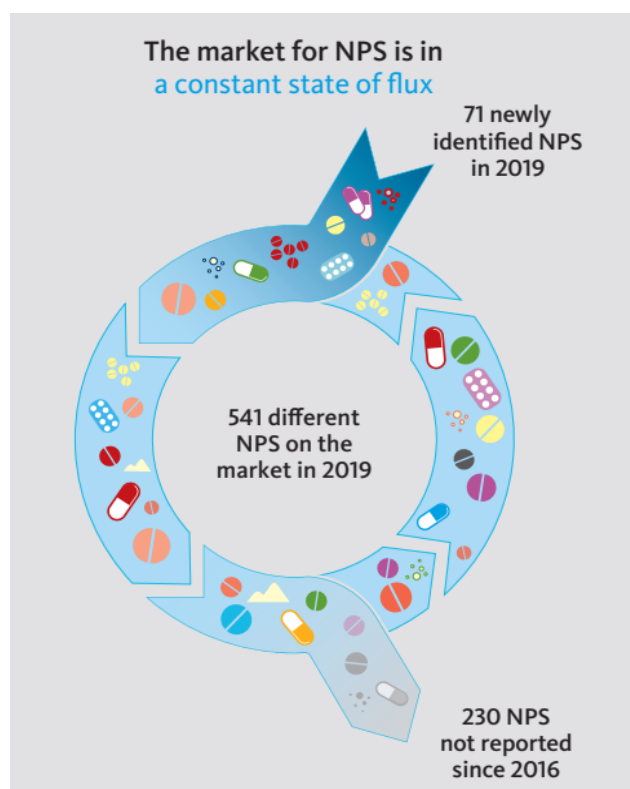


Figura 3: World Drug Report 2021, Booklet 2, Drug demand drug supply (United Nation Pubblicati on sales, No E.21.XI.8.)

Ciò nonostante, la rapida comparsa di un elevato numero di NPS nel mercato globale della droga risulta essere una sfida impegnativa per le politiche antidroga.[7] Infatti, nel 2020 in Europa sono stati segnalati all'EWS circa 34800 sequestri da parte di forze dell'ordine, di cui più di 0,9 tonnellate di cannabinoidi e 0,7 tonnellate di catinoni. (Figura 4)[6]

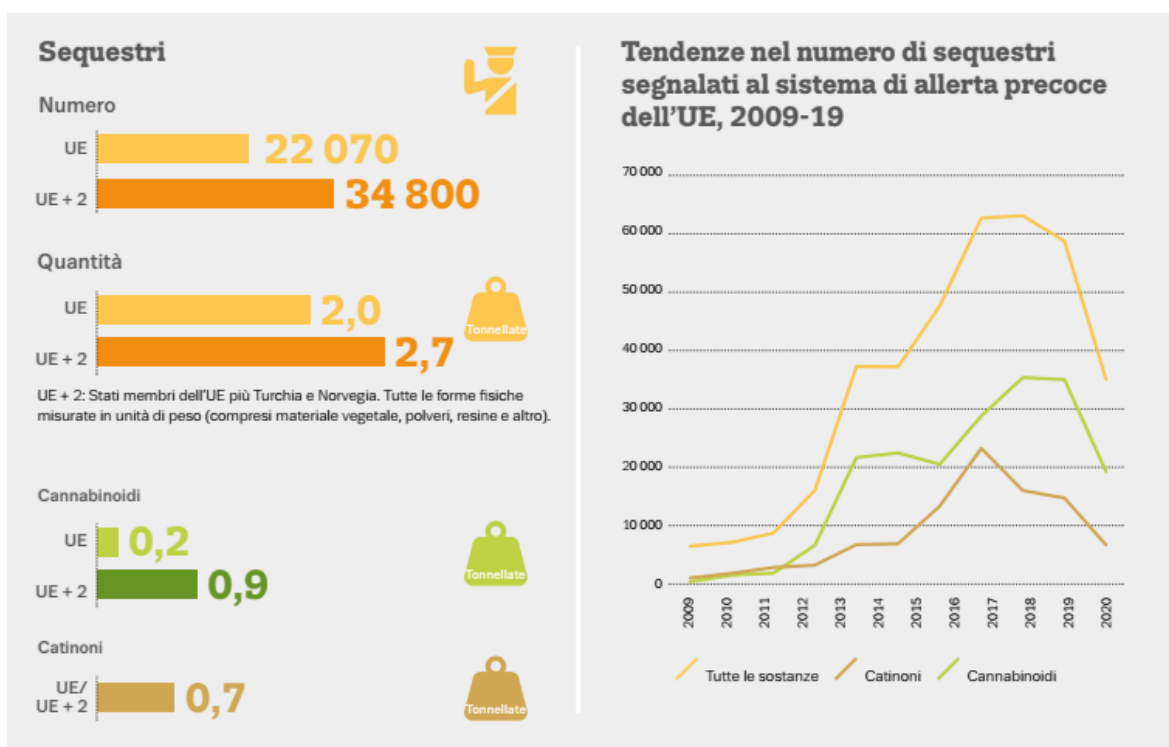


Figura 4: Sequestri di Nuove Sostanze Psicoattive segnalate al Sistema di Allerta precoce Europeo: tendenze nel numero totale di sequestri (2008-18) e ripartizione del numero dei sequestri per categoria (Unione Europea) nel 2018. EMCDDA. Trends and Development, 2021.

Nel 2019, nel solo territorio Europeo sono stati riportati 5141 casi di morti per overdose, che hanno coinvolto soggetti di un'età compresa fra 15 e 64 anni di cui il 77% composto da uomini. [6]

Nel 2020, il Sistema di Allerta precoce sulle NPS (Early Warning System, EMCDDA) monitorava 830 NPS di cui 46 riportate per la prima volta.

Risulta importante notare che in Europa il picco di sostanze riportate per la prima volta è stato rilevato nel 2014(Figura 5). La maggior parte di queste sostanze è rappresentata da cannabinoidi e catinoni sintetici, rispettivamente 209 e 156 (Figura 6). Questo trend è inoltre coerente anche a livello globale in cui cannabinoidi e catinoni spiccano fra i gruppi di sostanze maggiormente riportate tra il 2009 e 2019.[6,18]

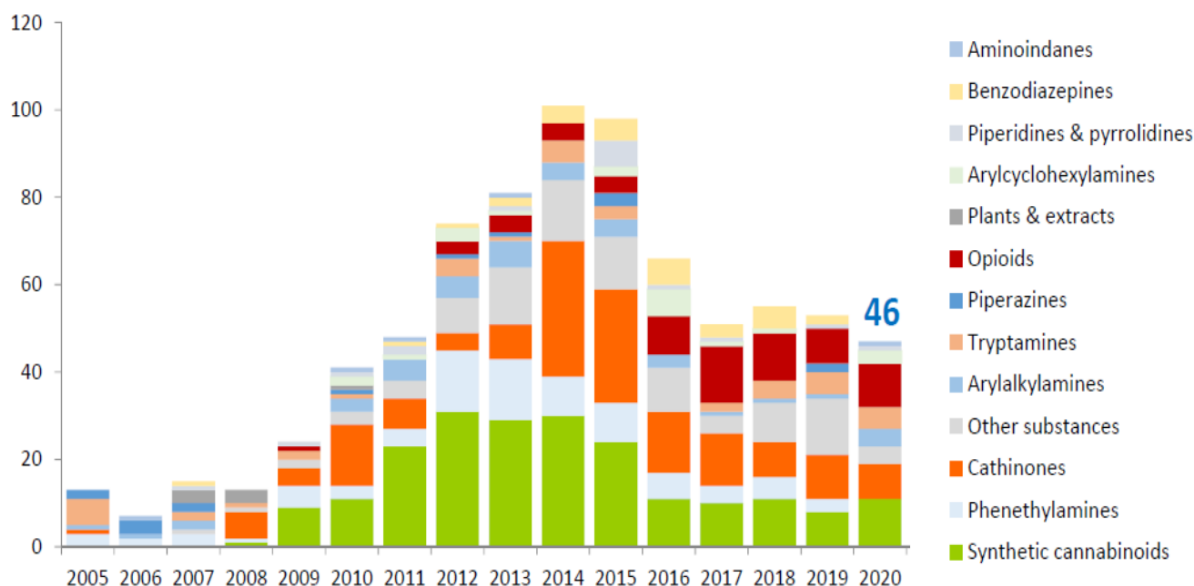


Figura 5: Numero di categorie di nuove sostanze psicoattive riportate all'Unione Europea per la prima volta al Sistema di Allerta Precoce, 2005-2020, Fonte: Istituto Superiore di Sanità

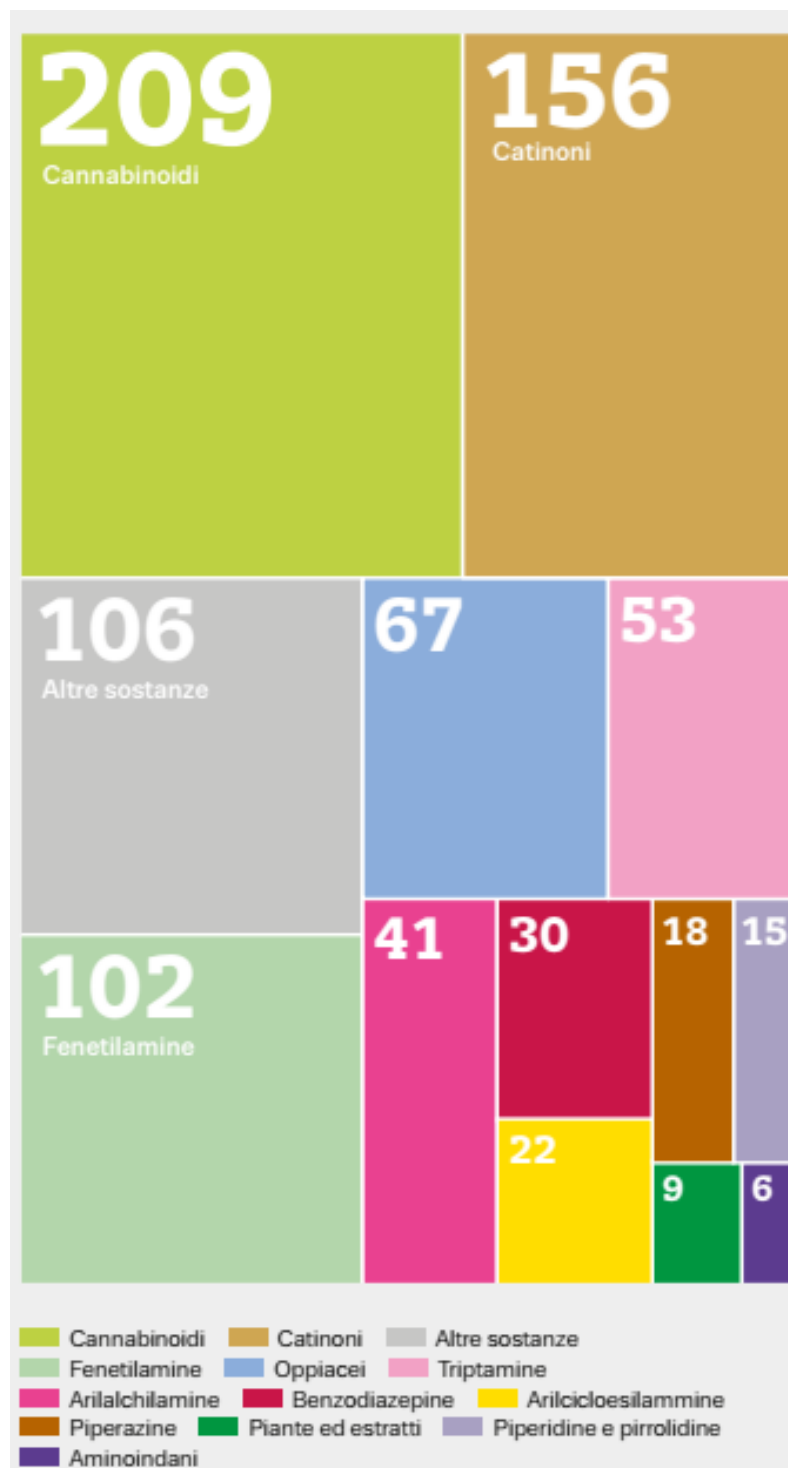


Figura 6: Numero di sostanze monitorate in UE dal Sistema di Allerta Precoce dell'EMCDDA alla fine del 2020

1.3 Il controllo delle NPS

Tra gli anni '80 e anni '90 del ventesimo secolo c'è stato un aumento sorprendente della popolarità e della richiesta di alcune droghe sintetiche psicostimolanti. A seguito di ciò i governi hanno consentito la condivisione delle informazioni su queste sostanze per poter rafforzare le leggi e la cooperazione giudiziaria.[26]

Nel 1997, è stato sviluppato l'EWS in recepimento della legislazione europea conosciuta come Azione Congiunta sulle Nuove droghe sintetiche (97/396/JHA). Tale sistema è stato rafforzato nel 2005 dalla Decisione del Consiglio Europeo 2005/387/JHA. Da novembre 2018 opera sotto il Regolamento (EU) 2017/2101.[27]

L'EWS è composto da una rete multidisciplinare di agenzie, che comprende l'EMCDDA, 30 Sistemi Nazionali di Allerta Precoce (28 Stati membri dell'UE, Turchia e Norvegia), l'Europol e le sue reti di contrasto, l'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA), la Commissione Europea e altri partner. I sistemi nazionali e l'EWS stesso si basano sullo scambio di informazioni sulla caratterizzazione chimica di nuove sostanze psicoattive da parte dei laboratori di tossicologia. Principalmente, questi laboratori analizzano reperti provenienti da sequestri di NPS da parte delle forze dell'ordine (come polizia, dogane e polizia di frontiera), da avvelenamenti (come quelli da reparti di emergenza ospedaliera

e indagini medico-legali sulla morte) e da campioni raccolti da persone che utilizzano NPS e da acquisti di prova, ad esempio dai mercati online. Questo approccio consente la raccolta e la comunicazione rapida all'EMCDDA di informazioni basate sugli eventi sulla comparsa e sui danni causati da NPS a livello nazionale. [27]

1.4 Allerta Precoce, Valutazione e Misure di Controllo

Come stabilito dai testi legislativi sopracitati, i sistemi di nazionali ed internazionali di allerta precoce sulle NPS si avvalgono di un flusso di lavoro strutturato in 3 fasi successive basato sull'allerta rapida, sulla valutazione dei rischi e sulle misure di controllo. La prima fase consiste nella segnalazione di una sostanza sospettata come NPS da parte degli Stati Membri dell'EU all'EWS presso l'EMCDDA, come notifica formale. Tale notifica include informazioni chimico-analitiche sulle sostanze e informazioni sulle circostanze in cui esse sono state rilevate. Sulla base delle informazioni comunicate all'EWS, l'EMCDDA produce un rapporto iniziale sulla sostanza, che specifica tutte le informazioni fondamentali che descrivono la nuova sostanza segnalata, se essa comporta rischi per la salute o sociali. L'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA), l'Agenzia Europea per le sostanze chimiche (ECHA), il Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC) e

l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) collaborano alla stesura della relazione iniziale, fornendo le informazioni e i dati.[27]

Sulla base del rapporto iniziale, la Commissione Europea può adottare un atto delegato per aggiungere la nuova sostanza psicoattiva nella definizione di droga nell'Allegato del Quadro Decisionale del Comitato del 2004/757/JHA, a condizione che la nuova sostanza psicoattiva sia un grave rischio per la salute pubblica, che sarà applicato anche dagli Stati Membri dell'EWS. Gli Stati Membri dell'UE metteranno in atto le leggi.[26]

1.5 Sistema Nazionale di Allerta Precoce (SNAP) In Italia

Nel 2009, l'Italia ha attivato il proprio sistema nazionale di allerta precoce (SNAP) in risposta alla Decisione del Consiglio Europeo 2005/387/JHA.

Lo SNAP, facente parte della rete che coinvolge gli stati Membri dell'UE, nasce con l'obiettivo di individuare tempestivamente fenomeni legati alla comparsa di NPS sul territorio italiano che possano costituire un rischio per la salute pubblica.[28]

A seguito della decisione del 1° giugno 2016 del Dipartimento per le politiche antidroga (DPA), lo SNAP è coordinato dal Centro Nazionale Dipendenze e Doping (CNDD) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS). [22]

A partire dall'anno 2021 Lo SNAP è composto da 5 unità operative, [22] :

- La Direzione Centrale per i Servizi Antidroga (DCSA) con funzione di direzione delle Forze di Polizia
- Il Centro Antiveleni e Centro Nazionale di Informazione Tossicologia-Istituti Clinici Scientifici di Pavia che coordina gli aspetti clinico tossicologici
- L'Unità di Ricerca di Tossicologia Forense del Dipartimento S.A.I.M.L.A.L dell'Università La Sapienza di Roma, che si occupa degli aspetti bio-tossicologici e analitici.
- Dipartimento di Eccellenza di Ancona di Scienze Biomediche e Sanità Pubblica
- Centro Controllo Qualità e Rischio Chimico dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico "Paolo Giaccone" di Palermo -

Queste unità lavorano in modo coordinato, applicando a livello nazionale il medesimo flusso di lavoro raccomandato dall'EMCDDA e sopra citato.

Il sistema si avvale della collaborazione del Reparto di Investigazioni Scientifiche dei Carabinieri, Polizia Scientifica e Agenzia delle Dogane; inoltre riceve informazioni anche da parte di organizzazioni che offrono servizi per le dipendenze quali ad esempio comunità e strutture specializzate. Nel 2019 il Sistema ha ricevuto 187 segnalazioni, 95 da parte delle forze dell'Ordine, 32

dai Centri Collaborativi, 56 riguardanti le NPS e 4 avvertimenti riguardo le sigarette elettroniche.[22]

Nel territorio italiano e da parte dell'EMCDDA sono state rilevate 103 segnalazioni sulle NPS, di cui la maggior parte erano catinoni, oppioidi e cannabinoidi sintetici (Figura 7).[22]

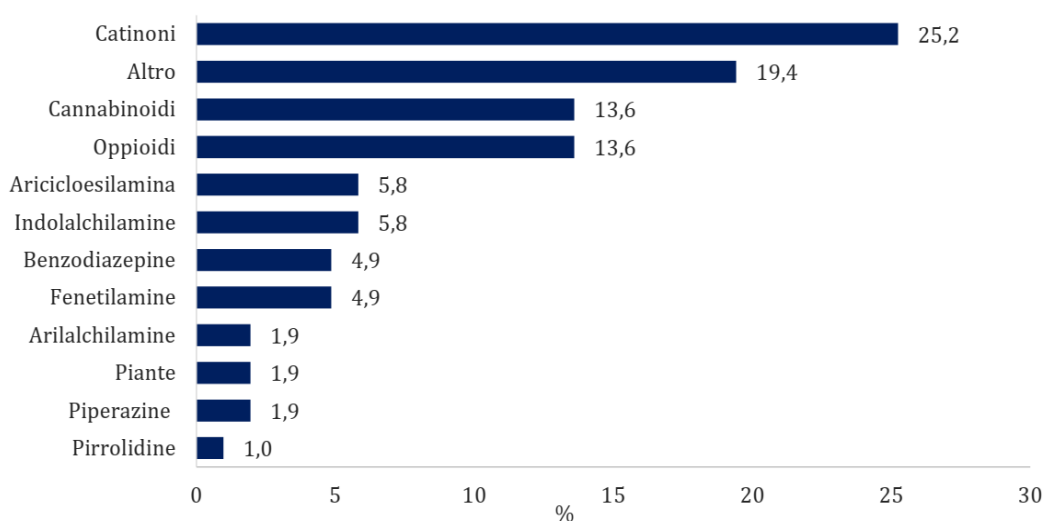


Figura 7: Prevalenza percentuale delle NPS segnalate allo SNAP; fonte: Istituto Superiore di Sanità, anno 2019

Le organizzazioni partner dello SNAP hanno elaborato 15 comunicazioni informative riguardanti 37 NPS circolanti nel territorio Nazionale, 13 comunicazioni sono state ricevute da parte dell'EMCDDA inerenti a 59 sostanze appartenenti soprattutto alle classi di catinoni, cannabinoidi sintetici, 11 allerte sono state inviate dallo SNAP relative a 20 molecole appartenenti alle classi sopracitate, 19 report sono stati inviati all'EMCDDA riguardanti sostanze individuate per la prima volta in Italia o a seguito di sequestri, intossicazioni e/o decessi e 2 report riassuntivi sull'attività svolta sul territorio

nazionale, che indicano tutte le 32 NPS circolanti in Italia. Tutti i dati sono stati riportati nel 2020, riferiti all'anno 2019.[22] In figura 8 è riportato il numero di centri collaborati in Italia nel 2021.

REGIONE	n. Centri collaborativi
LOMBARDIA	40
EMILIA ROMAGNA	28
VENETO	23
LAZIO	21
PUGLIA	19
TOSCANA	18
PIEMONTE	17
MARCHE	17
CAMPANIA	17
SICILIA	16
LIGURIA	10
UMBRIA	8
TRENTINO ALTO-ADIGE	6
ABRUZZO	6
CALABRIA	5
SARDEGNA	4
VALLE D'AOSTA	3
FRIULI VENEZIA GIULIA	3
BASILICATA	2
MOLISE	1

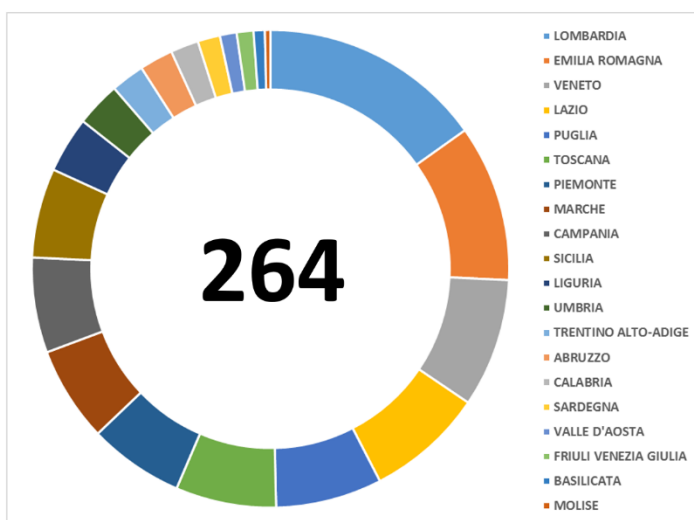


Figura 8 Numero dei centri collaborativi in Italia. Fonte: Istituto Superiore di Sanità, anno 2021

Capitolo secondo

2 CLASSI DI NUOVE SOSTANZE PSICOATTIVE:

2.1 I catinoni sintetici

I catinoni sintetici rappresentano il secondo gruppo maggiormente presente sul mercato di NPS spesso venduto nei mercati clandestini con il nome di sali da bagno, fertilizzanti o prodotti di ricerca chimica o con nomi di fantasia come Miaow, Fert, Bubbles. [16] La loro diffusione è dovuta al fatto che al momento dell'immissione sul mercato rappresentavano l'alternativa legale ad altre sostanze stimolanti illegali, come ad esempio amfetamina e cocaina [24].

Queste sostanze sono state inizialmente sviluppate per modifica chimica della molecola del catinone, un alcaloide naturale presente in *Catha Edulis* Forsk[29,30]. Tradizionalmente le foglie di Khat venivano masticate per via dei suoi effetti psicoattivi in regioni quali Corno d'Africa, Yemen e il sud est della Penisola Arabica.[31]

L' incredibile aumento di intossicazioni acute e morti associate al consumo di catinoni sintetici (in combinazione anche ad altre NPS) ha destato l'attenzione degli organi politici che hanno provveduto alla loro inclusione all'interno delle Tabelle delle Sostanze Controllate dalla Convenzione sulle Sostanze Psicoattive del 1971. Tra queste, mefedrone, metilone e metilendiossiprovalerone sono state inserite nel 2015; α -pirrolidinovalerone

(α -PVP) è stato incluso nel 2016; 4'-metil-N-etilecatinone, pentedrone e etilone nel 2017, epilone nel 2019. Più di recente, sono stati inseriti il 4'-clorometcatinone, N-etilexedrone e α -pirrolidinoesanofenone nel 2020.[32][29]

I catinoni possono essere considerati dei β -cheto analoghi delle amfetamine con le quali condividono la struttura ad eccezione di un gruppo funzionale chetonico in posizione α della catena alchilica laterale del catinone (Figura 9).[33]

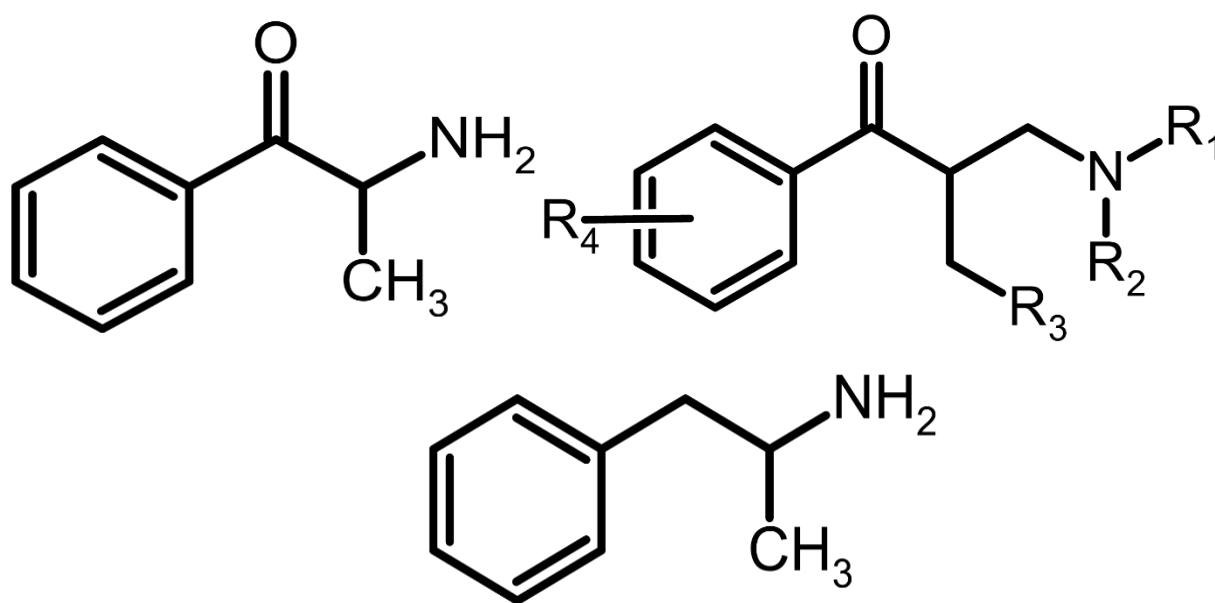


Figura 9 Confronto della struttura di un catinone naturale (a sinistra), un catinone sintetico (a destra) e un'amfetamina (in basso)

Numerose sono infatti le modificazioni strutturali che hanno portato alla formazione di un ampio numero di catinoni sintetici.[29]

Le principali modificazioni riscontrate sono a livello dell'anello aromatico (Figura 9, R₄) con aggiunta di gruppi alogeni (fluoro, bromo, cloro) o metilendiossi derivati, variazioni a livello della catena alchilica in α (Figura 9, R₃), e modifiche a livello dei sostituenti amminici formando varie sottoclassi di N-derivati (metile, etile, pirrolidina..).[29,34]

Tali modificazioni permettono la classificazione dei catinoni sintetici in 4 gruppi principali:

- Catinoni sintetici N-alchilati con o senza sostituenti nell'anello aromatico. A questo gruppo appartiene etcatinone, efedrone, mefredone, 3,4'-metilmetcatinone.
- Catinoni sintetici N-pirrolidinici con sostituenti nell'anello aromatico. Questo gruppo include i pirovaleroni, α -PVP etc.
- Catinoni 3,4'-metilendiossi-N-alchilati. Alcuni esempi sono metilone, etilone, butilone e pentilone..
- Catinoni 3,4'-metilendiossi-N-pirrolidinici, i quali possiedono sia la frazione 3,4'-metilediossi che quella pirrolidinica.[34]

I catinoni sintetici agiscono come stimolanti del sistema nervoso centrale attraverso un'interazione selettiva a livello cerebrale con i trasportatori della

dopamina (DAT), serotonina (SERT) e noradrenalina (NET) provocando un'inibizione della ricaptazione dei neurotrasmettitori e conseguente aumento di quest'ultimi. Grazie alla loro analogie strutturali, i catinoni sintetici producono una serie di effetti farmacologici simili a quelle delle amfetamine e metanfetamine, quali ad esempio agitazione tachicardia, ipertensione, perdita di coscienza e allucinazioni.[24,29,35,36].

Particolare attenzione hanno richiamato i catinoni sintetici pirrolidin-derivati che possiedono una maggiore affinità per i DAT rispetto ad altre modificazioni strutturali della frazione amminica come nel caso degli α -pivaleroni, la cui azione inibitoria verso i DAT è 10 volte superiore a quella della cocaina, provocando quindi un maggior effetto farmacologico e potenziale di abuso.

Secondo quanto riportato dal World Drug Report 2021, mefedrone e α -PVP rappresentano le due sostanze più trafficate, arrivando a ricoprire il 30% rispetto a tutte le vendite del dark web, nel 2020. [18]

Tra il 2017 e il 2020, sono stati riportati circa 150 casi di morte relativi al consumo di catinoni sintetici, sia da soli che in combinazione con altre droghe. Inoltre, 3-fluoro- α -pirrolidinopentiofenone (3F- α -PVP), un analogo fluorurato dell' α -PVP ha rappresentato il maggior numero di morti correlate a catinoni sintetici in Svezia, nel 2018. [29].

Considerando quindi i differenti effetti farmacologici scaturiti da piccole modificazioni strutturali, lo studio del pattern metabolico di questa classe di NPS risulta essere fondamentale non solo per la rapida identificazione di biomarker specifici di consumo delle differenti classi di cationi sintetici ma anche per caratterizzare il profilo farmacocinetico e i potenziali effetti avversi. [29,32,34,37–39]

Ad oggi, il profilo metabolico di alcuni pirrolidinofenoni tra cui α -PHP, 4F- α -PVP, 4Cl-PVP, PV8, 4-metossi- α -PVP, MDPV, α -PVP, α -pirrolidinbutilfenoni è già stato caratterizzato.[34,37–40]

Ciò nonostante, a causa quindi dell'elevato numero di cationi che appaiono sul mercato, il metabolismo di questi ultimi più recentemente riportati rimane sconosciuto, rappresentando quindi una notevole difficoltà per le autorità che hanno lo scopo di attuare misure di contrasto adeguate, attraverso specifici metodi analitici per la quantificazione e identificazione della NPS e i suoi metaboliti in fluidi biologici.[32]

3 STUDIO DEL METABOLISMO DEL 3F- α -PVP

3.1 L'obiettivo dello studio

Considerata, quindi la cruciale importanza nell'individuazione di marker di esposizione, è stato studiato il profilo metabolico del 3F- α -PVP.

Ad oggi, è stata sviluppata una vasta gamma di metodi sperimentali ed *in silico* per lo studio del metabolismo attraverso differenti approcci, i quali se utilizzati separatamente si focalizzano esclusivamente su aspetti specifici del metabolismo trascurandone altri. [41]

Il metodo applicato ed implementato in questo studio è stato recentemente sviluppato per la valutazione del profilo metabolico di un analogo del fentanyl, il β -fenilfentanyl. Il protocollo prevedeva l'incubazione della droga d'interesse in epatociti umani, l'analisi con cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione (LC-HRMS/MS), seguito da una fase di analisi ed elaborazione dei dati strumentali attraverso un software specializzato. L'innovatività del metodo è il duplice approccio targeted/untargeted, accompagnato da una predizione *in silico* dei metaboliti.[42] Quest'ultima si è rivelata un ottimo strumento per la predizione del destino metabolico delle sostanze, la quale combinata con la fase *in vitro* permette di ottenere una visione più completa del processo metabolico,

aumentare il numero dei metaboliti individuati, ma soprattutto di risparmiare tempo e risorse in questo tipo di esperimenti. È importante quindi comprendere il potenziale di entrambi le fasi *in vitro* ed *in silico*. [41]

In questo contesto, è stato sviluppato un approccio multiplo della predizione *in silico* per l'implementazione del collaudato protocollo sperimentale, basandosi sull'utilizzo di 3 software con architettura e concettualizzazione differenti, con l'obiettivo di valutare l'applicabilità allo studio *in vitro* del metabolismo delle 3F- α -PVP.

Pertanto, lo studio del metabolismo del 3F- α -PVP è stato condotto attraverso l'incubazione di epatociti umani, l'analisi strumentale con LC-HRMS e l'analisi dei dati attraverso uno specifico workflow con l'obiettivo di individuare un possibile marker di consumo.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Sostanze chimiche e reagenti

Gli standard puri di 3F- α -PVP e diclofenac sono stati ottenuti rispettivamente da Cayman Chemical (Ann Harbor, MI, USA) e Sigma Aldrich (Milano, Italia). Metanolo (di grado analitico LC-MS), acetonitrile, acqua e acido formico (di grado analitico LC-MS) sono stati acquistati dall'azienda Carlo Erba (Cornaredo, Italia).

La soluzione metanolica standard è stata preparata a partire dalla sostanza in polvere ad una concentrazione finale di 1mg/ml e mantenuta a -20°C fino al giorno dell'analisi.

I seguenti reagenti per l'incubazione sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich: William's Medium E (WME), tampone buffer (acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinil-etansolfonico) e L-glutamina. Il WME è stato aggiunto di HEPES e L-glutamina a una rispettiva concentrazione di 2 e 20mmol/L(SWME). Le soluzioni, precedentemente preparate, sono state mantenute a 4°C fino al giorno dell'incubazione.

Il mezzo per lo scongelamento, il colorante Tripan blue allo 0,4% e un pool di epatociti umani criopreservati (HEP) sono stati ottenuti da Lonza (Basel, Svizzera).

4.2 Incubazione del 3F- α -PVP con epatociti

Secondo il protocollo, l'incubazione con la NPS d'interesse è stata fatta in contemporanea all'incubazione di diclofenac, utilizzato come controllo positivo [42]. In aggiunta due controlli negativi sono stati impiegati per escludere eventuali reazioni non metaboliche.

Il protocollo prevedeva le seguenti fasi: gli epatociti sono stati scongelati in un bagno termostatico ad acqua a 37°C per circa 90-120 sec e sono stati versati

delicatamente in una provetta di polipropilene conica da 50 mL contenente il mezzo per lo scongelamento. Quindi, le cellule sono state centrifugate per 5 minuti a 50-100 g a temperatura ambiente e il surnatante è stato eliminato e le cellule sono state risospese in 50 mL di SWME.

Una seconda centrifugazione è stata effettuata e le cellule sono state risospese in 2 mL di SWME, procedendo quindi con la conta cellulare secondo il metodo di colorazione per esclusione con il Tripan blue. Sulla base della vitalità delle cellule è stato aggiunto un volume adeguato di SWME per raggiungere una concentrazione di 2×10^6 cellule vitali/mL.

Successivamente, sono stati aggiunti 250 μ l di 3F- α -PVP metanolico a 250 μ l di sospensione contenente gli epatociti per procedere con l'incubazione.

Per effettuare l'incubazione è stato quindi utilizzato un incubatore (Argo Lab, Capri Italia) a 37° e successivamente la reazione è stata interrotta dopo 0h e 3h con l'aggiunta di 500 μ l di acetonitrile.

Terminata l'incubazione, l'attività metabolica è stata valutata attraverso la formazione in vitro dei due metaboliti caratteristici del diclofenac (4'-idrossidiclofenac e diclofenac acil- β -D-glucuronato).

4.3 Preparazione dei campioni

La preparazione del campione contenente gli epatociti incubati con le sostanze d'interesse è stata effettuata attraverso l'aggiunta di 100 μ l di acetonitrile seguita da una doppia centrifugazione a temperatura ambiente a 15,000 g per 10 minuti.

Successivamente il soprannatante è stato portato a secco a 37° sotto flusso di azoto e ricostituito con una miscela di fase mobile A e fase mobile B (MPA: MPB 8:2 v/v). Infine, dopo aver trasferito la miscela in una vial, 10 μ l di campione sono stati iniettati nel sistema cromatografico.

4.4 Condizioni strumentali

Le analisi strumentali sono state effettuate con un DIONEX UltiMate 3000 cromatografo liquido accoppiato a un Q-Exactive Classic quadrupolo-Orbitrap accoppiato a spettrometria di massa ad alta risoluzione con sorgente di ionizzazione elettrospray riscaldata (HESI) della Thermo Scientific (Waltham, MA, USA).

4.4.1 Condizioni cromatografiche

Una colonna cromatografica bifenilica Kinetex (120x2.1 mm, 2 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA) è stata utilizzata per la separazione cromatografica del 3F- α -PVP e dei suoi metaboliti. La fase mobile A era composta da 0.1% di acido formico in acqua (MPA) e fase mobile B composta da 0,1% acido formico in acetonitrile (MPB) ad un flusso di 0.4 mL/min. Il gradiente cromatografico è riportato in figura 10, i dettagli delle composizioni delle fasi mobili nel gradiente cromatografico in figura 11

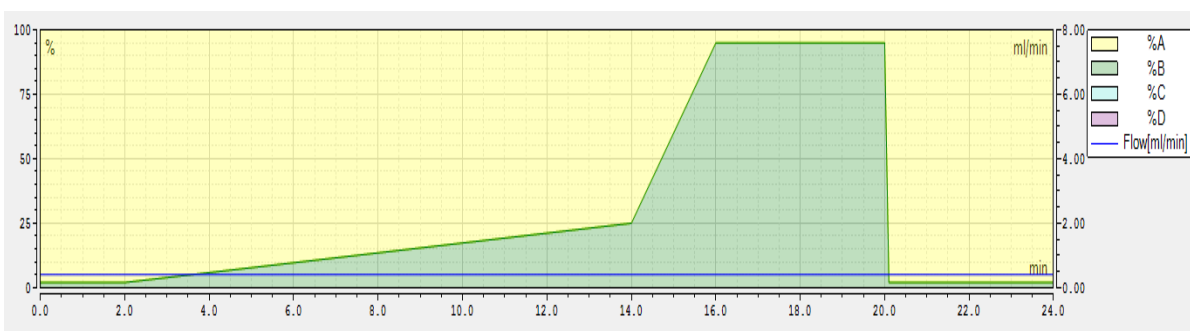


Figura 10: Gradiente cromatografico

La colonna è stata mantenuta a $37\pm 1^\circ\text{C}$, mentre l'autocampionatore a $10\pm 1^\circ\text{C}$.

No	Time	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
1	0.000					Run
2	0.000	0.400	2.0	0.0	0.0	5
3	2.000	0.400	2.0	0.0	0.0	5
4	14.000	0.400	25.0	0.0	0.0	5
5	16.000	0.400	95.0	0.0	0.0	5
6	20.000	0.400	95.0	0.0	0.0	5
7	20.100	0.400	2.0	0.0	0.0	5
8	24.000	0.400	2.0	0.0	0.0	5
9	New Row					
10	24.000					Stop Run

Figura 11: Dettaglio della composizione delle fasi mobili nel gradiente cromatografico

4.4.2 Condizioni spettrometro di massa

Tutti i campioni sono stati analizzati sia in modalità di ionizzazione negativa che in modalità di ionizzazione positiva con le seguenti impostazioni della sorgente di ionizzazione (HESI):

- Voltaggio dello spray: 3.5 kV
- Flusso sheat gas: 50 a.u
- Flusso gas ausiliare: 10 a.u.;
- Temperatura del capillare: 300°C
- Temperatura del sistema di riscaldamento del gas ausiliare :300°C.
- Livello di radio frequenza della lente S-lente a 50 a.u.;

La calibrazione è stata effettuata attraverso l'uso di una soluzione calibrante certificata prima dell'analisi strumentale dei campioni, sia modalità di ionizzazione positiva che negativa. Inoltre, al fine di raggiungere una maggior accuratezza sono state impostate le seguenti "lock masses" per la modalità positiva: m/z 279.0933, 144.9821, 146.9803 e per la modalità negativa: m/z 265.1479, 162.9824, 248.9604.

Lo spettrometro di massa è stato impostato per un acquisizione dal minuto 1 al minuto 20 della corsa cromatografica in modalità full-scan HRMS (FullMS)/data dependent MS/MS(ddMS²), dalla massa m/z 100 a m/z 650 con una risoluzione di 70,000 all'ampiezza a mezza altezza del picco alla massa m/z

200, mentre l'automatic gain control target(AGC) era 1×10^6 e il massimo tempo di iniezione(IT) è stato 200ms. I parametri della finestra di isolamento del ddMS² erano: ACG target 2×10^5 , IT massimo 64 ms, finestra di isolamento *m/z* 1.2 con una risoluzione di 17,500 ed un energia di collisione normalizzata a step (NCE) corrispondente a 40, 70, 90 a.u. Un massimo di 5 scansioni ddMS² sono state selezionate per ogni scansione FullMS scan, considerato come riferimento la lista d'inclusione dei possibili metaboliti in base ai risultati della predizione *in silico* e al confronto con i profili metabolici di cationi sintetici simili riportati in letteratura. (Sezione 3.5, Tabella 1)[25,32,37–39]

Gli ioni con un'intensità superiore a 10^4 , non inclusi nella lista sopracitata (Tabella 1), sono stati selezionati comunque dal ddMS² con un'esclusione dinamica di 2.0 sec. In aggiunta, è stata sviluppata anche una lista di esclusione basata sulle masse più rilevanti presenti ad un'elevata intensità, selezionate durante l'iniezione del campione bianco di controllo (MPA: MPB 80:20 v/v%).

Trasformazione metabolica	Formula Molecolare	[M+H]⁺ (<i>m/z</i>)	[M-H]⁻ (<i>m/z</i>)
PARENT (3F-α-PVP)	C₁₅H₂₀FNO	250.1602	248.1456
+2H	C₁₅H₂₂FNO	252.1758	250.1613

+O	$C_{15}H_{20}FNO_2$	266.1551	264.1405
+2O	$C_{15}H_{20}FNO_3$	282.1500	280.1354
-2H +O	$C_{15}H_{18}FNO_2$	264.1394	262.1249
-2H +2O	$C_{15}H_{18}FNO_3$	280.1343	278.1198
-2H	$C_{15}H_{18}FNO$	248.1445	246.1300
+2H +O	$C_{15}H_{22}FNO_2$	268.1707	266.1562
+2H +2O	$C_{15}H_{22}FNO_3$	284.1656	282.1511
+C +2H	$C_{16}H_{22}FNO$	264.1758	262.1613
+6C +10H +6O	$C_{21}H_{30}FNO_7$	428.2079	426.1934
+2H +3O +S	$C_{15}H_{22}FNO_4S$	332.1326	330.1181
+3O	$C_{15}H_{20}FNO_4$	298.1449	296.1304
-2H +3O	$C_{15}H_{18}FNO_4$	296.1293	294.1147
-F +H +O	$C_{15}H_{21}NO_2$	248.1645	246.1499
-F +H	$C_{15}H_{21}NO$	232.1696	230.1550
+2C +3H +N +O	$C_{17}H_{23}FN_2O_2$	307.1816	305.1671
+2C +N +O	$C_{17}H_{20}FN_2O_2+$	303.1503	-
+3C +5H +N +O	$C_{18}H_{25}FN_2O_2$	321.1973	319.1827
+3C +2H +N +O	$C_{18}H_{22}FN_2O_2+$	317.1660	-
+2C +H +N +3O	$C_{17}H_{21}FN_2O_4$	337.1558	335.1413
+3C +3H +N +3O	$C_{18}H_{23}FN_2O_4$	351.1715	349.1569

-8C -15H -N	C_7H_5FO	125.0397	123.0252
-7C -5H -F -O	$C_8H_{15}N$	126.1277	124.1132
-4C -7H -N +O	$C_{11}H_{13}FO_2$	197.0972	195.0827
+6C +8H +7O	$C_{21}H_{28}FNO_8$	442.1872	440.1726
+4O +S	$C_{15}H_{20}FNO_5S$	346.1119	344.0973
+C +2H +O	$C_{16}H_{22}FNO_2$	280.1707	278.1562
-F +H +2O	$C_{15}H_{21}NO_3$	264.1594	262.1449
-4H +2O	$C_{15}H_{16}FNO_3$	278.1187	276.1041
-4C -7H -N +2O	$C_{11}H_{13}FO_3$	213.0921	211.0776
-4C -6H	$C_{11}H_{14}FNO$	196.1132	194.0987
+C +2H +2O	$C_{16}H_{22}FNO_3$	296.1656	294.1511
-F +6C +9H +7O	$C_{21}H_{29}NO_8$	424.1966	422.1820
-F +H +4O +S	$C_{15}H_{21}NO_5S$	328.1213	326.1068
+2H +4O +S	$C_{15}H_{22}FNO_5S$	348.1275	346.1130
+6C +9H +6O	$C_{21}H_{29}FNO_7+$	426.1923	-
+2H +2O	$C_{15}H_{22}FNO_3$	284.1656	282.1511
+10C +17H +3N +7O +S	$C_{25}H_{37}FN_4O_8S$	573.2389	571.2243
+2C +4H	$C_{17}H_{24}FNO$	278.1915	276.1769
+2C +4H +O	$C_{17}H_{24}FNO_2$	294.1864	292.1718

Tabella 1. Lista d' inclusione per il ddMS²

4.4.3 *Predizione in silico dei metaboliti*

La fase di predizione *in silico* del 3F- α -PVP è stata condotta utilizzando 3 differenti software gratuiti disponibili online:

- BioTransformer [43]
- GloryX [44,45]
- EAWAG-PPS Pathway Prediction System [46].

BioTransformer(versione 1.0.0) è un software di predizione del metabolismo adatto a piccole molecole; utilizza un approccio basato su conoscenza acquisita e sul machine-learning, disponibile gratuitamente su <https://bitbucket.org/djoumbou/biotransformerjar> [43].

Il software consente la scelta fra due differenti opzioni “predizione del metabolismo” e “identificazione dei metaboliti”, le quali indicano rispettivamente la predizione delle trasformazioni metaboliche a partire da un dato composto o dei possibili metaboliti.

In aggiunta, il metabolismo poteva essere predetto sulla base di 7 ulteriori opzioni: “CYP450”, “EC-BASED”, “Phase II”, “Gut Microbial” and “Environmental Microbial”, “All human” e “SuperBio”. Queste ultime due opzioni consentono un’esaustiva copertura del metabolismo nell’organismo

umano. La molecola prescelta può essere inserita sia come codice SMILES sia come file SDF.

Il codice SMILES del 3F- α -PVP è stato generato attraverso il programma ChemSketch (versione freeware 2.1); le opzioni “predizione del metabolismo” e “All Human” sono state selezionate come più adeguate al nostro studio per garantire una predizione più approfondita del profilo metabolico della molecola [43].

GloryX è uno strumento per la scoperta di nuovi farmaci (NEERD), presente su un portale web che permette la predizione dei siti del metabolismo (FAME) e metaboliti (GLORY), disponibile gratuitamente su <https://nerdd.zbh.uni-hamburg.de/> [44,45].

Questo strumento è una piattaforma in machine learning automatico che permette la predizione del metabolismo. Lo strumento web integra la predizione del metabolismo basato sul machine-learning, definendo una classifica della struttura dei metaboliti di fase I e fase II.

La molecola d'interesse può essere inserita sia come codice SMILES o attraverso un plug-in fornito dal sito web. È possibile scegliere fra due opzioni per la predizione del metabolismo: trasformazioni di “Fase I” o di “Fase II”, considerate insieme o separatamente. Ad ogni metabolita di fase I o fase II predetto viene assegnato uno score che considera la probabilità che ogni

reazione metabolica può accadere in quel sito molecolare specifico, sulla base delle regole del software. [44,45]

Tra i metaboliti predetti, quelli con uno score superiore a 0.30 sono stati nuovamente inseriti per ottenere la seconda generazione di metaboliti considerando in questo caso uno score combinato superiore a 0.25.

Infine, EAWAG-Pathway Prediction System (EAWAG-PPS) è uno strumento gratuito disponibile su <https://eawag-bbd.ethz.ch/index.html>. Questo software consente la predizione verosimile della degradazione microbica di un composto chimico.

EAWAG-PPS si basa su una libreria di trasformazioni metaboliche presente all'interno di un database (EAWAG-BBD) [46].

Ciò nonostante, nel totale delle reazioni metaboliche considerate sono incluse anche comuni reazioni metaboliche.

Il software predice le trasformazioni sulla base di regole riportate sul database delle reazioni di biocatalisi/biodegradazione di EAWAG e sulla mappatura “atom-to-atom” [46].

Attraverso il plugin Chemaxon's MarvinSketch Java applets fornito dallo strumento è possibile sia generare il codice SMILES dopo aver disegnato la struttura o scrivendolo direttamente. Per il nostro scopo sono state selezionate le seguenti opzioni: “tutte le reazioni”, 3 livelli, 20 prodotti di reazione in un

livello con 3+C' atomi. Infine, viene definito uno score come trasformazione probabile, molto probabile o neutrale sulla base della verosimiglianza aerobica.

4.4.4 Analisi ed elaborazione dei dati

L'analisi dei dati è stata effettuata attraverso il software Compound Discover (CD) (Thermo Scientific, version 3.2.0.421), applicando un workflow precedentemente sviluppato con piccole modificazioni per adattarlo alle nostre condizioni[42].

I dati grezzi sono stati quindi processati in base a un workflow composto da diversi nodi, con un duplice approccio targeted/untargeted.

La prima fase consiste nel processamento degli spettri, selezione e allineamento dei tempi di ritenzione e rilevamento dei composti attesi e non attesi. Il nodo di rilevamento dei composti attesi consente l'individuazione dei possibili metaboliti generati dalle reazioni di fase I e fase II previste, e la loro combinazione (Tabella 2)

Reazioni di fase I	Disidratazione ($-H_2 + O \rightarrow$) Desaturazione ($-2H \rightarrow$) Formazione di diidrodiole ($\rightarrow +H_2 + O_2$) Idratazione ($\rightarrow +H_2 + O$) <u>Ossidazione</u> ($\rightarrow +O$) Dealogenazione ossidativa ($-F \rightarrow + H + O$) Riduzione ($\rightarrow -2H$) Dealogenazione riduttiva ($-F \rightarrow + H$)
Reazioni di fase II	Acetilazione ($-H \rightarrow +C_2 +H_3 +O$) Coniugazione con glucuronide ($-H \rightarrow +C_6 +H_9 +O_6$) Coniugazione con glicina ($-H -O \rightarrow +C_2 +H_4 + N +O_2$) Coniugazione con GSH su fluoro ($-F \rightarrow +C_{10} +H_{16} +3N +O_6 +S$) Coniugazione con GSH 2 ($\rightarrow + C_{10} +H_{17} +N_3 +O_6 +S$) Metilazione ($-H \rightarrow +C +H_3$) Solfatazione ($-H \rightarrow +H +O_3 +S$)
# Max Dealchilazioni	3
# Max Fase I	2
# Max Fase I e II	5
Ioni	$[M+H]^+1, [M-H]^-1$

Tabella 2: Parametri di impostazione di Compound Discoverer per la generazione della lista di probabili metaboliti di 3F- α -PVP

I metaboliti di fase I e fase II individuati come più rilevanti sono stati inseriti nella lista di inclusione (Tabella 1), in base anche alla predizione *in silico* e alla letteratura[2,3,32,37–39].

Infine, i metaboliti rilevanti sono stati raggruppati e comparati con le librerie mzCloud, ChemSpider and HighResNPS.

Il nodo dei composti non attesi consente il rilevamento dei composti con una composizione elementare compresa in un range fra CH e C₉₀H₁₉₀BR₃CL₄K₂N₁₀NA₂O₁₈P₃S₅. In aggiunta, parametri avanzati hanno incluso i seguenti addotti: [M+FA-H]⁻, [M+H]⁺, [M+Na]⁺, [M+K]⁺, [M+NH₃]⁺, [M+H-H₂O]⁺, [M-H-H₂O]⁻, [M-H]⁻, [M+Cl]⁻, [M-H]⁻ and [M+HCOOH], [M+NH₄]⁺. Gli ioni [M+H]⁺ and [M-H]⁻ sono stati usati come ioni base.

Successivamente gli spettri del ddMS² e le formule molecolari risultanti sono state comparate con le librerie online sopra citate.

Infine, la lista dei composti è stata filtrata per escludere risultati ridondanti e successivamente selezionati manualmente dall'operatore.

5 *RISULTATI E DISCUSSIONE*

5.1 *Software di predizione in silico*

Recentemente, i metodi di predizione *in silico* hanno destato una particolare attenzione nell'ambito della descrizione dettagliata delle vie metaboliche come potente strumento per integrare gli esperimenti *in vitro* già consolidati[41,47]. Precisamente, il maggior vantaggio di questa metodologia è rappresentato dalla riduzione dei costi e del tempo richiesto per lo svolgimento degli esperimenti di farmacocinetica di molecole non ancora caratterizzata.

Tuttavia, il campo della predizione *in silico* del metabolismo rappresenta un campo ancora emergente della ricerca relativa al metabolismo delle sostanze, la quale combinata agli esperimenti *in vitro* e ad analisi strumentali avanzate consente una completa caratterizzazione metabolica e identificazione di specifici metaboliti. [41]

Ad oggi, esistono un'ampia varietà di strumenti computazionali basati su differenti approcci sviluppati per la predizione del metabolismo di farmaci, sia in versione gratuita che in versione commerciale.[12,41,48,49]

Benchè, uno specifico software per la predizione *in silico* del profilo metabolico delle NPS non sia ancora stato sviluppato, alcuni software commerciali hanno raggiunto risultati soddisfacenti nella caratterizzazione dei processi metabolici di differenti catinoni sintetici. [38]

I 3 software online gratuiti GloryX, BioTransformer e EAWAG-PPS sono stati individuati come più adeguati ad una rapida, chiara ed esaustiva caratterizzazione metabolica del 3F- α -PVP, vista la loro applicazione anche in altri studi di MetID e per la predizione di reazioni di biodegradazione/biotrasformazione di altre NPS. [42,43,50–53]

Uno studio, inoltre, ha dimostrato che BioTransformer riportava risultati soddisfacenti e coerenti con EAWAG-PPS per la predizione della degradazione ambientale di farmaci e pesticidi in acque reflue. [53]

In totale, 57 metaboliti di fase I e fase II sono stati predetti con l'utilizzo dei 3 software di predizione *in silico* (Tabella 3)

Per la prima generazione dei metaboliti EAWAG-PPS, GloryX e BioTransformer hanno predetto rispettivamente 3, 7 e 15 metaboliti. Per la seconda generazione EAWAG-PPS ha predetto 4 metaboliti e 24 metaboliti sono stati predetti da GloryX. Inoltre, GloryX ha predetto 9 metaboliti di fase II non predetti dagli altri software.

Benchè nessuno dei metaboliti sia stato predetto da tutti e 3 i software, una buona parte è stata predetta da almeno 2 software.

In particolare, le principali trasformazioni descritte da almeno 2 software sono state le seguenti: N-dealchilazione (EAWAG-PPS, BioTransformer), idrossilazione sulla frazione pirrolidinica, in posizione β - e α - nella catena

alchilica (GloryX, BioTransformer), β -keto riduzione (GloryX, BioTransformer) e idrossilazione aromatica in posizione meta e para (GloryX e BioTransformer).

Le principali trasformazioni predette individualmente da EAWAG-PPS sono state N-dealchilazione ossidativa, idrossilazione, ossidazione e β -keto riduzione.

GloryX è stato l'unico software ad aver predetto glucuronazione e solfatazione come possibili trasformazioni metaboliche di fase II. BioTransformer ha predetto altre reazioni di idrossilazione, epossidazione e saturazione.

Inaspettatamente, EAWAG-PPS e BioTransformer hanno riportato risultati non completamente compatibili nonostante quanto riportato precedentemente [43,53], mostrando una sovrapposizione dei metaboliti di prima generazione pari al 66%. Inoltre, BioTransformer ha predetto 12 metaboliti in più rispetto a EAWAG-PPS.

EAWAG-PPS fornisce un codice della regola metabolitca che definisce il tipo di reazione considerata e BioTransformer fornisce una descrizione dettagliata della trasformazione e la tipologia di CYP coinvolta.

È importante notare che GloryX è stato il software che ha predetto il maggior numero di metaboliti incluse biotrasformazioni non inserite all'interno della lista d'inclusione, sulla base del punteggio applicato al nostro studio.

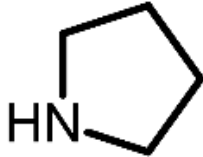
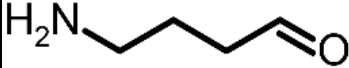
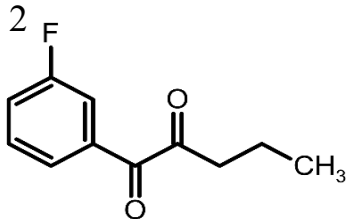
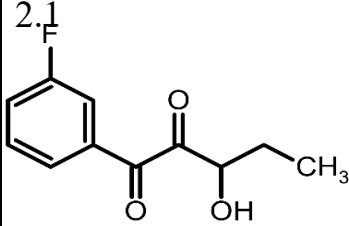
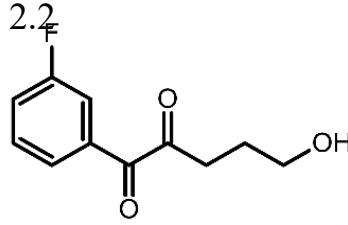
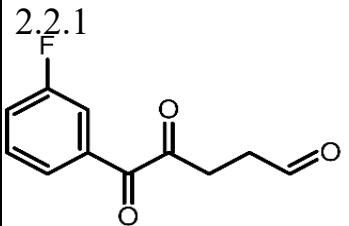
GloryX e EAWAG-PPS non hanno alcun metabolita in comune. Su 39 metaboliti predetti da GloryX, solo 6 metaboliti sono stati predetti anche da BioTransformer.

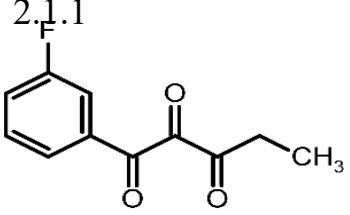
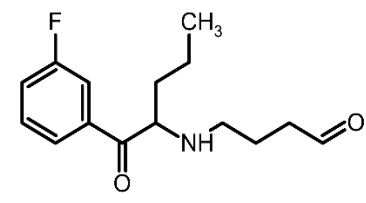
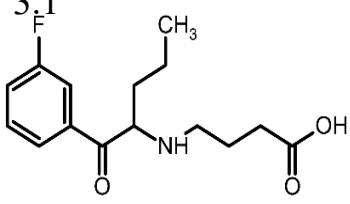
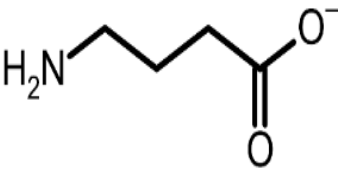
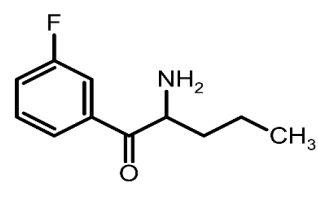
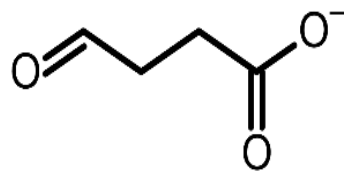
Considerando studi *in vitro* precedenti sui pirovaleroni, si nota come le trasformazioni più frequenti siano idrossilazione, β keto-riduzione, ossidazione e N-dealchilazione[37–39]

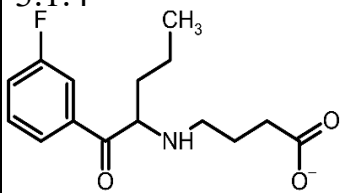
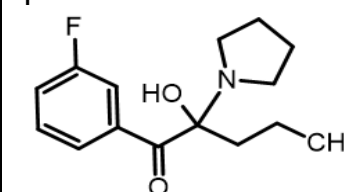
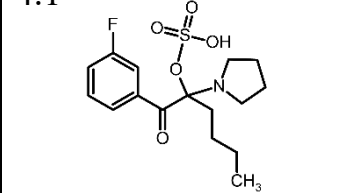
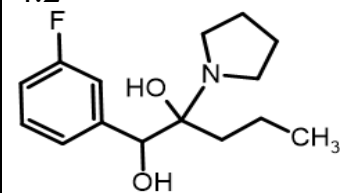
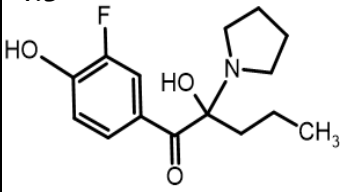
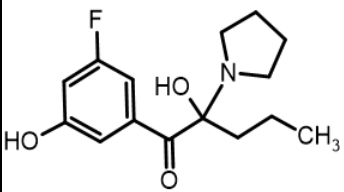
Su un totale di 11 metaboliti identificati, 6 metaboliti (M4, M6, M7, M8, M10, M11) sono stati predetti dai software di predizione *in silico*, dimostrando che specifici sistemi di predizione *in silico* per le NPS dovrebbero essere sviluppati per la caratterizzazione del metabolismo di queste nuove sostanze psicoattive.

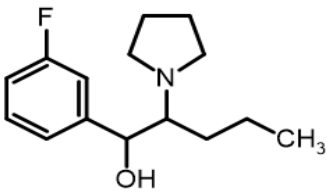
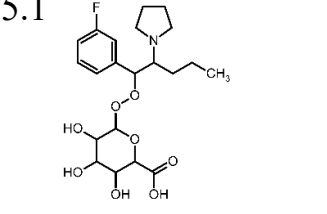
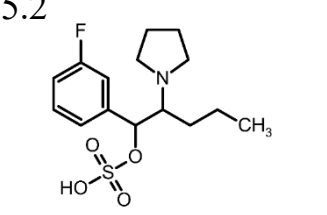
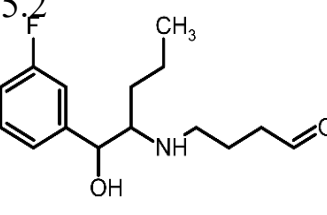
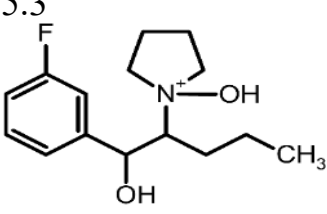
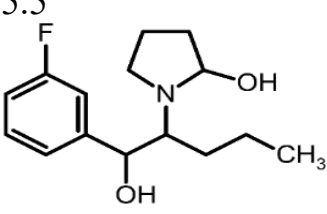
Però, è interessante notare che i metaboliti più abbondanti e il metabolita più caratteristico siano stati predetti da EAWAG-PPS(M7), GloryX e BioTransformer(M8).

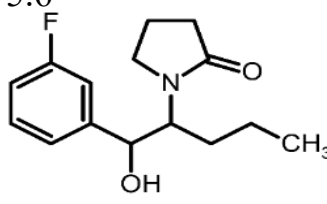
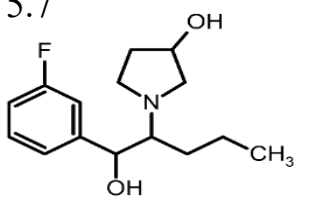
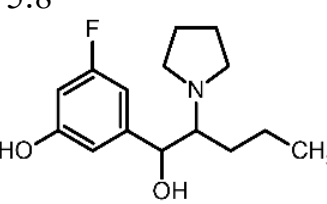
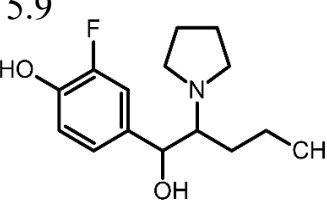
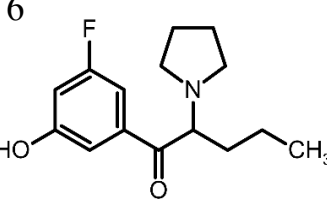
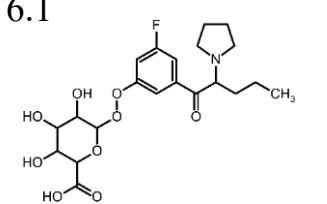
Inoltre, una ricerca in letteratura è stata condotta per validare i risultati *in silico* e includere reazioni inaspettate nella lista d'inclusione (Tabella 1). Le reazioni aggiuntive considerate nello screening mirato presenti nella lista erano le seguenti: coniugazione con glicina e alanina, dealogenazione, dealogenazione ossidativa, formazione del diidrodiole e coniugazione con GSH. [37,54,55]

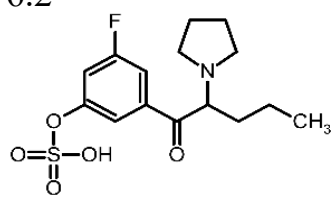
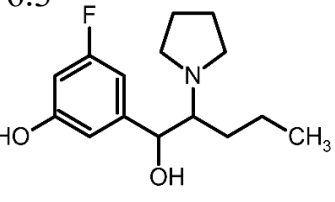
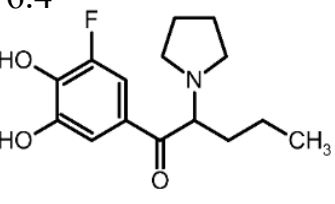
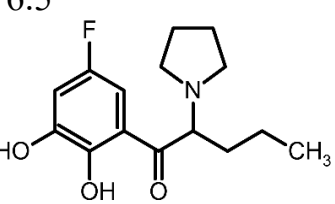
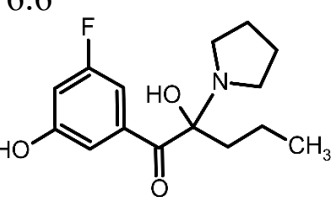
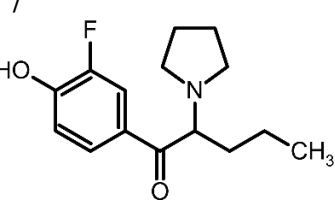
Struttura Molecolare	Trasformazione Metabolica	Software di predizione	di Score
1 	<i>N-Dealchilazione</i>	EAWAG-PPS GloryX BioTransformer	<i>Probabile</i> <i>N.A.</i> <i>Predetto</i>
1.2 	<i>Apertura dell'anello, ossidazione</i>	EAWAG-PPS GloryX BioTransformer	<i>Probabile</i> <i>N.A.</i> <i>N.A.</i>
2 	<i>N-Dealchilazione</i>	EAWAG-PPS GloryX BioTransformer	<i>Probabile</i> <i>N.A.</i> <i>Predetto</i>
2.1 	<i>Ossidrilazione</i>	EAWAG-PPS GloryX BioTransformer	<i>Neutrale</i> <i>N.A.</i> <i>N.A.</i>
2.2 	<i>w-Ossidrilazione</i>	EAWAG-PPS GloryX BioTransformer	<i>Neutrale</i> <i>N.A.</i> <i>N.A.</i>
2.2.1 	<i>Ossidazione</i>	EAWAG-PPS GloryX BioTransformer	<i>Probabile</i> <i>N.A.</i> <i>N.A.</i>

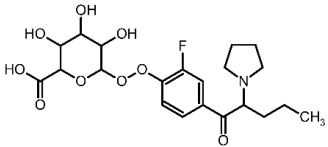
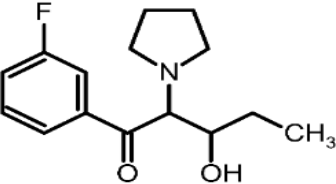
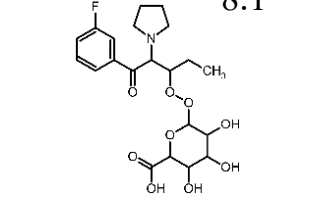
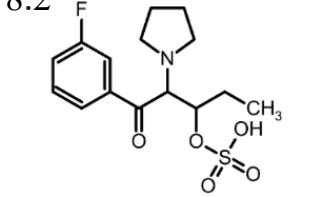
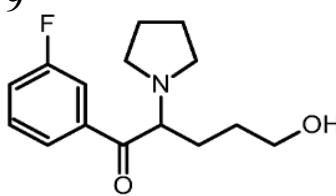
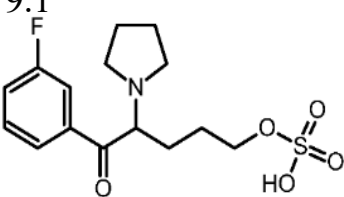
2.1.1 	<i>Ossidazione</i>	EAWAG-PPS GloryX BioTransformer	<i>Neutrale</i> <i>N.A.</i> <i>N.A.</i>
3 	<i>N-Dealchilazione</i> <i>ossidativa</i>	EAWAG-PPS GloryX BioTransformer	<i>Probabile</i> <i>N.A.</i> <i>N.A.</i>
3.1 	<i>Ossidazione</i>	EAWAG-PPS GloryX BioTransformer	<i>Probabile</i> <i>N.A.</i> <i>N.A.</i>
3.1.1 	<i>N-Dealchilazione/</i> <i>ossidazione</i>	EAWAG-PPS GloryX BioTransformer	<i>Probabile</i> <i>N.A.</i> <i>N.A.</i>
3.1.2 	<i>N-Dealchilazione</i>	EAWAG-PPS GloryX BioTransformer	<i>Probabile</i> <i>N.A.</i> <i>N.A.</i>
3.1.3 	<i>N-Dealchilazione</i> <i>ossidativa</i>	EAWAG-PPS GloryX BioTransformer	<i>Probabile</i> <i>N.A.</i> <i>N.A.</i>

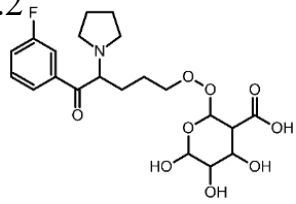
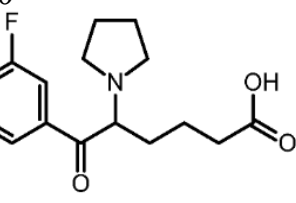
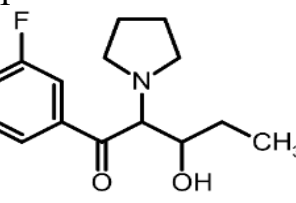
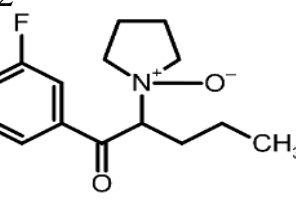
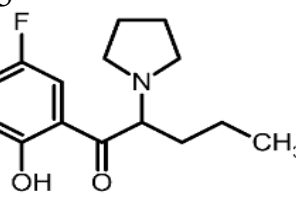
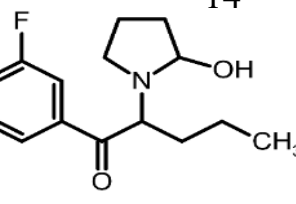
<p>3.1.4</p>  <p><i>N-Dealchilazione</i> <i>ossidativa</i></p>	<p>EAWAG-PPS <i>Probabile</i></p> <p>GloryX <i>N.A.</i></p> <p>BioTransformer <i>N.A.</i></p>
<p>4</p>  <p><i>Ossidrilazione</i></p>	<p>EAWAG-PPS <i>N.A.</i></p> <p>GloryX <i>0.58</i></p> <p>BioTransformer <i>Predetto</i></p>
<p>4.1</p>  <p><i>Sulfonazione</i></p>	<p>EAWAG-PPS <i>N.A.</i></p> <p>GloryX <i>0.27</i></p> <p>BioTransformer <i>N.A.</i></p>
<p>4.2</p>  <p><i>Ossidrilazione</i></p>	<p>EAWAG-PPS <i>N.A.</i></p> <p>GloryX <i>0.26</i></p> <p>BioTransformer <i>N.A.</i></p>
<p>4.3</p>  <p><i>Ossidrilazione</i></p>	<p>EAWAG-PPS <i>N.A.</i></p> <p>GloryX <i>0.26</i></p> <p>BioTransformer <i>N.A.</i></p>
<p>4.4</p>  <p><i>Ossidrilazione</i></p>	<p>EAWAG-PPS <i>N.A.</i></p> <p>GloryX <i>0.26</i></p> <p>BioTransformer <i>N.A.</i></p>

<p>5</p> 	<i>β-cheto riduzione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	0.58
		BioTransformer	<i>Predetto</i>
<p>5.1</p> 	<i>Glucuronazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	0.43
		BioTransformer	<i>N.A.</i>
<p>5.2</p> 	<i>Solfonazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	0.34
		BioTransformer	<i>N.A.</i>
<p>5.2</p> 	<i>N-Dealchilazione ossidativa</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	0.22
		BioTransformer	<i>N.A.</i>
<p>5.3</p> 	<i>Ossidrilazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	0.22
		BioTransformer	<i>N.A.</i>
<p>5.5</p> 	<i>Ossidrilazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	0.22
		BioTransformer	<i>N.A.</i>

<p>5.6</p> 	<i>Ossidazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
<p>5.7</p> 	<i>Ossidrilazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
<p>5.8</p> 	<i>Ossidrilazione aromatica</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
<p>5.9</p> 	<i>Ossidrilazione aromatica</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
<p>6</p> 	<i>Ossidrilazione aromatica</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
<p>6.1</p> 	<i>Glucuronazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	<i>0.53</i>
		BioTransformer	<i>N.A.</i>

6.2		<i>Solfonazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
			GloryX	0.52
			BioTransformer	<i>N.A.</i>
6.3		<i>β-cheto riduzione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
			GloryX	0.27
			BioTransformer	<i>N.A.</i>
6.4		<i>Ossidrilazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
			GloryX	<i>N.A.</i>
			BioTransformer	<i>N.A.</i>
6.5		<i>Ossidrilazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
			GloryX	0.27
			BioTransformer	<i>N.A.</i>
6.6		<i>Ossidrilazione</i> <i>Aromatica</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
			GloryX	0.27
			BioTransformer	<i>N.A.</i>
7		<i>Ossidrilazione</i> <i>Aromatica</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
			GloryX	0.58
			BioTransformer	<i>Predetto</i>

<p>7.1</p> 	<i>Glucuronazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	0.56
		BioTransformer	<i>N.A.</i>
<p>8</p> 	<i>Ossidrilazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	0.30
		BioTransformer	<i>Predetto</i>
<p>8.1</p> 	<i>Glucuronazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	0.26
		BioTransformer	<i>N.A.</i>
<p>8.2</p> 	<i>Solfonazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	0.29
		BioTransformer	<i>N.A.</i>
<p>9</p> 	<i>ω-Ossidrilazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	0.30
		BioTransformer	<i>Predetto</i>
<p>9.1</p> 	<i>Solfonazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	0.29
		BioTransformer	<i>N.A.</i>

<p>9.2</p> 	<i>Glucuronazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
<p>10</p> 	<i>Ossidazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
<p>11</p> 	<i>Ossidrilazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
<p>12</p> 	<i>Ossidazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
<p>13</p> 	<i>Ossidrilazione aromatica</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
<p>14</p> 	<i>Ossidrilazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	<i>N.A.</i>
		BioTransformer	<i>Predetto</i>

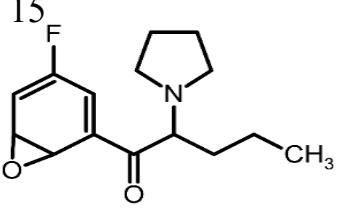
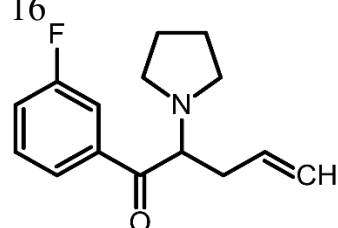
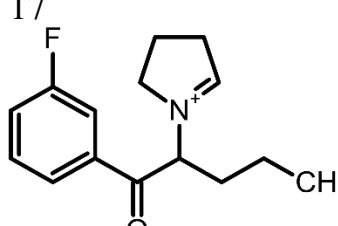
<p>15</p> 	<i>Epossidazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	<i>N.A.</i>
		BioTransformer	<i>Predetto</i>
<p>16</p> 	<i>Desaturazione terminale</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	<i>N.A.</i>
		BioTransformer	<i>Predetto</i>
<p>17</p> 	<i>Desaturazione</i>	EAWAG-PPS	<i>N.A.</i>
		GloryX	<i>N.A.</i>
		BioTransformer	<i>Predetto</i>

Tabella 3. Struttura molecolare, trasformazione metabolita, software di predizione, punteggio relative alla predizione *in silico* del 3F- α -PVP

N.A.= Non applicabile

5.2 Identificazione dei metaboliti del 3F- α -PVP

Prima dell'incubazione, una soluzione alla concentrazione di 1 $\mu\text{g/ml}$ dello standard puro del 3F- α -PVP in MPA:MPB (95:5 v/v) è stata iniettata nello strumento LC-HRMS/MS per la caratterizzazione del tempo di ritenzione e del pattern di frammentazione del composto di interesse sia in modalità di ionizzazione positiva che negativa, in quest'ultima modalità non è stato rilevato nessun segnale.

L'addotto idrogeno $[\text{M}+\text{H}]^+$ della molecola 3F- α -PVP è stato individuato al minuto 11.94 con una massa di m/z 250,1601 e con un pattern di frammentazione coerente con differenti composti analoghi già riportati in letteratura[37].

Gli ioni più rilevanti erano m/z 109,0448, 179,0867, 84,8080 126,1277, 123,0241 corrispondenti rispettivamente al taglio del gruppo funzionale F-benzenico, F-valerofenonico, pirrolidinico, F-benzoilico e frazione N-alchilpirrolidinica. (Figura 11)

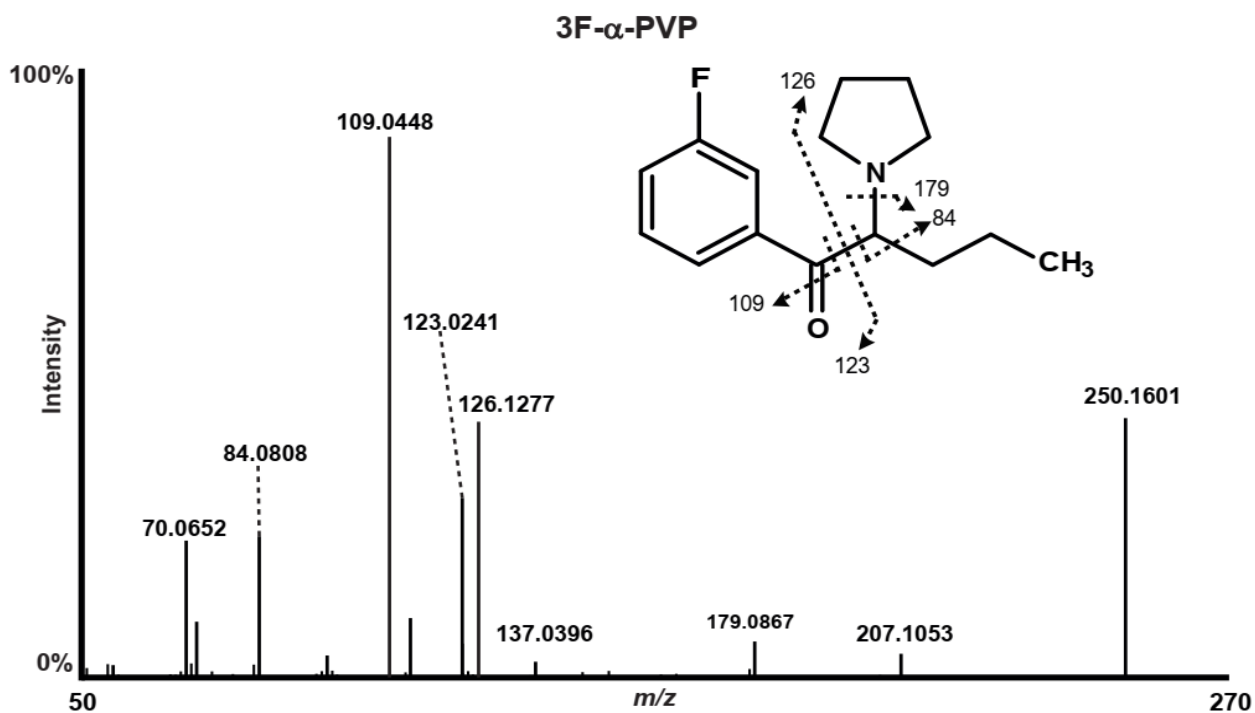


Figura 11: Spettro di frammentazione e caratterizzazione strutturale del 3F- α -PVP

L'area del picco cromatografico a 0h era 5 volte maggiore rispetto a quella rilevata a 3h, suggerendo che il metabolismo fosse avvenuto. I dati grezzi dalle analisi strumentali dei campioni sono stati processati da Compound Discoverer in 3 ore, sulla base del workflow precedentemente impostato.

Come risultato, l'analisi untargeted ha rilevato 21205 composti, 132202 composti sono stati individuati dall'analisi targeted. Considerando le trasformazioni metaboliche predette e le regole di combinazioni (tabella 1), il software ha generato una lista di 22025 composti previsti.

L'unione di queste due analisi ha generato un totale di 86061 composti.

Come area di riferimento a 3h è stato considerato il metabolita M7 per escludere i composti non necessari. Inoltre, la lista dei composti integrata è stata ridotta a un totale di 93 metaboliti probabili con un'area cromatografica maggiore di $1,4 \times 10^7$, individuando 11 composti come metaboliti rilevanti del 3F- α -PVP (Tabella 3)

Le principali trasformazioni identificate sono le seguenti: N-Dealchilazione sull'anello pirrolidinico (M1, M2, M3, M5, M7, M10), β -cheto riduzione del gruppo chetonico (M1, M2, M8), ossidazione sull'anello pirrolidinico (M4, M5, M7, M10, M11) e idrossilazione sull'anello aromatico(M6).

Contrariamente a quanto riportato in letteratura e predetto *in silico*, non sono stati identificati metaboliti di fase II. [54,56] Il profilo metabolico del 3F- α -PVP è proposto in figura 12.

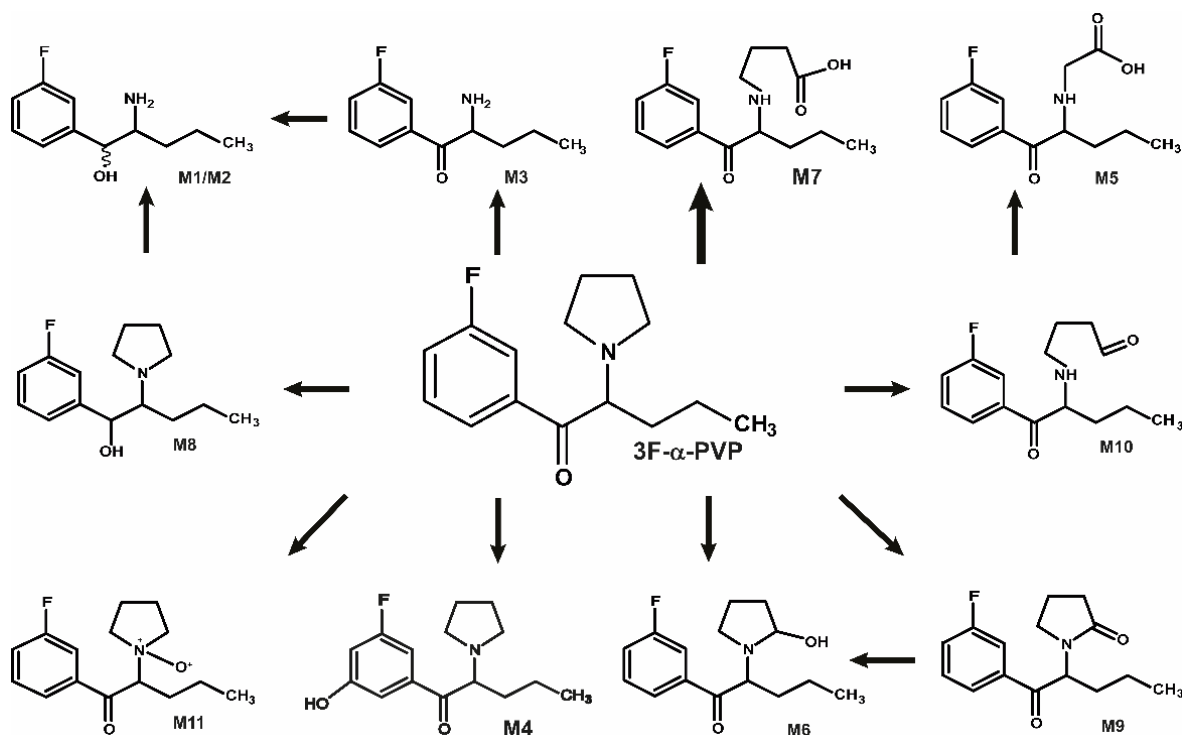


Figura 12: profilo metabolico proposto della molecola 3F- α -PVP

5.3 β -cheto riduzione

Coerentemente con quanto riportato in letteratura, la reazione di β -cheto riduzione (M8, Figura 13) risulta essere abbastanza frequente nei cationi pirovaleroni. [37,54–56]

Questo metabolita è eluito a 12,76 minuti, con una massa accurata $[M+H]^+$ di m/z 252,1760,

Il primo frammento identificato corrisponde alla perdita di acqua con una massa di m/z 234,1651, successivamente il frammento m/z 181,1024 (m/z 179,0866 +2H) suggerisce la riduzione del chetone ad alcol. Nonostante i principali due ioni caratteristici della molecola parent m/z 123,0604 and m/z

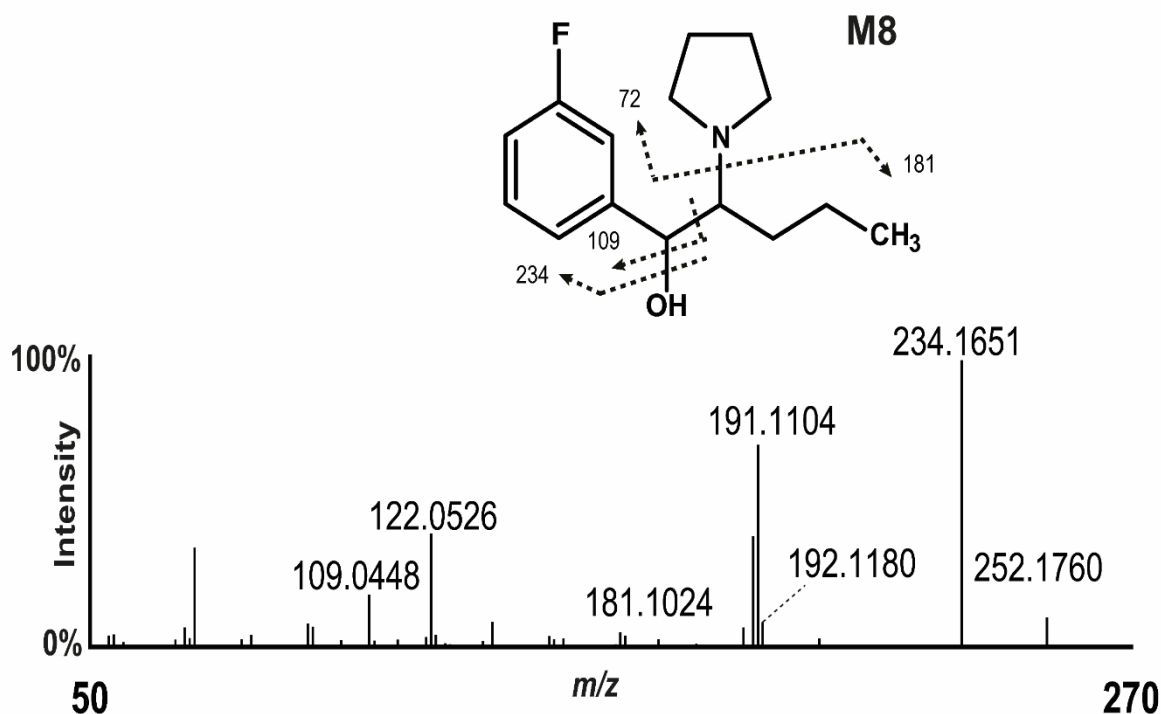


Figura 13: Spettro di frammentazione e caratterizzazione strutturale del metabolita

126,1277 non siano stati rilevati, reazioni sulla porzione N-alchilpirrolidina o F-benzenica sono state escluse in quanto gli ioni frammenti m/z 71,0491 and m/z 109,0448 sono stati riportati. Infatti, la scissione del legame coinvolto nei due frammenti non è avvenuta per via della riduzione dell'ossigeno carbonilico che ha impedito il riarrangiamento di McLafferty.

5.4 N-dealchilazione

Il metabolita M10 (Figura 14), è stato rilevato a 15,94 minuti con una massa accurata $[M+H]^+$ di m/z 266,1552 coerente con il metabolita 3 predetto da EAWAG-PPS.

Il frammento m/z 248,1445 (m/z 26,1552 - 18), confermato dalla formazione dell'N-butanale a seguito della reazione di N-dealchilazione ossidativa, rappresenta la perdita di acqua dello ione molecolare,

Infatti, il frammento m/z 86.0600 corrisponde alla rottura del legame del 4-amino-butan-1-ale. Inoltre, la presenza degli ioni m/z 109,0448, m/z 123,0605 e m/z 163,0918 nel pattern di frammentazione ha confermato che nessuna reazione è avvenuta né a carico della frazione F-fenonica né a carico della catena alchilica.

Risulta importante notare che il frammento m/z 141,0699 ($m/$ 126,1277+H₂O) e m/z 135,0604 confermano la reazione di ossidazione e successiva apertura dell'anello.

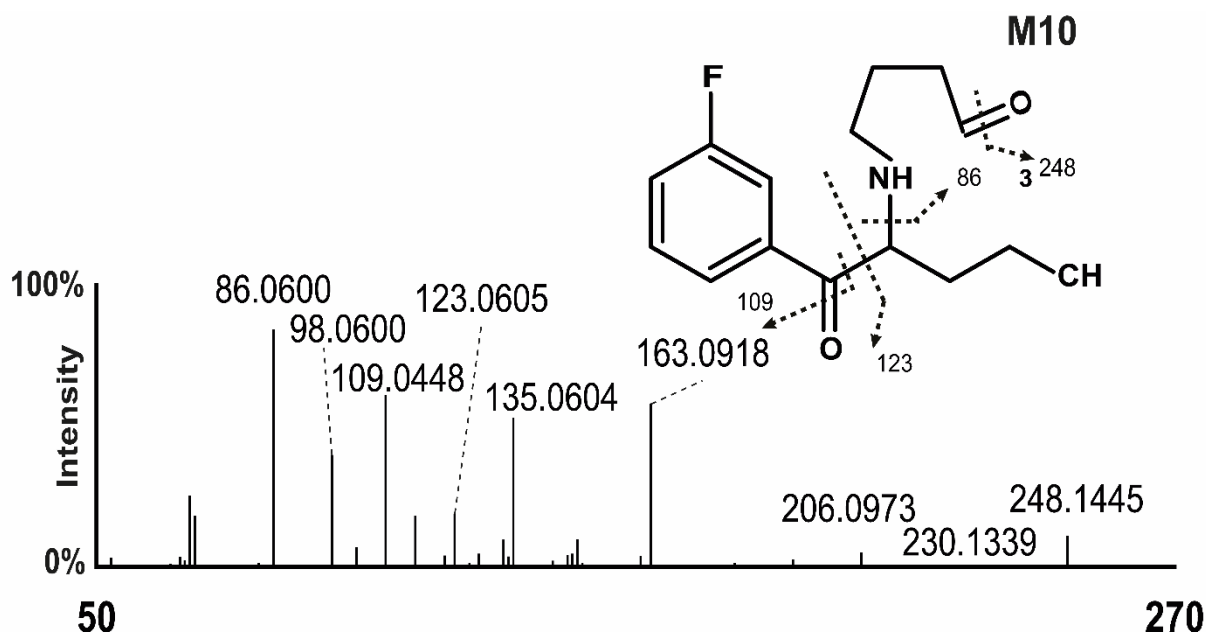


Figura 14: Spettro di frammentazione e caratterizzazione strutturale del metabolita proposto

5.5 Idrossilazione e ossidazione

La reazione di idrossilazione è una reazione di fase I molto frequente che può avvenire su numerosi siti metabolici molecolari.

Nel caso dei cationi sintetici pirovaleronici, sono stati caratterizzati differenti metaboliti idrossilati, in particolare l'idrossilazione della pirrolidina e della catena alchilica[37,38,56]. Come precedentemente menzionato, alcuni metaboliti idrossilati sono stati predetti dai software *in silico*.

Al minuto 10,80 e 9,30 sono stati identificati due composti isobarici rappresentati dalla massa accurata m/z 266,1551 (m/z 250,1601+H₂O) rispettivamente M6 e M4 (Figura 15). Il frammento m/z 248,1443 diagnostico di perdita di acqua è stato identificato solo nel metabolita 6.

Osservando gli spettri dei due metaboliti M6 e M4 appare chiaro che nel primo metabolita l'idrossilazione avviene sulla frazione pirrolidinica (m/z 109,0448 e m/z 123,0241) e nel secondo metabolita sulla frazione F-fenonica (frammento m/z 126,1278). Nello spettro del metabolita 6, il frammento m/z 142,1226 rappresenta la frazione idrossi-N-alchil pirrolidinica, confermando quindi l'idrossilazione sulla pirrolidina.

Sebbene l'esatta posizione del gruppo ossidrilico non sia individuabile, la trasformazione avviene più frequentemente sul carbonio α come predetto da BioTransformer (metabolita 14) In aggiunta, il tempo di ritenzione diminuito rispetto a quello della molecola parent e degli altri metaboliti idrossilati è coerente con la formazione del fenolo. Benchè l'idrossilazione aromatica non sia mai stata riportata prima d'ora nel profilo metabolico di altri cationi sintetici, i due software GloryX e BioTransformer hanno predetto due possibili siti di idrossilazione. Considerando inoltre quanto riportato dalla letteratura scientifica, l'effetto induttivo combinato del gruppo carbonile e del fluoro in

rispettiva posizione meta, la posizione più attivata nell'anello fenilico è la posizione meta rispetto a entrambi i sostituenti.

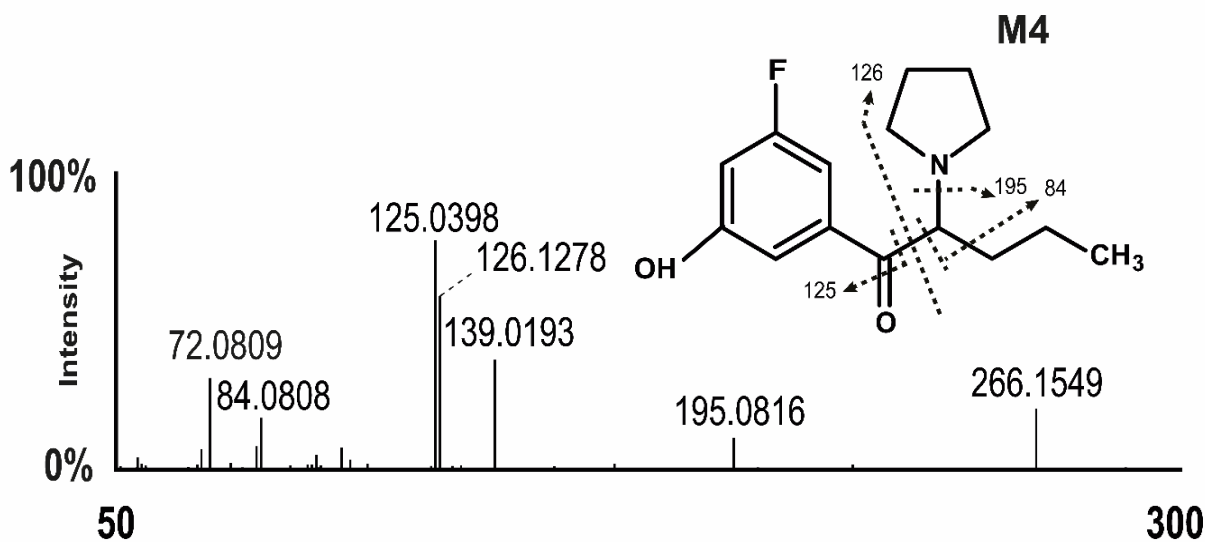
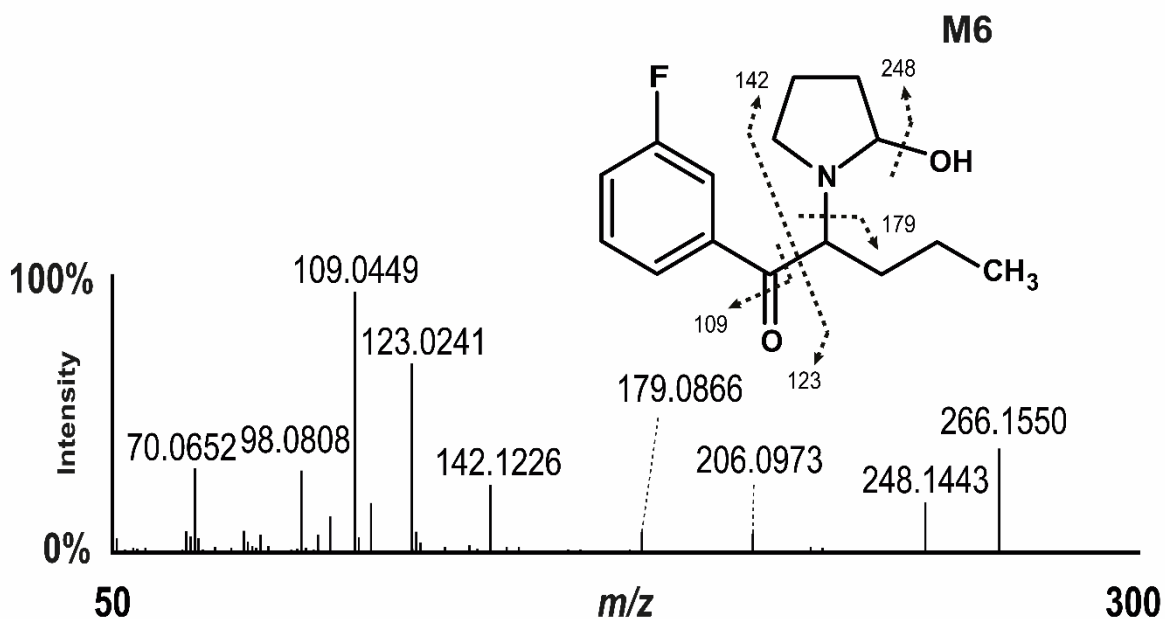


Figura 15: Spettri di frammentazione e caratterizzazione strutturale dei metaboliti proposti

È inoltre rilevante che questo metabolita fenolico non è stato identificato nell'isomero di posizione 4F- α -PVP, rendendo questo metabolita un possibile discriminante fra questi due isomeri nei casi reali

In aggiunta, il precoce tempo di ritenzione rispetto a quello della molecola parent e degli altri metaboliti idrossilati è coerente con la formazione del fenolo.

Benchè l'idrossilazione aromatica non sia mai stata riportata prima d'ora nel profilo metabolico di altri catinoni sintetici, i due software GloryX e BioTransformer hanno predetto due possibili siti di idrossilazione.

Considerando inoltre quanto riportato dalla letteratura scientifica, l'effetto induttivo combinato del Gruppo carbonile e del fluoro in posizione meta, la posizione più attivata nell'anello fenilico è la posizione meta rispetto a entrambi i sostituenti.

Infine, M11 (Figura 16) è coinvolto nella formazione dell’N-ossido, rilevato al minuto 16,41 con una massa accurata di m/z 264,1366. il frammento m/z 86,0601 suggerisce modificazione al gruppo pirrolidinico. Come già descritto, questo metabolita eluisce molto più tardi rispetto al composto parent. [37,38,56]

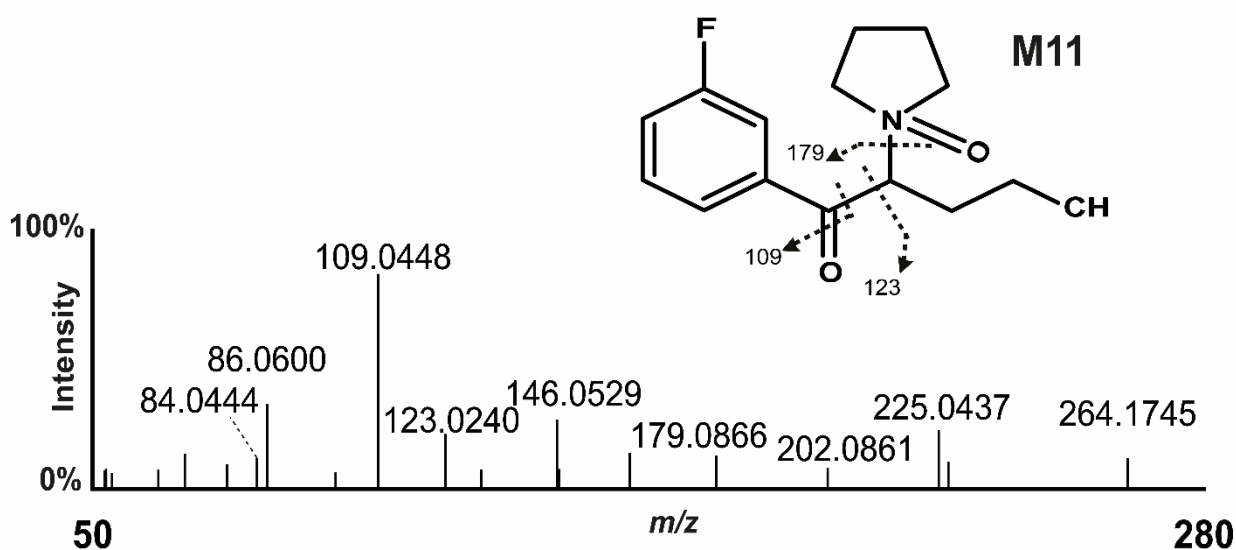


Figura 16: Spettro di frammentazione e caratterizzazione strutturale del metabolita proposto

5.6 Metaboliti di seconda generazione

Il metabolita M3 (Figura 17) proviene dalla deplezione totale della catena butilica dall’azoto pirrolidinico. Rilevato al minuto 9,31 con una massa di m/z 196,1132. Come precedentemente descritto, il frammento m/z 109,0448 suggerisce che il F-benzene non è coinvolto nella trasformazione metabolica. Come conferma della trasformazione di N-dealchilazione, il frammento m/z

84,0444 che rappresenta ione piridinico non è stato rilevato nello spettro di frammentazione.

Questo metabolita potrebbe originarsi a seguito di successive reazioni di dealchilazioni del metabolita M10

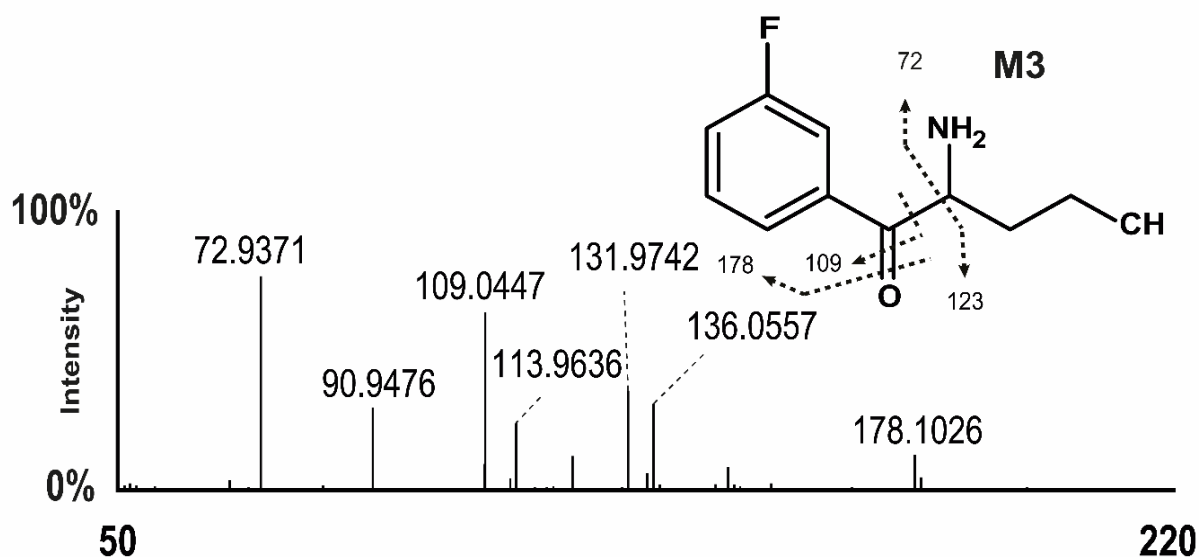


Figura 17: Spettro di frammentazione e caratterizzazione strutturale del metabolita proposto

Successiva metabolizzazione dell'anello pirrolidinico può essere individuata anche nel metabolita M5(Figura 18), rilevato a 10,46 minuti con la massa esatta di m/z 254,1180, con un segnale anche in modalità di ionizzazione negativa che tuttavia non ha generato alcuno spettro in tale modalità.

Visto quanto sopra riportato può essere suggerita la presenza di un gruppo carbossilico, confermato anche da un frammento caratteristico che indica la perdita di acqua (m/z 236,1084). Inoltre, il frammento m/z 148,0558 potrebbe

essere stato ricondotto allo ione N-metil-F-fenetilamina confermando la reazione di N-dealchilazione.

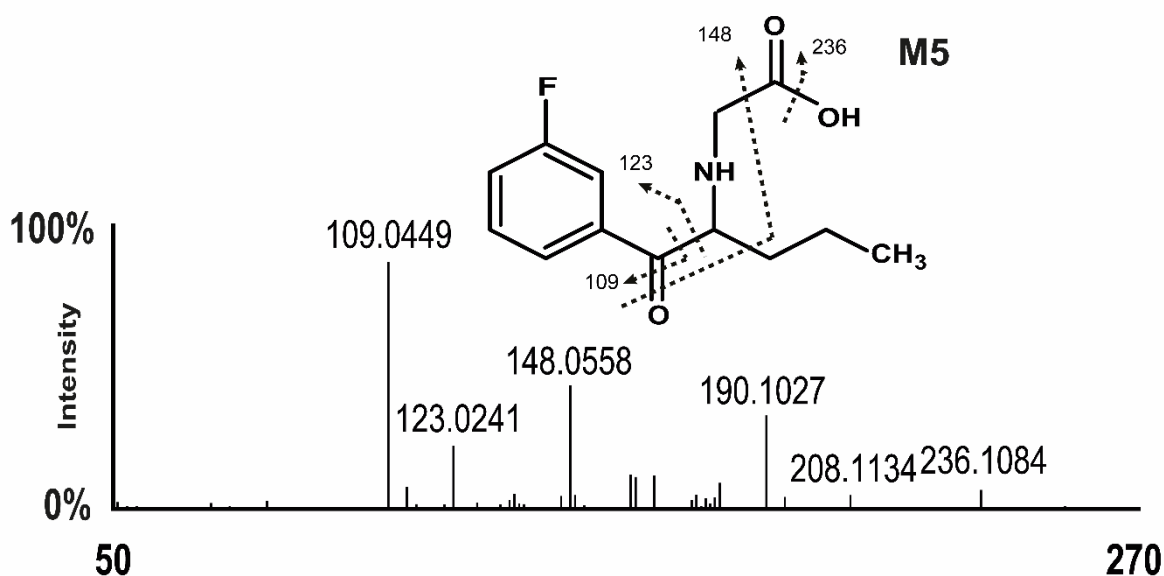


Figura 18: Spettro di frammentazione e caratterizzazione strutturale del metabolita proposto

M1 e M2 (Figura 19) sono stati invece identificati come 2 ioni isobarici con una massa di m/z 198,1289 rispettivamente a 8,66 min e 8,82 min.

Come riportato per il metabolita M8, la mancanza del frammento m/z 84,0444 dimostra che la reazione di N-dealchilazione è avvenuta, inoltre il frammento m/z 180,1182, suggerisce che è avvenuta una reazione di β -cheto riduzione.

L'assenza del frammento m/z 123,0604 e la concomitante presenza del frammento m/z 97,0448 dimostra la riduzione del gruppo chetonico.

Sebbene il metodo analitico non possa determinare in maniera accurata la configurazione esatta del metabolita, i pattern di frammentazione e i tempi di ritenzione suggeriscono che i due metaboliti sono diastereoisomeri.

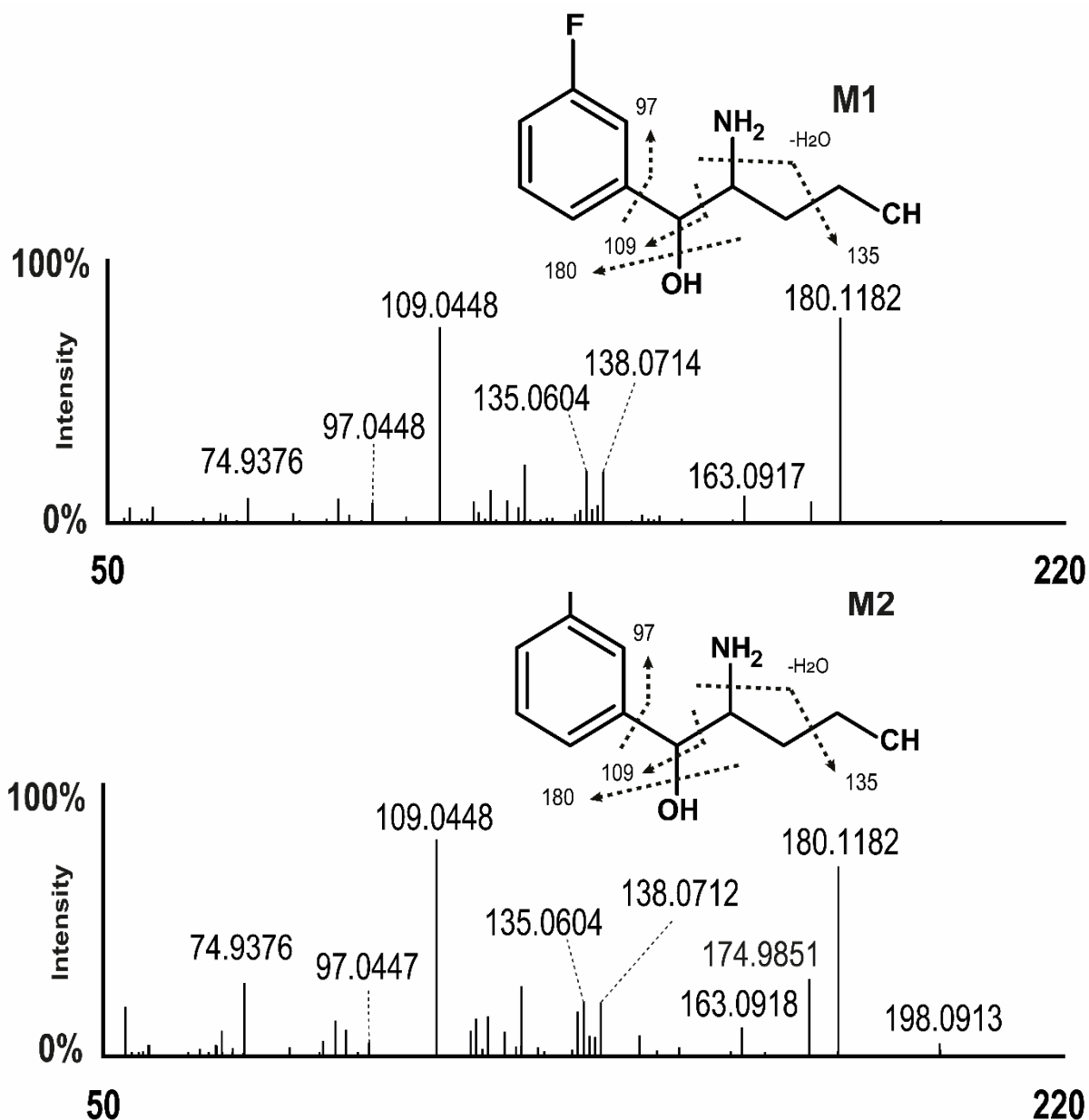


Figura 19: Spettri di frammentazione e caratterizzazione strutturale dei metaboliti proposti

Al minuto 11,40 eluisce il metabolita 7 (Figura 20) che possiede una massa accurata di m/z 282,1498. Il frammento m/z 264,1389 indica la perdita di acqua. Inoltre, il frammento m/z 123,0241 e m/z 109,10449 suggerisce non è avvenuta alcuna modificazione nel gruppo fenonico. La presenza del frammento m/z 87,0441 suggerisce che la N-dealchilazione e ossidazione è avvenuta, come trasformazione successiva del metabolita M10, M9, M6.

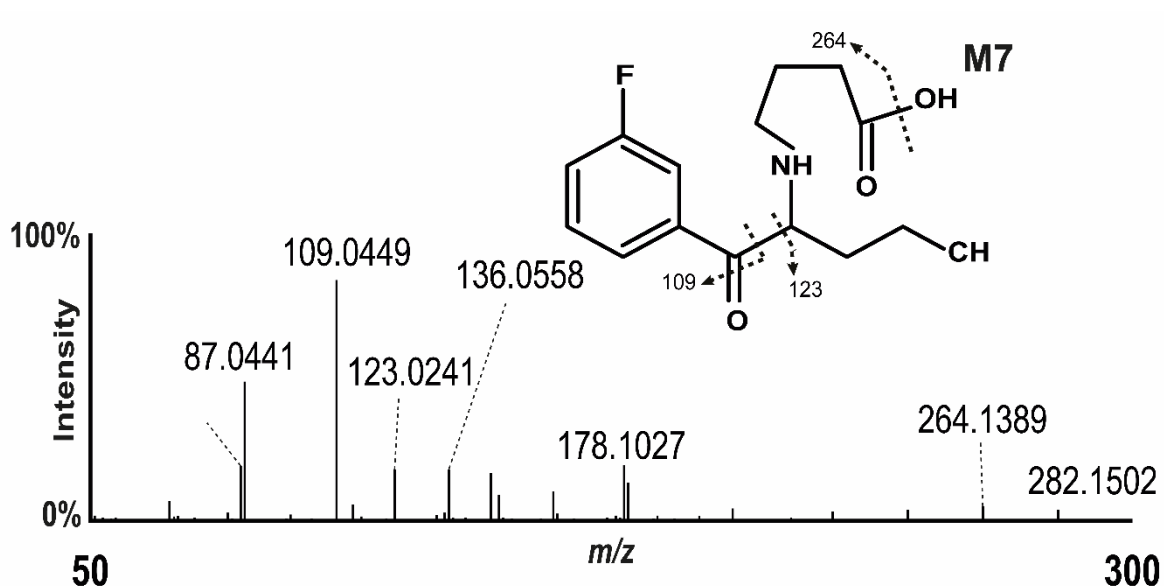


Figura 20: Spettro di frammentazione e caratterizzazione strutturale del metabolita proposto

5.7 Metaboliti di fase II

Nonostante metaboliti di fase II siano stati precedentemente osservati sia in vivo che in vitro per i catinoni pirovaleroni, nel nostro studio non è stato identificato alcun metabolita coniugato. [54,56]

In particolare, i metaboliti coniugati con glicina e alanina sono stati aggiunti alla lista dei metaboliti attesi, perché erano già stati individuati come metaboliti peculiari per altri catinoni sintetici [54].

Le masse di m/z 301,1910 e m/z 315,2067 sono state estratte manualmente dal cromatogramma, ma non è stato individuato alcun picco rilevante nel campione dopo 3h di incubazione.

Infine, altri metaboliti coniugati con l'acido glucuronico o GSH non sono stati individuati, dimostrazione del fatto che le trasformazioni di fase II non sono frequenti.

6 . CONCLUSIONI

Nello studio, è stata effettuata la caratterizzazione del metabolismo in vitro del 3F- α -PVP con una strategia di predizione *in silico* multipla accoppiata ad un approccio targeted/untargeted per l'elaborazione di dati ottenuti con tecnica analitica LC-HRMS/MS.

Come risultato, sono stati determinati 11 metaboliti dopo 3h di incubazione con un pool di epatociti umani, tra i quali è stato caratterizzato il metabolita risultante dall'idrossilazione aromatica. Tale metabolita non è stato rilevato per nessuno degli analoghi strutturali del 3F- α -PVP già studiati, ma è interessante notare che è stato predetto dai software *in silico*.

Inoltre, l'approccio *in silico* multiplo, ha consentito la predizione di 6 metaboliti su 11, incluso il metabolita più abbondante.

Ad ogni modo la predizione *in silico* ha prodotto un ampio numero di metaboliti ridondanti che non si sono verificati nel nostro esperimento.

Benché un software specifico per il metabolismo delle NPS non sia disponibile, gli studi metabolici in vitro rappresentano tutt'ora un importante argomento nel campo della tossicologia, poiché poche sono le informazioni riguardo la complessità delle trasformazioni metaboliche.

Bibliografia:

- [1] UNODC, The challenge of new psychoactive substances, United Nations Publ. (2013) 1–122.
https://www.unodc.org/documents/scientific/NPS_2013_SMART.pdf.
- [2] R.T. Sataloff, M.M. Johns, K.M. Kost, Report on the risk assessment of ketamine in the framework of the joint action on new synthetic drugs, n.d.
- [3] H. JA, L. MA, Reviewing the physiology, pharmacology and therapeutic uses of ketamine, *Nurs. Stand.* 36 (2021) 77–81. <https://doi.org/10.7748/NS.2021.E11737>.
- [4] J. Riley, E. Eisenberg, G. Müller-Schwefe, A.M. Drewes, L. Arendt-Nielsen, Oxycodone: a review of its use in the management of pain, *https://Doi.Org/10.1185/030079908X253708*. 24 (2007) 175–192.
<https://doi.org/10.1185/030079908X253708>.
- [5] D.D.I. Lavoro, I.T. It, Documento di lavoro n. 13 sulle Convenzioni ONU sulle sostanze stupefacenti Commissione per le libertà e i diritti dei cittadini, la giustizia e gli affari interni, (2013) 1–9.
- [6] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, European Drug Report 2021: Trends and Developments., Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2021. <https://doi.org/10.2810/18539>.
- [7] B. Davis, A. Lockwood, I. Pantelidis, P. Alcott, Trends and developments, 2020. <https://doi.org/10.4324/9780080966717-24>.
- [8] Synthetic cannabinoids in Europe, (n.d.).
https://www.emcdda.europa.eu/topics/pods/synthetic-cannabinoids_en.
- [9] CDC- Health Studies- Understanding Chemical and Radiation Exposure, (n.d.).
<https://www.cdc.gov/nceh/hsb/chemicals/sc/About.html>.
- [10] A. Giorgetti, F.P. Busardò, R. Tittarelli, V. Auwärter, R. Giorgetti, Post-mortem toxicology: A systematic review of death cases involving synthetic cannabinoid receptor agonists, *Front. Psychiatry.* 11 (2020) 1–22.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00464>.
- [11] UNODC, Market analysis of synthetic drugs, 2017.
<https://doi.org/10.18356/5c554389-en>.
- [12] D. Fever, DrugFacts: Fentanyl | National Institute on Drug Abuse (NIDA), Febr. 2019. (2019) 1–6. <https://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/fentanyl>.
- [13] A.F.L. faro Brunetti Pietro, Pirani Filippo, Carlier Jeremy, Giorgetti Raffaele, Francesco Paolo Busardo, A 2017–2019 Update on Acute Intoxications and Fatalities from Illicit Fentanyl and Analogues, *J. Chem. Inf. Model.* 53 (1981) 1689–1699.
- [14] EMCDDA, New benzodiazepines in Europe – a review, 2021.
<https://doi.org/10.2810/725973>.
- [15] R. Tittarelli, G. Mannocchi, F. Pantano, F. Romolo, Recreational Use, Analysis and

- Toxicity of Tryptamines, *Curr. Neuropharmacol.* 13 (2014) 26–46.
<https://doi.org/10.2174/1570159x13666141210222409>.
- [16] EMCDDA, Injection of synthetic cathinones, *Perspect. Drugs.* (2015).
http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2754/Synthetic_cathinones_updated2015.pdf.
- [17] United Nations Office on Drugs and Crime, Understanding the synthetic drug market: the NPS factor, *Glob. Smart Updat.* 19 (2018) 1–12.
- [18] United Nations Office On Drugs & Crime(UNODC), World Drug Report 2021- Drug demand drug supply, (United Nations publication, Sales No. E.21.XI.8)., 2021. <https://doi.org/10.21428/cb6ab371.e39c4e60>.
- [19] S. Pichini, R. Pacifici, E. Marinelli, F.P. Busardò, European Drug Users at Risk from Illicit Fentanyl Mix, *Front. Pharmacol.* 8 (2017) 785.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00785>.
- [20] B. Barceló, S. Pichini, V. López-Corominas, I. Gomila, C. Yates, F.P. Busardò, M. Pellegrini, Acute intoxication caused by synthetic cannabinoids 5F-ADB and MMB-2201: A case series, *Forensic Sci. Int.* 273 (2017) e10–e14.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.01.020>.
- [21] R. Solimini, S. Pichini, R. Pacifici, F.P. Busardò, R. Giorgetti, Pharmacotoxicology of non-fentanyl derived new synthetic opioids, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00654>.
- [22] D.P. Antidroga, Presidenza del Consiglio dei Ministri Dipartimento per le Politiche Antidroga, 2020 (2020).
- [23] EMCDDA–Europol 2015 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA, (n.d.). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ>. (accessed October 7, 2021).
- [24] U.E.W.A. on N.P. Substances, UNODC, What are NPS?, (2016) 5–9.
<https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS> (accessed September 20, 2021).
- [25] United Nations Office on Drugs and Crime, SMART update- Regional diversity and the impact of scheduling on NPS trends, 2021. www.unodc.org/tox.
- [26] M. Evans-Brown, A. Gallegos, R. Sedefov, EMCDDA operating guidelines for the European Union Early Warning System on new psychoactive substances, 2006 (2019) 1–27.
- [27] EMCDDA, Early Warning System on NPS, (n.d.).
<https://www.emcdda.europa.eu/publications/topic-overviews/eu-early-warning-system>.
- [28] S. Nazionale, Giugno 2016 - Febbraio 2018, (2018) 1–13.
- [29] N. La Maida, A. Di Trana, R. Giorgetti, A. Tagliabracci, F.P. Busardò, M.A. Huestis, A Review of Synthetic Cathinone–Related Fatalities From 2017 to 2020, *Ther. Drug Monit.* 43 (2021) 52–68.

<https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000808>.

- [30] A.F. Lo Faro, A. Di Trana, N. La Maida, A. Tagliabracci, R. Giorgetti, F.P. Busardò, Biomedical analysis of New Psychoactive Substances (NPS) of natural origin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2019) 112945. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112945>.
- [31] M.J. Valente, P. Guedes De Pinho, M. De Lourdes Bastos, F. Carvalho, M. Carvalho, Khat and synthetic cathinones: A review, *Arch. Toxicol.* 88 (2014) 15–45. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1163-9>.
- [32] B.T. Lopes, M.J. Caldeira, H. Gaspar, A.M.M. Antunes, Metabolic Profile of Four Selected Cathinones in Microsome Incubations: Identification of Phase I and II Metabolites by Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry, *Front. Chem.* 8 (2021) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.609251>.
- [33] F. Schifano, F. Napoletano, D. Arillotta, C. Zangani, L. Gilgar, A. Guirguis, J.M. Corkery, A. Vento, The clinical challenges of synthetic cathinones, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 86 (2020) 410–419. <https://doi.org/10.1111/bcp.14132>.
- [34] K. Zaitso, *Metabolism of Synthetic Cathinones*, Springer International Publishing, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78707-7_5.
- [35] D. Luethi, M.E. Liechti, *Designer drugs: mechanism of action and adverse effects*, Springer Berlin Heidelberg, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02693-7>.
- [36] S. Zaami, R. Giorgetti, S. Pichini, F. Pantano, E. Marinelli, F.P. Busardò, Synthetic cathinones related fatalities: An update, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22 (2018) 268–274. <https://doi.org/10.26355/eurrev-201801-14129>.
- [37] J. Carlier, X. Diao, R. Giorgetti, F.P. Busardò, M.A. Huestis, Pyrrolidinyll synthetic cathinones α -php and 4f- α -pvp metabolite profiling using human hepatocyte incubations, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms22010230>.
- [38] M.J. Swortwood, K.N. Ellefsen, A. Wohlfarth, X. Diao, M. Concheiro-Guisan, R. Kronstrand, M.A. Huestis, First metabolic profile of PV8, a novel synthetic cathinone, in human hepatocytes and urine by high-resolution mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 4845–4856. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9599-4>.
- [39] K.N. Ellefsen, A. Wohlfarth, M.J. Swortwood, X. Diao, M. Concheiro, M.A. Huestis, 4-Methoxy- α -PVP: in silico prediction, metabolic stability, and metabolite identification by human hepatocyte incubation and high-resolution mass spectrometry, *Forensic Toxicol.* 34 (2016) 61–75. <https://doi.org/10.1007/s11419-015-0287-4>.
- [40] M. Concheiro-Guisan, J. Jay, S. Vikingsson, J. Luiz Costa, H. Gaspar, A.M.M. Antunes, B.T. Lopes, M.J. Caldeira, Metabolic Profile of Four Selected Cathinones in Microsome Incubations: Identification of Phase I and II Metabolites by Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry, *Front. Chem.* | www.frontiersin.org. 1 (2021) 609251. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.609251>.

- [41] J. Kirchmair, A.H. Göller, D. Lang, J. Kunze, B. Testa, I.D. Wilson, R.C. Glen, G. Schneider, Predicting drug metabolism: Experiment and/or computation?, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 387–404. <https://doi.org/10.1038/nrd4581>.
- [42] A. Di Trana, P. Brunetti, R. Giorgetti, E. Marinelli, S. Zaami, F.P. Busardò, J. Carlier, In silico prediction, LC-HRMS/MS analysis, and targeted/untargeted data-mining workflow for the profiling of phenylfentanyl in vitro metabolites, *Talanta*. 235 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122740>.
- [43] D.-F. Yannick, F. Jarlei, G.-F. Alberto, G. Russell, M. Claudine, W.D. S., BioTransformer: A comprehensive computational tool for small molecule metabolism prediction and metabolite identification, *J. Cheminform.* 11 (2019) 1–25. <https://doi.org/10.1186/s13321-018-0324-5>.
- [44] C. Stork, G. Embruch, M. Šícho, C. De Bruyn Kops, Y. Chen, D. Svozil, J. Kirchmair, NERDD: A web portal providing access to in silico tools for drug discovery, *Bioinformatics*. 36 (2020) 1291–1292. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz695>.
- [45] C. de BruynKops, M. Šícho, A. Mazzolari, J. Kirchmair, GLORYx: Prediction of the Metabolites Resulting from Phase 1 and Phase 2 Biotransformations of Xenobiotics, *Chem. Res. Toxicol.* 34 (2020) 286–299. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.0C00224>.
- [46] J. Gao, L.B.M. Ellis, L.P. Wackett, The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: Improving public access, *Nucleic Acids Res.* 38 (2009) D488–D491. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp771>.
- [47] S.R. Kazmi, R. Jun, M.S. Yu, C. Jung, D. Na, In silico approaches and tools for the prediction of drug metabolism and fate: A review, *Comput. Biol. Med.* 106 (2019) 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2019.01.008>.
- [48] M.L. Peach, A. V. Zakharov, R. Liu, A. Pugliese, G. Tawa, A. Wallqvist, M.C. Nicklaus, Computational tools and resources for metabolism-related property predictions. 1. Overview of publicly available (free and commercial) databases and software, *Future Med. Chem.* 4 (2012) 1907–1932. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.150>.
- [49] X. Diao, M.A. Huestis, New synthetic cannabinoids metabolism and strategies to best identify optimal marker metabolites, *Front. Chem.* 7 (2019) 1–15. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00109>.
- [50] P.A. Espinosa-Barrera, C.A. Delgado-Vargas, D. Martínez-Pachón, A. Moncayo-Lasso, Using computer tools for the evaluation of biodegradability, toxicity, and activity on the AT1 receptor of degradation products identified in the removal of valsartan by using photo-electro-Fenton process, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28 (2021) 23984–23994. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11949-9>.
- [51] Z. Zheng, H.P.H. Arp, G. Peters, P.L. Andersson, Combining in Silico Tools with Multicriteria Analysis for Alternatives Assessment of Hazardous Chemicals: Accounting for the Transformation Products of decaBDE and Its Alternatives,

- Environ. Sci. Technol. 55 (2021) 1088–1098.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02593>.
- [52] Dr Chris Swain BA MA (Cantab) PhD CChem FRSC, Predicting Metabolism | Cambridge MedChem Consulting, (n.d.).
https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/ADME/predicting_metabolism.html (accessed September 24, 2021).
- [53] E. Campos, E. De Martinis, B. De Martinis, Forensic Analysis of Illicit Drugs and Novel Psychoactive Substances in Wastewater: A review of Toxicological, Chemical and Microbiological Aspects, *Brazilian J. Anal. Chem.* (2021) 1–20.
<https://doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.rv-19-2021>.
- [54] S.K. Manier, · Lea Wagmann, · Veit Flockerzi, M.R. Meyer, L. Wagmann, V. Flockerzi, M.R. Meyer, Toxicometabolomics of the new psychoactive substances α -PBP and α -PEP studied in HepaRG cell incubates by means of untargeted metabolomics revealed unexpected amino acid adducts, *94* (2020) 2047–2059.
- [55] M.J. Swortwood, J. Carlier, K.N. Ellefsen, A. Wohlfarth, X. Diao, M. Concheiro-Guisan, R. Kronstrand, M.A. Huestis, In vitro, in vivo and in silico metabolic profiling of α -pyrrolidinopentiothiophenone, a novel thiophene stimulant, *Bioanalysis*. 8 (2016) 65–82. <https://doi.org/10.4155/bio.15.237>.
- [56] S.K. Manier, L.H.J. Richter, J. Schäper, H.H. Maurer, M.R. Meyer, Different in vitro and in vivo tools for elucidating the human metabolism of alpha-cathinone-derived drugs of abuse, *Drug Test. Anal.* 10 (2018) 1119–1130.
<https://doi.org/10.1002/DTA.2355>.

Ringraziamenti:

A conclusione di questo elaborato, desidero menzionare tutte le persone, senza le quali questo lavoro di tesi non esisterebbe nemmeno.

Un sentito grazie al mio relatore, il professor Paolo Francesco Busardò, che mi ha dato la possibilità di svolgere il mio lavoro di tesi presso il Laboratorio di Tossicologia forense del Dipartimento di Eccellenza di Scienze Biomediche e Sanità Pubblica nella facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università Politecnica delle Marche, dandomi fiducia e dimostrando un'estrema professionalità.

A miei genitori, Antonella e Maurizio, che sono il mio punto di riferimento e il mio esempio di vita che mi hanno sempre sostenuta sia economicamente che emotivamente, permettendomi di concludere questo percorso. Grazie perché la vostra estrema tranquillità e sicurezza nel dirmi "In bocca al lupo Dili" prima di ogni esame, nonostante non fossi affatto tranquilla, mi ha dato la grinta e la forza di credere sempre in me stessa. Con questo lavoro spero di poter ripagare almeno in parte tutti i sacrifici che hanno fatto per permettermi di arrivare a questo traguardo da me tanto desiderato, a loro dedico la mia tesi.

A mia sorella Giorgia, che mi ha sostenuto incondizionatamente con la sua discreta e silenziosa presenza, insegnandomi che la costanza e l'impegno ripagano sempre. Grazie perché nonostante la distanza non hai mai smesso di esserci.

A Leonardo, che nei peggiori momenti di sconforto ha sempre saputo come farmi ragionare, incoraggiandomi a non mollare mai, condividendo con me ogni momento, sia nel bene che nel male. Grazie per il suo amore, il costante sostegno e presenza insostituibile.

Ad Anna Giulia, che mi ha accompagnata passo dopo passo lungo questo percorso, che fin dal primo giorno in laboratorio ha sempre creduto nelle mie potenzialità anche quando io stessa non ci riuscivo. Grazie per tutti i consigli, gli insegnamenti, il supporto costante, le dritte indispensabili durante questi mesi e la sua complicità nella realizzazione di ogni capitolo della mia tesi.

Ai colleghi del Laboratorio di Tossicologia Forense, grazie per la loro disponibilità e i preziosi consigli che mi hanno fornito durante tutto questo periodo permettendomi di lavorare in un ambiente piacevole e stimolante.

A tutte le mie amiche: a quelle che nonostante la distanza ci sono sempre state, a quelle che con la loro presenza hanno sopportato tutti i miei sfoghi regalandomi momenti di spensieratezza. Grazie a chi, è sempre restato al mio fianco sia durante le vittorie che durante le sconfitte. Grazie perché, ognuno a modo suo, ha reso possibile questo traguardo.

Un ringraziamento speciale va a tutti i miei familiari: nonna Miriam, zia Emanuela, zio Marco, zia Barbara, zio Samuele e i miei cugini Costanza ed Eugenio. Grazie perché anche il loro sostegno è stato prezioso.

Ringrazio i miei nonni Pierino e Silvana, che da lassù, ovunque essi siano, mi osservano e mi proteggono sempre. Grazie perché so che in questo momento sareste stati fieri di me. Questo traguardo lo dedico anche a loro.

Infine, vorrei ringraziare anche me stessa, per aver dimostrato una forza di volontà e una determinazione che mai pensavo di poter avere.