



**ISEL**

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

# **Toxicidade e Metabolismo de Novas Catinonas – A Ameaça das Drogas Ilícitas Emergentes**

**INÊS MARIA RAMOS FERREIRA**

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre  
em Engenharia Química e Biológica – Perfil Bioprocessos

Orientadores:

Doutora Rita Isabel Dias Pacheco

Doutora Helena Margarida Guerreiro Galla Gaspar

Júri:

Presidente: Doutora Ana Maria Barreiros

Vogais:

Doutora Ana Isabel Janeiro

Doutora Sónia Alexandra de Almeida Martins

Doutora Rita Isabel Dias Pacheco

**dezembro 2023**





**ISEL**

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

# **Toxicidade e Metabolismo de Novas Catinonas – A Ameaça das Drogas Ilícitas Emergentes**

**INÊS MARIA RAMOS FERREIRA**

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre  
em Engenharia Química e Biológica – Perfil Bioprocessos

Orientadores:

Doutora Rita Isabel Dias Pacheco

Doutora Helena Margarida Guerreiro Galla Gaspar

Júri:

Presidente: Doutora Ana Maria Barreiros

Vogais:

Doutora Ana Isabel Janeiro

Doutora Sónia Alexandra de Almeida Martins

Doutora Rita Isabel Dias Pacheco

**dezembro 2023**



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, um agradecimento à minha orientadora, a Professora Doutora Rita Pacheco, pela disponibilidade, todo o conhecimento transmitido, orientação, possibilidade de auxiliar novos alunos, projetos extra e pelas sugestões fornecidas durante todo o processo de elaboração da tese final de mestrado. Um agradecimento à Professora Doutora Helena Gaspar, pelo acompanhamento durante todo o trabalho experimental, principalmente, nas análises efetuadas por HPLC.

Agradeço o financiamento deste trabalho ao Polo Ciências do Centro de Química Estrutural da Universidade de Lisboa financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia pelos projetos UIDB/00100/2020 e UIDP/00100/2020, ao Institute of Molecular Sciences, Laboratório Associado financiado pela FCT pelo projeto LA/P/0056/2020, e ao BioISI (Biosystems and Integrative Sciences Institute) financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia pelos projetos UIDB/04046/2020 (DOI: [10.54499/UIDB/04046/2020](https://doi.org/10.54499/UIDB/04046/2020)) e UIDP/04046/2020.

Quero agradecer à Patrícia Tauleigne pelos conhecimentos transmitidos sobre as catinonas sintéticas e à Rafaela Cabral pela ajuda nos ensaios com os fibroblastos.

Um agradecimento especial à minha mãe, pai e irmão, que permitiram que fizesse este curso de mestrado e por todo o apoio ao longo destes anos. Agradecer à minha madrinha, padrinho, avós e afilhada pelo carinho e preocupação durante todo o processo. Agradecer ao meu namorado, Pedro Nunes, que esteve presente nos momentos de felicidade e tristeza.

A todos, muito obrigada!

*“Everywhere, Everything, Everyone”*

EMCDDA, 2022



## Resumo

As catinonas sintéticas, são  $\beta$ -ceto análogos das anfetaminas, e por isso, consideradas psicostimulantes. Estes compostos são sintetizados de forma a serem estruturalmente diferentes dos compostos ilegais, e por isso, aparecem no mercado como substâncias legais, representando uma alternativa de drogas de abuso, de fácil acesso no mercado.

Este trabalho teve como objetivos efetuar o estudo da permeabilidade da barreira gastrointestinal de oito catinonas sintéticas: 3'-CMC, 4'-CMC, 3'-CEC, 4'-CEC, 3'-CBC, 4'-CBC, 3'-CI-DEC e 4'-CI-DEC. Consequentemente, foi ainda necessário avaliar a sua toxicidade na linha celular Caco-2 e desenvolver um método de quantificação destas substâncias por HPLC-DAD.

A metodologia de HPLC-DAD desenvolvida mostrou ser linear na gama de concentrações avaliadas (1 a 25  $\mu\text{g/mL}$ ). O estudo da permeabilidade para cada catinona, foi efetuado com o valor da concentração do IC50 (entre 1,80 e 6,10 mM), obtido para a citotoxicidade, a partir do método MTT. Esta avaliação permitiu identificar que as catinonas mais tóxicas nas Caco-2 são as 3'-CBC e 4'-CBC, cujos IC50 são 1,87 mM e 1,90 mM, respetivamente. A catinona com maior taxa de permeação é a 4'-CEC, cujo valor de  $P_{app}$  foi de  $4,89 \times 10^{-6}$  cm/s, indicando que possui permeabilidade moderada. O estudo na linha celular Caco-2 sugere que existe uma relação entre a estrutura das catinonas e a sua citotoxicidade, mostrando que um aumento na cadeia *N*-alquílica conduz a um aumento da sua toxicidade, contudo a posição do átomo de cloro parece não influenciar a toxicidade.

Numa tentativa de perceber se as células normais têm um comportamento semelhante às células cancerígenas foi efetuado um estudo da citotoxicidade da 4'-CBC, por ser uma das mais tóxicas, em fibroblastos da derme humana, cujo valor do IC50 poderá ser, aproximadamente, 0,80 mM.

De modo a tentar compreender o mecanismo de toxicidade na linha celular HepG-2 foi ainda realizado um estudo de metabolómica por espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS) nestas células, com a 4'-CEC, por ter sido a que apresentou maior permeação. No modo positivo, verificou-se que os metabolitos extraídos das células controlo são diferentes dos metabolitos das células expostas à catinona, com variação de 81% e  $r^2=0,79$ . Para as células controlo foram propostos metabolitos como espermidina e monofosfato de uridina. Nas células tratadas foram propostos a N1-acetileespermidina e oleamida, indicando que a catinona afeta negativamente as células. Apesar de se ter efetuada ainda a quantificação de proteínas extraídas das células da linha celular HepG2, expostas à catinona em comparação com as células controlo e uma SDS-PAGE, os resultados não foram conclusivos. Este trabalho contribuiu para o aumento do conhecimento do efeito tóxico de catinonas sintéticas que circulam no mercado.

**Palavras-chave:** novas drogas psicoativas, catinonas sintéticas, biodisponibilidade, HPLC-DAD, espectrometria de massa, metabolómica, HepG2, Caco-2.



## Abstract

Synthetic cathinones are  $\beta$ -keto analogues of amphetamines and are therefore considered psychostimulants. These compounds are synthesized in such a way that they are structurally different from illegal compounds, and therefore appear on the market as legal substances, representing an alternative to drugs of abuse, easily accessible on the market.

This work aimed to study the permeability of the gastrointestinal barrier of eight synthetic cathinones: 3'-CMC, 4'-CMC, 3'-CEC, 4'-CEC, 3'-CBC, 4'-CBC, 3' -Cl-DEC and 4'-Cl-DEC. Consequently, it was still necessary to evaluate their toxicity in the Caco-2 cell line and develop a method for quantifying these substances by HPLC-DAD.

The developed HPLC-DAD methodology proved to be linear in the range of concentrations evaluated (1 to 25  $\mu\text{g/mL}$ ). The permeability study for each cathinone was carried out with the IC<sub>50</sub> concentration value (between 1,80 and 6,10 mM), obtained for cytotoxicity, from the MTT method. This evaluation made it possible to identify that the most toxic cathinones in Caco-2 are 3'-CBC and 4'-CBC, whose IC<sub>50</sub> are 1,87 mM and 1,90 mM, respectively. The cathinone with the highest permeation rate is 4'-CEC, whose  $P_{\text{app}}$  value was  $4,89 \times 10^{-6}$  cm/s, indicating that it has moderate permeability. The study on the Caco-2 cell line suggests that there is a relationship between the structure of cathinones and their cytotoxicity, showing that an increase in the *N*-alkyl chain leads to an increase in their toxicity, however the position of the chlorine atom does not seem to influence toxicity.

In an attempt to understand whether normal cells behave similarly to cancer cells, a study was carried out on the cytotoxicity of 4'-CBC, as it is one of the most toxic, on human dermal fibroblasts, whose IC<sub>50</sub> value could be approximately 0,80 mM.

In order to try to understand the mechanism of toxicity in the HepG-2 cell line, a metabolomics study by high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) was also carried out on these cells, with 4'-CEC being the one with the highest permeation. In positive mode, it was found that the metabolites extracted from control cells are different from the metabolites from cells exposed to cathinone, with a variation of 81% and  $r^2=0,79$ . For control cells, metabolites such as spermidine and uridine monophosphate were proposed. N1-acetylspermidine and oleamide were proposed in the treated cells, indicating that cathinone negatively affects the cells. Although the quantification of proteins extracted from cells of the HepG2 cell line, exposed to cathinone, was also carried out in comparison with control cells and SDS-PAGE was made, the results were not conclusive. This work contributed to increasing knowledge of the toxic effect of synthetic cathinones circulating on the market.

**Keywords:** new psychoactive drugs, synthetic cathinones, bioavailability, HPLC-DAD, mass spectrometry, metabolomics, HepG2, Caco-2.



## Lista de Abreviaturas

### A

<b>AMPHs</b>	Anfetaminas
<b>A</b>	Absorvância
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>ADMET</b>	Absorção Distribuição Metabolismo Excreção Toxicidade
<b>ANOVA</b>	Análise de variância (do inglês, <i>ANalysis Of VAriance</i> )
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina

### C

<b>Caco-2</b>	Linha celular do Adenocarcinoma Colorretal Humano
<b>CNV</b>	Inviabilidade celular
<b>CYP</b>	Citocromo P
<b>3'-CBC</b>	3'-cloro- <i>N</i> -butilcatinona
<b>3'-CEC</b>	3'-cloro- <i>N</i> -etilcatinona
<b>3'-CI-DEC</b>	3'-cloro- <i>N,N</i> -dietilcatinona
<b>3'-CMC</b>	3'-cloro- <i>N</i> -metilcatinona
<b>4'-CBC</b>	4'-cloro- <i>N</i> -butilcatinona
<b>4'-CEC</b>	4'-cloro- <i>N</i> -etilcatinona
<b>4'-CI-DEC</b>	4'-cloro- <i>N,N</i> -dietilcatinona
<b>4'-CMC</b>	4'-cloro- <i>N</i> -metilcatinona

### D

<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido

### E

<b>ECACC</b>	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
<b>EMCDDA</b>	Observatório Europeu da Droga e Toxicodependência (do inglês, <i>European Monitoring Centre for Drugs and Drugs Addiction</i> )

<b>EWS</b>	Sistema alerta rápido (do inglês, <i>Early Warning System</i> )
<b>Europol</b>	Agência da União Europeia para a Cooperação Policial (do inglês, <i>European Union Agency for Law Enforcement Cooperation</i> )
<b><u>F</u></b>	
<b>FBS</b>	Soro fetal bovino (do inglês, <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>FCUL</b>	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
<b><u>H</u></b>	
<b>HBSS</b>	Hank's Balanced Salt Solution
<b>HepG2</b>	Linha celular do Hepatocarcinoma Humano
<b>HPLC-DAD</b>	Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção de rede de díodos (do Inglês, <i>High-performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection</i> )
<b><u>I</u></b>	
<b>IC50</b>	Concentração necessária da substância para morte celular de 50%
<b>INML-CF</b>	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses
<b><u>J</u></b>	
<b>LPC-PJ</b>	Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária
<b><u>L</u></b>	
<b>LC-MS</b>	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (do inglês, <i>Liquid chromatography coupled to Mass spectrometry</i> )
<b>LC-HRMS</b>	Cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrometria de massa (do inglês, <i>Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry</i> )
<b>LOAEL</b>	Nível mínimo com efeitos adversos observáveis (do inglês, <i>Lowest observed adverse effect level</i> )
<b><u>M</u></b>	
<b>MetOH</b>	Metanol
<b>MDMA</b>	3,4-metilenodioximetanfetamina ( <i>ecstasy</i> )
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b><u>N</u></b>	
<b>NSP</b>	Novas Substâncias Psicoativas

## O

**OMS** Organização Mundial da Saúde

## P

**PBS** Tampão fosfato-salino (do inglês, *Phosphate buffered saline*)

**PJ** Polícia Judiciária

## R

**RMN** Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

**RPMI** *Roswell Park Memorial Institute*

## S

**SC** Catinonas Sintéticas

**SDS-PAGE** Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (do inglês, *Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

**SICAD** Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências

**SWGDRUG** Grupo de Trabalho Científico para Análise de Drogas Apreendidas (do inglês, *Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs*)

## U

**UNODC** Gabinete da Nações Unidas contra a Droga e o Crime (do inglês, *United Nations Office on Drugs and Crime*)

**UV-Vis** Espectroscopia Ultravioleta-Visível



# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>i</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>iv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vi</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>viii</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>xv</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>xxi</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. Novas Substâncias Psicoativas .....	2
1.2. Catinonas Sintéticas .....	4
1.2.1. Estrutura das Catinonas Sintéticas.....	6
1.2.2. Efeitos das Catinonas Sintéticas e Metabolismo .....	8
1.2.3. Absorção Gastrointestinal das Catinonas Sintéticas.....	12
1.3. Enquadramento do trabalho.....	16
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>19</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	<b>22</b>
3.1. Material Biológico.....	22
3.2. Substâncias Psicoativas .....	22
3.3. Reagentes .....	22
3.4. Equipamentos .....	23
3.5. Cultura celular .....	23
3.6. Determinação da citotoxicidade pelo Método MTT.....	24
3.7. Desenvolvimento do método de quantificação das catinonas por HPLC-DAD.....	25
3.8. Ensaio de Permeabilidade da Barreira Gastrointestinal .....	27
3.9. Extração de Proteínas e Metabolitos .....	28
3.10. Análise Metabólica.....	28
3.11. Quantificação de Proteínas pelo Método de Bradford.....	29

3.12. Eletroforese SDS-PAGE em gel.....	29
3.13. Análise <i>In Silico</i> .....	30
3.14. Análise estatística.....	30
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>33</b>
4.1. Citotoxicidade de cationos sintéticos em linhas celulares humanas Caco-2 e fibroblastos .....	33
4.2. Desenvolvimento do método de quantificação das cationos por HPLC-DAD.....	38
4.3. Ensaio de Permeabilidade da Barreira Gastrointestinal .....	44
4.4. Análise metabolômica das células HepG2 .....	48
4.5. Análise das Proteínas Celulares .....	54
4.6. Análise <i>In Silico</i> .....	57
<b>5. Conclusões e Perspetivas Futuras.....</b>	<b>63</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>69</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>81</b>



## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Número de pessoas em milhões, que consomem cannabis, cocaína, ecstasy e anfetaminas, na União Europeia em 2022 (Adaptado de EMCDDA, 2023).....	1
<b>Figura 2</b> - Classificação de compostos de acordo com o efeito farmacológico (adaptado de Gonçalves <i>et al.</i> , 2019).....	2
<b>Figura 3</b> - Localização das smartshops em Portugal Continental (Calado, 2013).....	3
<b>Figura 4</b> - Estruturas químicas da Catinona, Catina, Efedrina e Anfetamina, Efedrona e Mefedrona (Adaptado de Nobre, 2019). ....	5
<b>Figura 5</b> - Marcos importantes na história das catinonas sintéticas (adaptado de Almeida <i>et al.</i> , 2022). .....	6
<b>Figura 6</b> - Estrutura geral da catinona e padrões de substituição. ....	6
<b>Figura 7</b> - Derivados da catinona: famílias 1 (cadeia alquílica no grupo amino), 2 (grupo 3,4-metilenodioxilo ligado ao anel benzeno), 3 (grupo pirrolidilo) e 4 (misto). ....	7
<b>Figura 8</b> - Componentes da barreira gastrointestinal (adaptado através do <i>biorender</i> ).....	12
<b>Figura 9</b> - Catinonas sintéticas utilizadas no trabalho experimental: (a) 3'-CMC, (b) 3'-CEC, (c) 3'-CBC, (d) 4'-CMC, (e) 4'-CEC, (f) 4'-CBC, (g) 3'-CI-DEC e (h) 4'-CI-DEC.....	16
<b>Figura 10</b> - Diferenciação da monocamada da linha celular Caco-2 em transwells (adaptado através do <i>biorender</i> ).....	27
<b>Figura 11</b> - Curvas dose-resposta de citotoxicidade para as oito catinonas sintéticas, utilizando a linha celular Caco-2. ....	34
<b>Figura 12</b> - Valores de IC50 (mM) para as oito catinonas sintéticas, em células da linha celular Caco-2 indiferenciadas. *Não possuem diferença estatística significativa para $p < 0,05$ .....	35
<b>Figura 13</b> – Viabilidade celular para cada IC50 das oito catinonas sintéticas, na linha celular Caco-2. .....	36
<b>Figura 14</b> - Valores de IC50 das oito catinonas sintéticas para as linhas celulares Caco-2, HepG2 (Tauleigne, 2023) e SH-SY5Y (Tauleigne, 2023).....	36
<b>Figura 15</b> – Percentagem de fibroblastos não viáveis para 0,4 e 0,9 mM da 4'-CBC. ....	37
<b>Figura 16</b> - Tempos de retenção das catinonas sintéticas. Condições de HPLC-DAD: coluna ACE 3 C18, fluxo 1 mL/min, gradiente [0-5 min (25% B/75% A), 5-20 min de 25% B a 85% B; A – água com ácido fórmico (0,1%); B-metanol com ácido fórmico (0,1%)], detecção a 250 e 262 nm.....	38

<b>Figura 17</b> - Cromatogramas das cationonas 3'-CMC e 4'-CBC a 250 e 262 nm, respectivamente. Condições de HPLC: coluna ACE 3 C18, fluxo 1 mL/min; 0-5 min (25% B), 5-20 min (85% B); eluente A - H <sub>2</sub> O (0,1% ácido fórmico) e eluente B: Cromatograma A – eluente B MeOH (0,1% ácido fórmico), Cromatograma B - eluente B ACN (0,1% ácido fórmico); concentração 10 µg/mL e volume de injeção: Cromatograma A – 25 µL e Cromatograma B – 10 µL. ....	39
<b>Figura 18</b> - Tempos de retenção para as cationonas 3'-CMC e 4'-CBC, na análise 2. ....	39
<b>Figura 19</b> - Cromatograma das cationonas com o cloro na posição <i>meta</i> (P3Cl) e na posição <i>para</i> (P4Cl), para as condições otimizadas de HPLC: coluna ACE 3 C18; fluxo 1 mL/min; 0-5 min (25% ACN), 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN). Concentração 10 µg/mL, volume de injeção 10 µL. Detecção 250 nm (P3Cl) e 262 nm (P4Cl). ....	40
<b>Figura 20</b> - Cromatograma das cationonas com o cloro na posição <i>meta</i> (P3Cl), para as condições otimizadas de HPLC: coluna ACE 3 C18; fluxo 1 mL/min; 0-5 min (25% ACN), 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN). Volume de injeção 10 µL. Detecção 250 nm. ....	41
<b>Figura 21</b> - Cromatograma das cationonas com o cloro na posição <i>para</i> (P4Cl), para as condições otimizadas de HPLC: coluna ACE 3 C18; fluxo 1 mL/min; 0-5 min (25% ACN), 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN). Volume de injeção 10 µL. Detecção 262 nm. ....	41
<b>Figura 22</b> - Espectros UV-Vis para as cationonas com o cloro em posição (A) <i>meta</i> e (B) <i>para</i> , concentração de 25 µg/mL. ....	42
<b>Figura 23</b> - Curvas de calibração para as cationonas sintéticas: (A) 3'-CMC, (B) 4'-CMC, (C) 3'-CEC, (D) 4'-CEC, (E) 3'-CBC, (F) 4'-CBC, (G) 3'-Cl-DEC e (H) 4'-Cl-DEC; a 250 nm para as 3' e 262 nm para as 4'. ....	43
<b>Figura 24</b> - Cromatogramas das <i>meta</i> cloro-cationonas, zona basolateral às 3 horas, a 250 nm (fase móvel: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN),, fluxo 1mL/min e injeção 10 µ). ....	45
<b>Figura 25</b> - Cromatogramas das <i>para</i> cloro-cationonas, zona basolateral às 3 horas, a 262 nm (fase móvel: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN), fluxo 1 mL/min e injeção 10 µL). ....	45
<b>Figura 26</b> - Valores das percentagens de permeação (%) das oito cationonas sintéticas para o lado basolateral da monocamada de células Caco-2 diferenciadas, ao fim de 3h e 6 h de incubação. ....	46

<b>Figura 27</b> - (A) Cromatograma do atenolol, zona apical e basolateral às 6 horas; (B) Espectro UV-Vis do atenolol, a 275 nm (fase móvel: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN)), concentração de 0,8 mg/mL..	48
<b>Figura 28</b> - Cromatograma dos compostos extraídos, presentes no interior das células HepG2, a 262 nm (fase móvel: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN)).	49
<b>Figura 29</b> - Clustering dos metabolitos obtidos nas células controlo (vermelho) e células expostas à 4'-CEC (verde), na linha celular HepG2, com recurso ao <i>Metaboscape</i> para o modo positivo.	50
<b>Figura 30</b> - Gráfico PCA dos metabolitos obtidos nas células controlo (vermelho) e células expostas à 4'-CEC (verde), na linha celular HepG2, com recurso ao <i>Metaboscape</i> para o modo positivo.	50
<b>Figura 31</b> - Gráfico Volcano dos metabolitos diferentes obtidos nas células controlo (laranja) e células expostas à 4'-CEC (verde), na linha celular HepG2, com recurso ao <i>Metaboscape</i> para o modo positivo.	51
<b>Figura 32</b> - Gráfico $\text{Log}_2(\text{Fold Change})$ dos compostos mais abundantes, nas células controlo (laranja) e células tratadas (verde) da linha celular HepG2, para o modo positivo; identificação dos compostos na tabela 7.	51
<b>Figura 33</b> - SDS-PAGE 4-12 % ( <i>Bis-Tris</i> ), perfil de proteínas extraídas de células HepG2 controlo (C) e de células HepG2 expostas 24 h à catinona 4'-CEC, marcadores da ThermoScientific Page Ruler Prestained Protein Ladder 10-180 kDa (M), linha celular HepG2.	55
<b>Figura 34</b> - Perfil das bandas das proteínas (intensidade vs distância) presente no gel de SDS-PAGE: (A) controlo e (B) células tratadas com 4'-CEC, utilizando a linha celular HepG2.	55
<b>Figura 35</b> - Valores das áreas dos picos correspondentes às bandas presentes no gel SDS-PAGE e áreas normalizadas (ÁreaN) para o marcador (M), células controlo (C) e células tratadas (CEC), utilizando a linha celular HepG2.	56
<b>Figura 36</b> - Parâmetros farmacocinéticos (adaptado através do <i>biorender</i> ).	57
<b>Figura 37</b> - Curva de calibração área do pico em função da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ), do composto 3'-CMC.	82
<b>Figura 38</b> - Curva de calibração área do pico em função da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ), do composto 4'-CMC.	82
<b>Figura 39</b> - Curva de calibração área do pico em função da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ), do composto 3'-CEC.	82

<b>Figura 40</b> - Curva de calibração área do pico em função da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ), do composto 4'-CEC.....	83
<b>Figura 41</b> - Curva de calibração área do pico em função da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ), do composto 3'-CBC.....	83
<b>Figura 42</b> - Curva de calibração área do pico em função da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ), do composto 4'-CBC.....	83
<b>Figura 43</b> - Curva de calibração área do pico em função da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ), do composto 3'-CI-DEC.....	84
<b>Figura 44</b> - Curva de calibração área do pico em função da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ), do composto 4'-CI-DEC.....	84
<b>Figura 45</b> - Cromatograma das catinonas sintéticas com o cloro em posição <i>meta</i> , zona basolateral às 6 horas, a 250 nm (fase móvel: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN) fluxo de 1 mL/min e injeção de 10 $\mu\text{L}$ ). .....	85
<b>Figura 46</b> - Cromatograma das catinonas sintéticas com o cloro em posição <i>para</i> , zona basolateral às 6 horas, a 262 nm (fase móvel: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN) fluxo de 1 mL/min e injeção de 10 $\mu\text{L}$ ). .....	85
<b>Figura 47</b> - Cromatograma das catinonas sintéticas com o cloro em posição (A): <i>meta</i> e (B): <i>para</i> , zona apical às 6 horas, a (A) 250 nm e (B) 262 nm (fase móvel: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN) fluxo de 1 mL/min e injeção de 10 $\mu\text{L}$ ). Diluições: 1:200 (3'-CBC), 1:500 (3'-CMC, 3'-CEC, 3'-CI-DEC, 4'-CMC, 4'-CBC e 4'-CI-DEC) e 1:1000 (4'-CEC).....	86
<b>Figura 48</b> - Valores das concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) da zona basolateral, ao tempo 3h e 6h, linha celular Caco-2. ....	86
<b>Figura 49</b> - Valores das concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) da zona apical, às 0 h (IC50) e às 6 h, linha celular Caco-2. ....	86
<b>Figura 50</b> - Cromatogramas dos metabolitos obtidos após exposição com a 4'-CEC, na linha celular HepG2, através da análise por LC-QTOF-MS/MS: (A) modo positivo e (B) modo negativo, utilizando o <i>software Datanalyses</i> . ....	89
<b>Figura 51</b> - Cromatogramas dos metabolitos obtidos sem exposição, ou seja, o controlo, na linha celular HepG2, através da análise por LC-QTOF-MS/MS: (A) modo positivo e (B) modo negativo, utilizando o <i>software Datanalyses</i> . ....	90

<b>Figura 52</b> - Curva de calibração de BSA (0,1 mg/mL), para quantificação de proteínas, no método de Bradford. ....	91
<b>Figura 53</b> - Curva de calibração logaritmo da massa molecular em função da mobilidade relativa ( $R_f$ ), referente às bandas do marcador (Figura 42). ....	92
<b>Figura 54</b> - Perfil das bandas das proteínas (intensidade vs distância) presentes no marcador do gel de SDS-PAGE: (A) primeira eletroforese e (B) liofilizado e repetição, utilizando a linha celular HepG2. ....	92
<b>Figura 55</b> - Perfil das bandas das proteínas (intensidade vs distância) extraídas das células controle, presente no gel de SDS-PAGE: (A) primeira eletroforese e (B) liofilizado e repetição, utilizando a linha celular HepG2. ....	93
<b>Figura 56</b> - Perfil das bandas das proteínas (intensidade vs distância) extraídas das células tratadas com a 4'-CEC, presente no gel de SDS-PAGE: (A) primeira eletroforese e (B) liofilizado e repetição, utilizando a linha celular HepG2.....	94



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Dose típica de consumo e vias de administração da Khat, catinona, mefedrona, metcatinona e metilona (Adaptado de Rosenbaum <i>et al.</i> , 2012). .....	8
<b>Tabela 2</b> - Efeitos provocados pelo consumo de catinonas sintéticas (Adaptado de Nelson <i>et al.</i> , 2014). .....	10
<b>Tabela 3</b> - Modelos de absorção intestinal para compostos farmacológicos (Adaptado de Breemen & Li, 2005).....	14
<b>Tabela 4</b> - Valores de IC50 (mM), intervalo de confiança de 95%, declive de Hill e concentração mínima de catinona com efeitos adversos observáveis (LOAEL), para células da linha celular Caco-2 indiferenciadas. ....	34
<b>Tabela 5</b> - Valores do comprimento de onda ( $\lambda$ ), declive, ordenada na origem, $r^2$ e erro associado à estimativa da concentração, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) em $\mu\text{g/mL}$ , para as catinonas. ....	44
<b>Tabela 6</b> - Valores da %permeação/hora e coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{\text{app}}$ ), para as oito catinonas estudadas. ....	47
<b>Tabela 7</b> - Compostos identificados nas células controlo e expostas à 4'-CEC, tempo de retenção, m/z e intensidades, da linha celular HepG2, no modo positivo. ....	52
<b>Tabela 8</b> - Parâmetros obtidos na análise <i>in silico</i> , para a CMC e CEC, com o <i>software admetSAR</i> . .	58
<b>Tabela 9</b> - Parâmetros obtidos na análise <i>in silico</i> , para a CBC e Cl-DEC, com o <i>software admetSAR</i> . .....	59
<b>Tabela 10</b> - Composição da solução de HBSS. ....	81
<b>Tabela 11</b> - Valores de CNV (inviabilidade celular) e respetivo desvio-padrão, utilizados nas curvas dose-resposta de citotoxicidade das oito catinonas sintéticas (gama de 1 a 10 mM), para a linha celular Caco-2. ....	81
<b>Tabela 12</b> - Valores dos tempos de retenção ( $t_r$ ) e concentrações ( $C_t$ ) para a zona basolateral, ao tempo 3 e 6 horas, para as catinonas. ....	87
<b>Tabela 13</b> - Valores das concentrações (C) iniciais e às 6 horas, com respetivos tempos de retenção ( $t_r$ ), para a zona apical; valores da diferença (%) entre a concentração inicial e final, para as catinonas. ...	87
<b>Tabela 14</b> - Análise estatística dos valores de permeação (%) para as oito catinonas sintéticas.....	87
<b>Tabela 15</b> - Valores de parâmetros estatísticos para a permeação (%) ao tempo 3 horas, para cada catinona. ....	88

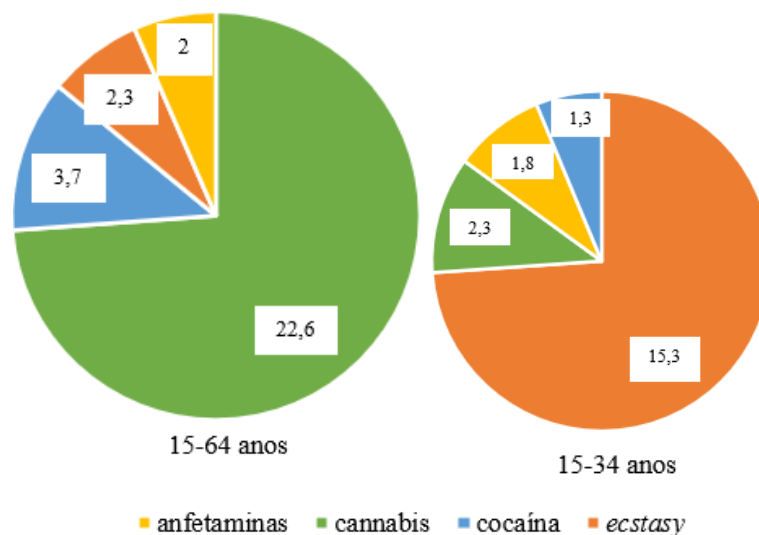
<b>Tabela 16</b> - Valores de parâmetros estatísticos para a permeação (%) ao tempo 6 horas, para cada catinona. ....	88
<b>Tabela 17</b> - Valores da massa e quantidade a ser permeada no intestino, com uma toma de 200 mg de catinona. ....	88
<b>Tabela 18</b> - Valores dos pesos moleculares (MW), distâncias percorridas e $R_f$ das bandas presentes no perfil do marcador. ....	91
<b>Tabela 19</b> - Valores das distâncias percorridas (L), $R_f$ e pesos moleculares de algumas bandas das células controlo, da linha celular HepG2. ....	94
<b>Tabela 20</b> - Valores das distâncias percorridas (L), $R_f$ e pesos moleculares de duas bandas, das células expostas à 4'-CEC, da linha celular HepG2. ....	95
<b>Tabela 21</b> - Parâmetros obtidos na análise in silico, para a CMC e CEC, com o <i>software pkCSM</i> . ....	95
<b>Tabela 22</b> – Parâmetros obtidos na análise in silico, para a CMC e CEC, com o <i>software SwissADME</i> . ....	95
<b>Tabela 23</b> – Parâmetros obtidos na análise in silico, para a CBC e Cl-DEC, com o <i>software pkCSM</i> . ....	96
<b>Tabela 24</b> – Parâmetros obtidos na análise in silico, para a CBC e Cl-DEC, com o <i>software SwissADME</i> . ....	96



# **01 Introdução**

## 1. Introdução

Em 2022, estima-se que, aproximadamente, 29% dos adultos na União Europeia, com idades entre os 15 e 64 anos, já utilizaram substâncias ilícitas. Para além dos problemas de dependência associados ao consumo deste tipo de substâncias e do risco para a saúde dos consumidores, surgem outros problemas sociais relacionados com a criminalidade, exploração de indivíduos e comunidades vulneráveis (EMCDDA, 2022). De acordo com o mais recente relatório da *European Monitoring Centre for Drugs and Drugs Addiction* (EMCDDA), a maioria dos indivíduos consumidores utilizam várias substâncias, sendo a mais utilizada a cannabis com 7,9% da população da União Europeia (15-64 anos), seguida da cocaína (1,3%), 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA ou *ecstasy*) (0,8%) e anfetaminas (0,7%) (EMCDDA, 2023). Na Figura 1 é possível observar o número de milhões de pessoas que em 2022 consumiram diferentes drogas e que entre os 15-64 anos, a droga mais consumida é a cannabis e entre os 15-34 anos é a *ecstasy*.



**Figura 1** - Número de pessoas em milhões, que consomem cannabis, cocaína, *ecstasy* e anfetaminas, na União Europeia em 2022 (Adaptado de EMCDDA, 2023).

De modo a controlar estas substâncias foram redigidos três tratados, que regulamentam o direito internacional do regime de controlo de drogas, proposto pelas Nações Unidas, com o objetivo de definir que estes compostos estejam disponíveis apenas para fins medicinais e científicos: Convenção Única sobre Estupefacientes de 1961 (alterada pelo protocolo de 1972), Convenção sobre substâncias Psicotrópicas de 1971 e Convenção contra o Tráfico Ilícito de Estupefacientes e Substâncias Psicotrópicas de 1988 (Ministério Público Portugal, 2023). A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu substâncias psicoativas como todo o tipo de substância que, quando ingerida ou administrada, afeta a mente ou processos mentais, e estas substâncias psicotrópicas de abuso foram anotadas pelos tratados internacionais relacionados com o controlo da produção e distribuição de drogas psicoativas.

### 1.1. Novas Substâncias Psicoativas

A novas substâncias psicoativas (NSP) surgiram, inicialmente, para contornar a legislação que controla as substâncias de abuso. A definição de NSP para o controlo europeu destas substâncias surgiu, pela primeira vez, em 2005, como resultado da decisão 2005/387/JAI do Conselho Europeu relativa ao intercâmbio de informações, avaliação de riscos e controlo de NSP (EUR-Lex, 2023). Posteriormente, o gabinete da Nações Unidas contra a Droga e o Crime (UNODC) definiu, de forma semelhante, o termo NSP como “substâncias de abuso, na forma pura ou de preparação, que não se encontram controladas pelas Convenções de 1961 e 1971, mas que representam uma ameaça à saúde pública” (UNODC, 2020). O novo termo representa apenas que os compostos se tornaram disponíveis recentemente no mercado e que são usados de forma ilícita (Nobre, 2019; Figueira, 2021; Tamama, 2021).

As NPS, também designadas “*Legal Highs*”, “*Herbal Highs*”, “*Research Chemicals*”, “*Party Pills*”, “*Designer Drugs*”, entre outros termos, são sintetizadas de forma a serem estruturalmente diferentes das substâncias controladas, tentando deste modo contornar a legislação, mas reproduzindo os mesmos efeitos de compostos como cannabis, cocaína, heroína, dietilamida do ácido lisérgico (LSD), MDMA (*ecstasy*) ou metanfetaminas (Figura 2) (Nobre, 2019).

No entanto, estes e outros efeitos, a maioria ainda desconhecidos, podem representar um elevado risco para a saúde do consumidor. As catinonas sintéticas são NSP que têm crescido exponencialmente no mercado, uma vez que induzem efeitos estimulantes no sistema nervoso central e periférico e ativam o sistema de compensação do cérebro, possuindo poder aditivo, são de fácil acesso e relativamente baratas (Nobre, 2019; Tamama, 2021; Almeida *et al.*, 2022).



**Figura 2** - Classificação de compostos de acordo com o efeito farmacológico (adaptado de Gonçalves *et al.*, 2019).

Desde 2005, a EMCDDA e a Agência da União Europeia para a Cooperação Policial (Europol) instalaram um sistema de alerta rápido da EU, designado *Early Warning System* (EWS) (Tamama, 2021). Em Portugal, o EWS é representado pelo Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD) e a monitorização destas substâncias é efetuada, maioritariamente, pelo Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC-PJ) em material apreendido e pelo Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INML-CF) em matrizes biológicas (Figueira, 2021).

De 2007 a 2013 foram detetadas 56 *smartshops* em Portugal, que vendiam substâncias ilícitas, onde sete delas funcionavam *online*. Geograficamente, 46% localizavam-se na área da grande Lisboa, uma loja situava-se nos Açores e a *smartshop* presente na Região Autónoma da Madeira foi fechada antes da contabilização. Foi detetado que as lojas estavam localizadas, preferencialmente, no centro das cidades ou em zonas de atividade noturna (Figura 3) (Calado, 2013).



**Figura 3** - Localização das *smartshops* em Portugal Continental (Calado, 2013).

Para além das diretivas e convenções implementadas pela União Europeia, cada país possui a sua legislação. Em Portugal foram implementados o Decreto-Lei n.º 54/2013, de 17 de abril, definindo o regime jurídico de prevenção e proteção contra a publicidade e comercialização das NSP e, para além disso, devido à elevada comercialização e elevados casos de intoxicações, potencialmente, associados ao consumo, o arquipélago da Madeira implementou a primeira legislação, Decreto Legislativo Regional n.º 28/2012/M de 25 de outubro, que permitiu a diminuição da oferta destas substâncias e encerramento das *smartshops* (Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa, 2023; SICAD, 2023).

Atualmente, a Internet, principalmente, a *deepweb*, tem um papel extremamente importante no que diz respeito à venda de substâncias designadas como “*Legal Highs*”. O facto de, tanto os fabricantes, como os fornecedores, entre outros, estarem sediados em países diferentes, torna o controlo dos mercados de droga particularmente difícil. Estas substâncias podem ser adquiridas em lojas online que se especializaram na sua venda ou serem vendidas por traficantes (Antunes, 2015).

Segundo o relatório europeu da EMCDDA de 2022, o consumo e, conseqüentemente, as apreensões de NSP diminuíram em 2020, mas não é claro se a diferença se deve à interrupção da distribuição das substâncias, reporte ou ajuda médica, ou devido à pandemia COVID-19. Em 2021 registou-se um aumento do consumo e apreensão, comparando com o ano 2020 (EMCDDA, 2023). Um ponto importante que o relatório europeu da EMCDDA de 2023 veio explorar e que tem sido um dos temas atualmente em debate, consiste na deteção destas substâncias em águas residuais, em mais de 50 países europeus (EMCDDA, 2023).

Até 2021, 8,5 toneladas de NSP foram apreendidas, com 880 compostos monitorizados pela EMCDDA, 52 deles reportados pela primeira vez na Europa (EMCDDA, 2022). Em 2022, foram reportadas, pela primeira vez, 41 novas NSP, através do EWS europeu (EMCDDA, 2023). É de notar que em 8,5 toneladas, 4 toneladas pertencem a catinonas sintéticas, tornando esta a classe de maior quantidade de apreensões em 2022.

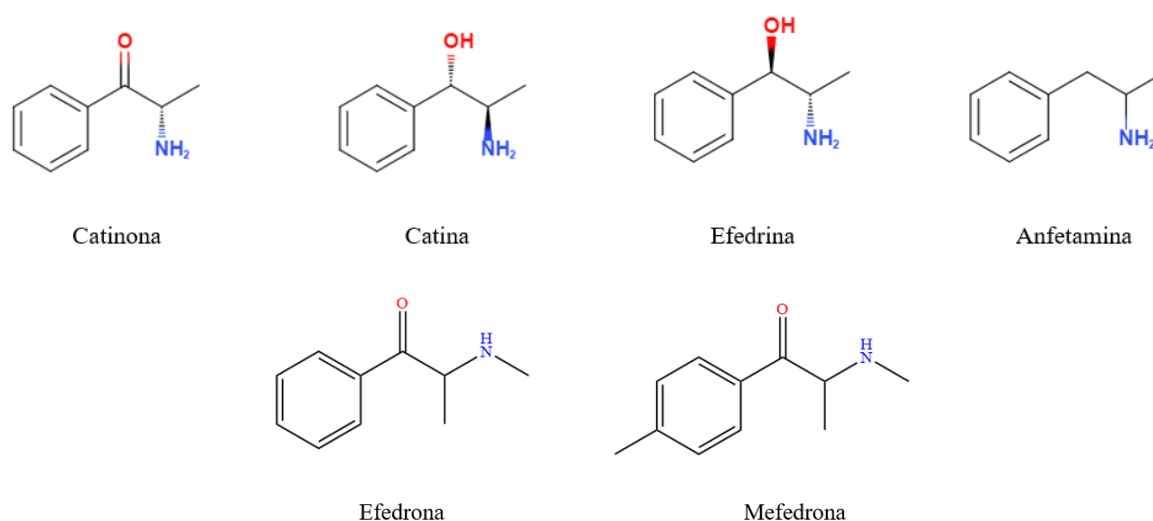
## 1.2. Catinonas Sintéticas

As catinonas sintéticas (SC), são o segundo grupo mais comum das NSP, e tal como referido, têm sido usadas como uma alternativa de drogas de abuso, devido à sua potência e fácil acesso no mercado, e devido ao aparente baixo risco de toxicidade na visão dos consumidores. Durante a sua venda em *smartshops* estas eram rotuladas, usualmente, como “fertilizantes para plantas” e com a especificação de “não para consumo humano”, de forma a dissimular que eram substâncias de abuso e para contornar a legislação (Nobre, 2019).

As SC são  $\beta$ -ceto análogos das anfetaminas (AMPHs), tendo efeitos psicoativos semelhantes aos da cocaína e das próprias anfetaminas (Zawilska, 2018; Adamowicz & Malczyk, 2019; UNODC, 2020; Almeida *et al.*, 2022). No entanto, os seus efeitos ainda não estão totalmente elucidados e o facto de por vezes serem misturadas com outros compostos, tornam os efeitos imprevisíveis.

As SC possuem uma estrutura análoga à catinona (Figura 4), um composto natural com efeito psicoestimulante presente nas folhas da planta *Catha edulis* (conhecida como Khat). Esta planta é nativa da Península Arábica e de África (Silva *et al.*, 2020; Faro *et al.*, 2020), onde mastigar as suas folhas, que contêm também alcaloides, flavonoides, aminoácidos, glicósidos, esteróis, vitaminas e minerais, tem sido tradição durante séculos em muitas culturas, sendo consumida por 90% da população masculina (Abebe, 2018; Almeida *et al.*, 2022).

Tal como a catinona, a norpseudoefedrina, também conhecida como catina, foi identificada como princípio ativo estimulante da planta Khat (Figura 4). Também nas folhas da planta Khat, além da catinona e catina foi identificada a efedrina (norefedrina), todas estruturalmente semelhantes à anfetamina (Figura 4) (Felice *et al.*, 2014; Nobre, 2019; Soares *et al.*, 2019). A semelhança estrutural destes compostos com a anfetamina e análogos, fez surgir um crescente interesse no desenvolvimento destes compostos para fins terapêuticos. As primeiras catinonas sintetizadas foram a metcatinona (efedrona) em 1928 e a metilmetcatinona (mefedrona), em 1929 (Figura 4) (Abebe, 2018; Almeida *et al.*, 2022).



**Figura 4** - Estruturas químicas da Catinona, Catina, Efedrina e Anfetamina, Efedrona e Mefedrona (Adaptado de Nobre, 2019).

A planta Khat é utilizada no tratamento de doenças respiratórias, uma vez que a catinona possui a capacidade de relaxar o músculo liso das vias aéreas. Para além disso, catinonas sintéticas como a dietilpropiona e a pirovalerona atuam como redutores de apetite. Outros fins consistem na redução da sensação de fadiga, antidepressivos, auxiliar da cessação tabágica e tratamento da dependência da cocaína e metanfetaminas (por exemplo: bupropiona, mais conhecida como Zyban) (Nobre, 2019). Apesar de as catinonas terem sido, inicialmente, utilizadas como fármacos, o seu efeito de dependência levou à remoção destes compostos do mercado (Nobre, 2019; Faro *et al.*, 2020).

A mefedrona tornou-se bastante popular, primeiro em Israel, e posteriormente, Irlanda, Escandinávia, Austrália e Reino Unido. Desde 2005 foram reportadas mais de 130 novas catinonas na Europa (EMCCDA, 2022). Na Figura 5 é possível observar os marcos mais importantes na evolução das SC que foram surgindo no mercado (Carvalho, 2017). Até ao final de 2022, as catinonas sintéticas foram consideradas o segundo maior grupo de NSP controladas, ultrapassado apenas pelos canabinóides sintéticos. Em 2022 foram reportadas 5 catinonas sintéticas, pela primeira vez. Apesar destes compostos serem também produzidos na Europa, os maiores produtores mundiais são a China e Índia (EMCCDA, 2022).

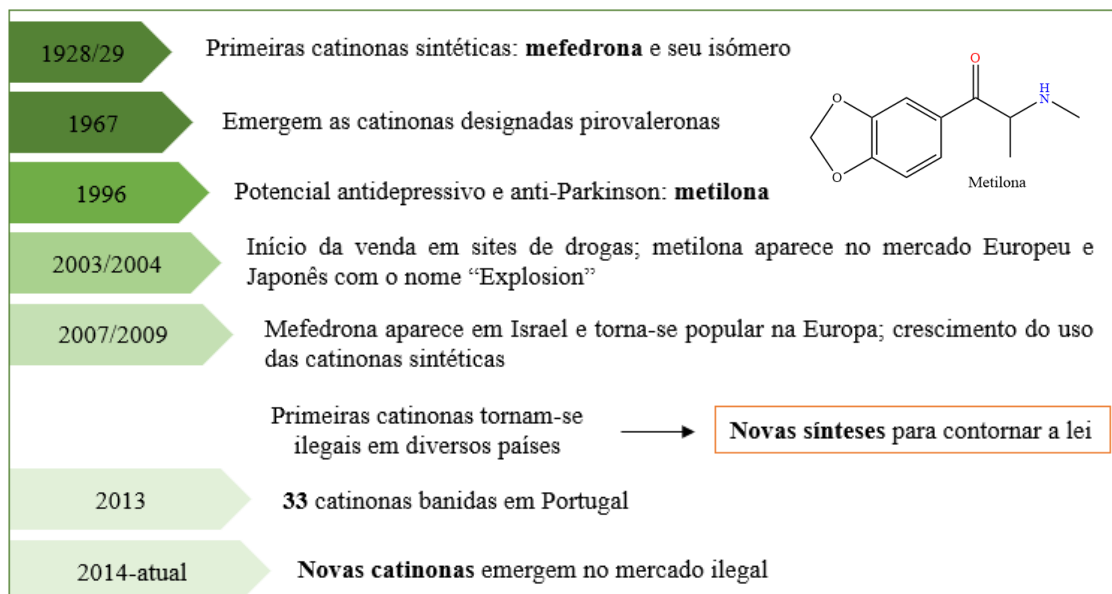


Figura 5 - Marcos importantes na história das catinonas sintéticas (adaptado de Almeida *et al.*, 2022).

### 1.2.1. Estrutura das Catinonas Sintéticas

A síntese química de catinonas é relativamente fácil e, geralmente, segue um processo de duas etapas. Normalmente, é feita uma síntese inicial de uma  $\alpha$ -bromocetona, seguida de uma substituição nucleofílica com uma amina apropriada, que forneça uma base livre. Devido à sua instabilidade, as catinonas são sintetizadas, usualmente, na forma de clorohidrato (UNODC, 2020). Na Figura 6 apresenta-se a estrutura geral das catinonas, estas têm um grupo carbonilo na posição  $\alpha$  da cadeia lateral adjacente ao anel aromático e podem ser substituídas em diferentes posições (R1 a R4). O tipo e posição dos substituintes na estrutura das catinonas sintéticas afetam a sua farmacocinética e a sua farmacodinâmica. (Oliveira, 2017; Soares *et al.*, 2019).

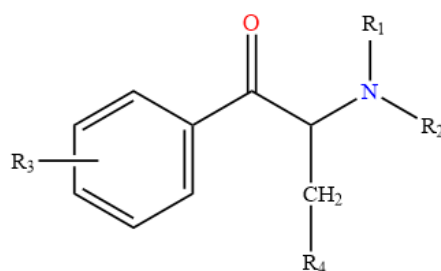
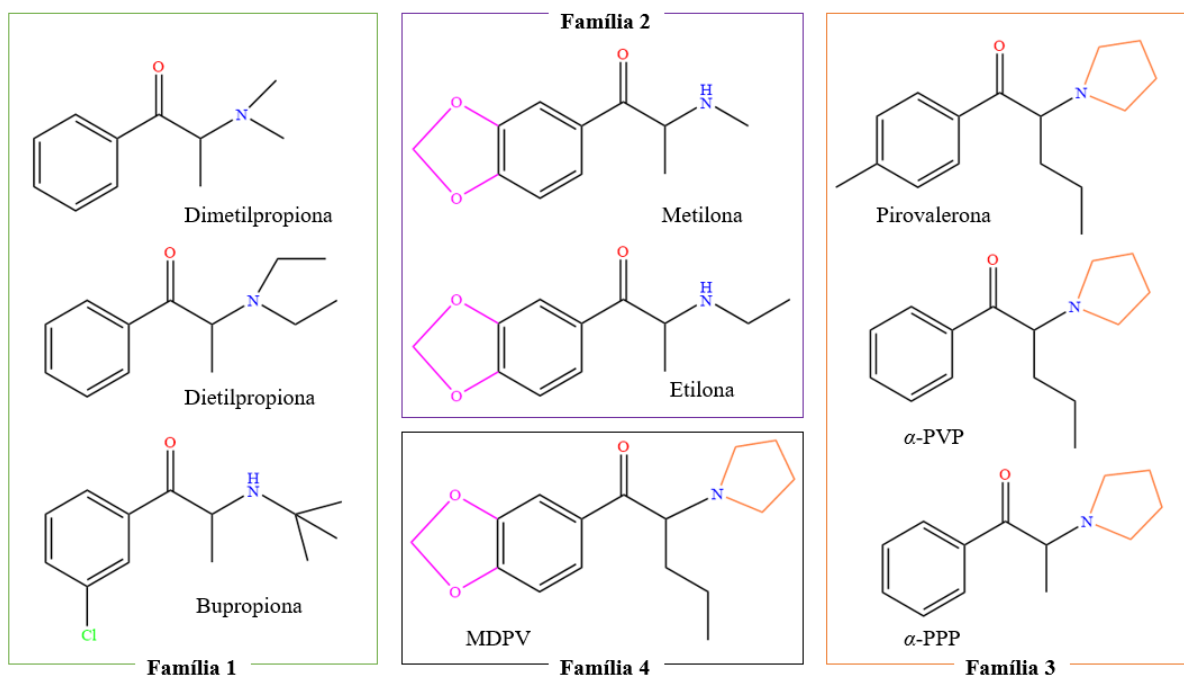


Figura 6 - Estrutura geral da catinona e padrões de substituição.

As catinonas sintéticas podem ser agrupadas em quatro famílias (Figura 7). Os compostos da primeira família têm uma cadeia alquílica no grupo amino em R1 e/ou R2, alguns dos quais substituídos no anel (R3). Como exemplo de catinonas sem substituintes no anel aromático, temos a dietilpropiona e dimetilpropiona, e com um átomo de cloro em posição 3' no anel aromático a bupropiona. A segunda família contém um grupo 3,4-metilenodioxilo ligado ao anel benzénico, como a metilona, etilona.

O terceiro grupo é composto pela família das pirrolidinofenonas, caracterizadas por terem um grupo amino cíclico, o grupo pirrolidilo, como a  $\alpha$ -pirrolidinavalerofenona ( $\alpha$ -PVP) e a  $\alpha$ -pirrolidinopentiofenona ( $\alpha$ -PPP). O quarto grupo é uma classe mista que contém catinonas com um grupo 3,4-metilenodioxilo e um grupo pirrolidilo, como a 3,4-metilenodioxipirovalerona (MDPV), que surgiu nos mercados como alternativa da anfetamina MDMA (Figura 7) (Oliveira, 2017; Nobre, 2019; Almeida *et al.*, 2022).



**Figura 7** - Derivados da catinona: famílias 1 (cadeia alquílica no grupo amino), 2 (grupo 3,4-metilenodioxilo ligado ao anel benzeno), 3 (grupo pirrolidilo) e 4 (misto).

Relativamente à monitorização das NPS e de outras substâncias psicoativas, de forma a ser possível um controlo rápido e eficaz no material suspeito é necessário proceder à sua análise por diversas técnicas analíticas que permitam a identificação inequívoca da sua estrutura química, deste modo é de extrema importância a construção de bibliotecas de dados analíticos, como é o caso da CaymanChemical e a SWGDRUG (Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs) (UNODC, 2020).

As técnicas analíticas mais utilizadas na identificação de catinonas, quer em material apreendido, são as técnicas hífenadas de cromatografia gasosa (GC) ou líquida (LC) acoplada à espectrometria de massa (MS), nomeadamente GC-MS e LC-MS. No entanto, na ausência de padrões, a cromatografia

líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um detetor UV-Vis, usualmente com uma rede de díodos (HPLC-DAD), apesar de não ser capaz de fornecer identificação estrutural das catinona sintéticas, pode ser uma ferramenta útil para a diferenciação de isómeros que apresentem os mesmos espectros de massa (UNODC, 2020; Alonzo *et al.*, 2022). Contudo, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) conjuntamente com a espectrometria de massa são as duas técnicas que devem ser utilizadas na identificação de catinonas e outras NSP, pois em conjunto, permitem a determinação da estrutura química de compostos desconhecidos.

Quando se pretende fazer a quantificação de catinonas, a técnica de HPLC-DAD, é a técnica que permite de uma forma rápida e eficaz proceder à quantificação de catinonas em diferentes matrizes (UNODC, 2020).

### 1.2.2. Efeitos das Catinonas Sintéticas e Metabolismo

As catinonas sintéticas estão disponíveis em pó, cápsulas ou comprimidos. As doses e vias de administração podem variar desde a inalação, ingestão oral, injeção intravenosa ou intramuscular, sendo as mais comuns por inalação e via oral (Tabela 1) (Grifell *et al.*, 2017; Nobre, 2019; UNODC, 2020).

**Tabela 1** - Dose típica de consumo e vias de administração da Khat, catinona, mefedrona, metcatinona e metilona (Adaptado de Rosenbaum *et al.*, 2012).

Planta	Dose típica de consumo	Via de administração
Khat	100-500 g	Oral
Composto	Dose típica de consumo	Via de administração
Catinona	200 mg	Oral
Mefedrona	150-250 mg	Oral
	5-75 mg	Inalação
Metcatinona	60-250 mg	Oral/Intravenosa/Oral
Metilona	100-250 mg	Oral

Como psicoestimulante, as catinonas sintéticas têm efeito sobre os neurotransmissores, as catecolaminas dopamina, serotonina e norepinefrina, com diferentes graus de potência. As catecolaminas exercem o seu efeito fisiológico ligando-se aos recetores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos, o que promove uma estimulação do sistema nervoso simpático. As catinonas exercem o seu efeito psicoestimulante, através do aumento da concentração sináptica destes neurotransmissores produzindo uma sobrestimulação, o que representa um elevado risco de reações adversas como agitação, delírio, convulsões, psicoses, falha de órgãos e morte, associado a um elevado potencial de abuso e dependência (Abebe, 2018; Nobre, 2019).

As catinonas podem inibir a recaptação destes neurotransmissores por interação com os transportadores de absorção de monoaminas, diminuindo assim a sua remoção da sinapse. Este processo de inibição competitiva, à semelhança da cocaína que impede a reabsorção da dopamina e da serotonina na fenda sináptica, leva ao aumento da concentração dos neurotransmissores na sinapse (Glennon & Dukat, 2017; Abebe, 2018; Figueira, 2021). Em alternativa, as catinonas sintéticas também podem proporcionar a libertação pré-sináptica excessiva das catecolaminas através da alteração do pH vesicular. Assim, as catinonas no interior das células, destabilizam as vesículas que armazenam estes neurotransmissores, o que resulta na sua libertação prematura na fenda sináptica, um processo semelhante ao desencadeado pelas anfetaminas (Soares *et al.*, 2020; Figueira, 2021).

Por outro lado, as catinonas sintéticas são inibidores parciais de monoamina oxidase, enzima responsável pela metabolização das catecolaminas, o que provoca uma diminuição da sua degradação na fenda sináptica, e, conseqüentemente a sua acumulação na fenda sináptica tem um efeito psicoestimulante (Glennon & Dukat, 2017; UNODC, 2020; Almeida *et al.*, 2022; Costa *et al.*, 2022). Os mecanismos são complexos e variam consoante a catinona em questão, daí a necessidade de estes serem investigados, de modo a elucidar a sociedade para a sua perigosidade. É de notar ainda que 95% dos consumidores destes compostos são também consumidores de álcool e/ou de outras drogas de abuso, por isso, os efeitos podem ser múltiplos e variados (Altun *et al.*, 2020).

As referências na literatura médica sobre farmacocinética e farmacodinâmica das catinonas sintéticas em humanos são ainda limitadas. Estudos efetuados em roedores demonstraram que a mefedrona ou a metilona, após administração, aumentam as concentrações extracelulares de dopamina e serotonina no cérebro. Estas substâncias provocam a estimulação locomotora em roedores, semelhante a outros estimulantes psicológicos (Soares *et al.*, 2019).

A toma de baixas doses de catinonas sintéticas promovem um estado de euforia e estado de alerta, porém, na Tabela 2 estão indicados alguns efeitos adversos graves já reportados que foram associados ao consumo de catinonas sintéticas (Abebe, 2018; Nelson *et al.*, 2014; Adamowicz, 2020; Almeida *et al.*, 2022). A nível clínico, alguns efeitos podem desaparecer ao fim de 5 horas, com a administração de benzodiazepinas ou hidratação com fluidos intravenosos (Gonçalves *et al.*, 2019). Os sintomas abrangem o sistema nervoso e cardíaco, mas podem resultar em falência de múltiplos órgãos ou mesmo morte.

**Tabela 2** - Efeitos provocados pelo consumo de catinonas sintéticas (Adaptado de Nelson *et al.*, 2014).

Sistema	Efeitos
Cardiovascular	Taquicardia, hipertensão, miocardite
Gastrointestinal	Vômitos, náuseas, dor abdominal, xerostomia
Metabólico	Acidose, hiponatremia
Ocular	Midríase, visão enevoada
Psicológico	Agressão, agitação, ansiedade, confusão, insónia, disforia, alucinações, paranoia
Renal	Insuficiência renal aguda
Sistema Nervoso Central	Hiperreflexia, tremores, convulsões, nistagmo
Outros	Hipertermia, diaforese, bruxismo, rabdomiólise, epistaxe

Dos estudos que têm sido realizados *in vitro* para compreender o efeito das catinonas sintéticas sobre linhas celulares humanas foram efetuados estudos em células neuronais humanas, SH-SY5Y, com uso de catinonas sintéticas, que apresentavam sinais de ativação de autofagia e, no geral, sinais de morte celular por apoptose (Nobre, 2019). Outros estudos já identificaram a toxicidade hepática e toxicidade em células renais, onde a causa de morte poderá ter em conta o aumento da produção intracelular de espécies reativas de oxigénio (ROS), despolarização da membrana mitocondrial e a depleção do trifosfato de adenosina (ATP) (Carvalho, 2017; Jackson *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2019; Pășkan *et al.*, 2022).

O aumento da cadeia lateral e o aumento das ramificações do grupo amino e as substituições no anel aromático têm influência no aumento da toxicidade das catinonas, sendo que estudos recentes efetuados em células hepáticas e neuronais confirmam esta hipótese (Gaspar *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2020).

Segundo Tauleigne (2023), ao estudar 21 catinonas sintéticas em células hepáticas, as catinonas mais tóxicas consistem na 3'-cloro-*N*-butilcatinona (3'-CBC) e 4'-cloro-*N*-butilcatinona (4'-CBC), com um IC50, ou seja, a concentração inibitória, de 1,18 e 0,8 mM, respetivamente.

O metabolismo de drogas e xenobióticos no organismo humano está, frequentemente, associado ao fígado. Os efeitos nas células podem ser estudados por ensaios de metabolómica. Os modelos *in vitro*, derivados de humanos, representam uma alternativa comum aos testes *in vivo*, de forma a ser possível detetar efeitos tóxicos (Canãveras *et al.*, 2015; Baranyuk, 2021).

A cultura primária de hepatócitos é considerada o padrão-ouro nestes ensaios, sendo limitada pela baixa disponibilidade de tecidos do fígado humano, elevados custos e elevada variabilidade na preparação destas células (Canãveras *et al.*, 2015; Baranyuk, 2021).

Em alternativa, são utilizadas células derivadas de linhas celulares do fígado humano. A linha celular de hepatocarcinoma humano, HepG2, é comumente utilizada em estudos de metabolismo e hepatotoxicidade. Apesar das funções metabólicas serem limitadas, oferecem vantagens como elevada

viabilidade, fácil manuseamento, tempo de vida útil, quase ilimitado, e fenótipo estável, que não depende das características do doador. Ao microscópio invertido, apresentam uma morfologia epitelial quando crescem numa superfície sólida. As células da linha celular HepG2 possuem funções como síntese e secreção de proteínas presentes no plasma, metabolismo do colesterol e triglicéridos, metabolismo e transporte de lipoproteínas, síntese de ácidos biliares, síntese de glicogénio e sinalização de insulina (Canãveras *et al.*, 2015; Vinken & Rogiers, 2015).

A abordagem de metabolómica têm sido, amplamente, utilizadas para a determinação simultânea de vários parâmetros, numa única amostra biológica, representando uma ferramenta sensível e abrangente. A metabolómica, cujo objetivo consiste em avaliar todos os metabolitos presentes numa amostra biológica, é uma alternativa na procura de marcadores de hepatotoxicidade induzida por drogas (Szeremeta *et al.*, 2021). A metabolómica evoluiu muito nos últimos anos e agora é descrita como o estudo de metabolitos, utilizando abordagens analíticas avançadas de alta resolução e bioinformática.

Embora ainda esteja em desenvolvimento na área forense, a metabolómica já é considerada uma abordagem útil para várias questões jurídicas. Por outro lado, as análises de vias metabólicas afetadas podem ser utilizadas com sucesso para explorar o comportamento de consumo, diferenciar entre uso agudo ou crónico de drogas, ou ainda, para encontrar o mecanismo de ação toxicológica em humanos (Szeremeta *et al.*, 2021).

As catinonas afetam as vias do metabolismo de lípidos, em particular, fosfolípidos e ácidos gordos, o metabolismo de aminoácidos, vias associadas a fatores de crescimento, uma vez que diminuem a produção de metabolitos essenciais para estas vias (Canãveras *et al.*, 2016; Kiseleva *et al.*, 2022). Um exemplo de estudo consiste na verificação de indução de distúrbios metabólicos em células do fígado e rim de ratos, após exposição da MDPV (Araújo *et al.*, 2020).

Os metabolitos celulares são produtos intermediários ou finais de múltiplas reações enzimáticas que incluem aminoácidos, nucleosídeos e ácidos gordos. Nesse sentido, e uma vez que o conjunto de metabolitos de baixa massa molecular (<1500 Da) presentes num sistema biológico é denominado metaboloma de uma amostra biológica, este pode ser alterado como resultado da influência de estímulos ambientais ou por substâncias exógenas, como fármacos ou drogas. A comparação do metaboloma de uma linha celular alterada com um controlo negativo pode fornecer informações em relação aos alvos celulares e às vias metabólicas afetadas pela exposição ao estímulo ou substância (Szeremeta *et al.*, 2021; Coelho, 2022).

Para a análise metabolómica de linhas celulares é necessária a extração de metabolitos das células que estão em contacto com o estímulo ou substância e, posteriormente, analisar e comparar estatisticamente com as células controlo negativo. A análise de compostos é feita recorrendo à ressonância magnética nuclear (NMR) e a espetrometria de massa (MS). Menos frequentemente, pode

ser utilizada a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Baranyuk, 2021; Szeremeta *et al.*, 2021; Coelho, 2022).

Uma técnica comum consiste na utilização de espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida (LC-MS) não direcionada, técnica hifenada de análise quantitativa e qualitativa. A LC-MS mostra grande eficiência para encontrar marcadores metabólicos. A especificidade consiste numa vantagem, porém, como a identificação por LC é baseada apenas no tempo de retenção, uma vez que muitos compostos podem possuir o mesmo tempo de retenção, é importante a associação desta técnica com a possibilidade de obter espectros de massa. A combinação LC-MS é então uma ferramenta eficaz na separação de compostos (Antunes, 2018; Gonçalves *et al.*, 2021). A posterior análise da informação obtida pode ser feita através de ferramentas de estatística e bioinformática com recurso a base de dados biológicos.

### 1.2.3. Absorção Gastrointestinal das Catinonas Sintéticas

A absorção do trato gastrointestinal é o primeiro passo, que influencia a entrada de uma substância na circulação sanguínea e, eventualmente, a sua chegada a determinados tecidos quando consumida oralmente, o que pode ser crucial para avaliar o seu metabolismo e a toxicidade (Breemen & Li, 2005).

As células epiteliais do intestino delgado estão dispostas em monocamadas, altamente polarizadas e dispostas lado a lado limitando os espaços intracelulares. As células mais abundantes no intestino delgado são designadas enterócitos. A principal função destas células é absorver substâncias do lúmen intestinal e transportá-las para a corrente sanguínea. Os enterócitos possuem dois domínios: apical e basolateral (Figura 8). Na membrana apical estão presentes microvilosidades altamente compactadas, aumentando a superfície da membrana cerca de 100 vezes. A vida de um enterócito é cerca de 2 a 5 dias, sendo que nos humanos, o epitélio intestinal é renovado a cada 4 a 5 dias (Baker, 2014).

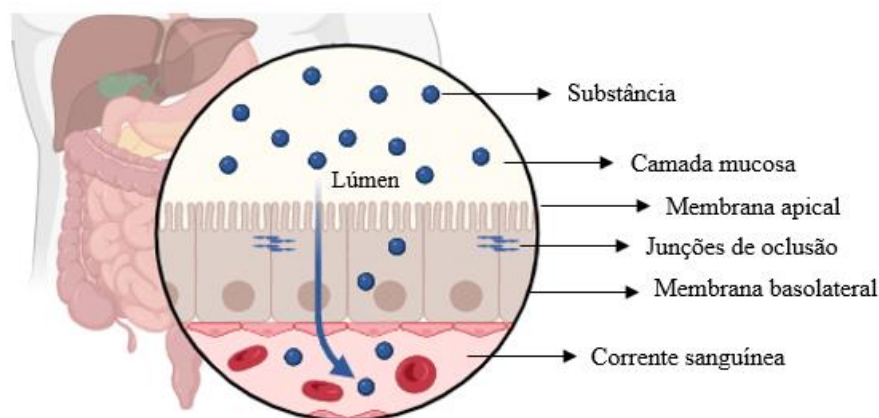


Figura 8 - Componentes da barreira gastrointestinal (adaptado através do *biorender*).

A absorção intestinal de compostos administrados oralmente ocorre, essencialmente, por difusão passiva paracelular e transcelular. Na difusão passiva paracelular ocorre permeação de compostos entre as junções entre células, através da rota aquosa extracelular, sendo as junções de oclusão a maior limitação desta via. A difusão passiva transcelular permite maior absorção uma vez que ocorre através da membrana celular das células epiteliais (Breemen & Li, 2005).

Dos fatores que influenciam a absorção intestinal de compostos químicos, como drogas, a taxa de dissolução e a sua solubilidade são os mais influentes. A lipofilicidade de moléculas tem sido comumente usada na previsão *in silico* da sua permeabilidade, sendo determinada através do coeficiente de partição entre o octanol e água. No entanto, existe uma diferença substancial quando comparado com o coeficiente de partição membrana e água (Breemen & Li, 2005; Zhao *et al.*, 2022).

Devido à necessidade de ensaios experimentais da permeabilidade intestinal, para avaliar a permeação de substâncias, como drogas, têm sido desenvolvidos métodos experimentais para determinar a permeabilidade de compostos na barreira gastrointestinal, para compostos farmacológicos que se encontram na Tabela 3. Alguns dos métodos mais sofisticados são a cromatografia por membrana artificial imobilizada e os ensaios de permeabilidade por membrana artificial paralela (PAMPA). Contudo, as membranas artificiais são substancialmente diferentes do epitélio gastrointestinal, carecendo de poros, proteínas transportadores e enzimas, que influenciam a absorção intestinal. Portanto, apesar de serem úteis, possuem limitação para compostos pequenos, hidrofílicos ou transportados por proteínas (Breemen & Li, 2005).

Outros estudos da permeabilidade gastrointestinal utilizam linhas celulares, como a linha celular do rim canino Madin Darby (MDCK), e a mais popular, a linha celular adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) (Breemen & Li, 2005; Kamiya *et al.*, 2020; Volpe, 2011).

**Tabela 3** -Modelos de absorção intestinal para compostos farmacológicos (Adaptado de Breemen & Li, 2005).

Modelo	Vantagens	Desvantagens
<b>Não Biológicos</b>		
Cromatografia de Membrana Artificial Imobilizada	Difusão transcelular passiva	Baixo rendimento. Não é possível modelar efeitos de transportadores, transporte vesicular, sistemas de efluxo ou difusão paracelular
Permeabilidade da Membrana Artificial Paralela	Modelo <i>High-throughput</i> de difusão transcelular passiva	Não é possível modelar efeitos de transportadores, transporte vesicular, sistemas de efluxo ou difusão paracelular
Modelação Computacional <i>in silico</i> de Difusão de Membrana	Modelo <i>High-throughput</i> de difusão transcelular passiva de baixo custo	
<b>Biológicos</b>		
Animal <i>in vivo</i>	Abrange mecanismos de absorção, efluxo e metabolismo	Caro e baixo rendimento. Papéis individuais da absorção intestinal e do metabolismo hepático na biodisponibilidade não delineados
Segmentos Intestinais <i>in situ</i>		Caro e baixo rendimento. Usa tecido não humano. Requer grandes quantidades de compostos de teste
Sacos intestinais inertido	Determinação de permeabilidade intestinal precisa	Viabilidade perdida rapidamente. Tecido fresco necessário para cada ensaio. Muitas vezes danificado durante a preparação
Mucosa Intestinal/ Câmara de Ussing		
Vesícula de Membrana Isolada	Pode ser criopreservada	Muitas vezes danificado durante a preparação. As enzimas não possuem polaridade apical e basolateral
Monocamadas células Caco-2	Modelos de permeabilidade transcelular e paracelular, transporte vesicular, transporte ativo, transporte facilitado e sistemas de efluxo	Baixa taxa de transferência. Baixa expressão intestinal de citocromo P450
Células Caco-2 tratadas com vitamina D <sub>3</sub> (expressão citocromo P450 3A4)	Modelos de permeabilidade transcelular e paracelular, transporte vesicular, transporte ativo, transporte facilitado e sistemas de efluxo e metabolismo intestinal	Baixo rendimento

A linha celular Caco-2 frequentemente, utilizada para avaliar a permeabilidade de drogas, representa uma ferramenta reprodutível e barata, com boa transição para modelos *in vivo*, uma vez que mimetiza o processo que ocorre na barreira gastrointestinal humana, pois possui transportadores, hidrolases e as enzimas mais representativas do intestino delgado (Sun *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2022). As células Caco-2 têm sido utilizadas como modelo de absorção intestinal humano desde o final da década de 1980.

Atualmente, são uma ferramenta *standard* para os ensaios referidos. Derivam do adenocarcinoma do cólon epitelial humano, sendo diferenciadas espontaneamente em monocamadas de células epiteliais polarizadas, durante vários dias, para expressarem junções entre células, permitindo resultados da absorção transcelular e paracelular (Breemen & Li, 2005; Patil, *et al.*, 2011).

A linha celular Caco-2 é diferenciada no mínimo em 10 dias, em superfícies semipermeáveis de policarbonato, em *inserts* que encaixam numa microplaca de 6, 12 ou 24 poços, permitindo a conexão do lado apical com o basolateral, que representam, respetivamente, o lúmen e sangue/linfa mesentérica. De forma a se realizarem estudos *in vitro* confiáveis, é necessária a caracterização das propriedades e controlo de qualidade das monocamadas epiteliais (Pires, 2018). Para avaliar a integridade da monocamada, antes do ensaio é medida a resistência elétrica transepitelial (TEER) através de um voltímetro, cujo valor tem de ser superior a  $250 \Omega/\text{cm}^2$  (Breemen & Li, 2005). Valores TEER entre 62 a  $1290 \Omega.\text{cm}^2$  foram relatados para monocamadas Caco-2 (Pires, 2018).

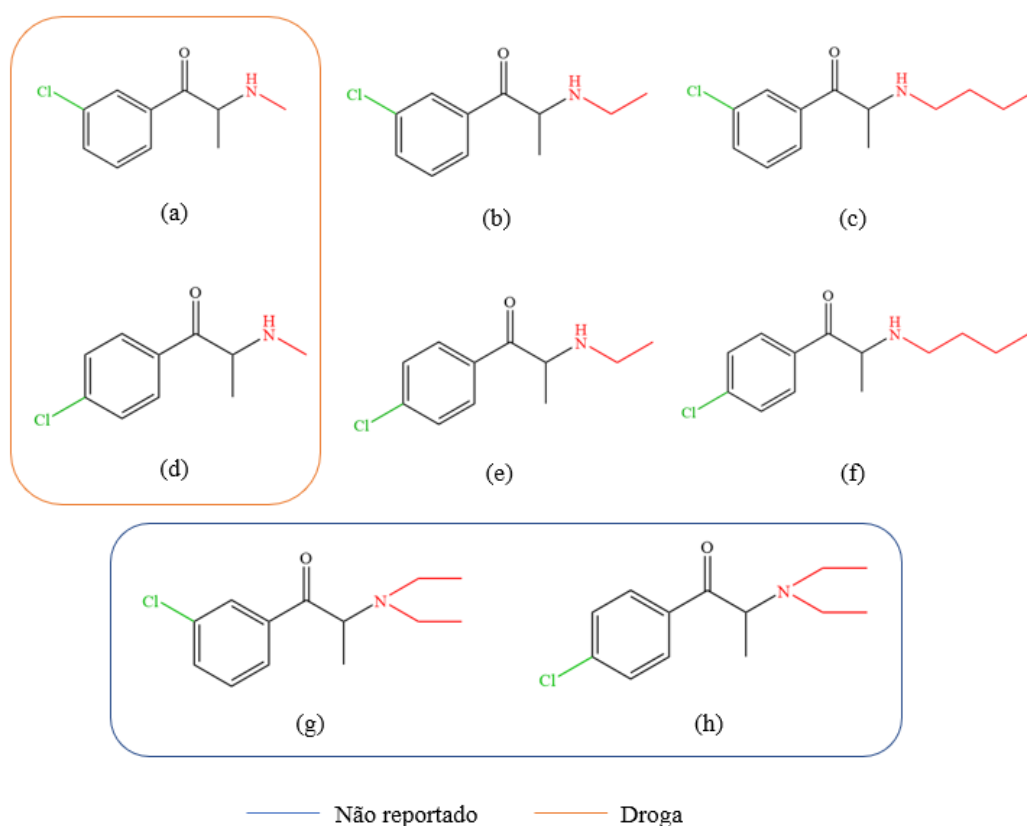
Estudos de Minaleshewa *et al.* (2016), indicam que a catinona apresenta melhor permeabilidade do que outros compostos presentes na planta Khat. Embora as catinonas sintéticas sejam amplamente estudadas, a permeabilidade da maioria dos compostos na barreira gastrointestinal é ainda desconhecida, tendo sido estudada para a pentedrona, metilona e MDPV, no modelo Caco-2, com valores de permeabilidade aparente superiores a  $1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ , sendo considerados compostos com permeabilidade moderada a alta (Silva *et al.* 2020; Almeida *et al.*, 2022).

### 1.3. Enquadramento do trabalho

Na sequência do protocolo de colaboração entre o Laboratório de Polícia Científica (LPC) da Polícia Judiciária (PJ) e a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) vários trabalhos têm sido desenvolvidos sobre NSP. Alguns destes trabalhos efetuaram a identificação, a caracterização estrutural e estudaram efeitos biológicos associados ao consumo de diversas catinonas sintéticas, nomeadamente a sua hepatotoxicidade, efeitos sobre o sistema colinérgico e sobre células neuronais dopaminérgicas.

No entanto, dada a diversidade de NSP que aparecem no mercado e o pouco conhecimento disponível sobre potenciais riscos associados ao seu consumo, existe ainda a necessidade de aprofundar a investigação. O estudo efetuado nesta tese final de mestrado sobre as catinonas sintéticas consiste no prosseguimento desses estudos.

Posto isto, o presente trabalho teve por base continuar o estudo de oito catinonas sintéticas [3'-cloro-*N*-metilcatinona (3'-CMC), 3'-cloro-*N*-etilcatinona (3'-CEC), 3'-cloro-*N*-butilcatinona (3'-CBC), 3'-cloro-*N,N*-dietilcatinona (3'-Cl-DEC), 4'-cloro-*N*-metilcatinona (4'-CMC), 4'-cloro-*N*-etilcatinona (4'-CEC), 4'-cloro-*N*-butilcatinona (4'-CBC), 4'-cloro-*N,N*-dietilcatinona (4'-Cl-DEC)] em células humanas, de forma a contribuir para a evolução do conhecimento (Figura 9).



**Figura 9** - Catinonas sintéticas utilizadas no trabalho experimental: (a) 3'-CMC, (b) 3'-CEC, (c) 3'-CBC, (d) 4'-CMC, (e) 4'-CEC, (f) 4'-CBC, (g) 3'-Cl-DEC e (h) 4'-Cl-DEC.

As catinonas foram escolhidas numa gama de 21 compostos, por serem as mais tóxicas do trabalho efetuado por Tauleigne, 2023. É de notar que se englobaram catinonas sintéticas já reportadas e compostos que possam surgir brevemente nos mercados de drogas ilícitas.

Em 2017, a 3'-CMC, a 4'-CMC, a 3'-CEC e a 4'-CEC constavam entre as catinonas mais apreendidas na Europa, sendo que desde 2020 aumentaram significativamente as quantidades de 3'-CMC e 4'-CMC apreendidas. A 3'-CMC foi associada a 10 casos fatais na Europa entre 2019 e 2021 e em apenas 4 casos não se verificou misturas com outras substâncias psicoativas. A 4'-CEC foi associada a 2 casos fatais de overdose entre 2017 e 2019 (Pieprzyca *et al.*, 2022; UNODC, 2023).

Este trabalho pretendeu quantificar a citotoxicidade das catinonas sintéticas em células de adenocarcinoma colorretal humano caucasiano, evidenciando a influência da cadeia lateral do grupo amino e da presença de cloro no anel aromático e desenvolver um método de quantificação das catinonas sintéticas por HPLC que permitiu caracterizar as oito catinonas.

Pretendeu-se determinar a biodisponibilidade dos compostos num modelo da barreira gastrointestinal, utilizando a linha celular Caco-2 e efetuar um estudo preliminar de metabolómica de uma catinona sintética utilizando a linha celular HepG2.

## **02 Objetivos**

## 2. Objetivos

O trabalho teve por base o estudo de oito catinonas sintéticas: 3'- CMC, 3'- CEC, 3'- CBC, 3'- CI-DEC, 4'-CMC, 4'- CEC, 4'-CBC, 4'-CI-DEC, e foi dividido em três objetivos específicos:

- Determinar a biodisponibilidade das oito catinonas selecionadas num modelo da barreira gastrointestinal, utilizando a linha celular Caco-2 de adenocarcinoma colorretal humano. De modo a poder cumprir este objetivo foi necessário:
  - Avaliar a citotoxicidade das oito catinonas na linha celular Caco-2, determinando a concentração das oito catinonas que induz 50 % de morte celular (IC50).
  - Desenvolver o método de quantificação das catinonas sintéticas por HPLC-DAD das oito catinonas em solução com Hank's Balanced Salt Solution (HBSS).
- Comparação da citotoxicidade da catinona mais tóxica sobre uma linha celular normal de fibroblastos da derme humana com a hepatotoxicidade já demonstrada sobre a linha celular do fígado HepG2 do hepatocarcinoma humano.
- Estudo do efeito da catinona mais permeável 4'-CEC sobre o metaboloma das células da linha celular HepG2 por LC-HRMS e sobre as proteínas das células por SDS-PAGE. Comparação dos resultados experimentais com resultados obtidos por previsão *in silico*.



# **03 Materiais e Métodos**

### 3. Materiais e Métodos

O seguinte capítulo irá abordar os diferentes materiais e métodos utilizados ao longo do trabalho, enumerando os reagentes, equipamento e técnicas utilizadas.

#### 3.1. Material Biológico

O material biológico utilizado neste trabalho foram células das linhas celulares Caco-2 (ECACC 86010202), HepG2 (ECACC 85011430) e fibroblastos da derme humanos (ECACC 90011801), adquiridas de *European Collection of Authenticated Cell Cultures*.

#### 3.2. Substâncias Psicoativas

As amostras utilizadas neste trabalho consistiram em catinonas sintéticas, previamente sintetizadas na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa no âmbito da colaboração com o Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária: 3'-cloro-*N*-metilcatinona (3'-CMC), 3'-cloro-*N*-etilcatinona (3'-CEC), 3'-cloro-*N*-butilcatinona (3'-CBC), 3'-cloro-*N,N*-dietilcatinona (3'-CI-DEC), 4'-cloro-*N*-metilcatinona (4'-CMC), 4'-cloro-*N*-etilcatinona (4'-CEC), 4'-cloro-*N*-butilcatinona (4'-CBC), 4'-cloro-*N,N*-dietilcatinona (4'-CI-DEC).

#### 3.3. Reagentes

Os reagentes utilizados na cultura celular e método MTT foram o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) da VWR e Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) da Biowest, soro fetal bovino inativado (FBS) da Biowest, L-Glutamina (200 mM) da Corning, Antimicótico (100x com 10 000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL estreptomina e 25 µg/mL de anfotericina B) da Cytiva, Pen/Strep (50x) da Corning e HEPES da Sigma Life Science. Utilização de tripsina (10x) da Longa Biowhitaker® e tampão fosfato salino (PBS 1x) da Corning. Etanol (96%) da LAB CHEM, água destilada (Pentair wellmate™ Diwer Watermaz A2) e metanol da Honeywell, Riedel-de Haën™. Para além dos reagentes utilizados na cultura celular foram utilizados o composto MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) ultrapuro da VWR, água ultrapura (Millipore RephiDuo U Pack 1) e dimetilsulfóxido (DMSO) da VWR (>99%).

Os solventes utilizados na preparação das fases móveis para o desenvolvimento do método de HPLC-DAD foram o ácido fórmico (98%) da Panreac, o acetonitrilo da VWR (≥99,9%) e água ultrapura (Millipore RephiDuo U Pack 1).

No ensaio de permeabilidade da barreira gastrointestinal, a solução de Hank's Balanced Salt Solution foi preparada com sulfato de magnésio (97%) da Acros Organics, cloreto de potássio (>99,7%) da Fluka, fosfato monopotássico (99,5%) da Merck Pro Analysis, bicarbonato de sódio (99,7%) da

Aldrich, cloreto de sódio (99,5%) da Panreac, fosfato dissódico (99%) da Panreac e D-glucose (99%) da Hi Media. Utilização de atenolol (98%) da Acros Organics.

Para a extração de proteínas e metabolitos, o reagente adicional foi o clorofórmio (99,5%) da Merck e para a análise metabolómica, os solventes extras foram água e metanol da Chromasoly™ (LC-MS grade).

Para o método de Bradford foram utilizados os reagentes hidróxido de sódio 0,66 N da J. T. Baker, albumina de soro bovino (fração V, 96%) da VWR Pro Labo® e reagente de Bradford da VWR Life Science. Para a eletroforese SDS-PAGE em gel foram utilizados os reagentes tampão de corrida (20x) da Novex Life Technologies, Bolt® - MOPS SDS, tampão de aplicação (4x) da Novex Life Technologies, Comassie® Brilliant blue R-250 comprado na VWR Life Science, LDS Sample Buffer, marcador da ThermoScientific PAGE Ruler Prestained Protein Ladder, etanol (> 99,8%) da Honeywell, Riedel-de Haën™ e ácido acético glacial (99,9%) da VWR, Analar Normapur.

### 3.4. Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram o analisador de imagem luminescente da Healthcare Bio-Sciences (Image Quant LAS 500), autoclave da ajc (uniclave 88), balança analítica da VWR LA 124i ( $\pm 0,0001$ g), bombas a vácuo BüchiVac (V-500) e Edwards (RV3), câmara de segurança biológica de fluxo laminar (Esco® *Class II Biohazard safety cabinet*), congelador -80°C da Panasonic (Ultra-low Temperature Freezer), fonte de alimentação da eletroforese da VWR (E0302), espectrómetro de massa UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS da marca Bruker (maXis Impact II), espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu (UV-160A), hematócitometro (*Marienfeld Improved Double Neubauer*, prof.: 0,100 mm; 0,0025 mm<sup>2</sup>), HPLC-DAD (Dionex Ultimate 3000), HPLC-DAD (VWR HITACHI), incubadora da Shel Lab, liofilizador da Thermo Electron Corporation (LL3000), leitor de microplacas da Tecan Sunrise (A5082), microscópio ótico invertido da Motic (AE21, type 101M), microcentrífuga da minispin (máx. 13400 rpm, FE028), mini gel tanque da Invitrogen Thermo Fisher Scientific (A25977), ultrassons da Elma Transsonic (T460/H), vórtex da Heidolph.

### 3.5. Cultura celular

As células Caco-2 foram cultivadas em *t-flaks* 25 cm<sup>2</sup> e 75 cm<sup>2</sup> da VWR, a uma temperatura de 37°C, uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, em meio RPMI, suplementado com 10% FBS, 1% L-Glutamina e 1% Antimicótico (100x com 10 000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B). O meio foi renovado a cada 2 dias, sendo as células ressuspendidas em meio através de tripsina 1x, após atingirem 80% de confluência. O mesmo método foi utilizado para as células HepG2, com alteração do meio, DMEM, suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS), 1% L-Glutamina e 1% Antimicótico. Para os fibroblastos, o meio utilizado foi o DMEM suplementado com 10% FBS, 1%

Penicilina/Estreptomicina, 1% tampão Hepes 1M a pH 7,4, filtrado por membrana, e ainda, 1% L-Glutamina.

A criopreservação de células das linhas celulares Caco-2 e HepG2, foi feita libertando as células da fase sólida com tripsina 1x, centrifugando durante 5 minutos a 1000 rpm. Posteriormente, procedeu-se ao descarte da tripsina e adição de 900 µL de FBS, incubando 30 minutos a 37°C. Adição da suspensão celular em vials com DMSO 5% (V/V). Colocou-se no Mr. Frost (contendo isopropanol), a -80°C.

### 3.6. Determinação da citotoxicidade pelo Método MTT

A citotoxicidade das catinonas sintéticas nas linhas celulares foi efetuada através do método colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), por clivagem do anel tetrazólio. Este composto de tonalidade amarela apresenta uma carga positiva e uma estrutura lipofílica que lhe confere a capacidade de permear a membrana celular. O MTT é reduzido por ação de enzimas oxidoredutases presentes em células viáveis. Assim, ocorre a formação de cristais roxos de formazan insolúveis em água que permitem relacionar diretamente a quantidade de células viáveis (Ghasemi, *et al.*, 2021). Evidências sugerem ainda que a redução do MTT pode ser mediada pelo NADH ou NADPH, no interior das células e no exterior das mitocôndrias (Fotakis & Timbrell., 2006).

As células da linha celular Caco-2 foram cultivadas em microplacas de 96 poços da VWR (densidade  $25 \times 10^4$  células/poço), durante dois a três dias com 100 µL de RPMI em cada poço, tendo sido a contagem celular efetuada pela câmara de *Neubauer improved* (Marienfeld). Posteriormente, após remoção do meio, foram adicionados 100 µL a cada poço de soluções com catinonas sintéticas (3'-CMC, 3'-CEC, 3'-CBC, 3'-CI-DEC, 4'-CMC, 4'-CEC, 4'-CBC e 4'-CI-DEC) em meio RPMI sem FBS, durante 24 horas de incubação.

Foram utilizadas concentrações entre 0 e 10 mM, substituindo as catinonas por água ultrapura como controlo. O passo seguinte consistiu em remover a solução dos compostos, lavagem com 100 µL de PBS e adicionar de 100 µL de uma solução com 0,5 mg/mL de MTT em RPMI sem FBS, a cada poço, com incubação entre 2 a 4 h. Por fim, após formação dos cristais pelas células viáveis, removeu-se a solução de MTT e adicionou-se 200 µL por poço de metanol, de forma a dissolver os mesmos, sendo possível a leitura da absorvância no espectrofotómetro UV-Vis a 595 nm, com referência de 630 nm, após 20 min. O mesmo procedimento foi efetuado para as células hepatocarcinoma humanas (Araújo *et al.*, 2014; Präbst *et al.*, 2017).

Para os fibroblastos, o procedimento teve de ser otimizado. A concentração celular ótima foi de  $5 \times 10^4$  células/mL, tendo se efetuado centrifugação durante 5 min, a 1000 rpm. Efetuou-se a adição de 200 µL da suspensão celular em meio completo, em cada poço. Após 24 h, remoção do meio e adição de 200 µL da 4'-CBC (0,4 e 0,9 mM) em meio completo. Após 24 h, remoção da solução com meio e lavagem com PBS. Preparação de uma solução MTT 5 mg/mL com água destilada. A 0,5 mL da solução

MTT, adição de 4,5 mL de meio apenas com L-glutamina. Incubação durante 4 h, com 50 µL da solução de MTT em cada poço. Após incubação, adição de 150 µL de DMSO, diretamente em cada poço, com posterior leitura das absorvâncias.

Os dados foram analisados pelo *software GraphPad Prism 5*, sendo a viabilidade celular (CV) calculada pelo quociente entre a absorvância da amostra e a absorvância do controlo (Equação 1) e inviabilidade celular (CNV) determinadas pela Equação 2.

$$CV = \frac{Abs_{amostra}}{Abs_{controlo}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

$$CNV = 100 - CV \quad (\text{Equação 2})$$

Para cada catinona foi traçada uma curva dose-resposta, utilizando um modelo de regressão não linear através do *software GraphPad Prism 5* em que se representou a inibição celular (%) em função do logaritmo da concentração de catinona, que permitiu determinar o IC50, que corresponde à concentração da substância que leva a 50 % de morte celular.

Para os ensaios realizados, os resultados foram ajustados ao modelo de regressão não linear sigmoidal de Hill através da função log(agonista) vs resposta – FindECanything, com as equações  $\log IC_{50} = \log ICF - (1/HillSlope) * \log(F/(100-F))$  e  $Y = Bottom + (Top-Bottom)/(1+10((LogIC_{50}-X)*HillSlope))$ , onde F foi restringido a 50%. As curvas dose-resposta encontram-se expressas através da média e o desvio padrão associado a cada ensaio para uma dada concentração testada.

Este modelo de regressão não linear permite estimar a resposta mínima (Bottom), a resposta máxima (Top), o declive de Hill (Hillslope) e os valores de IC50. Determinaram-se os valores de IC50 e respetivo intervalo de confiança ao nível de confiança de 95%, os declives de Hill, que fornecem o maior valor absoluto do declive da curva dose-resposta, e a concentração mínima com efeitos adversos observáveis (LOAEL) para as oito catinonas sintéticas.

### 3.7. Desenvolvimento do método de quantificação das catinonas por HPLC-DAD

Para o desenvolvimento do método de quantificação das catinonas por HPLC-DAD foi testada uma coluna de fase reversa, a 150-4,6 ACE 3 C18 (3 µm), com diferentes programas de gradiente binários usando como eluente A - água com ácido fórmico (0,1 %) e como eluente B - metanol com ácido fórmico (0,1%) ou acetonitrilo com ácido fórmico (0,1%). Tendo sido efetuadas as experiências iniciais num HPLC-DAD da Dionex (Ultimate 3000), sem injetor automático. No entanto, tendo em conta que tinha de ser efetuada uma grande quantidade de análises, a otimização final foi efetuada num equipamento HPLC-DAD VWR HITACHI por estar equipado com um injetor automático.

Apesar de terem sido realizadas diversas condições, apenas se apresentam as condições das análises que permitiram otimizar as melhores condições.

#### Análise 1

Foram analisadas soluções individuais de cada catinona à temperatura ambiente, na concentração 1 mg/mL em água, num HPLC-DAD (Dionex Ultimate 3000), com uma coluna 150-4,6 ACE 3 C18 (3 µm). A fase móvel consistiu num gradiente de água com ácido fórmico (0,1 %) (eluyente A) e metanol com ácido fórmico (0,1%) (eluyente B), a um fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 10 µL. Programa de gradiente: 0-5 min (25% B); 5-20 min (85% B); 20-25 min (85% B); 25-26 min (25% B) e 26-30 min (25% B). A deteção foi efetuada entre os 200 e os 600 nm, tendo-se obtido os cromatogramas a 250 nm para as 3'-clorocatinonas e a 262 nm para as 4'-clorocatinonas.

#### Análise 2

Foram analisadas as soluções individuais da 3'-CMC e da 4'-CBC na concentração 10 µg/mL num HPLC-DAD (VWR HITACHI), com injetor automático (detetor L-2455, forno da coluna L-2300, autosampler L-2200 e bomba L-2130), nas mesmas condições da análise 1. Adicionalmente, as soluções foram ainda analisadas com um programa de gradiente semelhante, mas no qual o eluyente B foi substituído por uma solução de acetonitrilo com ácido fórmico 0,1%.

#### Análise 3

Foram efetuadas soluções das misturas dos isómeros *meta* e *para* das cloro-catinonas (10 µg/mL) selecionadas, a partir de soluções previamente preparadas de 50 mM. Estas soluções foram injetadas várias vezes em diferentes programas de gradientes, que permitiu obter o programa final de gradiente otimizado: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN); 17-20 min (25% ACN).

Para a construção das curvas de calibração foram preparadas soluções-padrão, em duplicado, das catinonas sintéticas (solução-padrão com as catinonas 3'-CMC, 3'-CEC, 3'-CBC e 3'-Cl-DEC e solução-padrão com 4'-CMC, 4'-CEC, 4'-CBC, 4'-Cl-DEC), com concentrações finais de cada catinona de 1, 5, 10 15, 20 e 25 µL/mL em HBSS, a partir de soluções mãe de cada catinona com concentração 50 mM (pesou-se cerca de 5 mg e dissolveu-se na quantidade de água necessária para uma concentração final da solução mãe de 50 mM).

As soluções resultantes foram analisadas por HPLC-DAD, injetando 10 µL de cada solução, com dois replicados, três vezes cada replicado, em 3 dias diferentes, no programa otimizado. Os cromatogramas foram analisados a 250 nm para as soluções com as catinonas *meta* e a 262 nm para as catinonas *para*, permitindo determinar os tempos de retenção médios para as oito catinonas estudadas e as respetivas áreas dos 18 replicados de cada concentração. Foram obtidas curvas de calibração das áreas dos picos em função da concentração para cada catinona. Os limites de deteção (LOD) e de quantificação

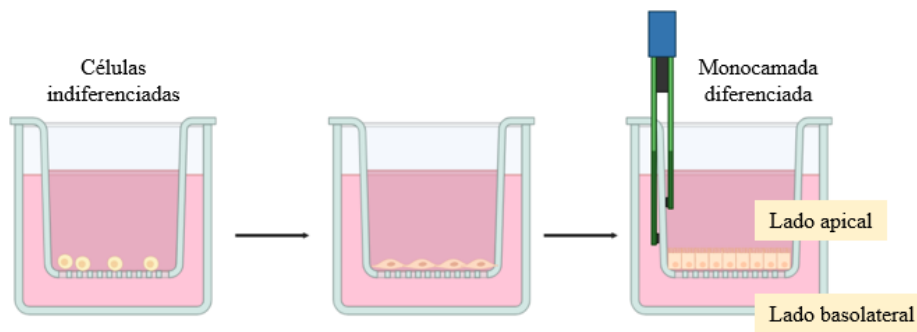
(LOQ) foram calculados para cada catinonas através das equações 3 e 4, onde  $S_{yx}$  consiste no erro e  $b$  consiste no declive. O erro de cada curva foi determinado através da função EPADYX do *Excel*, que devolve o erro-padrão da concentração em função da área do pico.

$$\text{LOD} = 3.3 \times \frac{S_{yx}}{b} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{S_{yx}}{b} \quad (\text{Equação 4})$$

### 3.8. Ensaio de Permeabilidade da Barreira Gastrointestinal

De forma a ser possível simular a barreira gastrointestinal efetuou-se um ensaio em transwell que numa microplaca de 12 poços da VWR com inserts de polycarbonato (Falcon®,  $A = 0,9 \text{ cm}^2$ ) cultivando células Caco-2 (Figura 10). Neste ensaio foi utilizada uma concentração celular de  $5 \times 10^4$  células/mL, tendo sido a contagem celular efetuada em câmara de *Neubauer improved*.



**Figura 10** - Diferenciação da monocamada da linha celular Caco-2 em transwells (adaptado através do *biorender*).

As células foram diferenciadas cerca de 14-16 dias, permitindo a formação das monocamadas, sendo o meio substituído a cada 48 h. A integridade da monocamada foi avaliada medindo a resistência elétrica celular com um medidor Millicell ERS-2 V Ohm (Millipore), sendo consideradas aptas ao apresentarem uma resistência elétrica igual ou superior a  $250 \Omega/\text{cm}^2$ . Os valores TEER são calculados multiplicando o valor da resistência obtido (após subtração do valor da resistência obtido com filtros sem células) pela área superficial da inserção da membrana, sendo o resultado expresso em  $\Omega.\text{cm}^2$ . Valores acima de  $1000 \Omega.\text{cm}^2$  indicam alta resistência. Valores baixos de TEER são, geralmente, indicativos de monocamadas com espaçamentos (Breemen & Li, 2005).

Na câmara de fluxo laminar, as células foram lavadas com Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), filtrado a  $0,22 \mu\text{m}$ , permitindo o balanço osmótico, sais essenciais e energia para o metabolismo e manutenção do pH do meio a 7,4 (Anexo I).

Na zona apical foi adicionado 0,5 mL da catinona em estudo, em HBSS, à concentração do valor  $\text{IC}_{50}$  (determinado no ponto 3.6) e na zona basolateral foi aplicado 1 mL de HBSS. Ao tempo 0, 3 e 6h de incubação das amostras a analisar, a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , foram recolhidos 150

$\mu\text{L}$  das soluções apicais e basolaterais em eppendorfs, congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sendo, posteriormente, analisados por HPLC-DAD. Foram realizados 2 ensaios para cada catinona sintética e efetuadas duas corridas para cada ensaio, da zona basolateral e apical.

Analisou-se ainda um controlo. Como controlo negativo o atenolol com uma concentração de  $0,8 \text{ mg/mL}$  (permeabilidade baixa) (Song *et al.*, 2017). A permeação das amostras foi calculada através da Equação 5, onde C consiste na concentração.

$$\text{Permeação (\%)} = \frac{C_{\text{basolateral}}}{C_{\text{apical}}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Foi possível ainda, calcular o valor da taxa de permeação por hora, através da equação 6, onde P representa a taxa de permeação.

$$\frac{\% \text{Perm}}{h} = \frac{P_{t_6} - P_{t_3}}{6 - 3} \quad (\text{Equação 6})$$

O estudo da permeabilidade utiliza ainda, frequentemente, um coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{\text{app}}$ ), como forma de quantificar os compostos, sendo calculado através da Equação 7.

$$P_{\text{app}} = \frac{V}{A \times C_i} \times \frac{C_f}{t} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde V é o volume do lado apical em mL, A é a área da membrana do insert em  $\text{cm}^2$  ( $0,9 \text{ cm}^2$ ),  $C_i$  é a concentração inicial no lado apical em  $\mu\text{M}$ ,  $C_f$  é a concentração do lado basolateral em  $\mu\text{M}$  e t é o tempo em segundos (Press & Gradin, 2008). Este parâmetro determina a quantidade de moléculas transportadas em função do tempo.

### 3.9. Extração de Proteínas e Metabolitos

De forma a ser possível extrair proteínas e metabolitos, para posterior análise, colocaram-se dois *t-flasks*  $25 \text{ cm}^2$  a incubar células da linha celular HepG2. Após confluência, colocou-se em contacto um *t-flask* com as células em meio com a concentração do IC50 ( $2,4 \text{ mM}$ ), da catinona 4'-CEC, durante 24 h. O segundo *t-flask* serviu como controlo. Na extração, lavaram-se os *t-flasks* com PBS frio, congelando a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Em cada *t-flask*, utilizaram-se  $1200 \mu\text{L}$  de uma solução composta por água, metanol e clorofórmio (10:27:3) e raspadores. A suspensão foi sonicada 3 vezes, para se obter as proteínas e metabolitos.

### 3.10. Análise Metabolómica

A obtenção de metabolitos para análise metabolómica, foi conseguida através da centrifugação de  $550 \mu\text{L}$ , durante 10 minutos, a  $1000 \text{ g}$  e a  $4^{\circ}\text{C}$ . Evaporou-se o sobrenadante na corrente de ar até à secura,

congelando, posteriormente, a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para a análise metabolómica em Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massa (LC-HRMS), adicionaram-se 75  $\mu\text{L}$  metanol e água (1:1) e centrifugou-se a suspensão durante 10 minutos, a 1000 g e a  $4^{\circ}\text{C}$ , de forma a preparar a amostra (Theodoridis *et al.*, 2012).

Para a análise LC-MS, utilizou-se um espectrómetro de massa UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS da marca Bruker (maXis Impact II) e uma coluna CSH C18 da Acquity™ Premier (2,1x100 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ), com um fluxo de injeção de 180  $\mu\text{L}/\text{h}$  do calibrante. O programa foi realizado com uma fase móvel constituída por um sistema binário de água e acetonitrilo, com um fluxo de 0,25 mL/min até aos 15 minutos e 0,30 mL/min até aos 38 min, em modo gradiente: 0-3 min (5% ACN); 3-7 min (20% ACN); 7-15 min (70% ACN); 15-25 min (85% ACN); 25-30 min (85% ACN); 30-35 min (5% ACN) e 35-38 min (5% ACN).

Os parâmetros de aquisição foram scan entre 50-1500  $m/z$ , polaridade positiva, potencial capilar 4000V, voltagem -500 a 2000 V, nebulizador a 2 bar, calor seco a  $200^{\circ}\text{C}$ , fluxo de gás seco 8 L/min.

A injeção do composto controlo e composto tratado foi efetuada três vezes. Foram utilizados os softwares *Datanalyses* de forma a ser possível calibrar os espectros, obtidos por LC-MS, com os padrões internos, e o *software Metaboscape* para identificar diferenças significativas nos metabolitos das células HepG2. A calibração da massa foi efetuada com adutos de formato e acetato de sódio, com uma escala de  $m/z$  entre 50 e 1500.

### 3.11. Quantificação de Proteínas pelo Método de Bradford

A suspensão para a quantificação de proteínas foi preparada com 50  $\mu\text{L}$  da suspensão celular de 3.9, adicionando-se 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de hidróxido de ódio 0,66 N. Para a efetuar a quantificação foi necessário construir uma curva de calibração com Albumina de Soro Bovino (BSA) 0,1 mg/mL, com concentrações entre 0 e 0,01 mg/mL. Para 5  $\mu\text{L}$  de cada concentração e suspensão controlo, adicionaram-se 795  $\mu\text{L}$  de água destilada e 200  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford. Após 5 minutos, foi possível ler a absorvância no espectrofotómetro a 595 nm. Para a amostra de 4'-CEC, em vez de 5  $\mu\text{L}$ , utilizaram-se 20  $\mu\text{L}$ , de forma a se encontrar na gama da curva de calibração.

### 3.12. Eletroforese SDS-PAGE em gel

A suspensão para a eletroforese foi preparada com 50  $\mu\text{L}$  da suspensão celular do ponto 3.9, adicionando-se 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de hidróxido de ódio 0,66 N. Prepararam-se 400 mL de tampão de corrida com água destilada, lavou-se o gel de poliacrilamida (Bolt™ 4-12% *Bis-Tris Plus*) da Invitrogen Thermo Fischer e colocaram-se as amostras a ferver durante 5 minutos. A solução do controlo continha 40  $\mu\text{L}$  de amostra, 40  $\mu\text{L}$  de tampão de aplicação e 80  $\mu\text{L}$  de água destilada. A amostra 4'-CEC continha 120  $\mu\text{L}$  de amostra e 40  $\mu\text{L}$  de tampão de aplicação.

Adicionaram-se 5 µL de marcadores num poço e 40 µL de cada solução. Efetuou-se uma corrida de 32 min, a 200V. No fim da corrida, retirou-se o gel e adicionou-se uma solução de azul de Coomassie. Após 30 min, descartou-se a solução presente e adicionou-se descorante (10% etanol e 7,5% de ácido acético). O gel permaneceu dois dias em agitação. A imagem do gel foi obtida pelo equipamento *ImageQuant LAS 500* e analisada pelo *software ImageJ*. A quantificação das proteínas feito por normalização, de forma a serem eliminados erros de quantificação, assumindo-se que em todos os poços foi aplicada a mesma quantidade de proteína (Equação 8).

$$\text{Área normalizada} = \frac{\text{Área de cada lane}}{\sum \text{Área de cada lane}} \quad (\text{Equação 8})$$

Foi repetida a eletroforese, com as amostras liofilizadas (-50°C) e ressuspensão com 100 µL água, metanol e clorofórmio (10:27:3). A 50 µL da suspensão adicionaram-se 100 µL de hidróxido de sódio. Ferver 45 µL de amostra liofilizada com hidróxido de sódio com 15 µL de tampão de aplicação e 60 µL da solução de proteínas utilizada no método de Bradford com 20 µL de tampão de aplicação. Foi efetuado o mesmo procedimento para a corrida de eletroforese.

A restante suspensão foi centrifugada durante 10 minutos, a 1000 g, a 4°C. Para análise HPLC, utilizaram-se 100 µL, congelando o restante, a -80°C.

### 3.13. Análise *In Silico*

A análise *in silico* foi realizada de forma a identificar parâmetros como a toxicidade no corpo humano, como a hepatotoxicidade, a absorção, como a permeabilidade da barreira gastrointestinal, e efeitos no metabolismo, como por exemplo, inibição. O estudo foi feito para oito catinonas sintéticas de forma a comparar com os dados experimentais obtidos. Os *softwares* utilizados foram o *pkCSM*, *SwissADME* e *admetSAR 2.0*, sendo reconhecidos como ferramentas de primeira abordagem para previsão de propriedades farmacocinéticas.

### 3.14. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi efetuada utilizando o programa Microsoft Office *Excel*, com os resultados expressos em média ± desvio padrão.

Para a análise da variância dos resultados foi aplicada *One-Way ANOVA*, complementada com *teste de Tukey* para identificar os resultados de IC50 das diferentes catinonas que diferem significativamente entre si. Foram determinadas como diferenças estatísticas não significativas os valores de *p-value* superiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Para a análise da permeabilidade da barreira gastrointestinal foi efetuado um tratamento estatístico, recorrendo à análise de variância *One-Way ANOVA*.



# **04 Resultados e Discussão**

## 4. Resultados e Discussão

As catinonas sintéticas como NSP de fácil acesso e devido aos seus efeitos psicoativos, são bastante utilizadas como drogas de abuso. Assim sendo, apresenta-se como crucial efetuar estudos sobre estes compostos, possibilitando aumentar o conhecimento sobre a sua variabilidade estrutural, a sua biodisponibilidade, quer na permeação da barreira gastrointestinal, uma vez que são habitualmente consumidas oralmente, quer na barreira hematoencefálica, a sua toxicidade, com destaque para a hepatotoxicidade e possíveis efeitos sobre outros alvos do organismo humano.

Num trabalho anterior para uma gama de 21 catinonas sintéticas (Tauleigne 2023), foi feito o estudo da relação entre a variação da estrutura das catinonas com efeitos biológicos sobre o sistema colinérgico e na citotoxicidade contra células do fígado e células neuronais diferenciadas num fenótipo neuronal dopaminérgico. O presente trabalho teve por base a continuação desse estudo selecionando oito catinonas sintéticas, por se terem apresentado como as mais citotóxicas: 3'-CMC, 4'-CMC, 3'-CEC, 4'-CEC, 3'-CBC, 4'-CBC, 3'-CI-DEC e 4'-CI-DEC, e teve o objetivo de avaliar a sua biodisponibilidade na barreira gastrointestinal e o mecanismo de ação sobre células do fígado humanas.

Este tipo de abordagem, nunca antes realizada, teve como finalidade dar um contributo para aumentar o conhecimento sobre os possíveis efeitos prejudiciais associados ao consumo destas catinonas. De modo a avaliar a permeabilidade da barreira gastrointestinal foi, inicialmente, estudada a sua citotoxicidade sobre as linhas celulares humanas Caco-2, modelo da barreira gastrointestinal e desenvolvido um método de identificação e quantificação das catinonas por HPLC-DAD. Por fim, foi efetuada uma análise metabólica do efeito da catinona 4'-CEC sobre as células hepáticas, de modo a explicar o mecanismo hepatotóxico frequentemente reportado em incidentes com consumo destas substâncias.

### 4.1. Citotoxicidade de catinonas sintéticas em linhas celulares humanas Caco-2 e fibroblastos

O ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi utilizado para avaliar *in vitro* a citotoxicidade das oito catinonas sintéticas selecionadas para este trabalho. Os resultados obtidos permitiram definir a concentração das catinonas para o ensaio posterior da análise da permeabilidade das catinonas, onde as células do adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) usadas têm de se manter viáveis, sem ocorrer perda de células.

A viabilidade das células Caco-2, usadas como modelo da barreira gastrointestinal, após exposição a soluções de concentração entre 0 e 10 mM, para as oito catinonas foi determinada pelo método descrito em 3.6. A percentagem de inviabilidade celular e respetivo desvio-padrão, para cada concentração das oito catinonas, encontram-se no Anexo II, e com os resultados obtidos foi possível elaborar as curvas de dose-resposta para as oito catinonas que constam na Figura 11, utilizando o *software GraphPad Prism*.

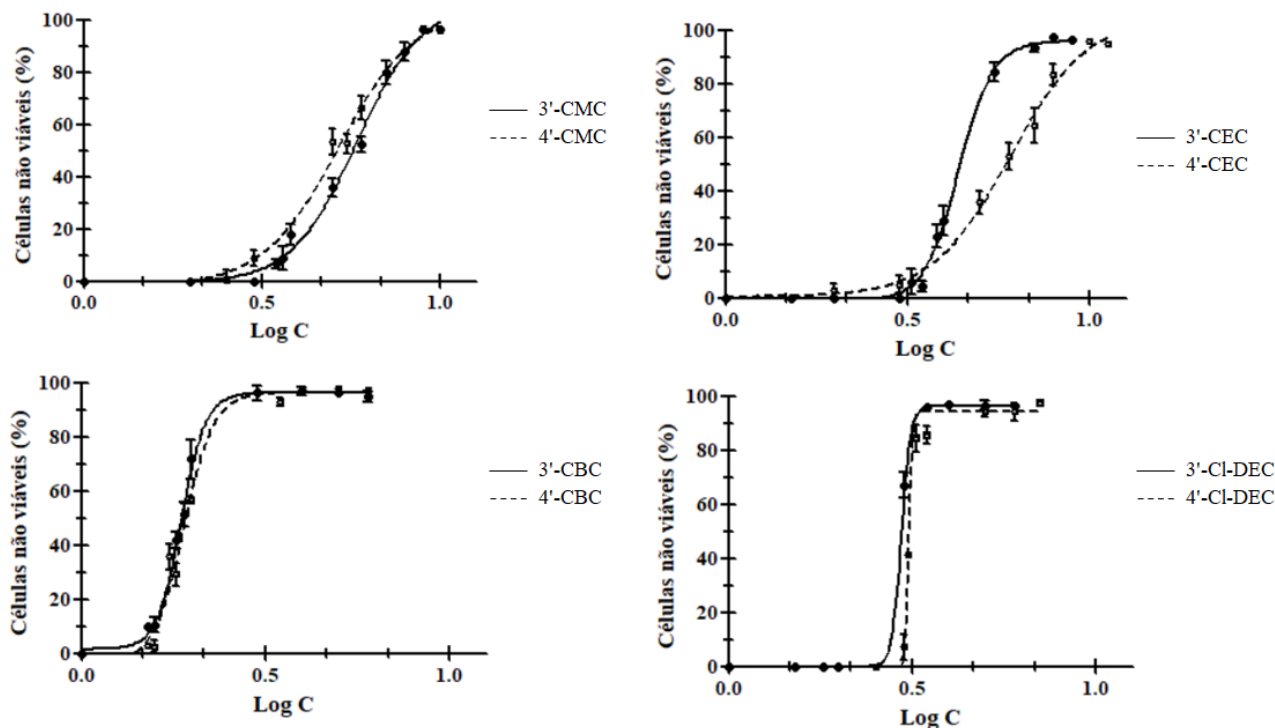


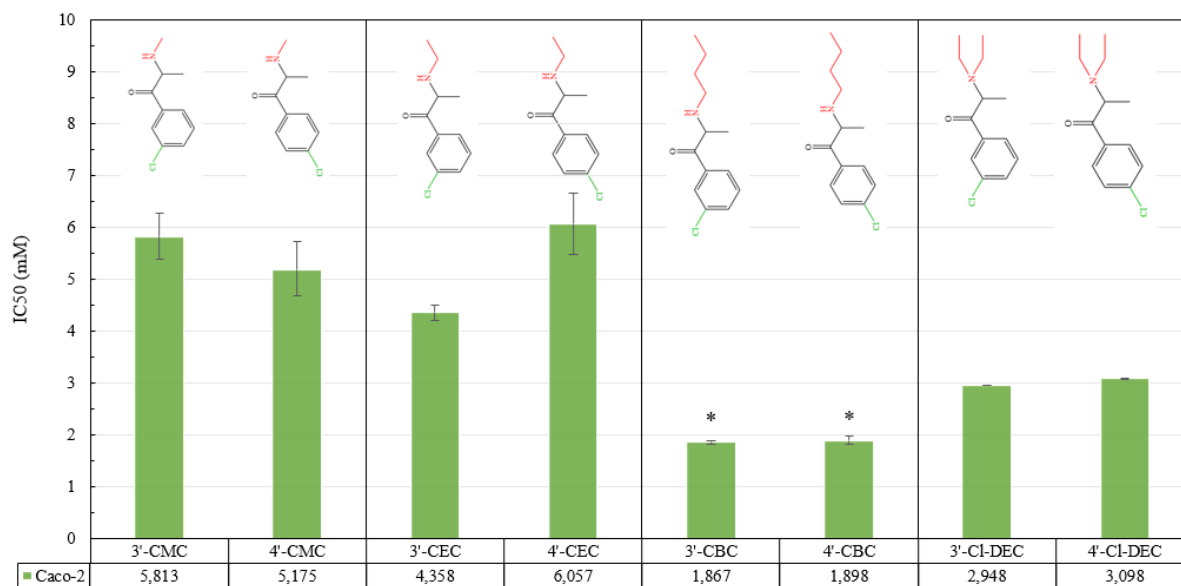
Figura 11 - Curvas dose-resposta de citotoxicidade para as oito catinonas sintéticas, utilizando a linha celular Caco-2.

A partir do ajuste do modelo de regressão não linear sigmoidal de Hill ( $r^2$  entre 0,984 e 1) foi possível obter os valores do IC50, ou seja, a concentração de catinona em que se obtém 50% das células não viáveis, e o respetivo intervalo de confiança do IC50, a inclinação da curva dose-resposta ou declive de Hill (maior valor absoluto do declive da curva) e a concentração mínima de catinona com efeitos adversos observáveis (LOAEL), Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de IC50 (mM), intervalo de confiança de 95%, declive de Hill e concentração mínima de catinona com efeitos adversos observáveis (LOAEL), para células da linha celular Caco-2 indiferenciadas.

Catinona	IC50 (mM)	Intervalo (95% IC)	Declive	LOAEL (mM)
3'-CMC	5,813	5,380 - 6,280	4,74	3,50
4'-CMC	5,175	4,681 - 5,722	4,06	3,00
3'-CEC	4,358	4,218 - 4,502	9,30	3,25
4'-CEC	6,057	5,481 - 6,653	4,07	3,50
3'-CBC	1,867	1,829 - 1,898	13,44	1,25
4'-CBC	1,898	1,819 - 1,980	10,75	1,50
3'-Cl-DEC	2,948	2,948 - 2,948	35,80	2,25
4'-Cl-DEC	3,098	3,098 - 3,099	97,92	3,00

Os valores dos IC<sub>50</sub> para as oito catinonas sintéticas foram representados na Figura 12, sendo que com a análise estatística se verificou que apenas entre a 3'-CBC e 4'-CBC o valor de IC<sub>50</sub> não tem diferença significativa para um nível de confiança de 95%. Pelos resultados obtidos, foi possível observar que as catinonas mais tóxicas para as células da linha celular Caco-2, ou seja, com menor IC<sub>50</sub>, foram a 3'-CBC e a 4'-CBC, cujos valores dos IC<sub>50</sub> foram 1,867 mM e 1,898 mM, respetivamente, seguidas das catinonas 3'-Cl-DEC e 4'-Cl-DEC. Para a catinona menos tóxica 4'-CEC, o valor do IC<sub>50</sub> obtido foi de 6,057 mM.

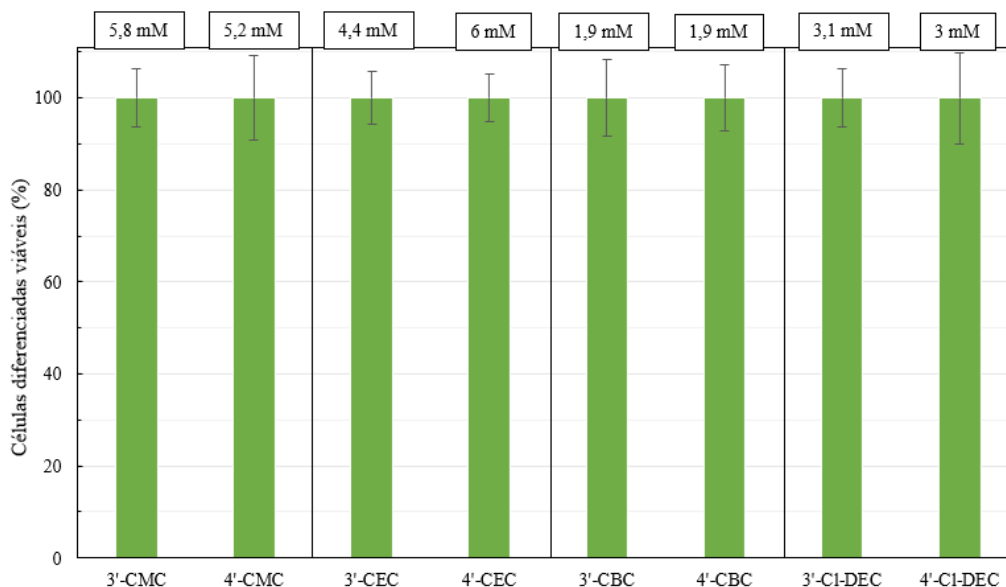


**Figura 12** - Valores de IC<sub>50</sub> (mM) para as oito catinonas sintéticas, em células da linha celular Caco-2 indiferenciadas.  
\*Não possuem diferença estatística significativa para  $p < 0,05$ .

É possível afirmar que a posição do cloro no anel aromático da catinona (*meta* ou *para*) parece não influenciar o IC<sub>50</sub>, uma vez que não se verificou um padrão de variação identificável entre os isómeros 3' e 4'. Em oposição, o aumento da cadeia lateral e das ramificações do grupo amino têm influência, ou seja, maior será a toxicidade, o que está de acordo com a literatura para outras catinonas (Greco *et al.*, 2017), ou seja, a catinona Cl-DEC por ser ramificada possui maior toxicidade em comparação com a CEC.

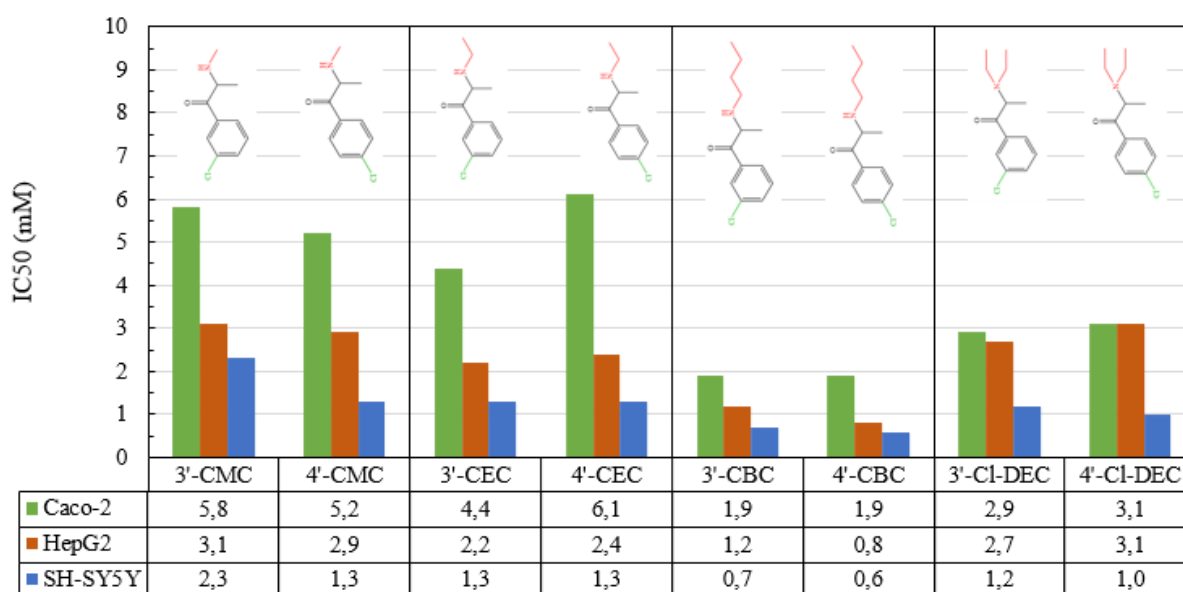
Tendo em conta que os ensaios de permeabilidade, usando como modelo da barreira gastrointestinal as células da linha celular Caco-2 diferenciadas em cultura para formação de uma monocamada de células polarizadas à semelhança dos enterócitos, foi realizado um ensaio de viabilidade celular de células Caco-2 diferenciadas durante 10 dias, na presença das catinonas usadas neste trabalho à concentração do IC<sub>50</sub> obtido para as células não diferenciadas. Os valores da percentagem de células diferenciadas viáveis, após 24h em contacto com as catinonas, e respetivos desvios-padrão podem ser observados na Figura 13. Os resultados obtidos indicam que as células Caco-2 diferenciadas são mais resistentes que as indiferenciadas, uma vez que na presença de todas as oito catinonas sintéticas, a média

de células viáveis obtida foi de 100%, demonstrando que a barreira de células se manterá na presença das catinonas, permitindo estudar a sua biodisponibilidade *in vitro*, utilizando este modelo.



**Figura 13** – Viabilidade celular para cada IC50 das oito catinonas sintéticas, na linha celular Caco-2.

Os resultados obtidos para a citotoxicidade das oito catinonas usadas neste trabalho para a linha celular Caco-2 foram comparados com um trabalho recente de Tauleigne (2023), em células da linha celular hepatocarcinoma humano (HepG2) e da linha celular neuroblastoma metástico humano (SH-SY5Y). Como se pode verificar, na Figura 14 apesar de se ter obtido valores de IC50 diferentes para diferentes linhas celulares, com maior sensibilidade nas células neuronais SH-SY5Y e menor sensibilidade para as células intestinais Caco-2, a 3'-CBC e a 4'-CBC são as catinonas mais citotóxicas para todas as linhas celulares.

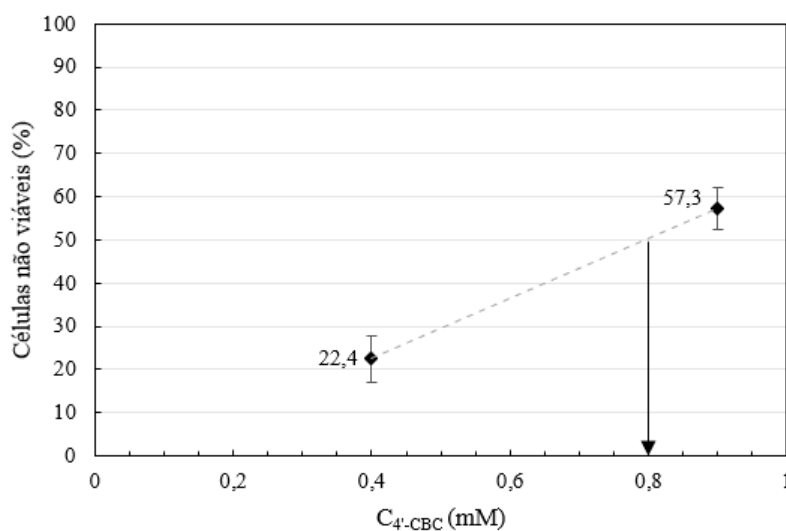


**Figura 14** - Valores de IC50 das oito catinonas sintéticas para as linhas celulares Caco-2, HepG2 (Tauleigne, 2023) e SH-SY5Y (Tauleigne, 2023).

É de notar que, as células da linha celular Caco-2 são mais resistentes do que as células das linhas celulares HepG2 e SH-SY5Y, uma vez que suportam concentrações de catinonas mais elevadas, o que já era esperado, de acordo com a literatura (Snoeck *et al.*, 2005; Vandenhaute *et al.*, 2015; Kadry *et al.*, 2020).

Para completar o estudo da citotoxicidade foi ainda realizado um ensaio preliminar de citotoxicidade da catinona sintética identificada neste trabalho como uma das mais citotóxica, a 4'-CBC, contra uma linha celular de células normais de fibroblastos humanos. Uma vez que os estudos realizados foram em linhas celulares cancerígenas, e uma vez que os fibroblastos da derme humana são células primárias, ensaios nesta linha celular fornecem uma base de comparação para estudar o impacto de drogas sobre as células normais do organismo humano (Chalkidi *et al.*, 2022; Madaleire *et al.*, 2022).

De notar que estas células têm um tempo de diferenciação maior do que linhas celulares cancerígenas, tendo sido necessário otimizar o método de ensaio de avaliação da citotoxicidade referido no ponto 3.6. Posto isto, foram testadas apenas duas concentrações da 4'-CBC, ou seja, 0,4 e 0,9 mM, escolhidas de forma a englobar o IC25 e o IC50 determinadas por Tauleigne 2023 (0,56 e 0,8 mM, respetivamente).



**Figura 15** – Percentagem de fibroblastos não viáveis para 0,4 e 0,9 mM da 4'-CBC.

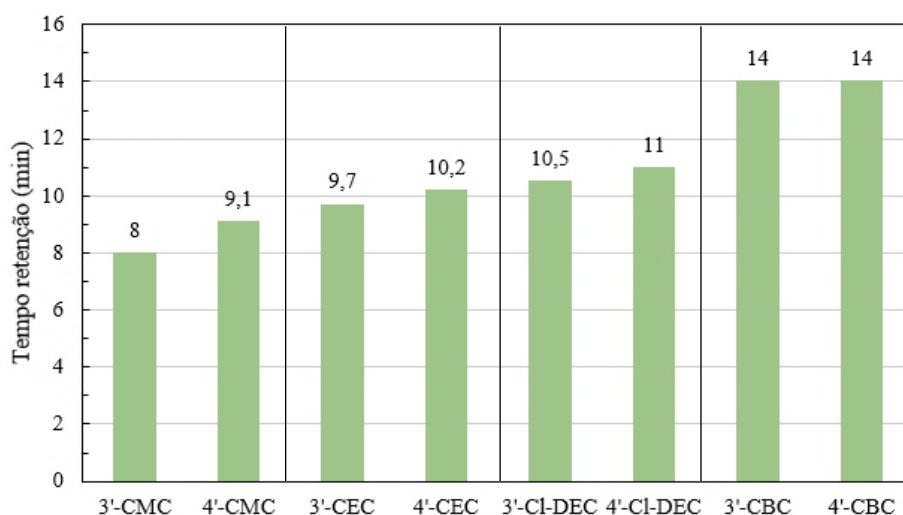
O resultado obtido para a percentagem de células não viáveis nas duas condições está presente na Figura 15, sendo previsível que o IC50 poderá estar no intervalo entre 0,4 e 0,9 mM, estimando-se de modo grosseiro um valor de 0,8 mM, um valor aproximado, ao IC50 da catinona 4'-CBC contra as células hepáticas HepG2 determinado por Tauleigne (2023). No entanto, será necessário efetuar futuramente mais ensaios para obter a curva dose-resposta, para uma mais fidedigna previsão do valor do IC50 e do efeito citotóxico das catinonas sobre linhas celulares normais. Este e os anteriores resultados estão de acordo com o conceito amplamente referenciado e frequentemente reportado da

elevada toxicidade das catinonas o que pode justificar alguns incidentes ocorridos associados ao uso destas drogas.

#### 4.2. Desenvolvimento do método de quantificação das catinonas por HPLC-DAD

Outro ponto essencial antes do ensaio de permeabilidade é a deteção e quantificação das catinonas sintéticas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detetor com arranjo de díodos (HPLC-DAD). Foram testados vários programas e otimizações, até se obter um programa com tempo mais curto e com boa resolução, tendo sempre em atenção se ocorria o efeito de memória, ou seja, deteção de compostos injetados em corridas anteriores.

Como descrito no ponto 3.7, a primeira análise foi efetuada para determinar a ordem de eluição das catinonas (1 mg/mL em água) na coluna ACE 3 C18, fluxo 1 mL/min, gradiente [0-5 min (25% B/75% A), 5-20 min de 25% B a 85% B; A – água com ácido fórmico (0,1%); B-metanol com ácido fórmico (0,1%)], deteção a 250 e 262 nm, apresentando-se na Figura 16 os respetivos tempos de retenção.

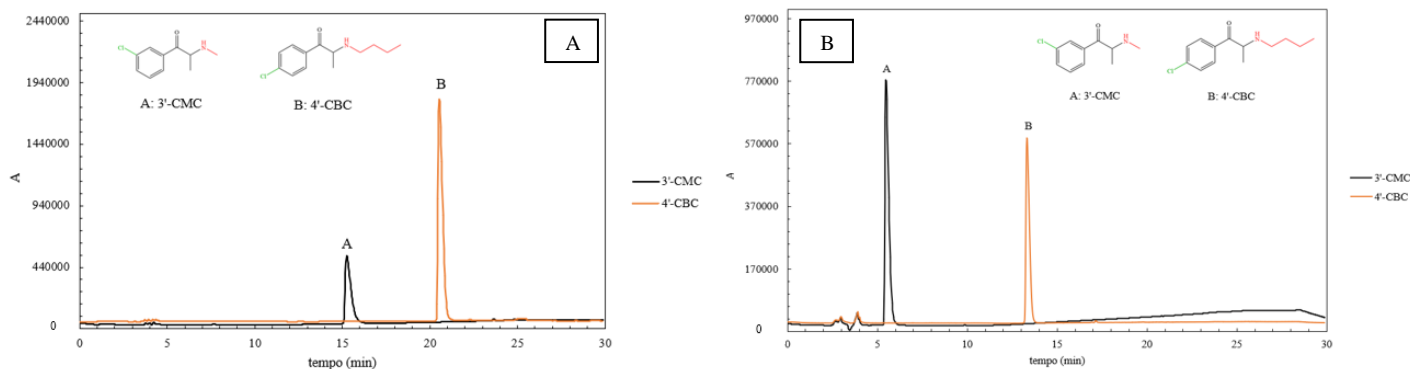


**Figura 16** - Tempos de retenção das catinonas sintéticas. Condições de HPLC-DAD: coluna ACE 3 C18, fluxo 1 mL/min, gradiente [0-5 min (25% B/75% A), 5-20 min de 25% B a 85% B; A – água com ácido fórmico (0,1%); B-metanol com ácido fórmico (0,1%)], deteção a 250 e 262 nm.

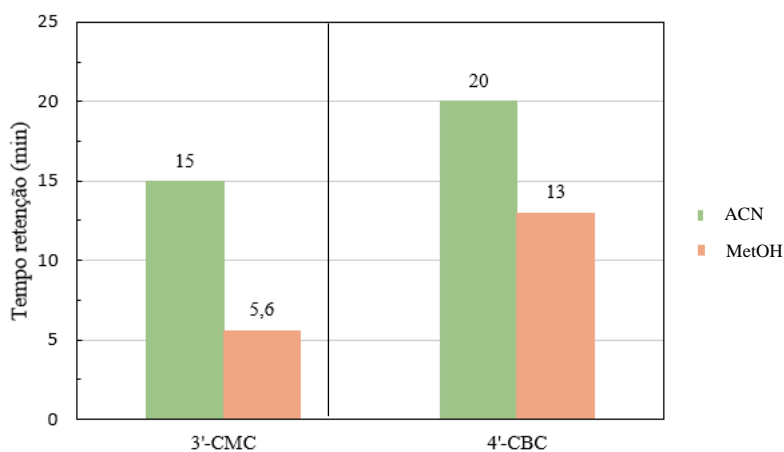
É possível verificar que a catinona com menor tempo de retenção foi a 3'-CMC e a catinona com maior tempo de retenção foi a 4'-CBC. Note-se que as catinonas com o cloro na posição *meta* (posição 3') possuem menor tempo de retenção que o respetivo isómero com o cloro na posição *para* (posição 4'), indicando que as primeiras são mais polares que as últimas.

De forma a ser possível agilizar o processo, o equipamento RP-HPLC-DAD (VWR HITACHI, com detetor L-2455, forno L-2300, injetor L-2200, bomba L-2130) foi utilizado, por possuir um injetor automático. De seguida fomos analisar o efeito da mudança do eluente B da fase móvel de metanol (0,1% ácido fórmico) para acetonitrilo (0,1% de ácido fórmico). Na Figura 17 apresentam-se os cromatogramas resultantes da análise das catinonas 3'-CBC e 4'-CBC, a 250 e 262 nm, respetivamente,

obtidos em condições experimentais que diferem apenas no eluente B utilizado na fase móvel (metanol ou acetonitrilo). Esta comparação mostra claramente que a substituição do metanol por acetonitrilo faz baixar, como esperado, o tempo de retenção das catinonas (Figura 18). Por este motivo foi escolhido o acetonitrilo, para as condições cromatográficas.



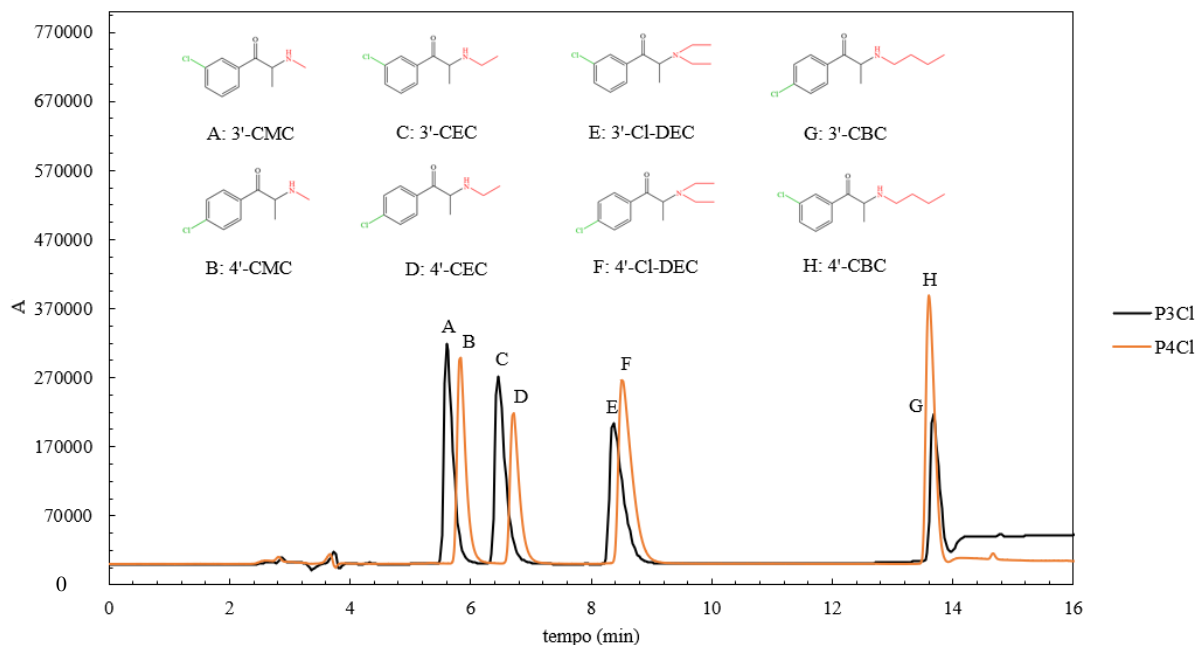
**Figura 17** - Cromatogramas das catinonas 3'-CMC e 4'-CBC a 250 e 262 nm, respetivamente. Condições de HPLC: coluna ACE 3 C18, fluxo 1 mL/min; 0-5 min (25% B), 5-20 min (85% B); eluente A - H<sub>2</sub>O (0,1% ácido fórmico) e eluente B: Cromatograma A – eluente B MeOH (0,1% ácido fórmico), Cromatograma B - eluente B ACN (0,1% ácido fórmico); concentração 10 µg/mL e volume de injeção: Cromatograma A – 25 µL e Cromatograma B – 10 µL.



**Figura 18** - Tempos de retenção para as catinonas 3'-CMC e 4'-CBC, na análise 2.

Por último, as condições cromatográficas foram otimizadas, de modo a diminuir o tempo da corrida do HPLC e manter a resolução das catinonas, e de modo a permitir a análise de uma mistura das catinonas *meta* ou *para*, simultaneamente. Na Figura 19 apresentam-se os cromatogramas obtidos nas condições otimizadas para a mistura das catinonas *meta* (3'-CMC, 3'-CEC, 3'-CI-DEC e 3'-CBC) e *para* (4'-CMC, 4'-CEC, 4'-CI-DEC e 4'-CBC) selecionadas para este estudo.

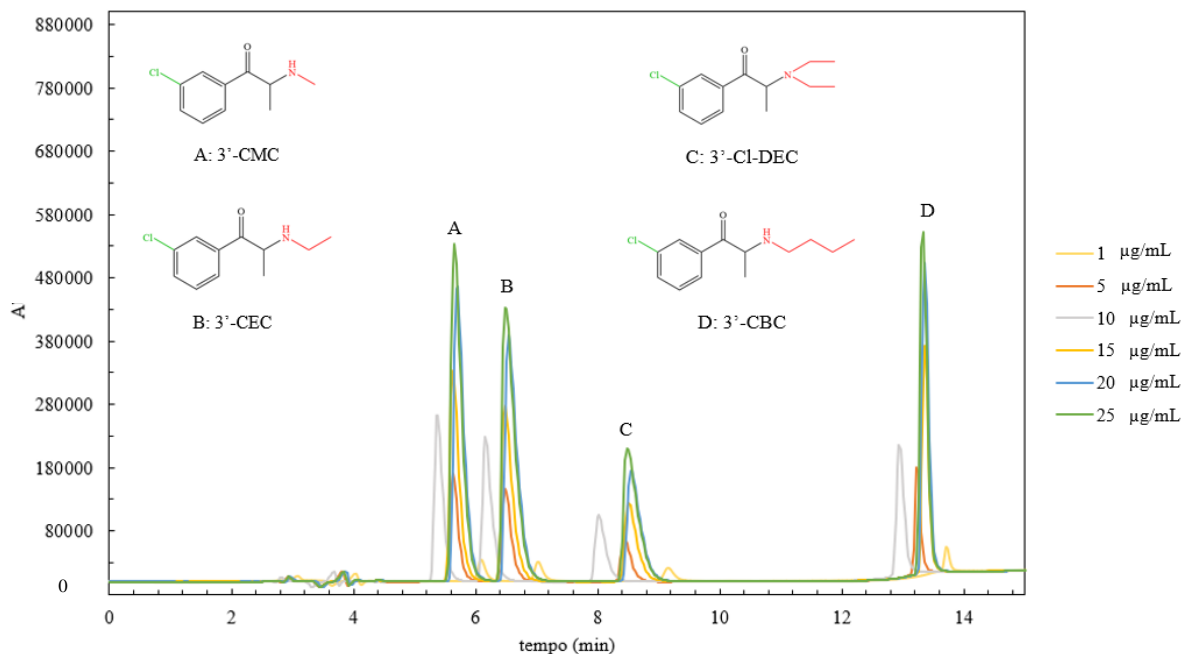
O método de HPLC-DAD otimizado foi usado para a elaboração das curvas de calibração das catinonas, de forma a ser possível a sua quantificação nos ensaios de permeabilidade. Foram preparadas 2 soluções designadas P3Cl e P4Cl, que continham respetivamente, 4 catinonas sintéticas com o cloro na posição 3' (posição *meta*), e 4 catinonas sintéticas com o cloro posicionado em 4' (posição *para*), de forma a não existir sobreposição de picos.



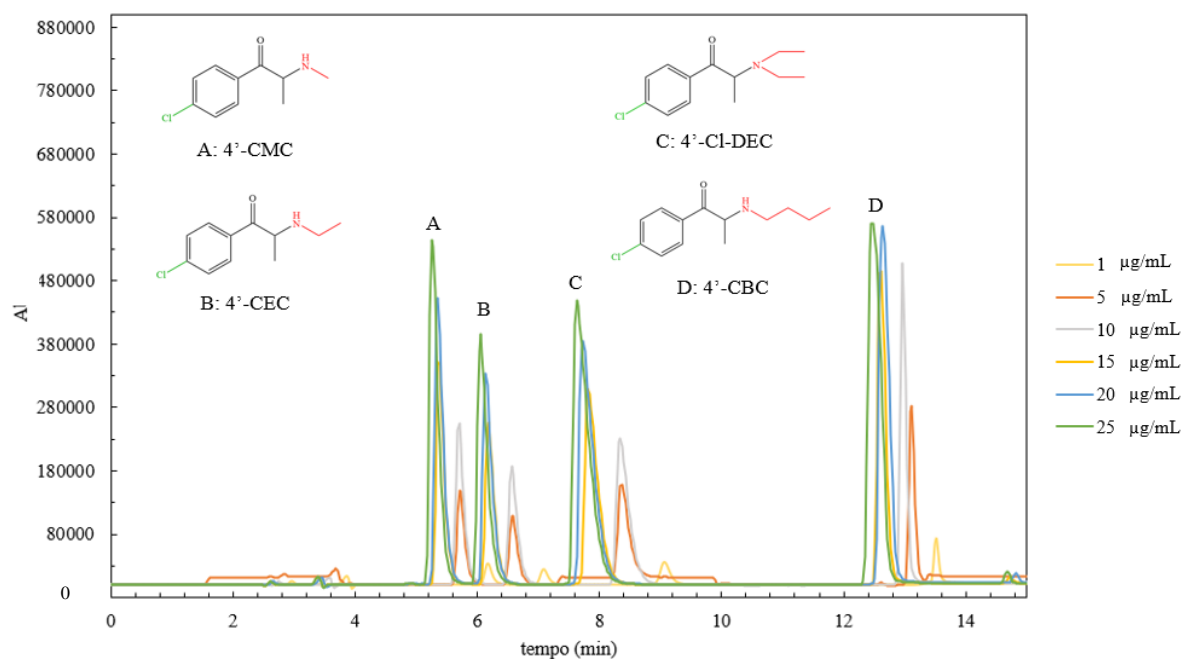
**Figura 19** - Cromatograma das catinonas com o cloro na posição *meta* (P3Cl) e na posição *para* (P4Cl), para as condições otimizadas de HPLC: coluna ACE 3 C18; fluxo 1 mL/min; 0-5 min (25% ACN), 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN). Concentração 10 µg/mL, volume de injeção 10 µL. Detecção 250 nm (P3Cl) e 262 nm (P4Cl).

Como se pode observar na Figura 19, nas condições cromatográficas desenvolvidas não existe qualquer interferência significativa nos tempos de retenção com uma boa separação entre compostos, quer quando os isómeros *meta* quer quando os isómeros *para* das diferentes catinonas são analisadas em conjunto. Apesar de nos ensaios de permeabilidade as catinonas serem analisadas separadamente, para a elaboração das curvas de calibração das catinonas, o método otimizado permitiu reduzir o número de análises cromatográficas.

Foram preparadas soluções destas misturas em duplicado, de modo a que as concentrações individuais finais de cada catinona fosse de 1, 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL. Cada replicado foi injetado 3 vezes, em três dias diferentes e intercalados. Os cromatogramas resultantes da análise de um replicado de cada concentração para as soluções das catinonas *meta* e *para* podem ser observados nas figuras 20 e 21, respetivamente, nas condições otimizadas.

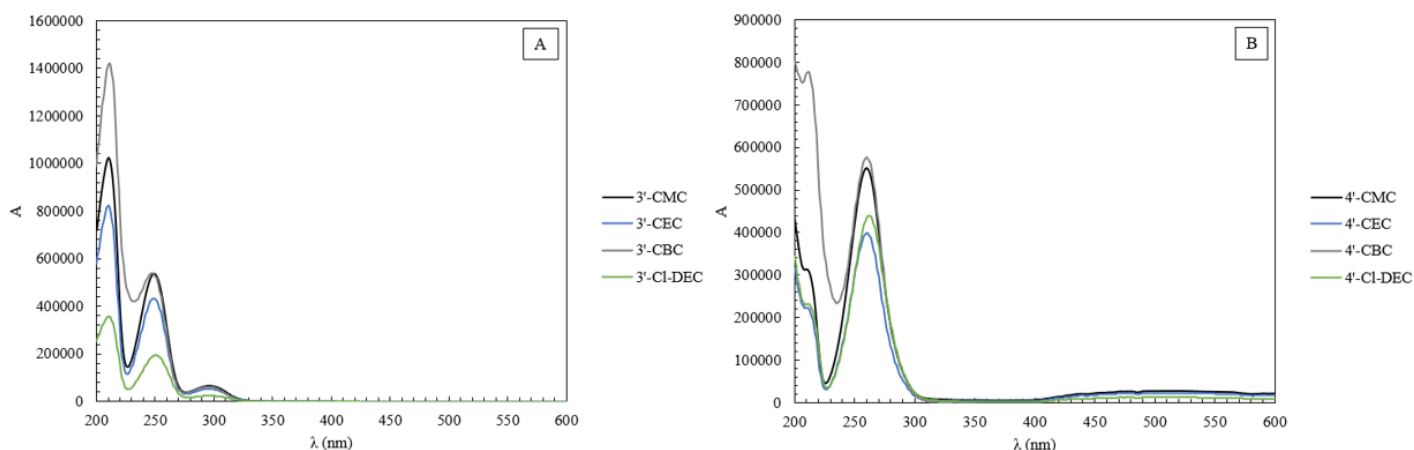


**Figura 20** - Cromatograma das catinonas com o cloro na posição *meta* (P3Cl), para as condições otimizadas de HPLC: coluna ACE 3 C18; fluxo 1 mL/min; 0-5 min (25% ACN), 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN). Volume de injeção 10 µL. Detecção 250 nm.



**Figura 21** - Cromatograma das catinonas com o cloro na posição *para* (P4Cl), para as condições otimizadas de HPLC: coluna ACE 3 C18; fluxo 1 mL/min; 0-5 min (25% ACN), 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN). Volume de injeção 10 µL. Detecção 262 nm.

É de notar ainda que, é possível confirmar se as catinonas observadas, por HPLC, têm o cloro na posição *meta* ou *para*, através do espectro UV-Vis. As cloro-catinonas *meta* possuem três picos, com máximos em 210, 250 e 300 nm (Figura 22-A). Enquanto, as cloro-catinonas *para* possuem dois picos, com máximos em 210 e 262 nm (Figura 22-B).



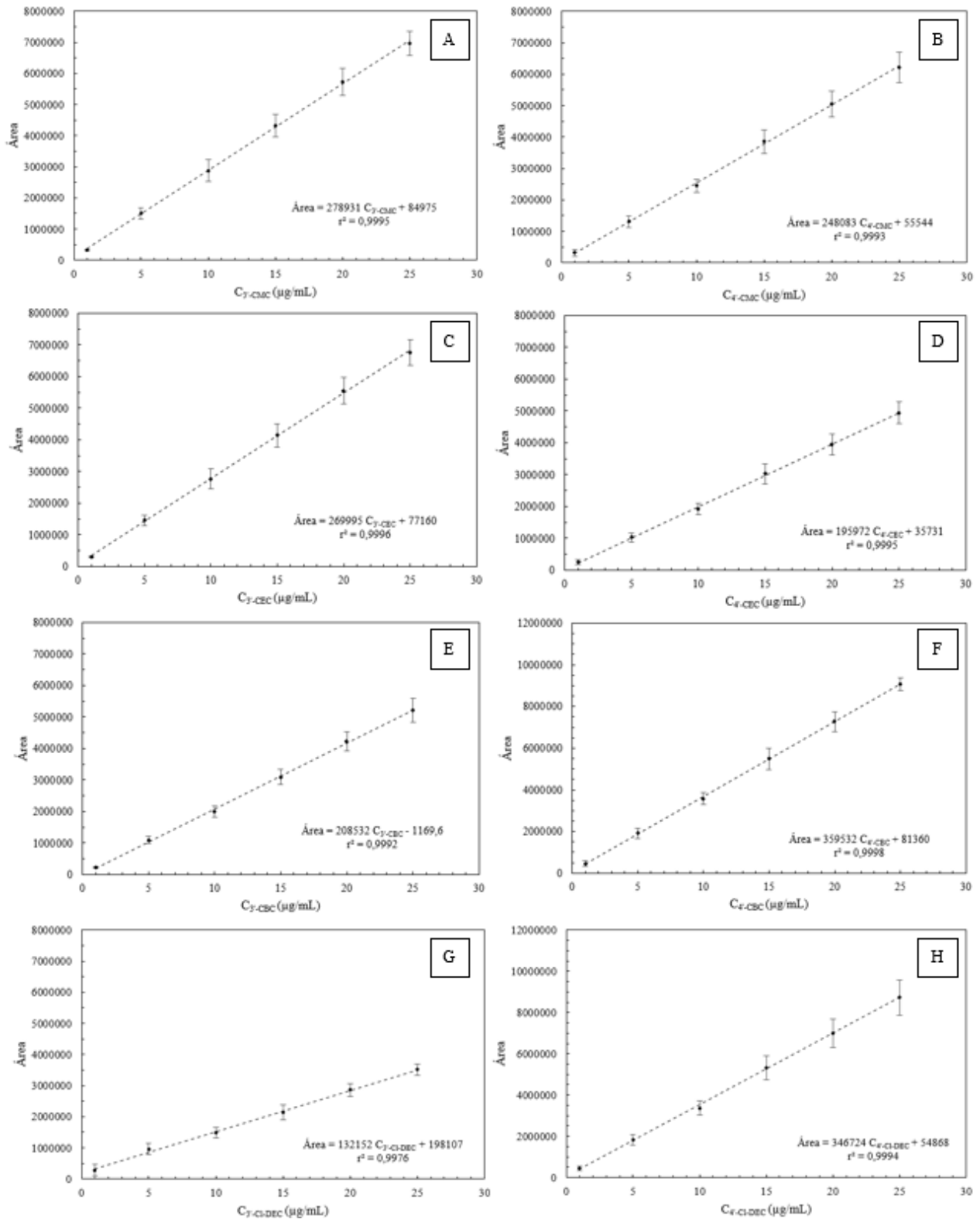
**Figura 22** - Espectros UV-Vis para as catinonas com o cloro em posição (A) *meta* e (B) *para*, concentração de 25 µg/mL.

Por forma a simplificar os cromatogramas as cloro-catinonas *meta* foram quantificadas a 250 nm e as cloro-catinonas *para* a 262 nm (Figura 22). Os espectros UV-Vis obtidos estão de acordo com a literatura (Chen & Wong, 2019).

Usando as condições otimizadas e através dos cromatogramas obtidos a diferentes concentrações das soluções P3Cl e P4Cl, foram obtidas para cada concentração, as áreas dos picos para as catinonas estudadas, calculadas as médias com os respetivos desvios-padrão e ajustaram-se retas segundo o método dos mínimos quadrados para cada uma das catinonas.

As curvas de calibração e as retas obtidas podem ser observadas na Figura 23 e Anexo III, como se pode constatar verificou-se que existe uma boa linearidade do método na gama de concentrações testadas com os valores do coeficiente de correlação entre 0,998 e 0,999 sendo a reta de calibração uma boa representação do sinal em função da concentração.

Na Tabela 5, encontram-se os resultados obtidos e as incertezas associadas à estimativa da concentração, o limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), para as oito catinonas sintéticas estudadas, tendo em conta estes resultados para a gama de concentrações testadas o método revela-se adequado para a quantificação das catinonas para os ensaios experimentais de avaliação da permeação das catinonas estudadas através do modelo da barreira gastrointestinal com a linha celular Caco-2.



**Figura 23** - Curvas de calibração para as catinonas sintéticas: (A) 3'-CMC, (B) 4'-CMC, (C) 3'-CEC, (D) 4'-CEC, (E) 3'-CBC, (F) 4'-CBC, (G) 3'-Cl-DEC e (H) 4'-Cl-DEC; a 250 nm para as 3' e 262 nm para as 4'.

**Tabela 5** - Valores do comprimento de onda ( $\lambda$ ), declive, ordenada na origem,  $r^2$  e erro associado à estimativa da concentração, limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) em  $\mu\text{g/mL}$ , para as catinonas.a) Estatisticamente diferente para  $p < 0.05$ , entre todas as catinonas

Catinona	$\lambda$ (nm)	Declive	Ordenada Origem	$r^2$	Erro	LOD	LOQ
3'-CMC	250	278931	84975	0,9995	0,2	$2,77 \times 10^{-6}$	$8,38 \times 10^{-6}$
4'-CMC <sup>a)</sup>	262	248083	55544	0,9993	0,3	$3,58 \times 10^{-6}$	$1,09 \times 10^{-5}$
3'-CEC	250	269995	77160	0,9996	0,2	$2,61 \times 10^{-6}$	$7,91 \times 10^{-6}$
4'-CEC <sup>a)</sup>	262	195972	35731	0,9995	0,2	$3,98 \times 10^{-6}$	$1,21 \times 10^{-5}$
3'-CBC	250	208532	-1169,6	0,9992	0,3	$4,42 \times 10^{-6}$	$1,34 \times 10^{-5}$
4'-CBC	262	359532	81360	0,9998	0,2	$1,40 \times 10^{-6}$	$4,25 \times 10^{-6}$
3'-CI-DEC	250	132151	198107	0,9976	0,5	$1,23 \times 10^{-5}$	$3,73 \times 10^{-5}$
4'-CI-DEC	262	346724	54868	0,9994	0,3	$2,41 \times 10^{-6}$	$7,30 \times 10^{-6}$

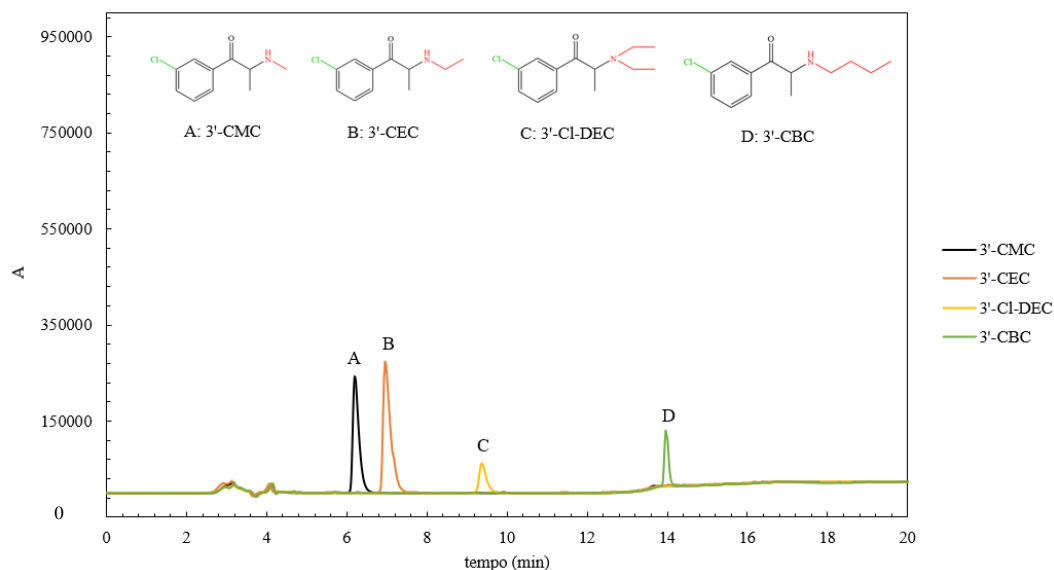
### 4.3. Ensaios de Permeabilidade da Barreira Gastrointestinal

Foram efetuados ensaios da permeabilidade das oito catinonas estudadas neste trabalho na barreira gastrointestinal. A linha celular Caco-2 do adenocarcinoma colorretal, quando diferenciada durante mais de 10 dias fica num estado funcional e morfológicamente semelhante aos enterócitos humanos. A monocamada celular cultivada em *inserts* forma uma barreira que simula o epitélio intestinal, em que o lado apical mimetiza o lúmen intestinal e o lado basolateral representa a corrente sanguínea (Baker, 2014).

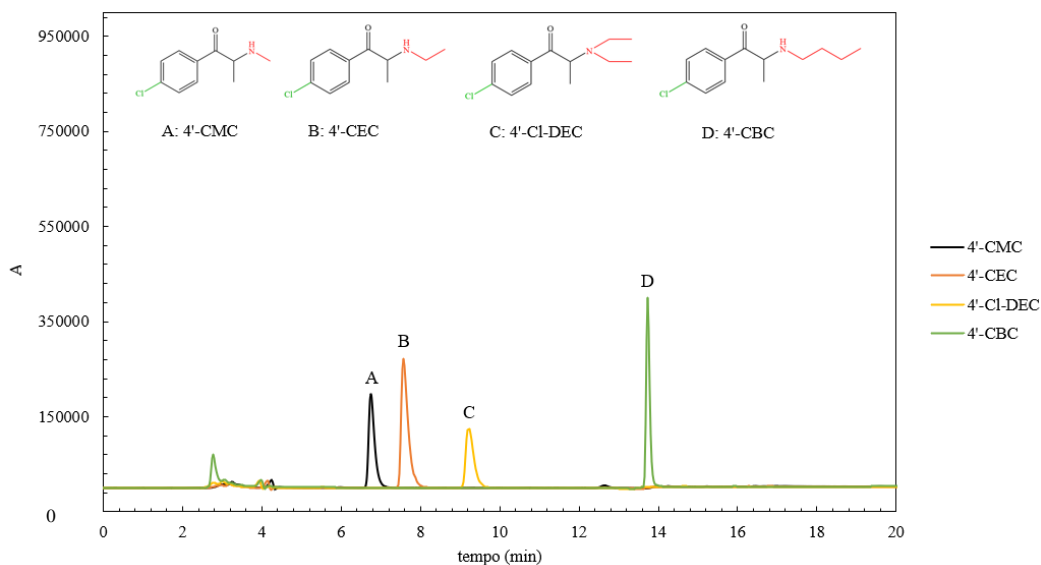
Recorrendo a este modelo celular pode monitorizar-se a absorção gastrointestinal de várias substâncias, como drogas, fármacos e outros compostos. Neste caso, após se verificar a integridade da monocamada de células diferenciadas (por medição da TEER de acordo com o descrito em 3.8), foi simulada a ingestão das catinonas estudadas neste trabalho, por aplicação de soluções das catinonas em HBSS no lado apical das células Caco-2 diferenciadas, simulando o lúmen intestinal e depois verificando-se a sua permeação para o lado basolateral, simulando a saída para a corrente sanguínea em intervalos de tempo durante 6 h.

A deteção das catinonas pelo método de HPLC-DAD, desenvolvido em 4.7, permitiu determinar a percentagem de permeação da(s) mesma(s) durante o tempo da experiência. Tendo em conta que os resultados anteriores, descritos em 4.1., revelaram que as células Caco-2 diferenciadas não perdiam a viabilidade por contacto com as soluções das catinonas à concentração do IC50 (Figura 13), o ensaio teve por base a adição de soluções com essa concentração das catinonas sintéticas na zona apical da monocamada de células diferenciadas no *insert*. De modo a avaliar a permeação das catinonas foram retiradas amostras às 0, 3 e 6h do ensaio, quer da zona apical quer da zona basolateral. As amostras foram analisadas por HPLC-DAD, para quantificação das catinonas, sendo previamente diluídas de acordo com o limite de quantificação. Nas figuras 24 e 25 é possível observar os cromatogramas da zona basolateral recolhidas às 3 horas para as *meta* cloro-catinonas (3'-CMC, 3'-CEC, 3'-CBC e 3'-CI-DEC)

e *para* (4'-CMC, 4'-CEC, 4'-CBC e 4'-Cl-DEC). Os cromatogramas das recolhas às seis horas (basolateral e apical) estão presentes no Anexo IV.



**Figura 24** - Cromatogramas das *meta* cloro-catinonas, zona basolateral às 3 horas, a 250 nm (fase móvel: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN),, fluxo 1mL/min e injeção 10  $\mu$ ).

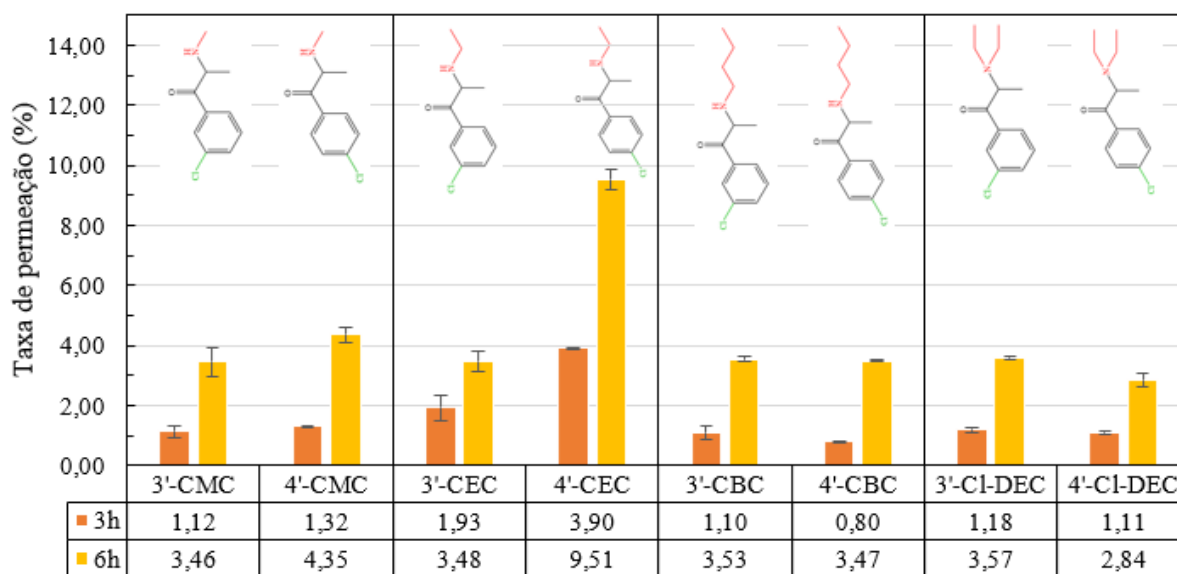


**Figura 25** - Cromatogramas das *para* cloro-catinonas, zona basolateral às 3 horas, a 262 nm (fase móvel: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN),, fluxo 1 mL/min e injeção 10  $\mu$ L).

Os valores da concentração da zona basolateral e apical, e respetivos tempos de retenção de cada catinona podem ser observados no Anexo IV.

Quando analisados os cromatogramas das amostras do lado basolateral ao fim das 6 h de incubação das catinonas sobre a monocamada das células Caco-2 diferenciadas, pode-se observar que as catinonas permearam para o lado basolateral em percentagem muito inferior ao esperado relativamente

à redução observada na sua concentração do lado apical (Anexo IV), o que pode ser explicado pelas catinonas quer pelas catinonas serem retidas dentro das células ou possivelmente sofrerem algum tipo de metabolização, uma vez que as células Caco-2 expressam enzimas de metabolização de drogas e fazem efluxo de metabolitos e/ou compostos parentes para o lado apical e basolateral (Lim *et al.*, 2007; Masungi *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2018). Na Figura 26, estão representadas as percentagens de permeação das catinonas estudadas neste trabalho para o lado basolateral da barreira gastrointestinal simulada pela monocamada de células Caco-2 diferenciadas, ao fim de 3 e 6 h.



**Figura 26** - Valores das percentagens de permeação (%) das oito catinonas sintéticas para o lado basolateral da monocamada de células Caco-2 diferenciadas, ao fim de 3h e 6 h de incubação.

Como se pode observar na Figura 26 foi possível concluir que a catinona com maior taxa de permeação foi a 4'-CEC, atingindo-se relativamente à concentração da catinona no lado apical, 9,51% de catinona no lado basolateral permeada ao fim de 6 h de incubação. A catinona que foi menos permeável foi a 4'-Cl-DEC, obtendo-se somente 2,84% de catinona permeada ao fim de 6 h de incubação. Relativamente à percentagem de permeação das catinonas pode referir-se ainda que apesar de, para as catinonas sintéticas 3'e 4'-CMC e 3' e 4'- CEC terem sido utilizadas as concentrações mais elevadas para a incubação do lado apical, apenas a 4'-CEC dentro deste grupo apresentou percentagens de permeação mais elevada o que não pode ser explicado somente pela difusão através da membrana celular.

Ainda tendo em conta estes resultados, não é possível indicar se a posição do cloro no anel aromático da catinona poderá influenciar a sua permeação, uma vez que não existe um padrão definido entre o isómero 3' e o isómero 4'. Neste caso, verificou-se que um aumento da permeação no caso da 4'-CMC e a 4'-CEC, relativamente às 3'-CMC e a 3'-CEC, respetivamente. No entanto, o contrário acontece no caso da 4'-CBC e 4'-Cl-DEC, relativamente às 3'-CBC e 3'-Cl-DEC. Relativamente ao

aumento da cadeia de carbonos ou ramificação da cadeia também não foi possível concluir sobre o efeito da na permeação.

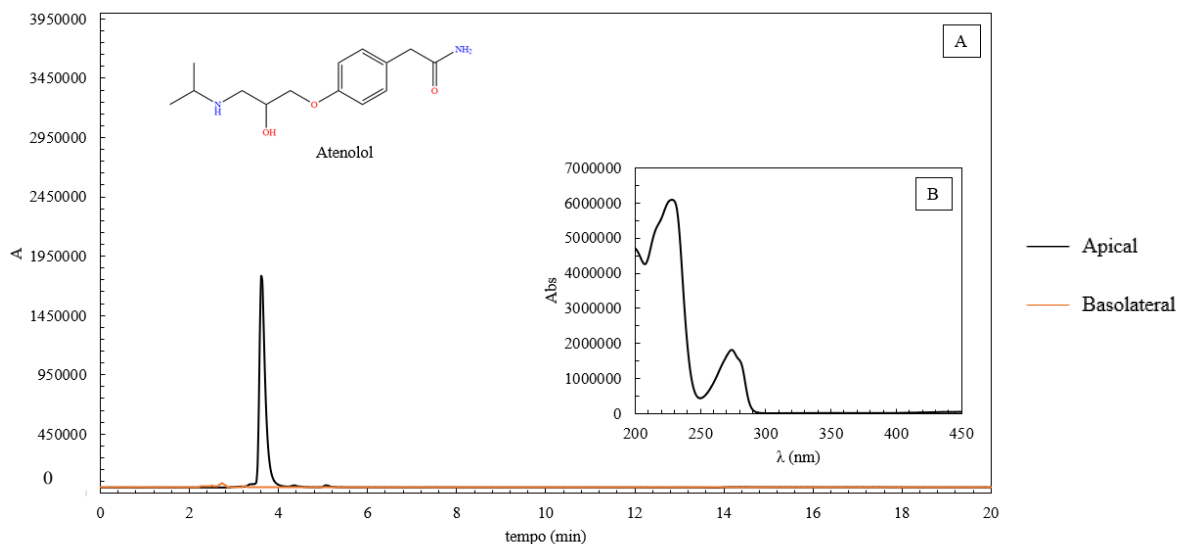
A Tabela 6 resume os resultados obtidos e apresenta o coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) calculado para cada catinona, com a análise estatística dos resultados obtidos (Anexo IV). De acordo com a análise estatística a 4'-CMC tal como a 4'-CEC apresentou a maior  $P_{app}$  entre as catinonas estudadas, e, confirmou-se que a 4'-CI-DEC a que possui o valor mais baixo.

**Tabela 6** - Valores da %permeação/hora e coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ), para as oito catinonas estudadas.

Catinona	%Perm/h	$P_{app}$ ( $\times 10^{-6}$ cm/s)
3'-CMC	0,78	1,78
4'-CMC	1,01	2,24
3'-CEC	0,52	1,79
4'-CEC	1,87	4,89
3'-CBC	0,81	1,82
4'-CBC	0,89	1,78
3'-CI-DEC	0,80	1,84
4'-CI-DEC	0,58	1,46

Tendo em conta que se considera que uma droga apresenta alta permeabilidade se valor do  $P_{app}$  for superior a  $10 \times 10^{-6}$  cm/s, que os compostos de baixa permeabilidade são caracterizados por uma  $P_{app}$  inferior a  $1,0 \times 10^{-6}$  cm/s e valores de  $P_{app}$  na gama de  $1-10 \times 10^{-6}$  são classificados como tendo uma permeabilidade moderada (Kus *et al.*, 2023), as catinonas utilizadas neste estudo enquadram-se neste último grupo. A pentedrona, a metilona e a MDPV foram também estudadas no modelo Caco-2, e apresentaram valores de permeabilidade aparente superiores a  $1 \times 10^{-6}$  cm/s, sendo também considerados compostos com permeabilidade moderada (Silva *et al.* 2020; Almeida *et al.*, 2022). É de notar, no entanto que *in vivo* a absorção tende a ser maior que nas linhas celulares standard (Breemen *et al.*, 2005), o que pode indicar a perigosidade destas drogas, em particular a 4'-CEC, que revelou valores de maior permeabilidade entre as catinonas estudadas podendo facilmente entrar na circulação sanguínea e afetar vários órgãos, em particular o fígado que é o principal órgão de destoxificação de drogas no organismo e para o qual se verificou em estudos anteriores que as catinonas apresentam elevada toxicidade.

Foi ainda efetuado um ensaio controlo para o composto atenolol à concentração de 0,8 mg/mL. O atenolol é conhecido por apresentar uma baixa permeabilidade (Song *et al.*, 2017) e, durante as 6h do ensaio, em comparação com as soluções de catinonas testadas revelou inferior permeabilidade. Na Figura 27 mostra-se o cromatograma da amostra da zona da zona apical e da zona basolateral após 6h de ensaio. É evidente nesta figura que o atenolol, com um tempo de retenção de 3,63 minutos com o espectro UV-Vis do composto (B), na amostra da zona apical não foi detetado na amostra da zona basolateral ao fim de 6h, revelando muito baixa permeabilidade em comparação com as catinonas testadas neste trabalho.



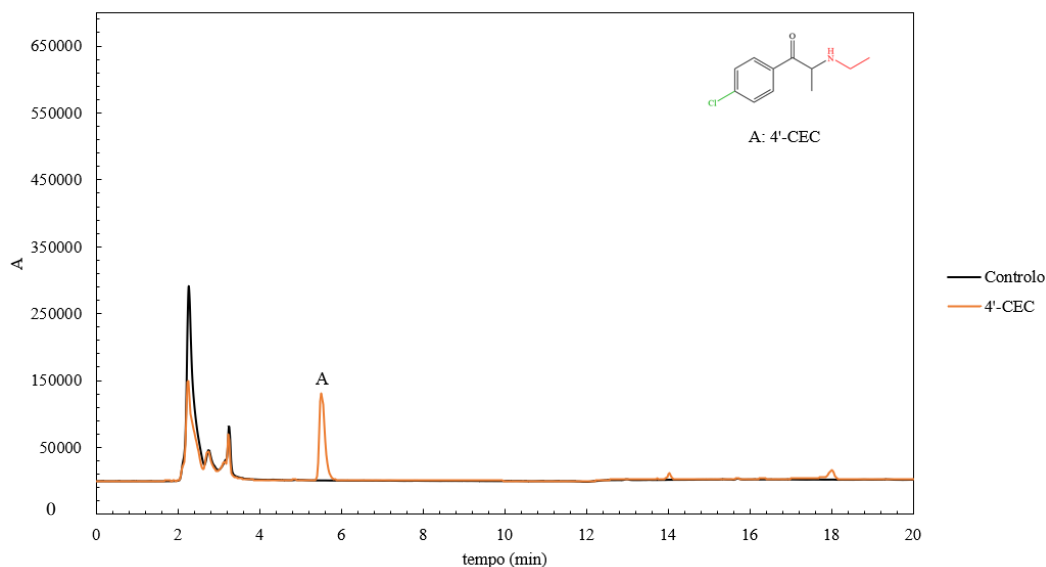
**Figura 27** - (A) Cromatograma do atenolol, zona apical e basolateral às 6 horas; (B) Espectro UV-Vis do atenolol, a 275 nm (fase móvel: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN)), concentração de 0,8 mg/mL.

#### 4.4. Análise metabolómica das células HepG2

Tendo em conta que têm sido reportadas várias ocorrências e mesmo fatalidades associadas ao consumo de catinonas sintéticas e sendo alguns desses efeitos foram associados ao seu potencial hepatotóxico (Tauleigne, 2023), neste trabalho foi utilizada uma abordagem metabolómica preliminar, de modo a perceber o efeito da exposição à catinona 4'-CEC sobre os metabolitos das células da linha celular do fígado HepG2, e tendo em conta que os resultados anteriores em 4.3. revelarem que esta catinona das estudadas foi a que tem maior permeabilidade na barreira gastrointestinal.

As células HepG2 foram cultivadas num *t-flask* com 25 cm<sup>2</sup> e expostas durante 24h a uma solução de 4'-CEC com a concentração IC<sub>50</sub> da catinona nesta linha celular, 2,4 mM (Tauleigne, 2023). Os metabolitos e as proteínas foram extraídos das células expostas e de células controlo, de acordo com o procedimento descrito em 3.10. Os metabolitos extraídos foram analisados por HPLC-DAD, de modo a detetar e quantificar a catinona dentro das células e, por espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS) em modo positivo para avaliar metabolitos diferencialmente presentes. As proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de acordo com o descrito em 3.12.

A análise dos metabolitos extraídos por HPLC-DAD usando o método descrito em 3.10 (Figura 28) permitiu quantificar a 4'-CEC no interior das células expostas 24h a esta catinona, obtendo-se um valor de 4,81 µg/mL, ou seja, 0,02 mM, pelo que indica que existe permeação da catinona.

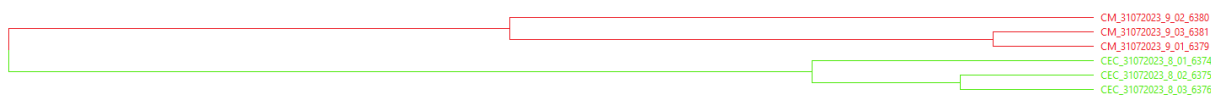


**Figura 28** - Cromatograma dos compostos extraídos, presentes no interior das células HepG2, a 262 nm (fase móvel: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN)).

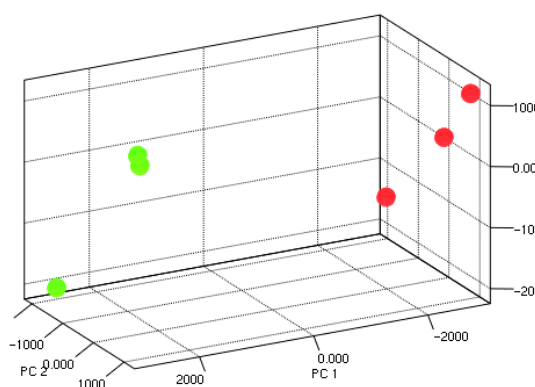
Os metabolitos das células HepG2 expostas 24h à catinona 4'-CEC, já identificada como presente no interior das células, foram comparados com metabolitos de células HepG2 não expostas, designadas controlo. Após extração dos metabolitos de ambos as células, estes foram analisados por cromatografia líquida associada a espectrometria de massa de elevada resolução (LC-HRMS) em modo positivo. Os metabolitos foram identificados através da sua razão carga/massa ( $m/z$ ) e tempo de retenção, recorrendo às bases de dados disponíveis no software *Metaboscape* como a PubChem. Os metabolitos presentes nas células controlo foram estatisticamente comparados com os metabolitos presentes após exposição à catinona sintética 4'-CEC.

Durante a análise foi elaborado um *clustering* e aplicado um método de redução de dimensionalidade, designado análise de componentes principais (PCA- Principal Component Analysis), de forma a ser possível identificar semelhanças e diferenças em metabolitos presentes em células controlo relativamente às células expostas à catinonas. Foi efetuada a representação gráfica em Volcano que relaciona a razão da abundância dos metabolitos presentes nas células tratadas relativamente ao controlo (*fold change*) e o *p-value* que indica a significância estatística dessa variação, ou seja, o eixo dos x como  $\log_2$  (*fold change*) e eixo do y como  $-\log_{10}$  (*p-value*), tendo sido considerados significativos os que apresentam *p-value* inferior a 0,05 e um *fold change* entre 0,5 e 2. A análise foi efetuada apenas para o modo positivo.

Os gráficos de *clustering* e PCA, presentes nas figuras 29 e 30, indicam que os metabolitos das células controlo (a vermelho) são diferentes comparando com os metabolitos das células expostas à 4'-CEC (a verde). É possível observar que as réplicas se relacionam entre si, formando dois grupos distintos (controlo e células tratadas), indicando que a exposição das células à catinona sintéticas produz efeito e alterou os metabolitos celulares nas células da linha celular HepG2.



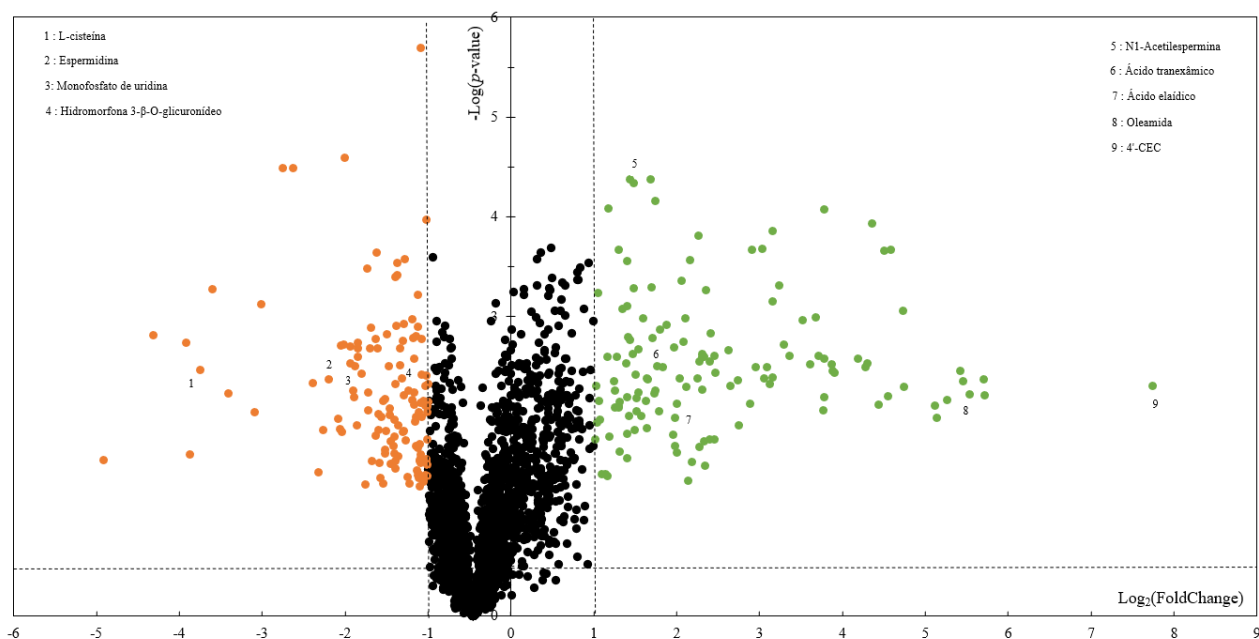
**Figura 29** - *Clustering* dos metabolitos obtidos nas células controlo (vermelho) e células expostas à 4'-CEC (verde), na linha celular HepG2, com recurso ao *Metaboscape* para o modo positivo.



**Figura 30** - Gráfico PCA dos metabolitos obtidos nas células controlo (vermelho) e células expostas à 4'-CEC (verde), na linha celular HepG2, com recurso ao *Metaboscape* para o modo positivo.

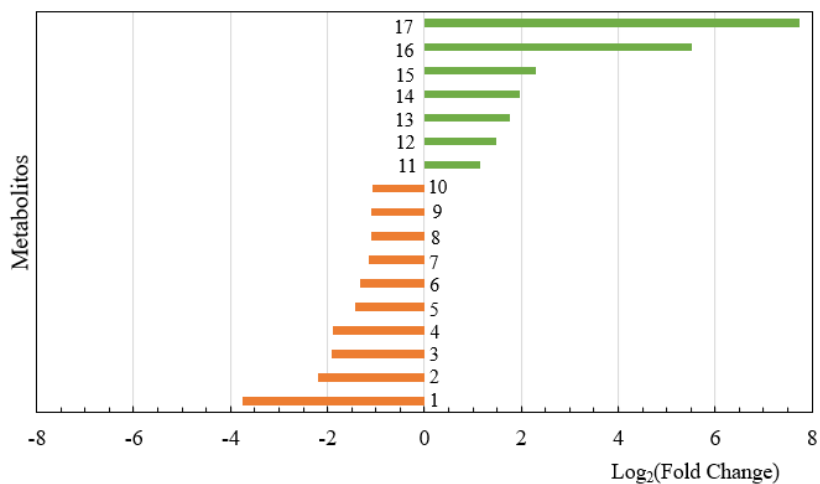
O agrupamento de dados é observado através dos componentes principais, PC1 e PC2, sendo PC1 superior a PC2. PC1, a maior variação dos dados obtidos, teve um valor de 68% e PC2, a segunda maior variação dos dados, teve um valor de 13%, ou seja, a variação total obtida foi de 81% com um  $r^2=0,79$ .

A análise do gráfico Volcano, presente na Figura 31, permitiu ainda identificar que metabolitos apresentam maior variação entre células controlo e tratadas, isto é, valores elevados de  $\text{Log}_2(\text{Fold Change})$ , mas com significância estatística ( $p\text{-values}<0,05$ ), ou seja, valores elevados de  $-\text{Log}_{10}(p\text{-value})$ . Valores  $m/z$  que se encontrem no quadrante superior esquerdo, a cor de laranja, correspondem aos metabolitos das células controlo. No quadrante superior direito, a verde, os valores correspondem aos metabolitos que estão diferencialmente mais abundantes nas células expostas à 4'-CEC. Os metabolitos cujo  $\text{Log}_2(\text{Fold Change})$  se encontra entre -1 e 1, não são significativamente diferentes entre as células controlo e as células tratadas, aparecem no centro a preto.



**Figura 31** - Gráfico Volcano dos metabolitos diferentes obtidos nas células controlo (laranja) e células expostas à 4'-CEC (verde), na linha celular HepG2, com recurso ao *Metaboscape* para o modo positivo.

O gráfico da Figura 32 indica alguns dos metabolitos mais abundantes, nas células controlo (laranja) e nas células expostas à catinona sintética (verde). A identificação dos metabolitos encontra-se na Tabela 7.



**Figura 32** - Gráfico  $\text{Log}_2(\text{Fold Change})$  dos compostos mais abundantes, nas células controlo (laranja) e células tratadas (verde) da linha celular HepG2, para o modo positivo; identificação dos compostos na tabela 7.

**Tabela 7** - Compostos identificados nas células controlo e expostas à 4'-CEC, tempo de retenção, *m/z* e intensidades, da linha celular HepG2, no modo positivo.

Nº	Nome	Fórmula molecular	tr (min)	<i>m/z</i>	[M]	Iões	Intensidade <sub>Controlo</sub>	Intensidade <sub>Exposição</sub>
1	L-Cisteína	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	9,58	122,03	121,02	[M+H] <sup>+</sup>	7,55E+03	5,14E+02
2	Espermidina	C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	1,33	146,16	145,16	[M+H] <sup>+</sup>	1,71E+04	3,01E+04
			2,02	146,17	145,16		3,51E+04	1,05E+04
3	Monofosfato de uridina	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> P	2,26	325,04	324,04	[M+H] <sup>+</sup>	2,72E+04	9,91E+03
4	Ácido tetrahydrofólico	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	11,85	446,18	445,17	[M+H] <sup>+</sup>	2,25E+03	8,37E+02
5	Sedoheptulose-7-fosfato	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> O <sub>10</sub> P	2,24	313,03	290,04	[M+Na] <sup>+</sup> , [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	5,05E+03	2,59E+03
6	Hidromorfona 3-β-O-glicuronídeo	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>9</sub>	12,32	462,17	461,17	[M+H] <sup>+</sup>	4,35E+03	2,38E+03
7	4'-Hidroxiopropanolol	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	14,91	276,16	275,15	[M+H] <sup>+</sup>	4,58E+03	2,83E+03
8	Desidrovofarina	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	15,20	307,10	306,09	[M+H] <sup>+</sup>	2,70E+03	1,74E+03
9	Ciclopirox	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	0,41	208,13	207,13	[M+H] <sup>+</sup>	3,25E+03	2,09E+03
			6,32	208,13	207,13		1,86E+03	1,65E+03
10	L-Carnitina	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	1,93	162,11	161,10	[M+H] <sup>+</sup>	5,43E+03	3,56E+03
11	Éster metílico de ecgonina	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	12,64	200,13	199,12	[M+H] <sup>+</sup>	9,43E+02	2,85E+03
12	N1-Acetilespermidina	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O	1,85	188,18	187,17	[M+H] <sup>+</sup>	8,08E+04	1,52E+05
			1,38	188,18	187,17		8,26E+04	1,39E+05
13	Ácido tranexânico	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	2,54	158,12	157,11	[M+H] <sup>+</sup>	4,57E+02	3,18E+03
14	Ácido eláidico	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	27,74	283,26	282,26	[M+H] <sup>+</sup> , [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> , [M+Na] <sup>+</sup>	4,97E+03	2,69E+04
15	N1,N12-Diacetilspermina	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1,33	144,13	286,24	[M+H+H] <sup>2+</sup>	9,09E+02	6,17E+03
			1,93	287,24	286,24	[M+H] <sup>+</sup>	2,02E+04	2,40E+04
16	Oleamida	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> NO	22,88	282,28	281,27	[M+H] <sup>+</sup> , [M+Na] <sup>+</sup>	1,09E+04	6,87E+05
17	4'-CEC	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> CINO	2,69	212,08	211,08	[M+H] <sup>+</sup>	1,23E+03	3,59E+05

Observa-se nas células expostas à catinona 4'-CEC, uma grande redução do composto 1 (cisteína), 2 (espermidina), 3 (uridina) e 4 (ácido tetrahidrofólico) e um grande aumento do composto 15 (diacetilespermidina) e 16 (oleamida).

Mais uma vez, é possível observar que os metabolitos foram alterados após exposição das células à catinona sintética escolhida e que a 4'-CEC está presente nas células expostas, sendo um metabolito bastante distinto, comparativamente às células controlo. Os compostos estão presentes nas vias metabólicas, sendo os mais intensos com valores superiores a  $10^4$ .

Por exemplo, a espermidina (2) é uma poliamina que se encontra em todos os seres eucariotas, podendo interagir modificando a função de moléculas com carga negativa, especialmente DNA, RNA, proteínas e fosfolípidos. Devido à capacidade de se ligar a outras moléculas, a espermidina possui funções protetoras nas células do fígado, associadas ao crescimento, autofagia, sobrevivência e proliferação celular (Canãveras *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2022). Neste estudo, verificou-se uma redução deste metabolito em células expostas à 4'-CEC o que diminui a proteção do fígado e pode explicar os efeitos hepatotóxicos destas drogas uma vez que a depleção em poliaminas tem sido associada à morte celular por apoptose.

Vários estudos demonstraram ainda que N-acetilpoliaminas, particularmente, a N1-acetilespermidina possuem valores elevados na urina de pacientes com cancro, também podendo aumentar durante infeções. O aparecimento destes compostos é atribuído ao seu papel intermediário na degradação da espermina ou espermidina no fígado (Pine *et al.*, 1989). Nesta análise verificou-se que a intensidade desta molécula aumentou após exposição das células à catinona sintética, indicando que este efeito poderá estar associado à redução de espermidina e, tal como referido consequentemente afetar a sobrevivência das células (Mandal *et al.*, 2015).

Outro exemplo de metabolito, que sofreu alteração, consiste no monofosfato de uridina, um nucleótido presente no RNA, que participa na síntese de glicogénio e glicoproteínas, e também está envolvido no crescimento e desenvolvimento do intestino (proliferação, maturação e apoptose de enterócitos do intestino), em conjunto com o crescimento e constituição hepática nos mamíferos (Li *et al.*, 2019). Nesta análise verificou-se que intensidade deste metabolito diminuiu após exposição das células à catinona sintética. Este tipo de alteração foi também reportado ocorrer em ratos sob exposição à cocaína (Marcos *et al.*, 2023), sendo que a 4'-CEC exhibe o mesmo tipo de mecanismo de toxicidade celular.

A oleamida é uma amida primária de ácidos gordos, que se acumula no líquido cefalorraquidiano sob condições de privação de sono, modula a neurotransmissão da serotonina e inibe a comunicação de junções comunicantes intercelulares, também é conhecido por ter uma ampla gama de efeitos sobre os sistemas neuroquímicos (Roy *et al.*, 2021). Nesta análise verificou-se que este metabolito aumentou nas

células expostas à catinona sintética, associando-se assim a 4'-CEC a efeitos protetores que podem estar associadas a uma resposta ao dano provocado nas células pelo contacto com a catinona.

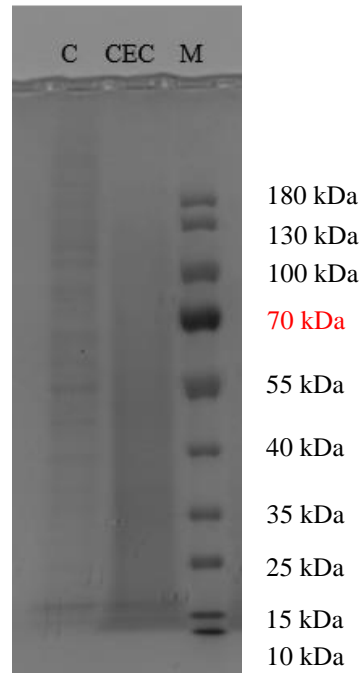
No geral, as vias metabólicas mais afetadas em ambos os tipos de células, quando expostas à catinona sintética poderão ser as vias do metabolismo de lípidos, em particular, fosfolípidos e ácidos gordos, do metabolismo de aminoácidos, vias associadas a fatores de crescimento (Canãveras *et al.*, 2016; Kiseleva *et al.*, 2022), indicando que a toma da catinona produz efeitos tóxicos no corpo humano.

Portanto, se a análise metabolómica preliminar indicou alteração nos metabolitos após exposição das células com a catinona sintética, onde o IC<sub>50</sub> é 2,4 mM e no *t-flask* estavam 0,02 mmol, se um indivíduo ingerir 200 mg de catinona (de acordo com a tabela 1), são permeadas 19,02 mg, ou seja, 0,08 mmol. O valor permeado é superior ao da análise, pelo que a toxicidade e a alteração dos metabolitos vai ser superior ao analisado.

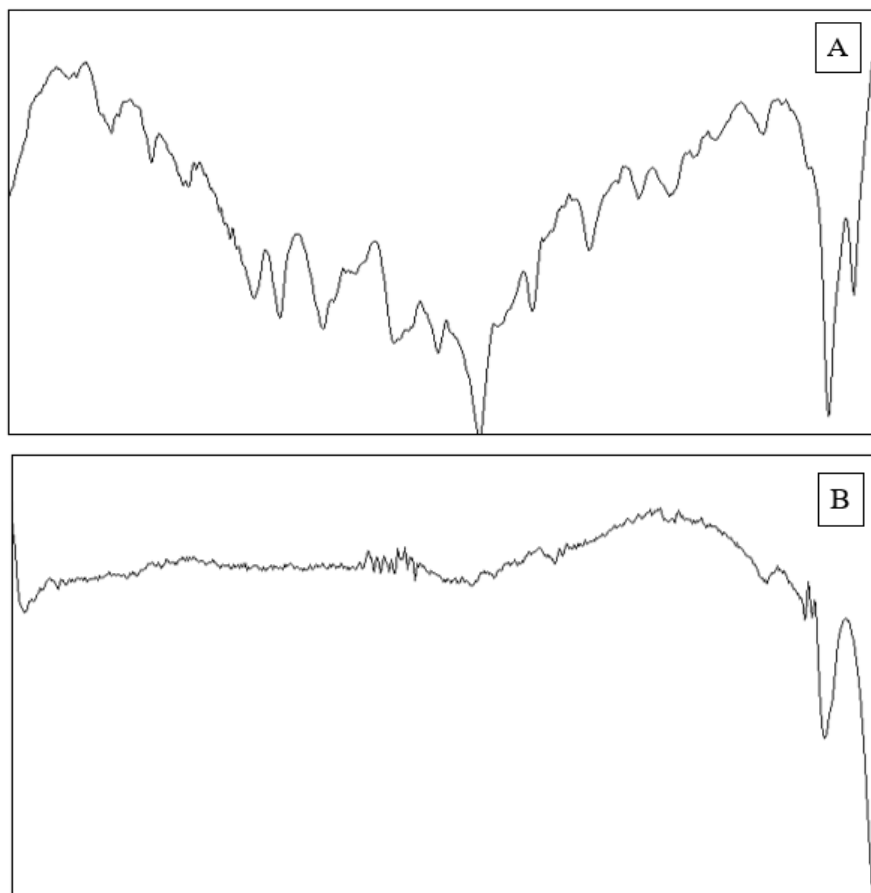
#### 4.5. Análise das Proteínas Celulares

De modo a complementar o estudo de metabolómica, tal como referido anteriormente, foram extraídas as proteínas das células expostas à catinona 4'-CEC e comparadas com células controlo não expostas. A quantidade de proteínas presentes nas células controlo em comparação com as células expostas, foi determinada pelo método de Bradford como descrito em 3.11, com recurso a uma curva de calibração de albumina de soro bovino (BSA) (Anexo VI). Obteve-se uma redução de cerca de 70 % na concentração de proteínas extraídas a partir das células expostas à catinona 4'-CEC relativamente ao controlo de 2,086 mg/mL para 0,621 mg/mL, tendo sido já evidenciado na literatura (Zhou *et al.*, 2019; Zwartsen *et al.*, 2020).

A eletroforese SDS-PAGE do perfil de proteínas extraídas, a partir de células expostas e controlo, pode ser observado na Figura 33. A análise dos géis de eletroforese foi feita através do software de *ImageJ*, tendo sido determinadas as intensidades das bandas de proteínas obtidas, pelo cálculo das áreas normalizadas, ou seja, pelo perfil total de proteínas obtidas em cada amostra. Os perfis podem ser observados na Figura 34.



**Figura 33** - SDS-PAGE 4-12 % (*Bis-Tris*), perfil de proteínas extraídas de células HepG2 controlo (C) e de células HepG2 expostas 24 h à catinona 4'-CEC, marcadores da ThermoScientific Page Ruler Prestained Protein Ladder 10-180 kDa (M), linha celular HepG2.



**Figura 34** - Perfil das bandas das proteínas (intensidade vs distância) presente no gel de SDS-PAGE: (A) controlo e (B) células tratadas com 4'-CEC, utilizando a linha celular HepG2.

Os valores das áreas normalizadas podem ser observados na Figura 35.

	Área <sub>M</sub>	ÁreaN <sub>M</sub>		Área <sub>C</sub>	ÁreaN <sub>C</sub>
1	1237,385	0,047	1	177,971	0,032
2	1689,213	0,064	2	300,556	0,053
3	2821,648	0,108	3	539,627	0,096
4	7239,962	0,276	4	424,456	0,076
5	4059,548	0,155	5	219,506	0,039
6	1950,991	0,074	6	1074,749	0,191
7	1996,527	0,076	7	306,556	0,055
8	2223,042	0,085	8	386,263	0,069
9	1364,456	0,052	9	159,607	0,028
10	1650,042	0,063	10	333,213	0,059
	Área <sub>CEC</sub>	ÁreaN <sub>CEC</sub>	11	225,556	0,040
1	374,971	0,704	12	1472,092	0,262
2	157,607	0,296			

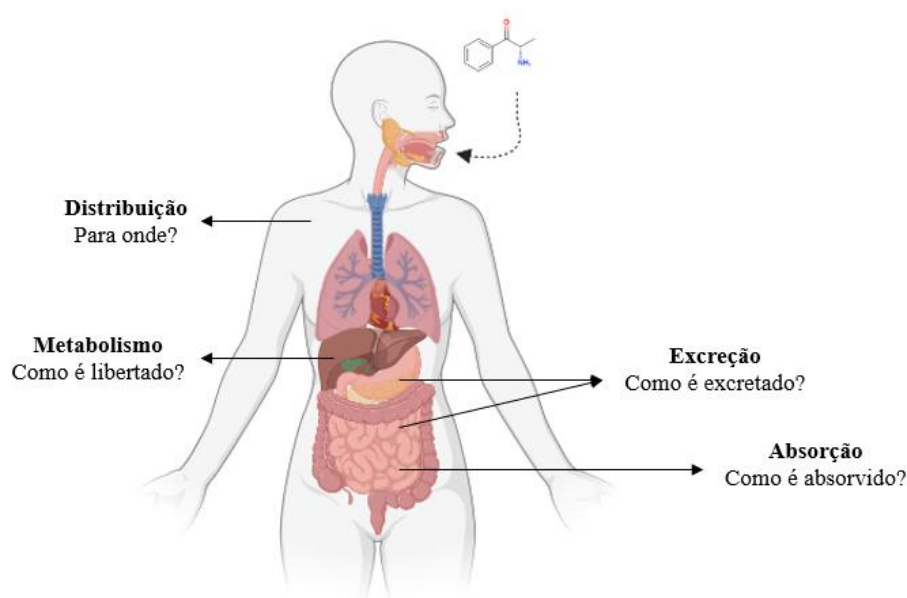
**Figura 35** - Valores das áreas dos picos correspondentes às bandas presentes no gel SDS-PAGE e áreas normalizadas (ÁreaN) para o marcador (M), células controlo (C) e células tratadas (CEC), utilizando a linha celular HepG2.

A normalização das áreas serviu para indicar quais as proteínas que reduziram. Esta análise foi somente preliminar, no entanto, verificou-se que a exposição das células à catinona 4'-CEC parece ter diminuído drasticamente a quantidade de proteínas expressas, identificando-se apenas proteínas com peso molecular de, aproximadamente, 20 kDa. As proteínas podem ainda ter sofrido modificações na sua expressão, o que poderá diminuir o seu peso molecular, ou não estar concentrado o suficiente para apresentar as bandas no gel.

#### 4.6. Análise *In Silico*

Nos últimos anos, as técnicas *in silico* têm sido uma alternativa a estudos experimentais, de forma a melhorar a compreensão entre a estrutura química de compostos e as respetivas interações com alvos biológicos, permitindo otimizar a seleção dos mesmos.

Esta análise recorre a modelos computacionais, simulando as principais propriedades farmacocinéticas (Figura 36), como a análise de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, também designados, parâmetros ADMET. Para além da redução do tempo de análise e custos associados, o aumento da eficiência na avaliação de riscos para os humanos e o ambiente, redução de testes em animais e construção de bibliotecas de compostos, são também vantagens destas técnicas (Cabral, 2021).



**Figura 36** - Parâmetros farmacocinéticos (adaptado através do *biorender*).

Os *softwares* utilizados para a análise *in silico* encontram-se disponíveis com acesso gratuito, sendo os mais complexos com necessidade de aquisição de uma licença. Os resultados obtidos resultam de uma procura de compostos semelhantes nas respetivas bases de dados associadas (Cabral, 2021). Exemplos de programas são o *SwissADME* (*Swiss Institute of Bioinformatics*), *pkCSM* e *admetSAR* (Daina *et al.*, 2017; Pires *et al.*, 2015).

A análise *in silico* foi realizada de forma a identificar alguns parâmetros relacionados com o estudo efetuado, como a toxicidade no corpo humano, a hepatotoxicidade, a absorção, como a permeabilidade da barreira gastrointestinal e efeitos no metabolismo e, ainda, comparar com resultados obtidos e prever perspectivas futuras. O estudo foi feito para as oito catinonas sintéticas. Os softwares utilizados foram o *pkCSM*, *SwissADME* e *admetSAR*, sendo reconhecidos como ferramentas de primeira abordagem para previsão de propriedades farmacocinéticas. Como o objetivo do trabalho não consiste em verificar se os compostos são possíveis fármacos, são apresentadas apenas as propriedades que podem estar relacionadas com os resultados obtidos experimentalmente. Os parâmetros podem ser observados nas tabelas 8 e 9. Os parâmetros dos restantes *softwares* podem ser observados no Anexo VII.

**Tabela 8** - Parâmetros obtidos na análise *in silico*, para a CMC e CEC, com o *software admetSAR*.

Propriedade	Modelo	3 <sup>o</sup> -CMC	4 <sup>o</sup> -CMC	3 <sup>o</sup> -CEC	4 <sup>o</sup> -CEC
Absorção	Absorção Intestinal Humano	0,9934	0,9934	0,9958	0,9958
	Permeabilidade Caco-2	0,9009	0,9586	0,8985	0,9602
Distribuição	Permeabilidade BBB (log BB)	0,7000	0,7000	0,8000	0,8000
	Biodisponibilidade oral humana	0,8000	0,7714	0,8143	0,8143
Metabolismo	Localização subcelular	Mitocôndria 0,5542	Mitocôndria 0,5542	Lisossomas 0,4727	Lisossomas 0,4727
	Inibidor OATP1B1	0,9403	0,9408	0,9292	0,9291
	Inibidor OATP1B3	0,9587	0,9587	0,9503	0,9503
	Inibição CYP2C19	0,7269	0,7269	0,6820	0,9820
	Inibição CYP2D6	0,5780	0,5780	0,6179	0,6179
	Inibição CYP1A2	0,7032	0,7032	0,8794	0,8794
Toxicidade	Hepatotoxicidade	0,8750	0,8500	0,8000	0,8000
	Toxicidade mitocondrial	0,7125	0,7125	0,7125	0,7125
	Nefrotoxicidade	0,4762	0,5839	-	0,4678
	Toxicidade oral aguda	0,8617	0,8617	0,5867	0,5867

**Tabela 9** - Parâmetros obtidos na análise *in silico*, para a CBC e CI-DEC, com o software *admetSAR*.

Propriedade	Modelo	3'-CBC	4'-CBC	4'-CI-DEC	3'-CI-DEC
Absorção	Absorção Intestinal Humano	0,9965	0,9965	0,9862	0,9862
	Permeabilidade Caco-2	0,9213	0,9682	0,9771	0,9665
Distribuição	Permeabilidade BBB (log BB)	0,8500	0,8500	0,9000	0,9000
	Biodisponibilidade oral humana	0,6714	0,6571	0,7714	0,7714
Metabolismo	Localização subcelular	Lisossomas 0,6839	Lisossomas 0,6839	Mitocôndria 0,5184	Mitocôndria 0,5184
	Inibidor OATP1B1	0,9064	0,9050	0,9263	0,9276
	Inibidor OATP1B3	0,9463	0,9463	0,9498	0,9498
	Substrato P-gp	0,6131	-	-	-
	Substrato CYP2D6	0,3966	0,3966	0,4158	0,4158
	Inibição CYP2C19	0,5478	0,5478	-	-
	Inibição CYP2D6	0,8254	0,8254	-	-
	Inibição CYP1A2	0,8529	0,8529	0,7778	0,7778
	Promiscuidade inibitória CYP	-	-	0,5441	0,5441
Toxicidade	Hepatotoxicidade	0,6250	0,6500	0,5750	0,5250
	Toxicidade reprodutiva	0,6226	0,6226	0,6444	0,6444
	Toxicidade mitocondrial	0,8375	0,8375	0,9125	0,9125
	Nefrotoxicidade	-	0,4654	-	-
	Toxicidade oral aguda	0,4994	0,4994	0,4631	0,4631

Os softwares utilizados na análise *in silico* baseiam-se em farmacóforos, pelo que são apenas previsões, sendo necessário verificar experimentalmente (Pires *et al.*, 2015; Daina, *et al.*, 2017).

Primeiramente, de acordo com o software *pkCSM* e *SwissADME*, os valores de permeabilidade na linha celular Caco-2 e a absorção intestinal humana possuem valores muito elevados relativamente ao que foi obtido experimentalmente, ou seja, apenas foram obtidos valores de permeação até 10%. Apesar de quanto maior a toma, maior a quantidade que será permeada, 90% continua a ser um valor elevado. Relativamente à hepatotoxicidade, é indicado que não existe, no entanto, já foi reportado e determinado experimentalmente que as catinonas são tóxicas em células da linha HepG2.

O software *admetSAR* indica também que a probabilidade de absorção intestinal humana e a permeabilidade na linha celular Caco-2 é elevada não estando de acordo com os resultados experimentais obtidos nesta análise, em que os resultados indicam moderada e diferente para as diferentes catinonas testadas. Indica também que todas as catinonas sintéticas possuem hepatotoxicidade, o que está de acordo com os resultados reportados. Também já foi reportada nefrotoxicidade. Posto isto, este software será o que vai mais ao encontro dos valores experimentais.

A análise *in silico* indica ainda que existe toxicidade mitocondrial e nefrotoxicidade, e ainda toxicidade reprodutiva nas catinonas CBC e CI-DEC que são as mais tóxicas. Posto isto, seria interessante estudar a permeabilidade da barreira hematoencefálica e a metabolização das catinonas em metabolitos de fase I e II e avaliação da toxicidade e efeitos biológicos dos metabolitos gerados com posterior comparação dos resultados obtidos com os resultados da análise *in silico*.



# **05 Conclusões e Perspetivas Futuras**

## 5. Conclusões e Perspetivas Futuras

O interesse das novas substâncias psicoativas, de forma a contornar a legislação de substâncias controladas, tem aumentado exponencialmente. Estes compostos são sintetizados de forma a serem estruturalmente diferentes dos compostos ilegais, mas que reproduzam os mesmos efeitos. As catinonas sintéticas, consideradas psicoestimulantes, representam uma alternativa de drogas de abuso, de fácil acesso no mercado, cujos efeitos variam desde agitação, alucinações a convulsões e até mesmo morte.

Este trabalho teve como objetivos continuar estudos já efetuados sobre oito catinonas sintéticas (3'-CMC, 4'-CMC, 3'-CEC, 4'-CEC, 3'-CBC, 4'-CBC, 3'-CI-DEC e 4'-CI-DEC) adicionando novos dados como o estudo da permeabilidade na barreira gastrointestinal uma vez que estas drogas são habitualmente consumidas oralmente. Neste sentido foi, primeiramente, determinada a citotoxicidade destas catinonas sobre a linha celular usada como modelo da barreira gastrointestinal, Caco-2 e desenvolvido um método de quantificação por HPLC-DAD das catinonas em estudo.

Outro ponto consistiu no estudo preliminar de metabolómica, ou seja, comparar efeitos no metaboloma de células controlo e células expostas à catinona sintética que exibiu maior permeabilidade gastrointestinal, utilizando a linha celular HepG2, como modelo das células do fígado, onde estas catinonas já haviam demonstrado elevada citotoxicidade. Por fim, quantificou-se o proteoma total e efetuou-se uma eletroforese SDS-PAGE, após exposição à 4'-CEC.

Os resultados obtidos permitiram identificar que as catinonas mais tóxicas para a linha celular Caco-2 são as 3'-CBC e 4'-CBC, cujos IC<sub>50</sub> são 1,867 mM e 1,898 mM, respetivamente, seguidas das catinonas 3'-CI-DEC e 4'-CI-DEC. A catinona menos tóxica consiste na 4'-CEC, cujo IC<sub>50</sub> é 6,057 mM. Apesar desta catinona ser a menos tóxica, no ensaio de permeabilidade da barreira gastrointestinal foi possível verificar que esta catinona exibiu a maior taxa de permeação com um  $P_{app}$  de  $4,89 \times 10^{-6}$  cm/s, o que indica que esta catinona tem uma permeação moderada.

Neste trabalho foi possível observar que a posição *meta* e *para* do cloro no anel aromático entre os isómeros das catinonas não influencia o IC<sub>50</sub>, no entanto, entre isómeros as catinonas com maior cadeia lateral do grupo amino e com maior ramificação, apresentaram maior citotoxicidade sobre a linha celular intestinal Caco-2. Com exceção das catinonas CBC, os resultados são estatisticamente diferentes para um  $p < 0,05$ . Quanto à permeação das catinonas na barreira gastrointestinal, não foi possível verificar a influência quer da posição do cloro no anel aromático quer do aumento da cadeia de carbonos ou ramificação da cadeia entre isómeros na permeação.

De forma a comparar a toxicidade das catinonas estudadas em células tumorais e saudáveis, determinou-se o intervalo do IC<sub>50</sub> em fibroblastos da derme humanos, que foi determinado como sendo um valor aproximado de 0,8 mM, à semelhança do efeito sobre a linha celular do fígado HepG2.

Na análise metabolómica das células HepG2 por LC-HRMS em modo positivo, verificou-se que os metabolitos extraídos das células controlo são diferentes dos metabolitos das células expostas à catinona mais permeável 4'-CEC e que se quantificou como estando presente no interior das células HepG2. Para as células controlo foram identificados, através das bases de dados, metabolitos como espermidina, monofosfato de uridina e L-carnitina, nas células controlo metabolitos como N1-acetilespermidina, oleamida e a própria 4'-CEC, nas células expostas à catinona sintética. No geral, as vias metabólicas mais afetadas nas células expostas à catinona sintética são as vias do metabolismo de lípidos, fosfolípidos e ácidos gordos, do metabolismo de aminoácidos, vias associadas a fatores de crescimento, apresentando alguns efeitos tóxicos para o ser humano como já reportados para a cocaína em ratos (Marcos *et al.*, 2023).

Como complemento, a quantificação de proteínas foi efetuada com recurso ao método de Bradford. As proteínas extraídas das células da linha celular HepG2, expostas à catinonas sofreram alteração, cujo valor da diferença com as células controlo é de 70,2%. Na eletroforese, apenas foi possível identificar duas bandas de proteínas pertencentes às células tratadas, com peso molecular de, aproximadamente, 20 kDa. As proteínas podem ter sofrido modificações na sua expressão ou terem sofrido degradação.

Relativamente à comparação dos dados obtidos com a previsão *in silico*, o *software* mais próximo dos resultados experimentais foi o *admetSAR*, apesar de os valores de permeabilidade na linha celular Caco-2 e a absorção intestinal humana possuem valores muito elevados relativamente ao que foi obtido experimentalmente, ou seja, apenas foram obtidos valores de permeação até 10%. Relativamente à hepatotoxicidade, é indicado que não existe, no entanto, já foi reportado que as catinonas são tóxicas em células da linha HepG2.

Este trabalho pretende dar um contributo para o conhecimento sobre as catinonas sintéticas e o efeito tóxico, que pode ser letal, nos humanos, tendo-se determinado pela primeira vez a permeabilidade das oito catinonas em análise e efetuado o estudo de metabolómica preliminar. O trabalho terá de ter continuidade para que possam ser aprofundados conhecimentos adquiridos nesta análise.

Quanto a perspetivas futuras sugere-se após os resultados obtidos neste trabalho que seria interessante determinar o IC50 das oito catinonas sintéticas nos fibroblastos da derme humana e avaliar o mecanismo de morte celular.

Sugere-se ainda analisar por HPLC-DAD as células da linha celular Caco-2, de forma a ser possível determinar a quantidade das catinonas estudadas no seu interior ou a presença de metabolitos resultantes de reações de metabolização celular das catinonas e alguns dos efeitos biológicos desses metabolitos. Como existem enzimas do citocromo P450 (CYP), expressas em altos níveis em células do intestino delgado, que podem ter um impacto significativo na biodisponibilidade de compostos administrados via oral, estudar a influência no CYP, com posterior comparação dos resultados obtidos com os resultados

da análise *in silico*. De modo a avaliar o consumo oral das catinonas sugere-se efetuar análises preliminares da digestão das catinonas com kits que possuem pancreatina e pepsina.

Outra perspetiva consiste em efetuar um estudo de metabolómica das restantes catinonas nas células da linha celular HepG2 e efetuar o mesmo procedimento para a linha celular Caco-2, identificando como é que os compostos são metabolizados, e ainda, identificar os compostos propostos na metabolómica para a HepG2, através da sua fragmentação e da massa. Um próximo passo seria analisar as vias metabólicas afetadas, associadas aos metabolitos alterados, recorrendo à plataforma *Metaboanalyst*. Por outro lado, seria importante efetuar uma análise mais profunda das proteínas alteradas e no mRNA das células por exposição às catinonas sintéticas.

Seria interessante estudar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, uma vez que as células neuronais podem ser mais sensíveis, mas sendo necessário considerar que as células do cérebro estão protegidas pela barreira sangue/cérebro, por isso era importante um estudo mais aprofundado da permeabilidade na barreira hematoencefálica, para a avaliar se de facto o efeito citotóxico se traduz, experimentalmente, num efeito mais pronunciado.

O trabalho desenvolvido na tese final de mestrado foi apresentado como comunicação poster num **encontro nacional**:

Ferreira, Inês; Gaspar, Helena; Pacheco, Rita. **2023**. “Synthetic cathinones used as drugs of abuse – Bioavailability and biological effects”. 5ª ed. CQE Days, 25 e 26 de maio de 2023, Academia das Ciências de Lisboa, Lisboa, Portugal.



## **06 Referências Bibliográficas**

## Referências Bibliográficas

- Abebe, W. (2018). Khat and synthetic cathinones: Emerging drugs of abuse with dental implications. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.*, 125, 140–146. Doi: 10.1016/j.oooo.2017.11.015.
- Adamowicz, P., Malczyk, A. (2019). Stability of synthetic cathinones in blood and urine. *For. Sci. Intern.*, 295, 36-45. Doi: 10.1016/j.forsciint.2018.12.001.
- Adamowicz, P. (2020). Blood concentrations of synthetic cathinones. *Clin Toxicol*, 59, 648-654. Doi: 10.1080/15563650.2020.1848100.
- Aldubayyan, A., *et al.* (2022). Quantitative LC–MS/MS Method for the Detection of 16 Synthetic Cathinones and 10 Metabolites and Its Application to Suspicious Clinical and Forensic Urine Samples. *Pharm.*, 15, 1-22. Doi: 10.3390/ph15050510.
- Almeida, S., *et al.* (2022). Synthetic Cathinones: Recent Developments, Enantioselectivity Studies and Enantioseparation Methods. *Molec.*, 27, 1-33. Doi: doi.org/10.3390/molecules27072057.
- Almeida, S., *et al.* (2023). Assessment of the Permeability of 3,4-Methylenedioxypropylvalerone (MDPV) across the Caco-2 Monolayer for Estimation of Intestinal Absorption and Enantioselectivity. *Int. Journ. of Mol. Sci.*, 24, 1-15. Doi: 10.3390/ijms24032680.
- Alonzo, M., *et al.* (2022). Portable testing techniques for the analysis of drug materials. *WIREs For. Sci.*, 4, 1-18. Doi: 10.1002/wfs2.1461.
- Altun, B., *et al.* (2020). Psychoactive Bath Salts and Neurotoxicity Risk. *Turk Journ. Pharm. Sci.*, 17, 235-241. Doi: 10.4274/tjps.galenos.2018.40820.
- Antunes, M. (2015). Alertas do OEDT: De Mensagens a Bases de Dados. Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado em Química Forense.
- Antunes, M. (2018). Desenvolvimento de Novas Metodologias Analíticas para a Identificação de Novas Substâncias Psicoativas em Matrizes Biológicas. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Dissertação de Mestrado em Química.
- Antunes, M., *et al.* (2020). Determination of Selected Cathinones in Blood by Solid-Phase Extraction and GC–MS. *Journ. Anal. Tox.*, 45, 233–242. Doi: 10.1093/jat/bkaa074.
- Aoki, S. – bioRender. Canada: 2017, atual. 2023. [Consult. jun. 2023]. Disponível em WWW: biorender.com.

- Araújo, M., *et al.* (2014). Raising awareness of new psychoactive substances: chemical analysis and in vitro toxicity screening of ‘legal high’ packages containing synthetic cathinones. *Arch. Tox.*, 89, 757–771. Doi: 10.1007/s00204-014-1278-7.
- Araújo, M., *et al.* (2020). In vivo toxicometabolomics reveals multi-organ and urine metabolic changes in mice upon acute exposure to human-relevant doses of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV). *Arc. Toxic.*, 95, 509-524. Doi: 10.1007/s00204-020-02949-2.
- Austin, P., Hux, J. (2002). A brief note on overlapping confidence intervals. *Journ. Vascul. Surg.*, 36, 194-195. Doi: 10.1067/mva.2002.125015.
- Avdeef, A., *et al.* (2005). Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA  $pK_a^{flux}$  method. *Eur. Journ. of Pharm. Sci.*, 24, 333-349. Doi: 10.1016/j.ejps.2004.11.011.
- Baker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15, 19–33. Doi: 10.1038/nrm3721.
- Baranyuk, K. (2021). Novas substâncias psicoativas: catinonas sintéticas. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.
- Boger, D., *et al.* (1998). Oleamide: an endogenous sleep-inducing lipid and prototypical member of a new class of biological signaling molecules. *Curr. Pharm. Des.*, 4, 303-14. Doi: 10.2174/138161280404221010152220.
- Boonyapiwat, B., *et al.* (2011). A Validated HPLC Method for Zanamivir and its Application to In vitro Permeability Study in Caco-2 Culture Model. *Indian Journ. Pharm. Sci.*, 73, 564-568. Doi: 10.4103/0250-474X.99015.
- Breemen, R., Li, Y. (2005). Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Exp. Opin. Drug Metb. Toxicol.*, 1, 175-185. Doi: 10.1517/17425255.1.2.175.
- Calado, V. (2013). Novas Substâncias Psicoativas: O caso da *Salvia Divinorum*. SICAD. Disponível em WWW: [sicad.pt/BK/EstatisticaInvestigacao/EstudosConcluidos](http://sicad.pt/BK/EstatisticaInvestigacao/EstudosConcluidos).
- Calinski, D., *et al.* (2019). A review of the influence of functional group modifications to the core scaffold of synthetic cathinones on drug pharmacokinetics. *Psychopharm.*, 236, 881-890. Doi: 10.1007/s00213-018-4985-6.
- Campos, E., *et al.* (2021). Identification of synthetic cathinones in seized materials: A review of analytical strategies applied in forensic chemistry. *WIREs For. Sci.*, 4, 1-29. Doi: 10.1002/wfs2.1455.

- Canáveras, J., *et al.* (2015). LC-MS untargeted metabolomic analysis of drug-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *Electrop.*, 36, 2294–2302. Doi: 10.1002/elps.201500095.
- Canáveras, J., *et al.* (2016). A metabolomics cell-based approach for anticipating and investigating drug-induced liver injury. *Scien. Repor.*, 6, 1-12. Doi: 10.1038/srep27239.
- Carlier, J., *et al.*, (2021). Pyrrolidinyl Synthetic Cathinones  $\alpha$ -PHP and 4F- $\alpha$ -PVP Metabolite Profiling Using Human Hepatocyte Incubations. *Int. Journ. Mol. Sci.*, 22, 1-17. Doi: 10.3390/ijms22010230.
- Carvalho, T. (2017). Avaliação in vitro da nefrotoxicidade de catinonas sintéticas. Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
- Chalkidi, N., *et al.* (2022). Fibroblasts in intestinal homeostasis, damage, and repair. *Front. Immunol.*, 13, 1-9. Doi: 10.3389/fimmu.2022.924866.
- Chen, W., Wong, W. (2019). Forensic drug analysis of chloro-N,N-dimethylcathinone (CDC) and chloroethcathinone (CEC): Identification of 4-CDC and 4-CEC in drug seizures and differentiation from their ring-substituted positional isomers. *For. Sci. Intern.*, 298, 268-277. Doi: 10.1016/j.forsciint.2019.03.002.
- Costa, M., *et al.* (2022). Natural Sympathomimetic Drugs: From Pharmacology to Toxicology. *Biomol.*, 12, 1-34. Doi: 10.3390/biom12121793.
- Coelho, M. (2022). Extratos de algas marinhas comestíveis aplicados para a redução do risco de doenças cardiovasculares. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química e Biológica.
- Daina, A., *et al.*, (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.*, 7, 1-13. Doi: 10.1038/srep42717.
- EUR-Lex - Decisão 2005/387/JAI do Conselho, de 10 de Maio de 2005, relativa ao intercâmbio de informações, avaliação de riscos e controlo de novas substâncias psicoactivas. 2023. [Consult. set. 2023]. Disponível em WWW: [eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32005D0387](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32005D0387).
- EMCDDA (2022). European Drug Report – Trend and Developments. Doi: 10.2810/75644.
- EMCDDA (2023). European Drug Report – Trend and Developments. Doi: 10.2810/161905.
- Faro, A., *et al.* (2020). Biomedical analysis of New Psychoactive Substances (NPS) of natural origin. *Journ. Phar. Biom. Anal.*, 179, 1-53. Doi: 10.1016/j.jpba.2019.112945.

- Feixiong, C., *et al.* (2012). admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties. *Journ. Chem. Inf. Model.*, 52, 3099–3105. Doi: 10.1021/ci300367a.
- Felice, L., *et al.* (2014). Synthetic cathinones: Chemical phylogeny, physiology and neuropharmacology. *Life Sci.*, 97, 20-26. Doi: 10.1016/j.lfs.2013.10.029.
- Figueira, A. (2021). Perfil Metabólico de Catinonas Sintéticas in vitro: Identificação de metabolitos de Fase I por Espectrometria de Massa de Alta Resolução. Instituto Superior Técnico de Lisboa. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.
- Fotakis, G., Timbrell, J. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxic. Lett.*, 160, 171-177. Doi: 10.1016/j.toxlet.2005.07.001.
- Gaspar, H., *et al.* (2018). Proactive response to tackle the threat of emerging drugs: Synthesis and toxicity evaluation of new cathinones. *Forens. Sci. Internl.*, 290, 146-156. Doi: 10.1016/j.forsciint.2018.07.001.
- Ghasemi, M., *et al.* (2021). The Mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Intern. Journ. of Molec. Sci.*, 22, 1-30. Doi: 10.3390/ijms222312827.
- Gibbons, S., Zloh, M. (2010). An analysis of the ‘legal high’ mephedrone. *Bio. Med. Chem. Let.*, 14, 4135–4139. Doi: 10.1016/j.bmcl.2010.05.065.
- Glennon, R., Dukat, M. (2017). Synthetic Cathinones: A Brief Overview of Overviews with Applications to the Forensic Sciences. *Ann. For. Res. Anal*, 4, 1-16. PMID: 30288398.
- Gonçalves, J., *et al.* (2019). Synthetic cathinones: an evolving class of new psychoactive substances. *Crit. Ver. Tox.*, 49, 549-566. Doi: 10.1080/10408444.2019.1679087.
- Gonçalves, J., *et al.* (2021). Structure Assignment of Seized Products Containing Cathinone Derivatives Using High Resolution Analytical Techniques. *Metabol.*, 11, 1-19. Doi: 10.3390/metabo11030144.
- Greco, G., *et al.* (2017). Impact of common clandestine structural modifications on synthetic cathinone “bath salt” pharmacokinetics. *Tox. App. Pharm.*, 328, 18-24. Doi: 10.1016/j.taap.2017.05.010.
- Griffell, M., *et al.* (2017). Patterns of use and toxicity of new para-halogenated substituted cathinones: 4-CMC (clephedrone), 4-CEC (4-chloroethcathinone) and 4-BMC (brephedrone). *Hum. Psych. Clin. Exp.*, 32, 1-9. Doi: 10.1002/hup.2621.

- Henriques, C. (2018). Drogas sintéticas e seus precursores: revisão sistemática de canabinóides sintéticos, catinonas sintéticas, efedrina e dimetilamina. Universidade da Beira Interior. Dissertação de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.
- Jackson, J., *et al.* (2018). Cognitive deficits and neurotoxicity induced by synthetic cathinones: is there a role for neuroinflammation?. *Psychopharm.*, 236, 1079-1095. Doi: 10.1007/s00213-018-5067-5.
- Kadry, H., *et al.* (2020). A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluid. Barr. Of the CNS*, 17, 1-24. Doi: 10.1186/s12987-020-00230-3.
- Kamiya, Y., *et al.* (2020). Determination and prediction of permeability across intestinal epithelial cell monolayer of a diverse range of industrial chemicals/drugs for estimation of oral absorption as a putative marker of hepatotoxicity. *Toxic. Report.*, 7, 149-154. Doi: 10.1016/j.toxrep.2020.01.004.
- Kiseleva, O., *et al.* (2022). Exploring Dynamic Metabolome of the HepG2 Cell Line: Rise and Fall. *Cells*, 11, 1-15. Doi: 10.3390/cells11223548.
- Kratz, J., *et al.* (2011). An HPLC-UV method for the measurement of permeability of marker drugs in the Caco-2 cell assay. *Brz. Journ. Med. Biol. Res.*, 44, 531-537. Doi: 10.1590/S0100-879X2011007500060.
- Kus, M., *et al.* (2023). Caco-2 Cell Line Standardization with Pharmaceutical Requirements and In Vitro Model Suitability for Permeability Assays. *Pharma.*, 15, 1-15. Doi: 10.3390/pharmaceutics15112523.
- Li, G., *et al.* (2019). Uridine/UMP metabolism and their function on gut in segregated early weaned piglets. *Food Funct.*, 10, 4081-4089. Doi: 10.1039/C9FO00360F.
- Lim, C., *et al.* (2007). Accumulation of Transferrin in Caco-2 Cells: A Possible Mechanism of Intestinal Transferrin Absorption. *Journ. Control Release*, 122, 393-398. Doi: 10.1016/j.jconrel.2007.03.021.
- Lopes, B. (2020). Estudo de Catinonas Sintéticas por HPLC-DAD e Identificação de Substâncias Psicoativas em Produtos Apreendidos em Portugal. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Projeto de Licenciatura em Química.
- Lopes, B., *et al.* (2020). 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, 1-13. Doi: 10.3389/fchem.2020.609251.
- Madaleira, C., *et al.* (2022). Fibroblasts as an experimental model system for the study of comparative physiology. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 260, 1-27. Doi: 10.1016/j.cbpb.2022.110735.

- Mandal, S., *et al.* (2015). Depletion of the polyamines spermidine and spermine by overexpression of spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase 1 (SAT1) leads to mitochondria-mediated apoptosis in mammalian cells. *Biochem. Journ.*, 468, 435-47. Doi: 10.1042/BJ20150168.
- Marcos, A., *et al.* (2023). Untargeted metabolomic study by liquid chromatography–mass spectrometry in brain tissues on the effects of combined cocaine and ethanol self-administration in male and female young rats. *Journ. Chroma. A*, 1700, 1-14. Doi: 10.1016/j.chroma.2023.464047.
- Masungi, C., *et al.* (2008). Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) combined with a 10-day multiscreen Caco-2 cell culture as a tool for assessing new drug candidates. *Pharm.*, 63, 194-199. Doi: 10.1691/ph.2008.7327.
- Minaleshewa, A., *et al.* (2016). Isolation and in vitro permeation of phenylpropylamino alkaloids from Khat (*Catha edulis*) across oral and intestinal mucosal tissues. *Journ. Et. Pharm.* 194, 307-315. Doi: 10.1016/j.jep.2016.09.012.
- Ministério Público Portugal – Convenção Única de 1961 sobre os Estupefacientes. Lisboa. 2023. [Consult. set. 2023]. Disponível em WWW: [ministeriopublico.pt/instrumento/convencao-unica-de-1961-sobre-os-estupefacientes-0](http://ministeriopublico.pt/instrumento/convencao-unica-de-1961-sobre-os-estupefacientes-0).
- Ministério Público Portugal – Convenção sobre as Substâncias Psicotrópicas. Lisboa. 2023. [Consult. set. 2023]. Disponível em WWW: [ministeriopublico.pt/instrumento/convencao-sobre-substancias-psicotropicas-0](http://ministeriopublico.pt/instrumento/convencao-sobre-substancias-psicotropicas-0).
- Ministério Público Portugal – Convenção das Nações Unidas contra o Tráfico Ilícito de Estupefacientes e Substâncias Psicotrópicas. Lisboa. 2023. [Consult. set. 2023]. Disponível em WWW: [ministeriopublico.pt/instrumento/convencao-das-nacoes-unidas-contra-o-traffic-ilicito-de-estupefacientes-e-substancias-1](http://ministeriopublico.pt/instrumento/convencao-das-nacoes-unidas-contra-o-traffic-ilicito-de-estupefacientes-e-substancias-1).
- Nelson, M., *et al.* (2014). Emerging drugs of abuse. *Emerg. Med. Clin. North Am.*, 32, 1-28. Doi: 10.1016/j.emc.2013.09.001.
- Nobre, M. (2019). Identificação de Novas Substâncias Psicoativas: Catinonas Sintéticas. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Dissertação de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.
- Oliveira, C. (2017). Síntese de Catinonas Psicoativas e Avaliação da sua Hepatotxicidade. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Dissertação de Mestrado em Química.
- Park, H., Yu, J. (2023). Hesperidin enhances intestinal barrier function in Caco-2 cell monolayers via AMPK-mediated tight junction-related proteins. *FES Open Bio.*, 13, 532-544. Doi: 10.1002/2211-5463.13564.

- Patil, S., *et al.* (2011). Validated HPLC Method for Concurrent Determination of Antipyrine, Carbamazepine, Furosemide and Phenytoin and its Application in Assessment of Drug Permeability through Caco-2 Cell Monolayers. *Sci. Pharm.*, 80, 89-100. Doi: 10.3797/scipharm.1109-03.
- Päskan, M., *et al.* (2022). 4-Isobutylmethcathinone—A Novel Synthetic Cathinone with High In Vitro Cytotoxicity and Strong Receptor Binding Preference of Enantiomers. *Pharm.*, 15, 1-17. Doi: 10.3390/ph15121495.
- Pendl, E., *et al.* (2021). Determination of cathinone and cathine in Khat plant material by LC–MS/MS: Fresh vs. dried leaves. *Forens. Sci. Intern.*, 319, 1-4. Doi: 10.1016/j.forsciint.2020.110658.
- Pereira, J., *et al.* (2022). Efeitos da poliamina espermidina no metabolismo e na longevidade. *Res., Soc. and Develop.*, 11, 1-8. Doi: 10.33448/rsd-v11i14.32266.
- Pieprzyca, E., *et al.* (2022) Toxicological Analysis of Intoxications with Synthetic Cathinones, *Journ. of Anal. Toxic.*, 46, 705–711. Doi: 10.1093/jat/bkab102.
- Pine, M., *et al.* (1989). Production of N1-acetyl spermidine by renal cell tumors. *Journ. Urol.*, 141, 1-5. Doi: 10.1016/s0022-5347(17)40925-6.
- Pires, D., *et al.* (2015). pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journ. Med. Chem.*, 58, 4066–4072. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104.
- Pires, C. (2018). Permeability through Caco-2 cell monolayers as a model for BBB: implementation and preliminar evaluation using model compounds. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Dissertação de Mestrado em Química Medicinal.
- Pluháček, T., *et al.* (2021). Tutorial and spreadsheet for the evaluation of instrumental quantification uncertainty by the linear weighted regression model: Determination of elemental impurities in a nasal spray by ICP-MS. *Tal.*, 225, 1-8. Doi: 10.1016/j.talanta.2020.122044.
- Präbst, K., *et al.* (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Met. Mol. Biol.*, 1601, 1-17. Doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9\_1.
- Press, B., Grandi, D. (2008). Permeability for Intestinal Absorption: Caco-2 Assay and Related Issues. *Curr. Drug. Metab.*, 9, 893-900. Doi: 10.2174/138920008786485119.
- Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa - DL n.º 54/2013, de 17 de Abril. Lisboa: Ministério Público, 2013, atual. 2023. [Consult. mai 2023]. Disponível em WWW: [pgdlisboa.pt/leis/lei\\_mostra\\_articulado.php?nid=1903&tabela=leis](http://pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?nid=1903&tabela=leis).

- Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa - Lei n.º 9/2023, de 03 de março. Lisboa: Ministério Público, 2001, atual. 2023. [Consult. mai 2023]. Disponível em WWW: [pgdlisboa.pt/leis/lei\\_mostra\\_articulado.php?nid=3621&tabela=leis&ficha=1&pagina=1&so\\_miolo=](http://pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?nid=3621&tabela=leis&ficha=1&pagina=1&so_miolo=).
- Rosenbaum, C., *et al.* (2012). Here today, gone tomorrow...and back again? A review of herbal marijuana alternatives (K2, Spice), synthetic cathinones (bath salts), kratom, *Salvia divinorum*, methoxetamine, and piperazines. *Journ. Med. Toxic.*, 8, 15-32. Doi: 10.1007/s13181-011-0202-2.
- Roy, A., *et al.* (2021). Oleamide, a Sleep-Inducing Supplement, Upregulates Doublecortin in Hippocampal Progenitor Cells via PPAR $\alpha$ . *Journ. Alzheimers Dis.*, 84, 1747-1762. Doi: 10.3233/JAD-215124.
- SICAD - Decreto Legislativo Regional n.º 28/2012/M. Lisboa. 2023. [Consult. jun. 2023]. Disponível em WWW: [sicad.pt/BK/Institucional/Legislacao/Lists/SICAD\\_LEGISLACAO/Attachments/839/DLR\\_28\\_2012\\_M.pdf](http://sicad.pt/BK/Institucional/Legislacao/Lists/SICAD_LEGISLACAO/Attachments/839/DLR_28_2012_M.pdf).
- Silva, B., *et al.* (2020). Enantioselectivity on the absorption of methylone and pentedrone using Caco-2 cell line: Development and validation of an UHPLC method for cathinones quantification. *Toxicol. and App. Pharm.*, 395, 1-7. Doi: 10.1016/j.taap.2020.114970.
- Snoeck, V., *et al.* (2005). The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Micr. Infect.*, 7, 997-1004. Doi: 10.1016/j.micinf.2005.04.003.
- Soares, J., *et al.* (2019). Structure-cytotoxicity relationship profile of 13 synthetic cathinones in differentiated human SH-SY5Y neuronal cells, *NeuroToxic.*, 75, 158-173. Doi: 10.1016/j.neuro.2019.08.009.
- Soares, J., *et al.* (2020). Adverse outcome pathways induced by 3,4-dimethylmethcathinone and 4-methylmethcathinone in differentiated human SH-SY5Y neuronal cells. *Arch. Toxicol.*, 94, 2481–2503. Doi: 10.1007/s00204-020-02761-y.
- Soares, J., *et al.* (2021). An updated review on synthetic cathinones. *Arch. Toxicol.*, 95, 2895–2940. Doi: 10.1007/s00204-021-03083-3.
- Song, I., *et al.* (2017). Comparison of Gastrointestinal Permeability of Caffeine, Propranolol, Atenolol, Ofloxacin, and Quinidine Measured Using Ussing Chamber System and Caco-2 Cell Monolayer. *Mass Spect. Lett.*, 8, 34-38. Doi: 10.5478/MSL.2017.8.2.34.
- SPL – Science Photo Library. London. 2023. [Consult. jul 2023]. Disponível em WWW: [sciencephoto.com/](http://sciencephoto.com/).

- Sun, H., *et al.* (2008). The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Exp. Opin. Drug Metab. Tox.*, 4, 395-411. Doi: 10.1517/17425255.4.4.395.
- Szeremeta, M., *et al.* (2021). Applications of Metabolomics in Forensic Toxicology and Forensic Medicine. *Int. Journ. Mol. Sci.*, 22, 1-16. Doi: 10.3390/ijms22063010.
- Tamama, K. (2021). Synthetic drugs of abuse. *Adv. Clin. Chem.*, 103, 191-208. Doi: 10.1016/bs.acc.2020.10.001.
- Tauleigne, A. (2023). Avaliação da toxicidade de catinonas sintéticas usadas como drogas de abuso. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química e Biológica.
- Theodoridis, G., *et al.* (2012). Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. *Anal. Chim. Acta.*, 20, 7-16. Doi: 10.1016/j.aca.2011.09.042.
- UNODC (2020). Recommended Methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cathinones in Seized Materials. *United Nations*. Disponível em WWW: [unodc.org/unodc/index.html](http://unodc.org/unodc/index.html).
- Vandenhoute, E., *et al.* (2015). The choroid plexus may be an underestimated site of tumor invasion to the brain: an in vitro study using neuroblastoma cell lines. *Can. Cell Int.*, 15, 1-8. Doi: 10.1186/s12935-015-0257-2.
- Vinken, M., Rogiers, V. (2015). Protocols in In Vitro Hepatocyte Research. *Met. in Molec. Biol.*, 1250, 77-93. Doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7\_5.
- Volpe, D. (2011). Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. *Fut. Med. Chem.*, 3, 2063-2077. Doi: 10.4155/FMC.11.149.
- Volpe, D. (2020). Advances in cell-based permeability assays to screen drugs for intestinal absorption. *Exp. Opin. Drug Disc.*, 15, 539-549. Doi: 10.1080/17460441.2020.1735347.
- Zwartsen, A., *et al.* (2020). Hazard Characterization of Synthetic Cathinones Using Viability, Monoamine Reuptake, and Neuronal Activity Assays. *Front. Neuros.*, 14, 1-12. Doi: 10.3389/fnins.2020.00009.
- Zawilska, J. (2018). Synthetic Cathinones: Novel Addictive and Stimulatory Psychoactive Substances. *Curr. Top. Neurot.*, 12. Doi: 10.1007/978-3-319-78707-7.
- Zhao, Y., *et al.* (2001). Evaluation of Human Intestinal Absorption Data and Subsequent Derivation of a Quantitative Structure±Activity Relationship (QSAR) with the Abraham Descriptors. *Journ. Pharm. Sci.*, 90, 749-784. Doi: 10.1002/jps.1031.

Zhao, Y., *et al.* (2022). Mechanism of Enhanced Oral Absorption of a Nano-Drug Delivery System Loaded with Trimethyl Chitosan Derivatives. *Intern. Journ. Nanomed.*, 7, 3313-3324. Doi: 10.2147/IJN.S358832.

Zhou, X., *et al.* (2019). Molecular Toxicological Mechanisms of Synthetic Cathinones on C2C12 Myoblasts. *Int. Journ. Molec. Sci.*, 20, 1-12. Doi: 10.3390/ijms20071561.



## **07 Anexos**

## Anexos

### Anexo I

Tabela 10 - Composição da solução de HBSS.

Componentes	H8264 [1X] g/L
<b>Sais inorgânicos</b>	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,185
MgSO <sub>4</sub> (anidro)	0,09767
KCl	0,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anidro)	0,06
NaHCO <sub>3</sub>	0,35
NaCl	8,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anidro)	0,04788
<b>Outros</b>	
D-Glucose	1,0
Phenol Red·Na	-

### Anexo II

Tabela 11 - Valores de CNV (inviabilidade celular) e respetivo desvio-padrão, utilizados nas curvas dose-resposta de citotoxicidade das oito catinonas sintéticas (gama de 1 a 10 mM), para a linha celular Caco-2.

C (mM)	Log C	3'-CMC		4'-CMC		3'-CEC		4'-CEC		3'-CBC		4'-CBC		3'-CI-DEC		4'-CI-DEC	
		CNV (%)	σ	CNV (%)	σ	CNV (%)	σ	CNV (%)	σ	CNV (%)	σ	CNV (%)	σ	CNV (%)	σ	CNV (%)	σ
1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,50	0,18					0,00	0,00			9,60	0,80	2,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,60	0,20									10,50	2,80	2,50	2,40				
1,75	0,24											35,68	4,80				
1,80	0,26									41,80	3,00	29,24	4,20	0,00	0,00		
1,90	0,28									51,40	4,50	51,13	4,20				
2,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,88	2,50	71,60	7,30	56,62	1,20	0,00	0,00	0,00	0,00
2,25	0,35																
2,50	0,40			0,28	3,90											0,00	0,00
3,00	0,48	0,00	0,00	8,95	3,10	0,00	0,00	4,94	3,20	96,20	2,70			67,00	4,90	7,10	4,60
3,10	0,49															41,20	0,00
3,25	0,51					6,06	4,80									84,10	5,00
3,50	0,54	6,73	1,80			4,37	1,90					92,74	1,60	96,10	1,10	85,50	3,20
3,60	0,56	8,70	4,40														
3,80	0,58	17,83	3,80			23,00	4,10										
3,90	0,59																
4,00	0,60					28,92	5,60			96,70	1,60	97,42	0,50	96,70	0,50		
5,00	0,70	35,70	3,50	53,58	5,00			35,66	4,30	96,30	1,20	97,94	0,30	96,40	1,80	94,40	2,10
5,25	0,72																
5,50	0,74			52,64	3,80	84,37	3,70										
6,00	0,78	52,45	3,00	66,25	4,40			52,76	5,00	94,90	1,70	97,55	0,30	96,20	0,10	94,10	3,40
7,00	0,85	79,83	4,60			93,47	1,60	64,33	6,60	95,20	0,90					97,10	0,40
8,00	0,90	87,88	3,30			97,16	0,70	83,21	4,10	90,20	1,90						
9,00	0,95	96,43	0,80	96,85	0,90	96,47	0,50										
10,00	1,00	96,54	0,90	95,95	0,70			95,95	0,70								

Anexo III

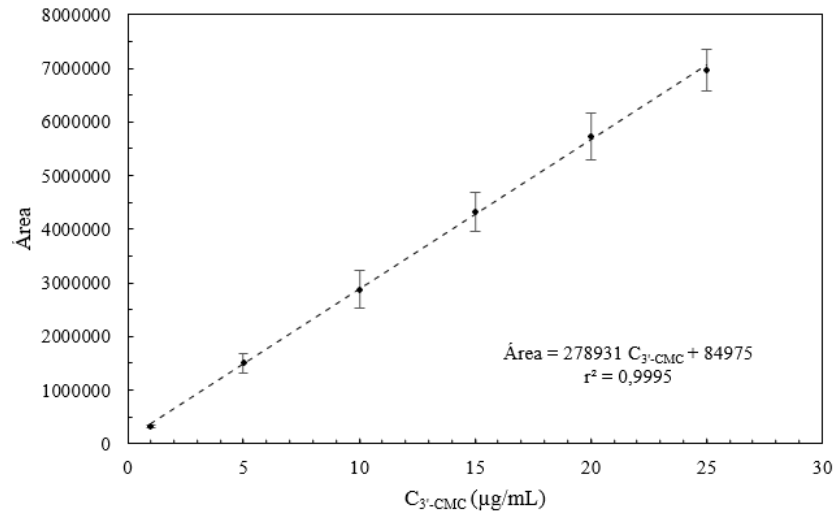


Figura 37 - Curva de calibração área do pico em função da concentração (µg/mL), do composto 3'-CMC.

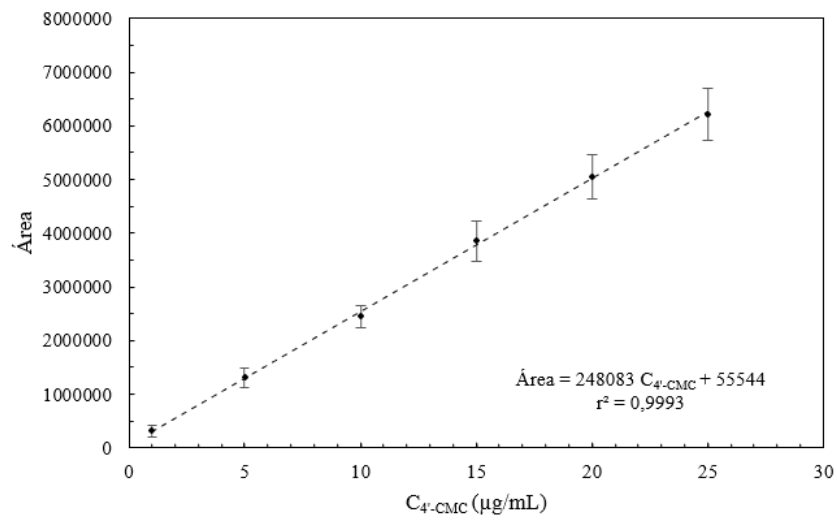


Figura 38 - Curva de calibração área do pico em função da concentração (µg/mL), do composto 4'-CMC.

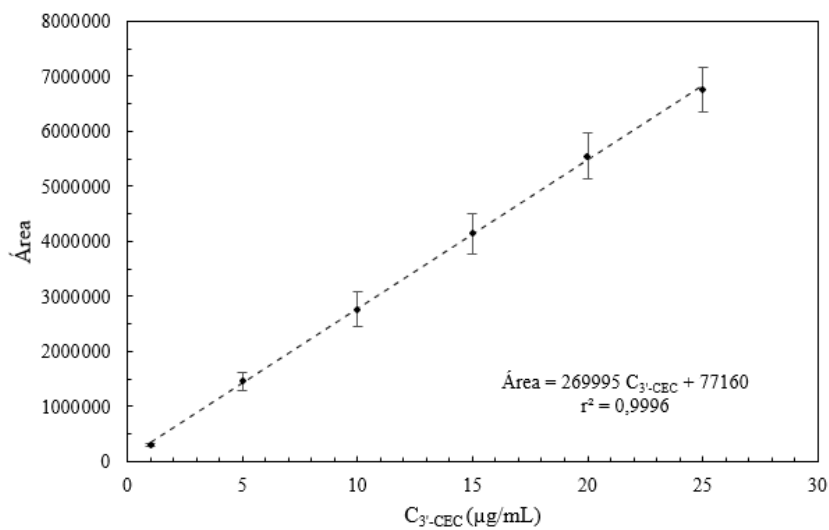
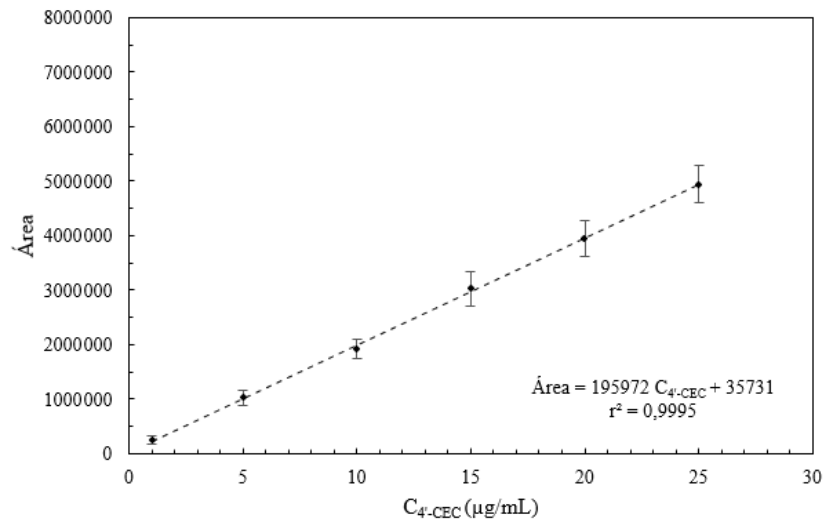
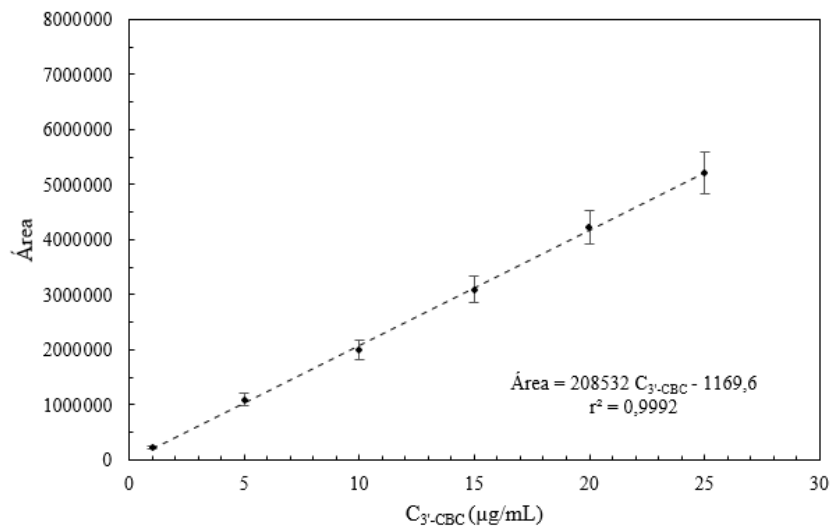


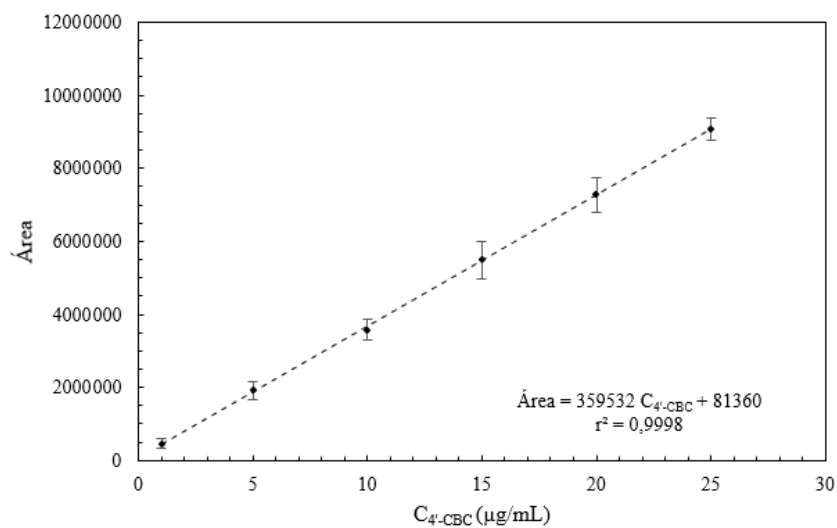
Figura 39 - Curva de calibração área do pico em função da concentração (µg/mL), do composto 3'-CEC.



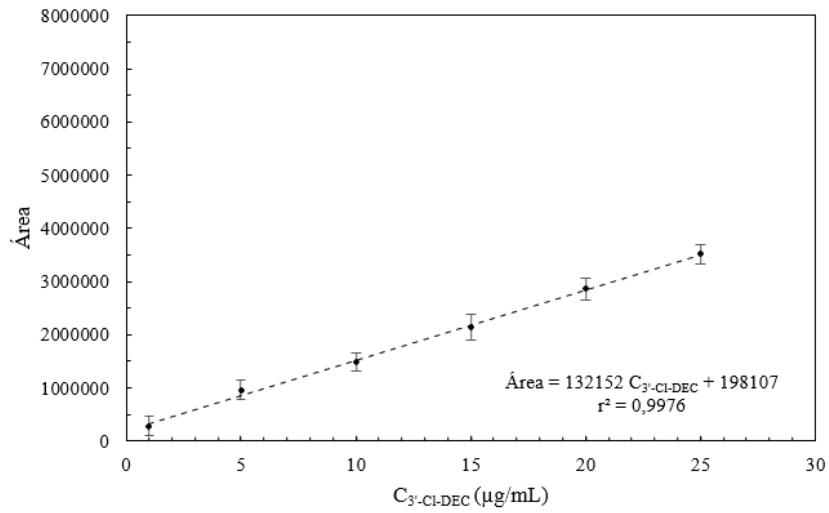
**Figura 40** - Curva de calibração área do pico em função da concentração (µg/mL), do composto 4'-CEC.



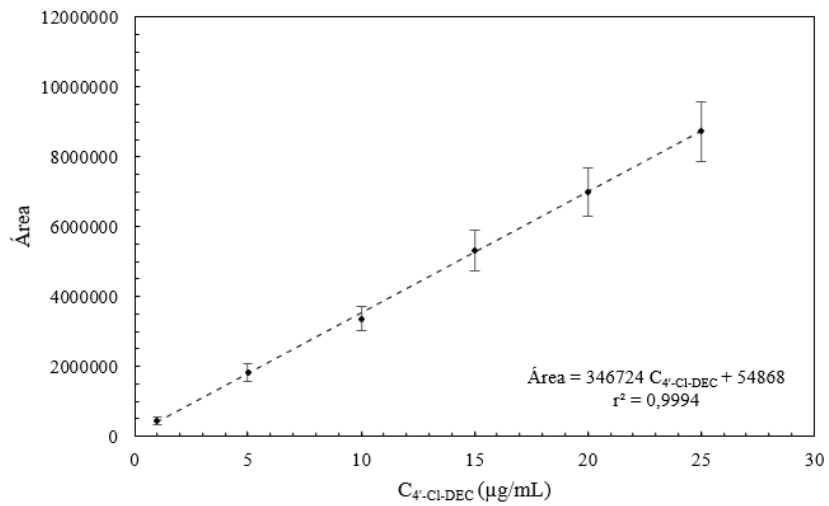
**Figura 41** - Curva de calibração área do pico em função da concentração (µg/mL), do composto 3'-CBC.



**Figura 42** - Curva de calibração área do pico em função da concentração (µg/mL), do composto 4'-CBC.

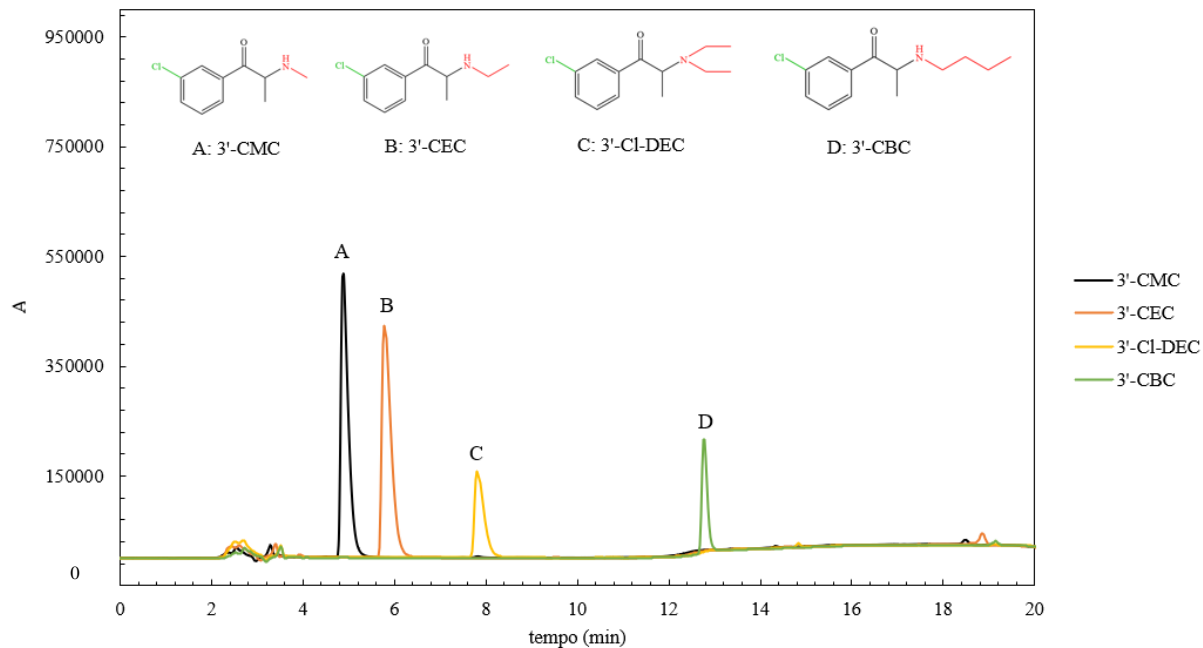


**Figura 43** - Curva de calibração área do pico em função da concentração (µg/mL), do composto 3'-Cl-DEC.

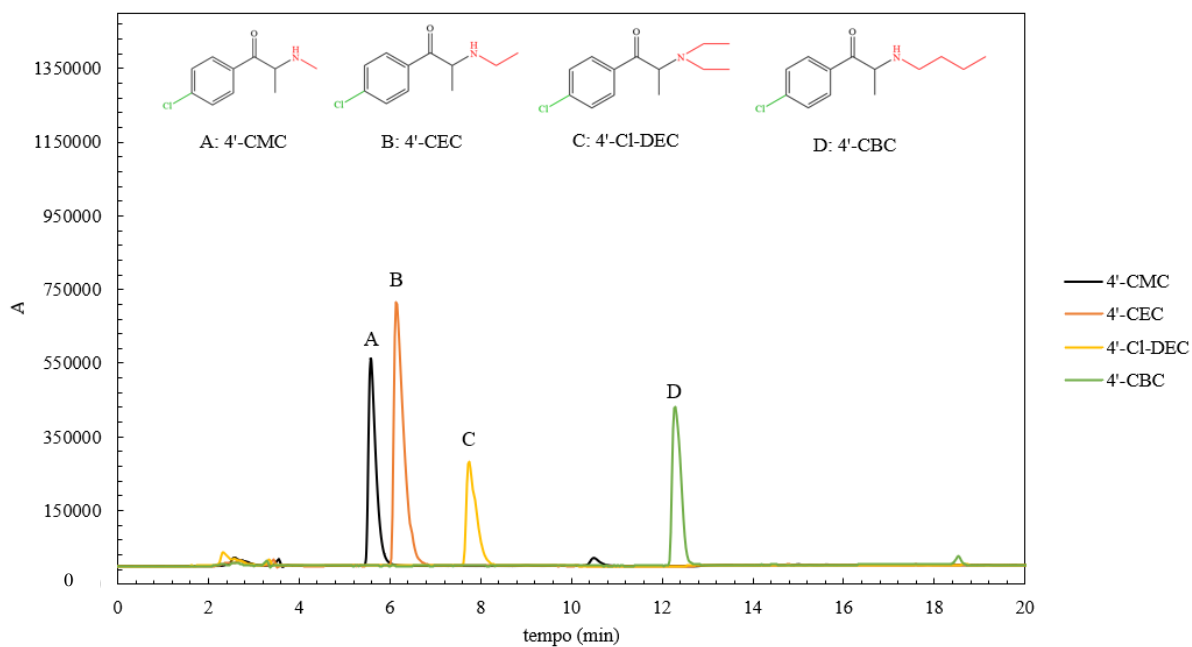


**Figura 44** - Curva de calibração área do pico em função da concentração (µg/mL), do composto 4'-Cl-DEC.

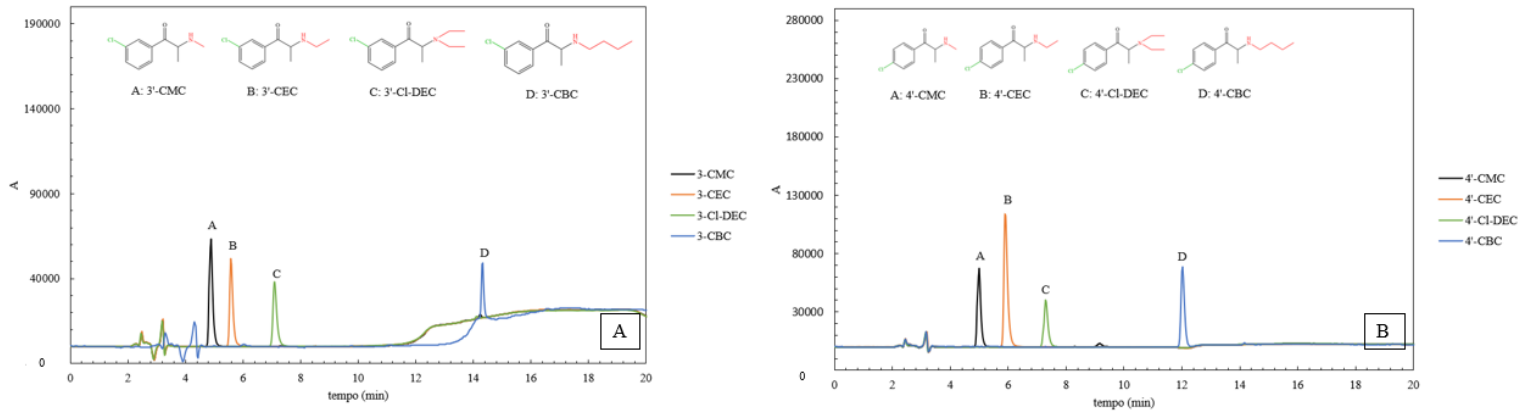
Anexo IV



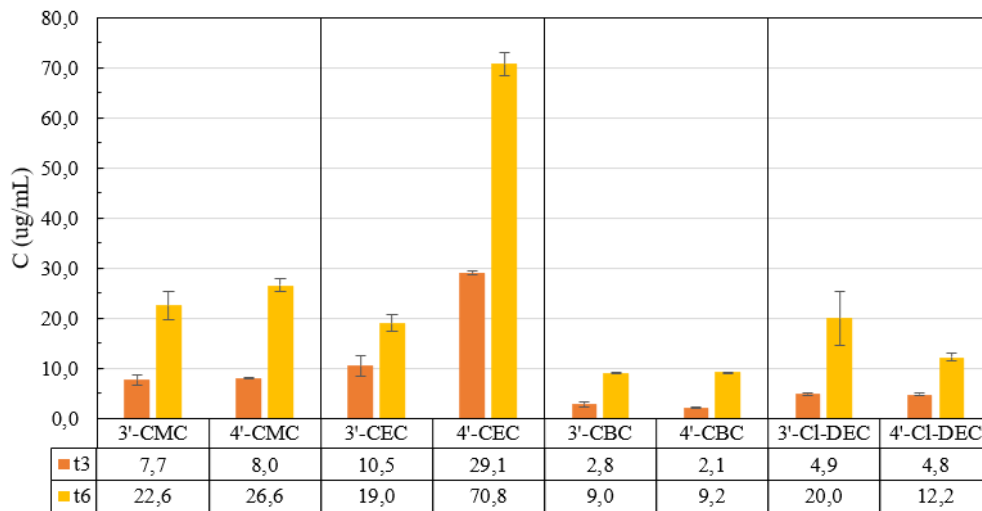
**Figura 45** - Cromatograma das catinonas sintéticas com o cloro em posição *meta*, zona basolateral às 6 horas, a 250 nm (fase móvel: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN) fluxo de 1 mL/min e injeção de 10  $\mu$ L).



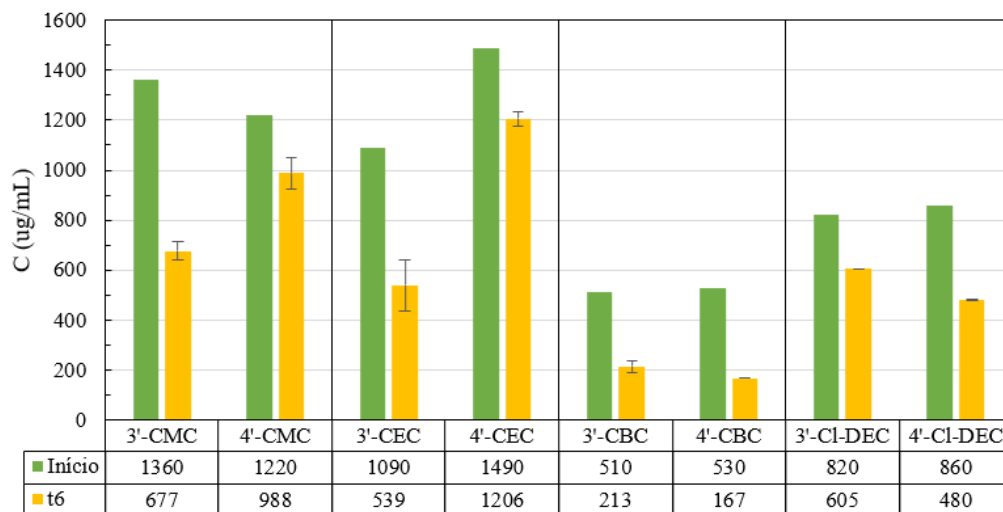
**Figura 46** - Cromatograma das catinonas sintéticas com o cloro em posição *para*, zona basolateral às 6 horas, a 262 nm (fase móvel: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN) fluxo de 1 mL/min e injeção de 10  $\mu$ L).



**Figura 47** - Cromatograma das catinonas sintéticas com o cloro em posição (A): *meta* e (B): *para*, zona apical às 6 horas, a (A) 250 nm e (B) 262 nm (fase móvel: 0-5 min (25% ACN); 5-7 min (30% ACN); 7-8 min (45% ACN); 8-12 min (60% ACN); 12-16 min (60% ACN); 16-17 min (25% ACN) fluxo de 1 mL/min e injeção de 10 µL). Diluições: 1:200 (3'-CBC), 1:500 (3'-CMC, 3'-CEC, 3'-Cl-DEC, 4'-CMC, 4'-CBC e 4'-Cl-DEC) e 1:1000 (4'-CEC).



**Figura 48** - Valores das concentrações (µg/mL) da zona basolateral, ao tempo 3h e 6h, linha celular Caco-2.



**Figura 49** - Valores das concentrações (µg/mL) da zona apical, às 0 h (IC50) e às 6 h, linha celular Caco-2.

**Tabela 12** - Valores dos tempos de retenção ( $t_r$ ) e concentrações ( $C_t$ ) para a zona basolateral, ao tempo 3 e 6 horas, para as catinonas.

Catinona	$t_{r3}$ (min)	$C_{t3}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$t_{r6}$ (min)	$C_{t6}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
3'-CMC	6,03 $\pm$ 0,11	7,65 $\pm$ 1,09	4,88 $\pm$ 0,00	22,57 $\pm$ 2,87
4'-CMC	6,37 $\pm$ 0,49	8,03 $\pm$ 0,13	5,54 $\pm$ 0,67	26,55 $\pm$ 1,32
3'-CEC	7,02 $\pm$ 0,06	10,51 $\pm$ 2,05	5,87 $\pm$ 0,07	18,99 $\pm$ 1,63
4'-CEC	7,17 $\pm$ 0,67	29,05 $\pm$ 0,30	6,20 $\pm$ 0,73	70,81 $\pm$ 2,38
3'-CBC	13,99 $\pm$ 0,03	2,80 $\pm$ 0,51	12,75 $\pm$ 0,01	9,00 $\pm$ 0,20
4'-CBC	14,00 $\pm$ 0,02	2,12 $\pm$ 0,007	12,80 $\pm$ 0,06	9,20 $\pm$ 0,06
3'-Cl-DEC	9,40 $\pm$ 0,03	4,86 $\pm$ 0,25	7,81 $\pm$ 0,00	20,02 $\pm$ 5,40
4'-Cl-DEC	9,50 $\pm$ 0,09	4,77 $\pm$ 0,22	7,85 $\pm$ 0,08	12,20 $\pm$ 0,79

**Tabela 13** - Valores das concentrações (C) iniciais e às 6 horas, com respetivos tempos de retenção ( $t_r$ ), para a zona apical; valores da diferença (%) entre a concentração inicial e final, para as catinonas.

Catinona	$C_i$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$C_{t6}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$t_{r6}$ (min)	Diferença (%)
3'-CMC	1360	677,06 $\pm$ 35,78	4,80 $\pm$ 0,08	50,22
4'-CMC	1220	988,30 $\pm$ 64,08	5,07 $\pm$ 0,08	19,02
3'-CEC	1090	539,15 $\pm$ 103,01	5,50 $\pm$ 0,06	50,53
4'-CEC	1490	1205,80 $\pm$ 29,43	5,88 $\pm$ 0,04	19,07
3'-CBC	510	213,28 $\pm$ 24,80	14,25 $\pm$ 0,06	58,18
4'-CBC	530	166,63 $\pm$ 0,00	14,3 $\pm$ 0,02	68,56
3'-Cl-DEC	820	605,26 $\pm$ 0,00	7,06 $\pm$ 0,03	26,18
4'-Cl-DEC	860	480,27 $\pm$ 0,89	7,42 $\pm$ 0,14	44,15

**Tabela 14** - Análise estatística dos valores de permeação (%) para as oito catinonas sintéticas.

		3'-CMC	3'-CEC	3'-CBC	3'-Cl-DEC	4'-CMC	4'-CEC	4'-CBC	4'-Cl-DEC
3'-CMC	F								
	$F_{\text{critico}}$								
	p-value					F>Fc	teste significativo para $p < 0,05$		
3'-CEC	F	0,0053							
	$F_{\text{critico}}$	5,9874							
	p-value	0,9445				F<Fc	teste não significativo para $p < 0,05$		
3'-CBC	F	0,0707	0,0613						
	$F_{\text{critico}}$	5,9874	5,9874						
	p-value	0,7992	0,8127						
3'-Cl-DEC	F	0,0799	0,0988	0,2564					
	$F_{\text{critico}}$	7,7086	7,7086	7,7086					
	p-value	0,7915	0,7690	0,6392					
4'-CMC	F	15,3450	22,7100	42,7827	19,6207				
	$F_{\text{critico}}$	5,3177	5,3177	5,3177	5,9874				
	p-value	0,0044	0,0014	0,0002	0,0044				
4'-CEC	F	529,3147	716,5278	1072,9312	513,5288	892,0996			
	$F_{\text{critico}}$	5,3177	5,3177	5,3177	5,9874	4,9646			
	p-value	1,3517x10 <sup>-8</sup>	4,0824x10 <sup>-9</sup>	8,2284x10 <sup>-10</sup>	4,8346x10 <sup>-7</sup>	4,1385x10 <sup>-11</sup>			
4'-CBC	F	0,0007	0,0021	0,6443	3,4442	24,8733	532,7044		
	$F_{\text{critico}}$	7,7086	7,7086	7,7086	18,5128	5,9874	5,9874		
	p-value	0,9802	0,9653	0,4671	0,2046	0,0025	4,3358x10 <sup>-7</sup>		
4'-Cl-DEC	F	5,5548	10,2170	35,9774	20,4834	106,6033	1141,1189	15,9256	
	$F_{\text{critico}}$	5,9874	5,9874	5,9874	7,7086	5,3177	5,3177	7,7086	
	p-value	0,0565	0,0187	0,0010	0,0106	6,6823x10 <sup>-6</sup>	6,4412x10 <sup>-10</sup>	0,0163	

**Tabela 15** - Valores de parâmetros estatísticos para a permeação (%) ao tempo 3 horas, para cada catinona.

	3'-CMC	3'-CEC	3'-CBC	3'-Cl-DEC	4'-CMC	4'-CEC	4'-CBC	4'-Cl-DEC
Média	1,1253	1,9277	1,0980	1,1845	1,3165	3,8988	0,8015	1,1104
Erro-padrão	0,0928	0,2172	0,1154	0,0348	0,0155	0,0232	0,0026	0,0290
Mediana	1,1263	1,9336	1,1056	1,1626	1,3150	3,9134	0,8015	1,1151
Desvio-padrão	0,1857	0,4344	0,2309	0,0696	0,0269	0,0463	0,0037	0,0580
Variância da amostra	0,0345	0,1887	0,0533	0,0048	0,0007	0,0021	0,0000	0,0034
Mínimo	0,9534	1,5384	0,8748	1,1309	1,2904	3,8318	0,7989	1,0488
Máximo	1,2951	2,3052	1,3059	1,2819	1,3441	3,9367	0,8041	1,1625
Soma	4,5012	7,7107	4,3920	4,7379	3,9495	15,5952	1,6029	4,4416
Contagem	4	4	4	4	3	4	2	4
Nível de confiança (95,0%)	0,2954	0,6912	0,3674	0,1107	0,0669	0,0737	0,0330	0,0923

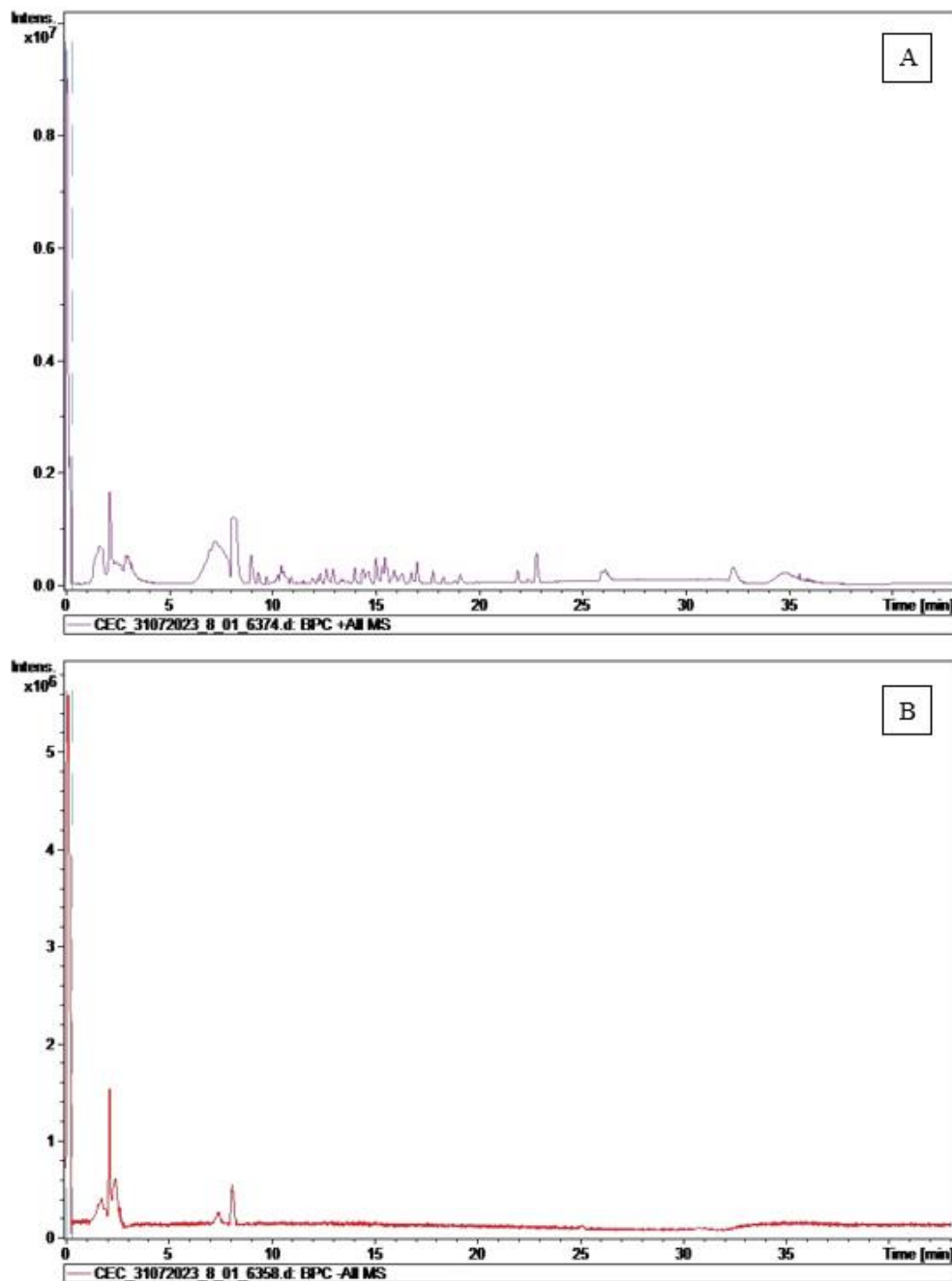
**Tabela 16** - Valores de parâmetros estatísticos para a permeação (%) ao tempo 6 horas, para cada catinona.

	3'-CMC	3'-CEC	3'-CBC	3'-Cl-DEC	4'-CMC	4'-CEC	4'-CBC	4'-Cl-DEC
Média	3,4631	3,4848	3,5290	3,5666	4,3523	9,5050	3,4728	2,8380
Erro-padrão	0,2433	0,1726	0,0459	0,0458	0,0964	0,1430	0,0214	0,1057
Mediana	3,4609	3,4577	3,5072	3,5666	4,2648	9,5913	3,4728	2,8362
Desvio-padrão	0,4866	0,3451	0,0917	0,0648	0,2362	0,3504	0,0303	0,2114
Variância da amostra	0,2368	0,1191	0,0084	0,0042	0,0558	0,1228	0,0009	0,0447
Mínimo	3,0352	3,1662	3,4505	3,5208	4,2226	8,8741	3,4514	2,6351
Máximo	3,8955	3,8575	3,6510	3,6124	4,8306	9,8827	3,4942	3,0444
Soma	13,8526	13,9391	14,1159	7,1332	26,1140	57,0303	6,9456	11,3519
Contagem	4	4	4	2	6	6	2	4
Nível de confiança (95,0%)	0,7743	0,5492	0,1459	0,5818	0,2479	0,3677	0,2722	0,3363

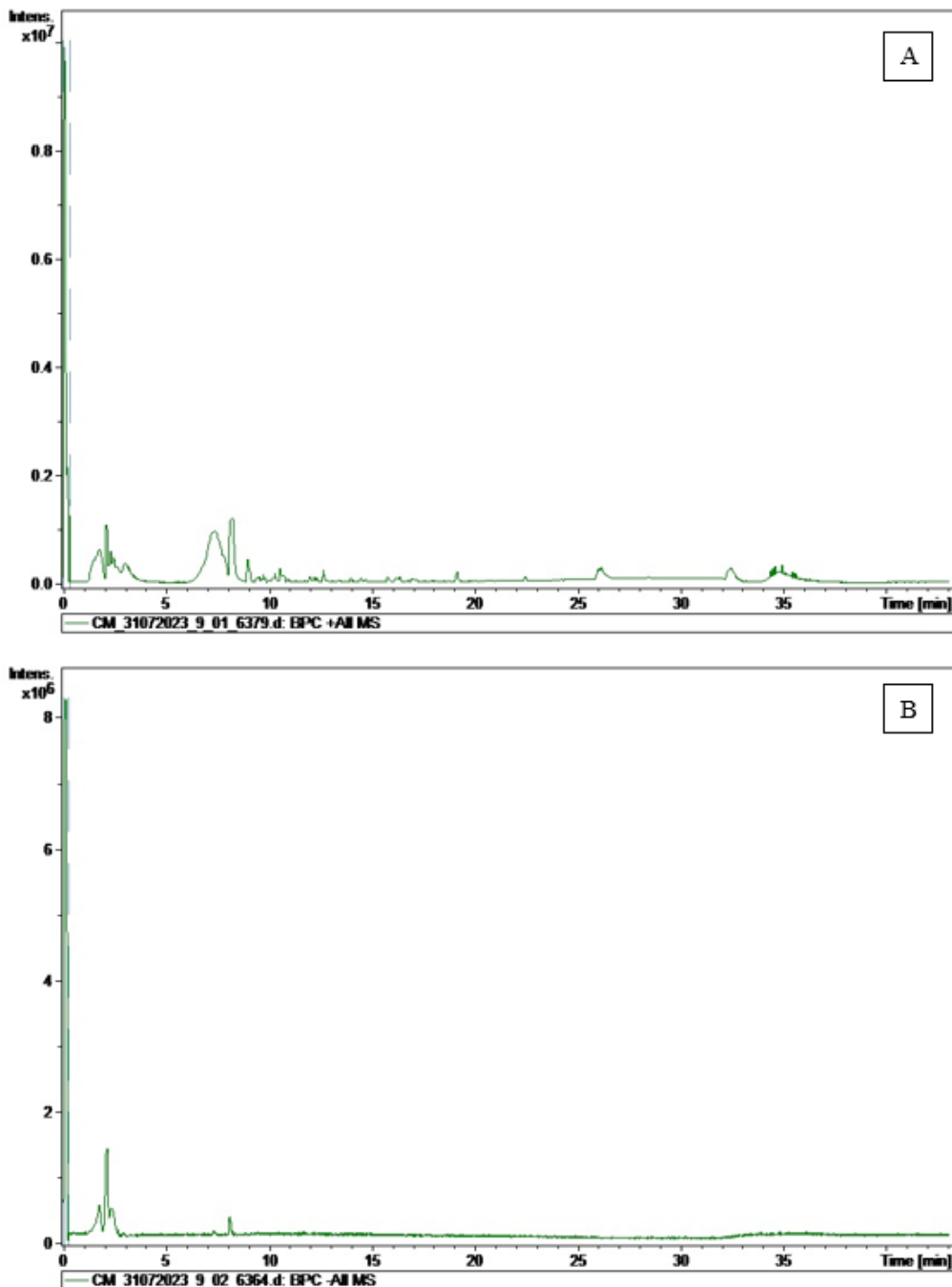
**Tabela 17** - Valores da massa e quantidade a ser permeada no intestino, com uma toma de 200 mg de catinona.

Catinona	m <sub>permeada</sub> (mg)	n (mmol)
3'-CMC	6,92	0,03
4'-CMC	8,70	0,04
3'-CEC	6,96	0,03
4'-CEC	19,02	0,08
3'-CBC	7,06	0,03
4'-CBC	6,94	0,03
3'-Cl-DEC	7,14	0,03
4'-Cl-DEC	5,68	0,02

Anexo V

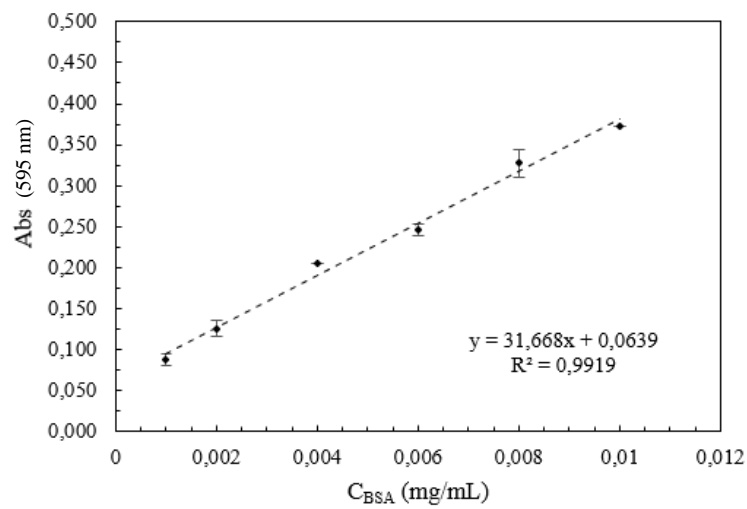


**Figura 50** - Cromatogramas dos metabolitos obtidos após exposição com a 4'-CEC, na linha celular HepG2, através da análise por LC-QTOF-MS/MS: (A) modo positivo e (B) modo negativo, utilizando o software *Datanalyses*.



**Figura 51** - Cromatogramas dos metabolitos obtidos sem exposição, ou seja, o controlo, na linha celular HepG2, através da análise por LC-QTOF-MS/MS: (A) modo positivo e (B) modo negativo, utilizando o software *Datanalyses*.

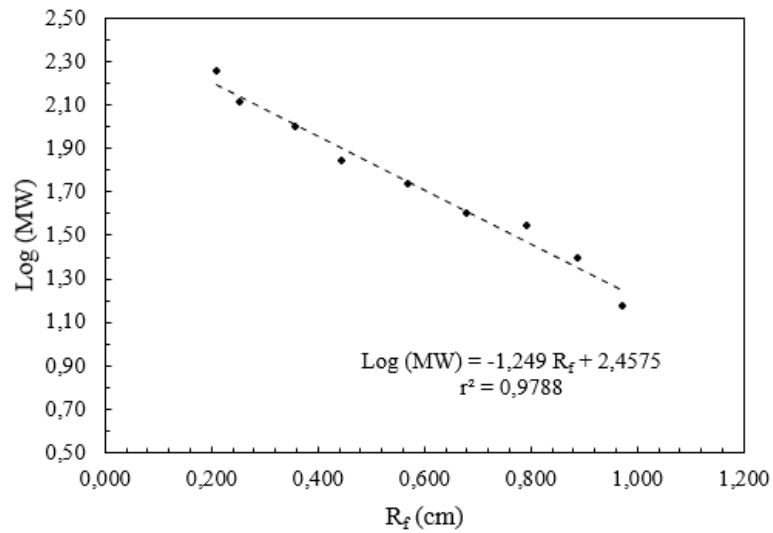
**Anexo VI**



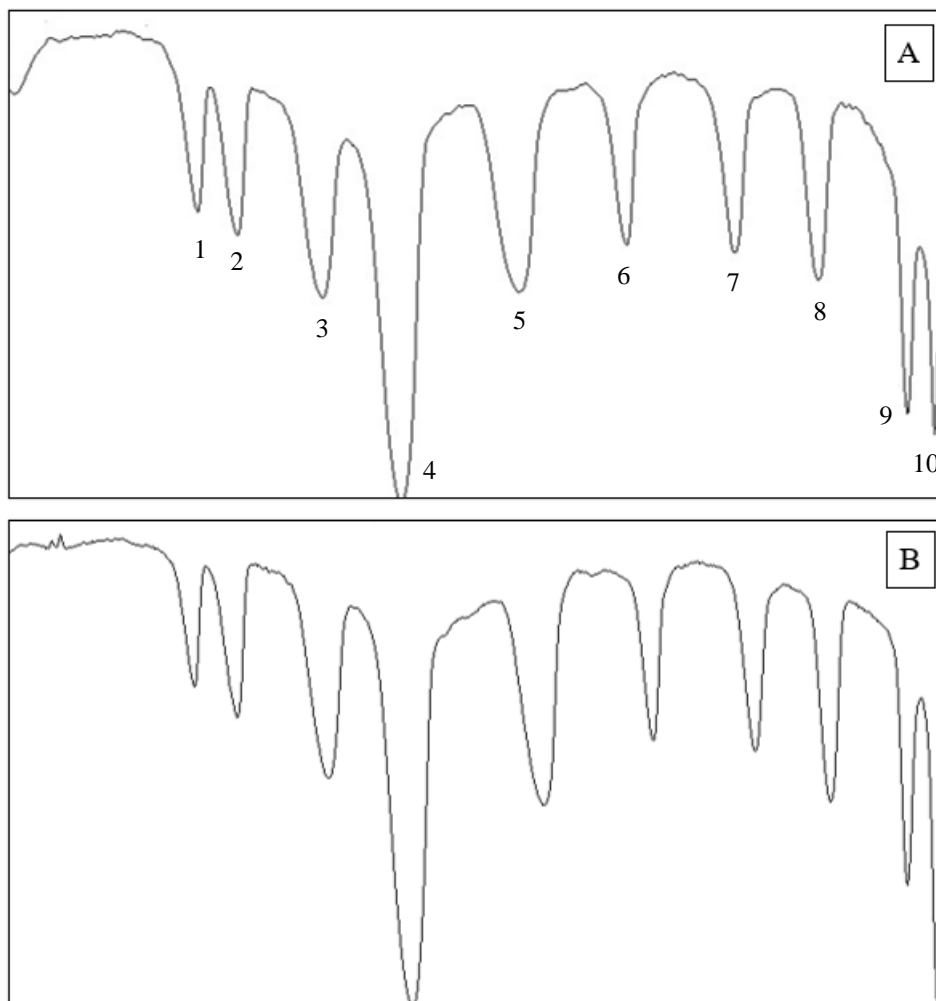
**Figura 52** - Curva de calibração de BSA (0,1 mg/mL), para quantificação de proteínas, no método de Bradford.

**Tabela 18** - Valores dos pesos moleculares (MW), distâncias percorridas e R<sub>f</sub> das bandas presentes no perfil do marcador.

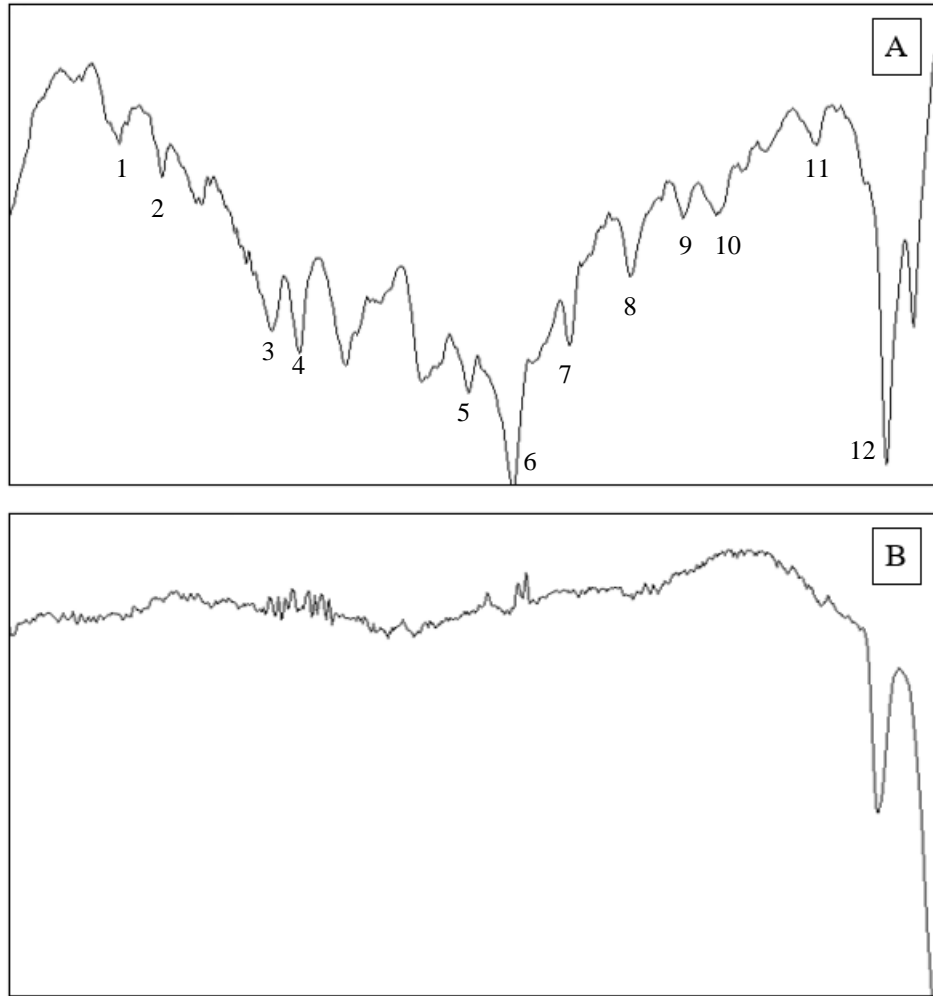
	MW (kDa)	Log (MW)	L (cm)	R <sub>f</sub> (cm)
10	10	1,00	5,881	1,000
9	15	1,18	5,707	0,970
8	25	1,40	5,211	0,886
7	35	1,54	4,655	0,792
6	40	1,60	3,993	0,679
5	55	1,74	3,341	0,568
4	70	1,85	2,610	0,444
3	100	2,00	2,097	0,357
2	130	2,11	1,488	0,253
1	180	2,26	1,235	0,210
Frente Solvente			5,881	



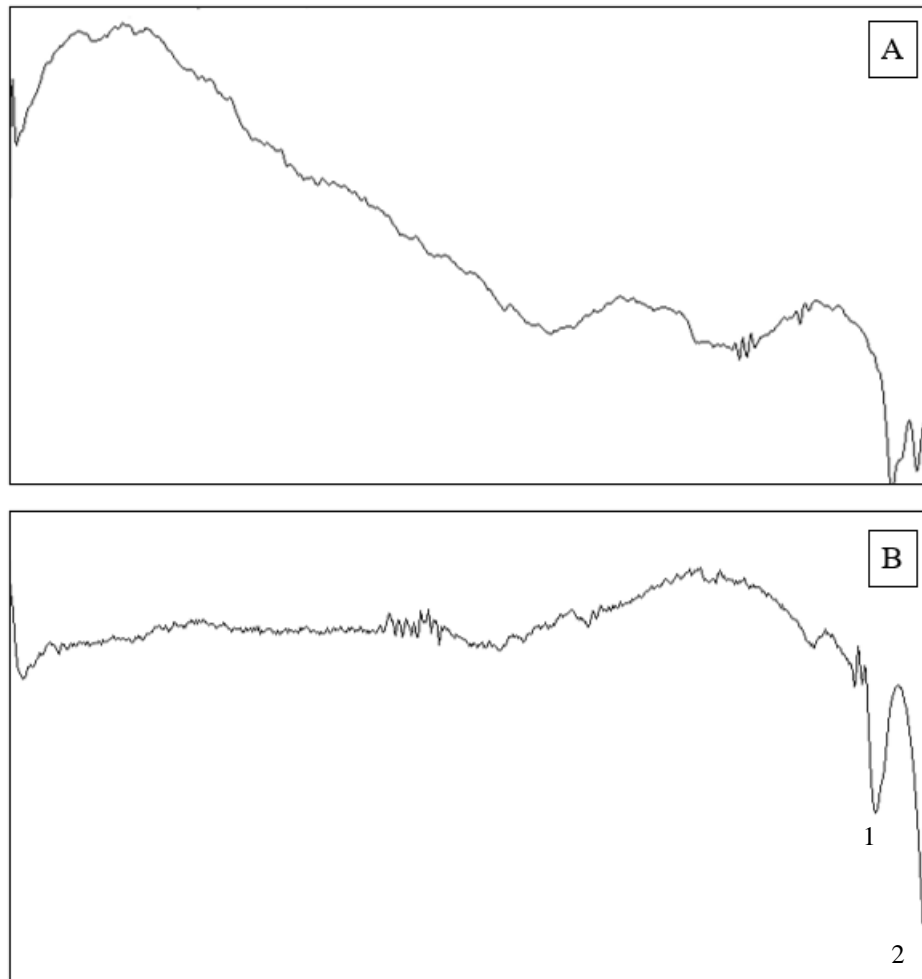
**Figura 53** - Curva de calibração logaritmo da massa molecular em função da mobilidade relativa (R<sub>f</sub>), referente às bandas do marcador (Figura 42).



**Figura 54** - Perfil das bandas das proteínas (intensidade vs distância) presentes no marcador do gel de SDS-PAGE: (A) primeira eletroforese e (B) liofilizado e repetição, utilizando a linha celular HepG2.



**Figura 55** - Perfil das bandas das proteínas (intensidade vs distância) extraídas das células controle, presente no gel de SDS-PAGE: (A) primeira eletroforese e (B) liofilizado e repetição, utilizando a linha celular HepG2.



**Figura 56** - Perfil das bandas das proteínas (intensidade vs distância) extraídas das células tratadas com a 4'-CEC, presente no gel de SDS-PAGE: (A) primeira eletroforese e (B) liofilizado e repetição, utilizando a linha celular HepG2.

**Tabela 19** - Valores das distâncias percorridas (L), R<sub>f</sub> e pesos moleculares de algumas bandas das células controlo, da linha celular HepG2.

Controlo			
L (cm)	R <sub>f</sub> (cm)	Log (MW)	MW (kDa)
0,992	0,169	2,247	176,5
1,253	0,213	2,191	155,4
1,470	0,250	2,145	139,7
1,697	0,289	2,097	125,1
1,844	0,314	2,066	116,4
2,166	0,368	1,997	99,4
2,610	0,444	1,903	80,0
2,906	0,494	1,840	69,2
3,149	0,535	1,789	61,5
3,480	0,592	1,718	52,3
3,916	0,666	1,626	42,2
4,220	0,718	1,561	36,4
4,576	0,778	1,486	30,6
5,559	0,945	1,277	18,9
5,759	0,979	1,234	17,2

**Tabela 20** - Valores das distâncias percorridas (L), Rf e pesos moleculares de duas bandas, das células expostas à 4'-CEC, da linha celular HepG2.

4'-CEC			
L (cm)	Rf (cm)	Log (MW)	MW (kDa)
5,516	0,938	1,286	19,3
5,759	0,979	1,234	17,2

## Anexo VII

**Tabela 21** - Parâmetros obtidos na análise *in silico*, para a CMC e CEC, com o *software pkCSM*.

Propriedade	Modelo	3'-CMC	4'-CMC	3'-CEC	4'-CEC
Absorção	Permeabilidade Caco-2 (log P <sub>app</sub> 10 <sup>-6</sup> cm/s)	1,481	1,369	1,615	1,502
	Absorção Intestinal Humano (% absorvida)	92,316	92,349	91,85	91,836
Distribuição	Permeabilidade BBB (log BB)	0,569	0,607	0,588	0,627
Metabolismo	Substrato CYP1A2	Sim	Sim	Sim	Sim
Toxicidade	Toxicidade AMES	Não	Não	Não	Não
	Dose tolerada máx humano (log mg/kg/dia)	0,38	0,443	0,315	0,398
	Hepatotoxicidade	Não	Não	Não	Não

**Tabela 22** – Parâmetros obtidos na análise *in silico*, para a CMC e CEC, com o *software SwissADME*.

Propriedade	Modelo	3'-CMC	4'-CMC	3'-CEC	4'-CEC
Absorção	Absorção gastrointestinal	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada
Distribuição	Permeabilidade BBB	Sim	Sim	Sim	Sim
Metabolismo	Substrato P-gp	Sim	Sim	Sim	Sim

**Tabela 23** – Parâmetros obtidos na análise *in silico*, para a CBC e CI-DEC, com o *software pkCSM*.

Propriedade	Modelo	3'-CBC	4'-CBC	4'-CI-DEC	3'-CI-DEC
Absorção	Permeabilidade Caco-2 (log Papp 10 <sup>-6</sup> cm/s)	1,536	1,423	1,514	1,627
	Absorção Intestinal Humano (% absorvida)	90,843	90,831	91,207	91,221
Distribuição	Permeabilidade BBB (log BB)	0,616	0,654	0,715	0,676
Metabolismo	Substrato CYP1A2	Sim	Sim	Sim	Sim
	Substrato CYP2D6	Sim	Sim	Sim	Sim
Toxicidade	Toxicidade AMES	Não	Não	Não	Não
	Dose tolerada máx. humano (log mg/kg/dia)	0,299	0,373	0,298	0,212
	Hepatotoxicidade	Não	Não	Não	Não

**Tabela 24** – Parâmetros obtidos na análise *in silico*, para a CBC e CI-DEC, com o *software SwissADME*.

Propriedade	Modelo	3'-CBC	4'-CBC	4'-CI-DEC	3'-CI-DEC
Absorção	Absorção gastrointestinal	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada
Distribuição	Permeabilidade BBB	Sim	Sim	Sim	Sim
Metabolismo	Substrato P-gp	Sim	Sim	Sim	Sim