



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Avaliação da toxicidade de cationas sintéticas usadas como drogas de abuso

ANA PATRÍCIA SOARES TAULEIGNE GOMES

(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: Doutor Ruben Anacoreta Seabra Elvas Leitão

Vogais:

Doutora Joana Rita Martins da Silva

Doutora Alexandra Isabel Paulo Martins da Costa

Doutora Rita Isabel Dias Pacheco

Novembro de 2023

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer às minhas orientadoras, a Doutora Rita Pacheco e a Doutora Helena Gaspar. À Doutora Helena, agradeço por todas as oportunidades extraordinárias que me proporcionou ao longo deste período. À Doutora Rita, quero agradecer não apenas pelo seu papel como orientadora mas como professora ao longo de todo o meu percurso académico. A ambas gostaria ainda de agradecer pela paciência, acompanhamento e disponibilidade, bem como pelo apoio constante, toda a dedicação, motivação, conhecimento transmitido e o próprio entusiasmo contagiante que foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

À Doutora Joana Silva e Doutor Celso Alves, pela oportunidade, disponibilidade e simpatia com que me acolheram no centro de investigação MARE, juntamente com as pessoas que tive o privilégio de conhecer neste espaço.

À Daniela Pinto, um especial obrigado pelo apoio, amizade, disponibilidade e paciência e me dar a conhecer os cantos à FCUL, tornando a minha passagem muito mais agradável.

À Olimpia, à Telma, ao Gonçalo, ao Jorge e à Inês pelo companheirismo e por tornarem as extensas horas de laboratório mais leves e alegres.

Quero agradecer à Margarida pela longa amizade e companhia durante as infinitas horas de escrita.

Ao meu namorado Rafael quero agradecer por toda a paciência que teve comigo neste percurso, pela compreensão, apoio inestimável, motivação e carinho demonstrados.

Agradeço aos meus pais e em especial ao meu irmão Bruno pelo apoio incondicional, incentivo e momentos que permitiram desanuviar e ainda às minhas companheiras felinas, pela companhia e ronronar incessante que proporcionaram ocasionais distrações e conforto durante as longas noites de escrita.

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 e UIDP/04046/2020.

Por último mas não obstante, quero agradecer a todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Divulgação Científica

Gomes, A.P., Gaspar, H., Pacheco, R., (2022) *Evaluation of the toxicity of synthetic cathinones used as drugs of abuse*, CQE Days (4^a Edição), Centro de Química Estrutural, Lisboa, Portugal, 26 e 27 de Maio.

Resumo

Na última década, verificou-se globalmente um aumento do consumo de novas substâncias psicoativas (NSP) como drogas de abuso. A 2ª classe mais abundante entre as NSP relatadas ao EMCDDA (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*) são as catinonas sintéticas. Estas NSP representam uma ameaça à saúde pública pois pretendem mimetizar o efeito de drogas ilícitas, no entanto, as consequências associadas ao seu consumo são ainda pouco conhecidas e, tendo ocorrido várias fatalidades relacionadas à sua utilização.

De modo a aumentar o conhecimento sobre as catinonas sintéticas foi avaliado o potencial efeito citotóxico *in vitro*, usando a linha celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) e a linha celular diferenciada de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), e ainda o efeito sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), de 21 catinonas: 2'-CMC, 3'-CMC, 4'-CMC, 2'-CEC, 3'-CEC, 4'-CEC, 3'-CBC, 4'-CBC, 2'-CI-PPP, 3'-CI-PPP, 4'-CI-PPP, 2'-CDC, 3'-CDC, 4'-CDC, 3'-CI-DEC, 4'-CI-DEC, 3'-CIC, 4'-CIC, 3'-CI-TBC, 4'-CI-TBC e a mefedrona. Destas, foram sintetizadas e caracterizadas por RMN as cloro-*N*-butilcatinonas (CBC).

Foi possível comprovar uma relação entre as atividades obtidas e a estrutura das catinonas testadas, tendo-se demonstrado pela primeira vez, que as catinonas inibem a atividade da AChE. Verificou-se que as catinonas que apresentaram melhor capacidade inibitória têm uma cadeia *N,N*-dialquílica com quatro átomos de carbono (3'-CI-DEC, 4'-CI-DEC) ou uma cadeia *N*-isopropílica (3'-CIC).

Verificou-se, de um modo geral, um aumento da citotoxicidade em ambas as linhas celulares, com o aumento da cadeia *N*-alquílica do grupo amino, sendo as catinonas sintetizadas, 3'-CBC e 4'-CBC, as mais ativas. A comparação dos valores do LC₅₀ da mefedrona e da 4'-CMC sugere que a substituição de um grupo metilo por um átomo de cloro no anel aromático aumenta a citotoxicidade.

Apesar de existirem diferenças significativas nas atividades obtidas entre a maioria dos regioisômeros, que diferem na posição do átomo do cloro no anel aromático (*orto*, *meta* e *para*), não se verificou uma tendência regular no efeito desta posição sobre a atividade.

Foi ainda realizada uma previsão *in silico* das propriedades farmacocinéticas ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) das catinonas usadas neste trabalho, nomeadamente as suas propriedades físico-químicas e o seu potencial de bioatividade. Os dados obtidos no geral indicam que todas as catinonas poderão exibir uma boa disponibilidade oral, evidenciando que o seu consumo, para além dos efeitos experimentalmente determinados neste trabalho, constituem um risco para saúde dos consumidores. É de ressaltar ainda a necessidade de continuar a investigar outros efeitos biológicos potencialmente associados ao consumo destas substâncias.

Palavras-chave: NSP, Catinonas Sintéticas, AChE, HepG2, SH-SY5Y, ADME *in silico*.

Abstract

Over the past decade, there has been a global increase in the consumption of new psychoactive substances (NPS) as drugs of abuse. Synthetic cathinones are the second most prevalent class of NPS reported to the European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). These NPS represent a threat to public health as they aim to mimic the effect of illicit drugs where the consequences associated with their consumption are still poorly understood, and several fatalities have already been related to their use.

In order to increase knowledge about synthetic cathinones, the potential cytotoxic effect was evaluated in vitro using the human hepatocarcinoma cell line (HepG2) and the differentiated human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y), as well as the effect on the enzyme activity acetylcholinesterase (AChE), of 21 cathinones: 2'-CMC, 3'-CMC, 4'-CMC, 2'-CEC, 3'-CEC, 4'-CEC, 3'-CBC, 4'-CBC, 2'-Cl-PPP, 3'-Cl-PPP, 4'-Cl-PPP, 2'-CDC, 3'-CDC, 4'-CDC, 3'-Cl-DEC, 4'-Cl-DEC, 3'-CIC, 4'-CIC, 3'-Cl-TBC, 4'-Cl-TBC and mephedrone. Of these, chloro-*N*-butylcathinones (CBC) were synthesized and characterized by NMR.

A relationship between the activities obtained and the structure of the cathinones assessed was proven, demonstrating for the first time that cathinones inhibit AChE activity. It was found that cathinones with the best inhibitory capacity have an *N,N*-dialkyl chain with four carbon atoms (3'-Cl-DEC, 4'-Cl-DEC) or an *N*-isopropyl chain (3'-CIC).

In general, there was an increase in cytotoxicity in both cell lines, with an increase in the *N*-alkyl chain of the amino group, with the synthesized cathinones 3'-CBC and 4'-CBC being the most active. Additionally, a comparison of the LC₅₀ values of mephedrone and 4'-CMC seems to indicate that the replacement of a methyl group by a chlorine atom in the aromatic ring increases cytotoxicity.

Although there are significant differences in the activities obtained between the majority of regioisomers that differ in the position of the chlorine atom in the aromatic ring (ortho, meta and para), there was no regular trend in the effect of this position on the activity.

An in silico prediction of the ADME pharmacokinetic properties (absorption, distribution, metabolism and excretion) of the cathinones used in this work was also analysed, namely their physicochemical properties and their potential for bioactivity. The data obtained in general indicate that all cathinones may exhibit good oral availability, revealing that their consumption, in addition to the experimentally determined effects in this work, constitutes a risk to the health of consumers. It is also noteworthy the need to continue investigating other potentially associated biological effects of the consumption of these substances.

Keywords: NSP, Synthetic Cathinones, AChE, HepG2, SH-SY5Y, ADME in silico.

Índice

Agradecimentos.....	i
Divulgação Científica.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas.....	xii
Índice de Anexos.....	xiii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Novas Substâncias Psicoativas (NSP).....	1
1.2. Catinonas Sintéticas – Mercado e Prevalência.....	3
1.3. Estrutura das catinonas sintéticas.....	6
1.4. Farmacologia e efeitos adversos associados ao consumo.....	7
1.5. Mecanismos de Acção no SNC.....	10
1.6. O sistema colinérgico e a acetilcolinesterase.....	12
1.7. Métodos <i>in silico</i>	14
2. Enquadramento.....	16
3. Materiais e Métodos.....	20
3.1. Reagentes e Solventes.....	20
3.2. Linhas Celulares Humanas.....	21
3.3. Equipamentos.....	22
3.4. Preparação das catinonas.....	23
3.4.1. Síntese da 2'-Cloropropiofenona.....	23
3.4.2. Síntese das α -Bromocetonas.....	24
3.4.3. Síntese das Cloro- <i>N</i> -butilcatinonas.....	26
3.4.4. Síntese do Ácido Clorídrico Etéreo (3M).....	27
3.5. Ensaio de Inibição da Atividade Enzimática da AChE.....	28
3.6. Ensaio de avaliação de citotoxicidade em linhas celulares humanas.....	29
3.6.1. Cultivo da linha celular HepG2 e ensaios de viabilidade celular.....	30
3.6.2. Cultivo e diferenciação da linha celular SH-SY5Y e ensaios de viabilidade celular.....	31
3.7. Análise estatística de dados.....	33
3.8. Estudo <i>In Silico</i>	33
4. Resultados e Discussão.....	36
4.1. Preparação das catinonas.....	36
4.1.1. Síntese da 2'-Cloropropiofenona.....	36
4.1.2. Síntese das α -Bromocetonas.....	38
4.1.3. Síntese das Cloro- <i>N</i> -butilcatinonas.....	41
4.2. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase (AChE).....	44
4.3. Efeito das catinonas sobre a viabilidade das células hepáticas HepG2.....	52
4.4. Efeito das catinonas sobre a viabilidade das células neuronais SH-SY5Y.....	60
4.5. Estudos <i>in silico</i>	68
5. Considerações Finais e Perspetivas Futuras.....	74
6. Referências.....	76
A. Anexos.....	I

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Número de NSP monitorizadas pelo EWS da UE, por categoria, detetadas até ao final de 2022.	2
Figura 1.2 - Estrutura química da catinona natural presente na planta Khat.	3
Figura 1.3 - Evolução cronológica do desenvolvimento de catinonas sintéticas com potencial farmacológico, destacando-se a bupropiona como a única catinona que permanece disponível comercialmente (amarelo) e a identificação da estrutura da catinona na planta khat em 1975 (verde).....	4
Figura 1.4 - Dados estatísticos relativos às catinonas sintéticas na Europa desde 2005. (a) Número de catinonas sintéticas notificadas pela primeira vez, (b) Número e quantidade de apreensões de catinonas na Europa, e (c) Estrutura química das catinonas mais apreendidas em 2020: N-etil-hexedrona (NEH), 3'-metilmetcatinona (3'-MMC) e 3'-cloro-N-metilcatinona (3'-CMC) [19,20].	5
Figura 1.5 - Estruturas químicas das catinonas e das anfetaminas destacando-se a azul o grupo carbonilo, específico das catinonas, na posição β da cadeia aminoalquílica.	6
Figura 1.6 - Estrutura geral das catinonas sintéticas com os potenciais locais de substituição e respetivos grupos destacados: a amarelo as substituições no carbono α da cadeia lateral (R_1), a vermelho substituições no grupo amino (R_2/R_3) e a azul as substituições no anel aromático (R_4).	7
Figura 1.7 - Permeação de catinonas sintéticas através da barreira hematoencefálica (BHE). Adaptado de [49].	8
Figura 1.8 - Modos de ação das catinonas sintéticas no sistema nervoso central (SNC) [79].	11
Figura 1.9 - Representação esquemática da sinapse colinérgica.	13
Figura 1.10 - Visão esquemática do centro ativo da enzima AChE [92].	13
Figura 2.1 - Estrutura das cloro-catinonas estudadas no âmbito deste trabalho e respetivo estatuto legal atual, e local e data da primeira vez que foram reportadas ao EMCDDA, destacando-se a mefedrona como a única catinona não-clorada [109–113].	17
Figura 3.1 - Esquema reacional geral da síntese das catinonas na forma de cloridrato, destacado a azul o passo adicional de síntese da 2'-cloropropiofenona (24).	23
Figura 3.2 - Montagem para síntese do Ácido Clorídrico Etéreo (3M).	28
Figura 3.3 - Esquema representativo da reação enzimática da AChE, para a determinação da atividade enzimática através do método de Ellman [143].	28
Figura 3.4 - Conversão do MTT em Formazan por desidrogenases presentes em células viáveis.	30
Figura 3.5 - Morfologia das células humanas de hepatocarcinoma HepG2. Observação ao microscópio óptico invertido ampliação (x200).	31
Figura 3.6 - Morfologia das células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y indiferenciadas (à esquerda) e após diferenciação (à direita), observadas ao microscópio óptico invertido (x200).	32
Figura 4.1 - Mecanismo de formação da 2'-cloropropiofenona (24) com a adição de H_2O e H_2SO_4	37
Figura 4.2 - Comparação dos espetros RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) da 2'-clorobenzonitrilo (23) com a 2'-cloropropiofenona (24).	38
Figura 4.3 - Mecanismo de formação das α -bromocetonas (27 , 28 e 29) a partir das respetivas cloropropiofenonas (24 , 25 e 26).	38

Figura 4.4 - Comparação dos espectros de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da 2'-cloropropriofenona (24) com a respetiva bromocetona (27). * sinal de dibromocetona.	40
Figura 4.5 - Comparação dos espectros de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da 3'-cloropropriofenona (25) com a respetiva bromocetona (28).	40
Figura 4.6 - Comparação dos espectros de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) da 4'-cloropropriofenona (26) com a respetiva bromocetona (29). * sinais de dibromocetona.	41
Figura 4.7 - Mecanismo de formação das catinonas (7, 8 e 9) na forma de base livre e na forma de cloridrato, a partir das bromocetonas correspondentes (27, 28 e 29).	42
Figura 4.8 - Comparação dos espectros de RMN ¹ H (400MHz, DMSO-d ₆) da 3'-cloro-2-bromopropriofenona (28) com a 3'-CBC (8).	43
Figura 4.9 - Comparação dos espectros de RMN ¹ H (400MHz, DMSO-d ₆) da 4'-cloro-2-bromopropriofenona (29) com a 4'-CBC (9).	43
Figura 4.10 - Curvas Dose-Resposta – Percentagem de inibição da AChE para as concentrações testadas das 20 catinonas agrupadas por conjuntos de isómeros e da mefedrona (22). A percentagem inibição para cada concentração é apresentada com a média e o desvio padrão associada aos vários ensaios realizados pelo método de Ellman descrito em [142].	46
Figura 4.11 - Comparação da capacidade inibição da AChE das diferentes catinonas. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.	48
Figura 4.12 - Comparação da capacidade inibição da AChE de catinonas com o aumento da cadeia do grupo amino secundário alifático linear (CMC, 1 carbono, CEC, 2 carbonos e CBC 4 carbonos). Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.	50
Figura 4.13 - Comparação da capacidade inibição da AChE das catinonas com cadeias <i>N</i> -alquílicas ramificadas. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.	51
Figura 4.14 - Comparação da capacidade inibição da AChE de diferentes catinonas contendo grupos amino terciários alifáticos ou cíclicos. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.	51
Figura 4.15 - Curvas Dose-Resposta – Percentagem de citotoxicidade das 21 catinonas estudadas agrupadas por conjuntos de isómeros e obtidas do método de redução por MTT em células hepáticas indiferenciadas HepG2 realizadas após uma exposição de 24h. A percentagem de toxicidade é apresentada com a média e o desvio padrão de cada ensaio, realizado pelo menos uma vez com 6 replicados.	54
Figura 4.16 - Comparação dos LC ₅₀ das diferentes catinonas para as células HepG2. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.	56
Figura 4.17 - Comparação dos LC ₅₀ de catinonas com o aumento da cadeia do grupo amino secundário alifático linear (CMC, 1 carbono, CEC, 2 carbonos e CBC 4 carbonos), em células HepG2. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.	58
Figura 4.18 - Comparação dos LC ₅₀ das catinonas com cadeias <i>N</i> -alquílicas ramificadas, em células HepG2. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.	58
Figura 4.19 - Comparação dos LC ₅₀ de diferentes catinonas contendo grupos amino terciários alifáticos ou cíclicos., em células HepG2. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.	59
Figura 4.20 - Curvas Dose-Resposta – Percentagem de citotoxicidade das 21 catinonas estudadas agrupadas por conjuntos de isómeros e obtidas do método de redução por MTT em células neuronais diferenciadas SH-SY5Y realizadas após uma exposição de 24h. A percentagem de citotoxicidade é	

apresentada com a média e o desvio padrão de cada ensaio, realizado por 3 ensaios independentes em triplicado.....	62
Figura 4.21 - Comparação dos LC ₅₀ das diferentes catinonas para as células SH-SY5Y. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.	64
Figura 4.22 - Comparação dos LC ₅₀ de catinonas com o aumento da cadeia do grupo amino secundário alifático linear (CMC, 1 carbono, CEC, 2 carbonos e CBC 4 carbonos), em células SH-SY5Y. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.	66
Figura 4.23 - Comparação dos LC ₅₀ de catinonas com diferentes graus de ramificação do grupo amino, em células HepG2. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.	67
Figura 4.24 - Comparação dos LC ₅₀ de diferentes catinonas contendo grupos amino terciários alifáticos ou cíclicos, em células SH-SY5Y. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.	67
Figura 4.25 - Representação dos valores de IC ₅₀ em relação ao Log P para os ensaios de inibição da atividade da AChE.....	70
Figura 4.26 - Representação dos valores de LC ₅₀ em relação ao Log P para os ensaios biológicos com as linhas celulares HepG2.....	71
Figura 4.27 - Representação dos valores de LC ₅₀ em relação ao Log P para os ensaios biológicos com as linhas celulares SH-SY5Y.....	71

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Efeitos adversos associados ao consumo de catinonas sintéticas [26,64].....	10
Tabela 1.2 - Classificação das catinonas sintéticas de acordo com a mecanismo de ação com efeito semelhante a cocaína-MDMA, metanfetamina e pirovaleronas [24,54,71,72,76].....	12
Tabela 3.1 - Quantidade de 2'-clorobenzonitrilo (23) usado, de 2'-cloropropiofenona (24) obtido e rendimento da reação.....	24
Tabela 3.2 - Condições e quantidades de reagente e de produto para as sínteses das bromocetonas e respetivo rendimento.....	25
Tabela 3.3 - Condições e quantidades de reagentes e de produto para as sínteses das catinonas e respetivo rendimento.....	27
Tabela 4.1 - Valores da concentração de catinona que inibe 50 % da atividade da AChE (IC ₅₀) e respetivos intervalos de confiança [CI], declives de Hill e concentração mínima com efeitos adversos observáveis (LOAEL), exceto para a 4'-CMC (3) e a 4'-Cl-TBC (21). * IC ₅₀ ~ 2 mM. Para 2 mM houve 47% inibição. ** IC ₅₀ ~ 2 mM. Para 2 mM houve 48% inibição.	45
Tabela 4.2 - Resultados da análise estatística realizada aos ensaios da AChE. A verde encontram-se as catinonas da coluna de A que apresentam valor de IC ₅₀ superior a B e a vermelho as catinonas da coluna de A que apresentam valor de IC ₅₀ inferior a B. As correlações estatísticas não significativas (NS) apresentam p>0,05. ND - Não definido.....	47
Tabela 4.3 – Valores de concentração da catinona que induz 50% de morte celular (LC ₅₀) e respetivos intervalos de confiança [CI], declives de Hill e concentração mínima com efeitos citotóxicos observáveis (LOAEL), após 24h de exposição das células hepáticas HepG2.....	53

Tabela 4.4- Resultados da análise estatística realizada aos ensaios da HepG2. A verde encontram-se as catinonas da coluna de A que apresentam valor de LC ₅₀ superior a B e a vermelho as catinonas da coluna de A que apresentam valor de LC ₅₀ inferior a B. As correlações estatísticas não significativas (NS) apresentam p>0,05.....	55
Tabela 4.5 - Valores de concentração da catinona que induz 50% de morte celular (LC ₅₀) e respetivos intervalos de confiança [CI], declives de Hill e concentração mínima com efeitos citotóxicos observáveis (LOAEL), após 24h de exposição das células neuronais SH-SY5Y.	61
Tabela 4.6- Resultados da análise estatística realizada aos ensaios da SH-SY5Y. A verde encontram-se as catinonas da coluna de A que apresentam valor de LC ₅₀ superior a B e a vermelho as catinonas da coluna de A que apresentam valor de LC ₅₀ inferior a B. As correlações estatísticas não significativas (NS) apresentam p>0,05.....	63
Tabela 4.7 - Resultados preditivos das propriedades moleculares das diferentes catinonas sintéticas analisadas (1-22). Massa Molecular (MM), Coeficiente de partição octanol/água (Log P), N° aceitadores de ligação de hidrogénio (HBA), N° doadores de protões (HBD), N° ligações com rotação (NRB), Área de superfície polar topológica (TPSA), probabilidade de permeabilidade através da barreira hematoencefálica (BHE), probabilidade de permeabilidade através da barreira gastrointestinal (BGI).	69
Tabela 4.8 - Resultados preditivos da bioatividade das catinonas estudadas (1-22) em relação aos alvos biológicos: Receptores acoplado à proteína G (GPCR), Modulador de canal iónico (ICM), Inibidor de cinase (KI), Ligante de receptor nuclear (NRL), Inibidor de protease (PI) e Inibidor de enzima (EI).	72

Índice de Anexos

Figura A.1 - Espetro de RMN ¹ H (CDCl ₃) da 2'-cloropropriofenona (24).	I
Figura A.2 - Espetro de RMN ¹ H (CDCl ₃) da 2'-cloropropriofenona (24) (ampliação).	I
Figura A.3 - Espetro de COSY (CDCl ₃) da 2'-cloropropriofenona (24).	II
Figura A.4 - Espetro de RMN ¹³ C APT (CDCl ₃) da 2'-cloropropriofenona (24).	II
Figura A.5 - Espetro de HSQC (CDCl ₃) da 2'-cloropropriofenona (24).	III
Figura A.6 - Espetro de HMBC (CDCl ₃) da 2'-cloropropriofenona (24).	III
Figura A.7 - Espetro de RMN ¹ H (CDCl ₃) da 2'-cloro-2-bromopropriofenona (27).	IV
Figura A.8 - Espetro de RMN ¹ H (CDCl ₃) da 2'-cloro-2-bromopropriofenona (27) (ampliação).	IV
Figura A.9 - Espetro de COSY (CDCl ₃) da 2'-cloro-2-bromopropriofenona (27).	V
Figura A.10 - Espetro de RMN ¹³ C APT (CDCl ₃) da 2'-cloro-2-bromopropriofenona (27).	V
Figura A.11 - Espetro de HSQC (CDCl ₃) da 2'-cloro-2-bromopropriofenona (27).	VI
Figura A.12 - Espetro de HMBC (CDCl ₃) da 2'-cloro-2-bromopropriofenona (27).	VI
Figura A.13 - Espetro de RMN ¹ H (DMSO-d ₆) da 2'-cloro-2-bromopropriofenona (27).	VII
Figura A.14 - Espetro de RMN ¹ H (DMSO-d ₆) da 2'-cloro-2-bromopropriofenona (27) (ampliação)...	VII
Figura A.15 - Espetro de COSY (DMSO-d ₆) da 2'-cloro-2-bromopropriofenona (27).	VIII
Figura A.10 - Espetro de RMN ¹³ C APT (DMSO-d ₆) da 2'-cloro-2-bromopropriofenona (27).	VIII
Figura A.17 - Espetro de HSQC (DMSO-d ₆) da 2'-cloro-2-bromopropriofenona (27).	IX
Figura A.18 - Espetro de HMBC (DMSO-d ₆) da 2'-cloro-2-bromopropriofenona (27).	IX
Figura A.13 - Espetro de RMN ¹ H (CDCl ₃) da 3'-cloro-2-bromopropriofenona (28).	X

Figura A.14 - Espetro de RMN ¹ H (CDCl ₃) da 3'-cloro-2-bromopropriofenona (28) (ampliação).	X
Figura A.15 - Espetro de COSY (CDCl ₃) da 3'-cloro-2-bromopropriofenona (28).....	XI
Figura A.16 - Espetro de RMN ¹³ C APT (CDCl ₃) da 3'-cloro-2-bromopropriofenona (28).	XI
Figura A.17 - Espetro de HSQC (CDCl ₃) da 3'-cloro-2-bromopropriofenona (28).....	XII
Figura A.18 - Espetro de HMBC (CDCl ₃) da 3'-cloro-2-bromopropriofenona (28).	XII
Figura A.19 - Espetro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) da 3'-cloro-2-bromopropriofenona (28).	XIII
Figura A.20 - Espetro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) da 3'-cloro-2-bromopropriofenona (28) (ampliação)...	XIII
Figura A.21 - Espetro de COSY (DMSO- <i>d</i> ₆) da 3'-cloro-2-bromopropriofenona (28).	XIV
Figura A.22 - Espetro de RMN ¹³ C APT (DMSO- <i>d</i> ₆) da 3'-cloro-2-bromopropriofenona (28).	XIV
Figura A.23 - Espetro de HSQC (DMSO- <i>d</i> ₆) da 3'-cloro-2-bromopropriofenona (28).	XV
Figura A.24 - Espetro de HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆) da 3'-cloro-2-bromopropriofenona (28).	XV
Figura A.25 - Espetro de RMN ¹ H (CDCl ₃) da 4'-cloro-2-bromopropriofenona (29).	XVI
Figura A.26 - Espetro de RMN ¹ H (CDCl ₃) da 4'-cloro-2-bromopropriofenona (29) (ampliação).	XVI
Figura A.27 - Espetro de COSY (CDCl ₃) da 4'-cloro-2-bromopropriofenona (29).	XVII
Figura A.28 - Espetro de RMN ¹³ C APT (CDCl ₃) da 4'-cloro-2-bromopropriofenona (29).	XVII
Figura A.29 - Espetro de HSQC (CDCl ₃) da 4'-cloro-2-bromopropriofenona (29).	XVIII
Figura A.30 - Espetro de HMBC (CDCl ₃) da 4'-cloro-2-bromopropriofenona (29).	XVIII
Figura A.31 - Espetro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) da 4'-cloro-2-bromopropriofenona (29).	XIX
Figura A.32 - Espetro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) da 4'-cloro-2-bromopropriofenona (29) (ampliação)...	XIX
Figura A.33 - Espetro de COSY (DMSO- <i>d</i> ₆) da 4'-cloro-2-bromopropriofenona (29).	XX
Figura A.34 - Espetro de RMN ¹³ C APT (DMSO- <i>d</i> ₆) da 4'-cloro-2-bromopropriofenona (29).	XX
Figura A.35 - Espetro de HSQC (DMSO- <i>d</i> ₆) da 4'-cloro-2-bromopropriofenona (29).	XXI
Figura A.36 - Espetro de HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆) da 4'-cloro-2-bromopropriofenona (29).	XXI
Figura A.37 - Espetro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) da 3'-CBC (8).	XXII
Figura A.38 - Espetro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) da 3'-CBC (8) (ampliação).	XXII
Figura A.39 - Espetro de COSY (DMSO- <i>d</i> ₆) da 3'-CBC (8).	XXIII
Figura A.40 - Espetro de RMN de ¹³ C APT (DMSO- <i>d</i> ₆) da 3'-CBC (8).	XXIII
Figura A.41 - Espetro de HSQC (DMSO- <i>d</i> ₆) da 3'-CBC (8).	XXIV
Figura A.42 - Espetro de HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆) da 3'-CBC (8).	XXIV
Figura A.43 - Espetro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) da 4'-CBC (9).	XXV
Figura A.44 - Espetro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) da 4'-CBC (9) (ampliação).	XXV
Figura A.45 - Espetro de COSY (DMSO- <i>d</i> ₆) da 4'-CBC (9).	XXVI
Figura A.46 - Espetro de RMN ¹³ C APT (DMSO- <i>d</i> ₆) da 4'-CBC (9).	XXVI
Figura A.47 - Espetro de HSQC (DMSO- <i>d</i> ₆) da 4'-CBC (9).	XXVII
Figura A.48 - Espetro de HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆) da 4'-CBC (9).	XXVII
Tabela A.1 - Resultados das previsões in silico obtidas no servidor pkCSM.	XXVIII
Tabela A.2 - Resultados das previsões in silico obtidas no servidor SwissADME.	XXIX

Lista de Abreviaturas e Símbolos

2'-CDC	2'-cloro- <i>N,N</i> -dimetilcatinona
2'-CEC	2'-cloro- <i>N</i> -etilcatinona
2'-Cl-PPP	2'-cloro-pirrolidilcatinona
2'-CMC	2'-cloro- <i>N</i> -metilcatinona
3'-CBC	3'-cloro- <i>N</i> -butilcatinona
3'-CDC	3'-cloro- <i>N,N</i> -dimetilcatinona
3'-CEC	3'-cloro- <i>N</i> -etilcatinona
3'-CIC	3'-cloro- <i>N</i> -isopropilcatinona
3'-Cl-DEC	3'-cloro- <i>N,N</i> -dietilcatinona
3'-Cl-PPP	3'-cloro-pirrolidilcatinona
3'-Cl-TBC	3'-cloro- <i>tert</i> -butilcatinona; Bupropiona
3'-CMC	3'-cloro- <i>N</i> -metilcatinona
3'-MMC	3'-metilmetcatinona
4'-CBC	4'-cloro- <i>N</i> -butilcatinona
4'-CDC	4'-cloro- <i>N,N</i> -dimetilcatinona
4'-CEC	4'-cloro- <i>N</i> -etilcatinona
4'-CIC	4'-cloro- <i>N</i> -isopropilcatinona
4'-Cl-DEC	4'-cloro- <i>N,N</i> -dietilcatinona
4'-Cl-PPP	4'-cloro-pirrolidilcatinona
4'-Cl-TBC	4'-cloro- <i>tert</i> -butilcatinona
4'-Cl-PVP	4'-cloro- α -pirrolidinovalerofenona
4'-CMC	4'-cloro- <i>N</i> -metilcatinona; Clefedrona
4'-MMC	4'-metilmetcatinona; Mefedrona
Abs	Absorvância
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChI	Iodeto de acetiltiocolina
ADMET	Absorção distribuição metabolismo excreção toxicidade
ANOVA	Análise de Variância (do inglês , <i>ANalysis Of VAriance</i>)
APT	Teste de Protões Diretamente Ligados (do inglês , <i>Attached Proton Test</i>)

BGI	Barreira gastrointestinal
BHE	Barreira hematoencefálica
CAS	Centro catalítico aniónico (do inglês , <i>Anionic Catalytic Site</i>)
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
COSY	Espectroscopia de Correlação Homonuclear (do inglês , <i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>)
CYP	Citocromo P
d	Dupleto
dd	Duplo Dupleto
DA	Dopamina
DAT	Transportadores de dopamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen gmbh</i>
DTNB	5-5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
EI	Inibidor de enzima (do inglês , <i>Enzyme Inhibitor</i>)
EMCDDA	Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (do inglês , <i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>)
EUROPOL	Agência da União Europeia para a Cooperação Policial
EWS	Sistema de Alerta Rápido da União Europeia (do inglês , <i>Early Warning System</i>)
FBS	Soro fetal bovino (do inglês , <i>Fetal bovine serum</i>)
GPCR	Receptor acoplado à proteína G (do inglês , <i>G protein-coupled receptor</i>)
HBA	Número de aceitadores de ligação de hidrogénio (do inglês , <i>Number of hydrogen bond acceptors</i>)
HBD	Número de doadores de ligação de hidrogénio (do inglês , <i>Number of hydrogen bond donors</i>)
HMBC	Espectroscopia de Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações (do inglês , <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)
HSQC	Espectroscopia de Correlação Heteronuclear a Uma Ligação (do inglês , <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>)
Hz	Hertz
IC₅₀	Metade da concentração máxima inibitória (do inglês , <i>Half-maximal inhibitory concentration</i>)

ICM	Modulador de canal iónico (do inglês , <i>Ligand Ion Channel Modulator</i>)
J	Constante de acoplamento
KI	Inibidor de cinase (do inglês , <i>Kinase Inhibitor</i>)
LC₅₀	Concentração 50% letal (do inglês , <i>50% lethal concentration</i>)
LOAEL	Nível mínimo com efeitos adversos observáveis (do inglês , <i>Lowest observed adverse effect level</i>).
Log P	Coefficiente de partição octanol/água
m	Multipeto
mAChR	Receptor muscarínicos de acetilcolina (do inglês , <i>Muscarinic acetylcholine receptor</i>)
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina; Ecstasy
MDPV	Metilenodioxiprovalerona;
MM	Massa molecular
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nAChR	Recetor nicotínico de acetilcolina (do inglês , <i>Nicotinic acetylcholine receptor</i>)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês , <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NAT	Transportadores de noradrenalina (do inglês , <i>Noradrenaline transporter</i>)
ND	Não definido
NEH	N-etil-hexedrona
NRB	Número de ligações com rotação (do inglês , <i>Number of Rotatable Bonds</i>)
NRL	Ligante de receptor nuclear (do inglês , <i>Nuclear Receptor Ligand</i>)
NS	Análise estatística não significativa ($p > 0,05$)
NSP	Novas substâncias psicoativas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	Centro catalítico aniónico periférico (do inglês , <i>Peripheral Anionic Site</i>)
PBS	Solução fosfato salino (do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>)
PHDA	Perturbação de Hiperatividade e Défice de Atenção
PI	Inibidor de protease (do inglês , <i>Protease inhibitor</i>)
q	Quarteto
QSAR	Relação estrutura-atividade quantitativa (do inglês , <i>Quantitative structure–activity relationship</i>)
RA	Ácido retinóico (do inglês , <i>Retinoic Acid</i>)

RMN ¹³C	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Protão
s	Singuleto
SER	Serotonina
SERT	Transportadores de serotonina
SICAD	Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências
sl	Singuleto alargado
SN₂	Substituição nucleofílica bimolecular
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
t	Tripleto
td	Triplo duplete
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia em Camada Fina (do inglês , <i>Thin Layer Chromatography</i>)
TPA	Éster de forbol (do inglês , <i>12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate</i>)
TPSA	Área de superfície polar topológica (do inglês , <i>Topological polar surface area</i>)
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UE	União europeia
UNODC	Gabinete das Nações Unidas contra a Droga e o Crime (do inglês , <i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>)
UV-Vis	Espetroscopia ultravioleta-visível
VMAT-2	Transportador Vesicular de Monoaminas 2
α-PVP	α-Pirrolidinovalerofenona
δ	Desvio químico
δ_c	Desvio químico de carbono
δ_H	Desvio químico de protão
η	Rendimento

1. Introdução

As substâncias psicoativas ou psicotrópicas atuam sobre o sistema nervoso central e nas funções cerebrais, influenciando tanto os processos cognitivos quanto a função motora [1,2]. Podem ser encontradas em medicamentos, drogas recreativas, plantas e outras fontes naturais sendo alguns dos exemplos mais comuns o álcool, a nicotina, a cafeína, a cocaína, as anfetaminas ou os opióides [2].

As substâncias psicoativas têm sido uma parte integrante da cultura, religião e crenças de diversos países, e ainda aplicadas para fins medicinais ou científicos, tendo sido o seu uso posteriormente alastrado à população em geral para fins recreativos [3]. Contudo, algumas destas substâncias rapidamente expuseram os riscos associados ao seu consumo, levando à formulação de legislação internacional para restringir o seu uso, como a Convenção das Nações Unidas sobre Estupefacientes de 1961 (modificada pelo Protocolo de 1972) [4], a Convenção das Nações Unidas sobre Substâncias Psicotrópicas de 1971 [5] e a Convenção das Nações Unidas contra o Tráfico Ilícito de Estupefacientes e de Substâncias Psicotrópicas de 1988 [6]. Estas convenções complementam-se de forma a garantir a disponibilidade deste tipo de substâncias para fins medicinais e científicos ao mesmo tempo que previnem o seu tráfico e uso ilícito [7,8].

1.1. Novas Substâncias Psicoativas (NSP)

O controlo e uso restrito de algumas substâncias psicoativas deste tipo provocou o surgimento das novas substâncias psicoativas (NSP) como alternativas às drogas controladas, com o intuito de mimetizar os mesmos efeitos, tornando o mercado das drogas ilícitas cada vez mais complexo. Uma vez que algumas destas substâncias escapam à monitorização legal e regulatória, são comumente designadas por drogas “legais” usualmente rotuladas como impróprias para consumo humano, e antigamente eram comercializadas em lojas físicas abertas ao público designadas por *smarthshops* nas quais as embalagens eram identificadas como *legal highs*, *herbal highs*, *bath salts*, *research chemicals*, *designer drugs* ou *party pills* [9]. As NSP são definidas como *novas substâncias de abuso, novos estupefacientes ou novas substâncias psicotrópicas, em estado puro ou em preparação, que não são controladas pelas Convenções sobre drogas das Nações Unidas de 1961 e 1971, mas que representam uma potencial ameaça para a saúde pública, semelhante às substâncias presentes nestas Convenções* [10]. Contudo, é de salientar que o termo NSP não só se refere a substâncias recém-sintetizadas como também se refere a substâncias lícitas que surgem nestes tipos de mercados ilegais e são usadas de forma recreativa [11,12].

No seguimento das convenções das Nações Unidas, surge em Portugal o Decreto-Lei (DL) n.º 15/93, de 22 de janeiro [13] que restringe o uso de novas substâncias psicoativas abrangidas por essas convenções bem como alguns dos seus isómeros. Contudo, dado o elevado ritmo de surgimento de NSP no mercado foi necessário reforçar a legislação com a promulgação, em 2013, do DL n.º 54/2013, de 17 de abril [14]. Este decreto limita a produção, importação, exportação,

publicidade, distribuição, venda, detenção ou disponibilização de NSP exceto quando estas são destinadas a fins industriais ou uso farmacêutico, desde que devidamente autorizados pelo INFARMED-Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P, o que permitiu encerrar as *smartshops* e consequentemente reduzir a disponibilidade destas substâncias [14].

Sabe-se, no entanto, que o número de apreensões e de NPS reportadas e monitorizadas tem vindo a aumentar devido ao desenvolvimento tecnológico que permite uma rápida produção e venda a grande escala. Além disso, o mercado de NSP é caracterizado por ser altamente dinâmico e de difícil controlo, principalmente devido ao baixo custo de produção e à facilidade de substituição destas substâncias por outras de estrutura semelhante, o que permite uma alta disponibilidade de substâncias diferentes [15]. A grande maioria das NSP e respetivos precursores são sintetizados principalmente na China, mas também na Índia, o que facilita a comercialização deste tipo de substâncias nos mercados de drogas ilícitas, pois nestes países o trabalho laboral como o transporte para outros países é relativamente mais barato e eficiente [15,16].

Para monitorizar o surgimento de outras NSP na Europa, o Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (EMCDDA), em parceria com a Agência da União Europeia para a Cooperação Policial (EUROPOL), implementaram um sistema de alerta rápido (EWS) para permuta mais eficaz de informações, avaliação de riscos, prevalência e controlo das NSP entre estados-membros. Em Portugal, o Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD) é o ponto focal do EWS [17].

O EMCDDA publica anualmente um relatório relativo às tendências e evoluções sobre drogas no território europeu onde constam as NSP que surgem pela primeira vez, e os números totais de monitorização para cada tipo de substância. Atualmente, entre as cerca de 940 NSP monitorizadas, os canabinóides e as catinonas sintéticas constituem os 2 maiores grupos de substâncias monitorizadas (Figura 1.1). Destas 940 NSP, 41 substâncias foram comunicadas pela primeira vez em 2022 na Europa, entre as quais 5 novas catinonas sintéticas, constatando-se um novo aumento do número total monitorizado desta classe de compostos de 162 em 2021 para 167 [18–20].

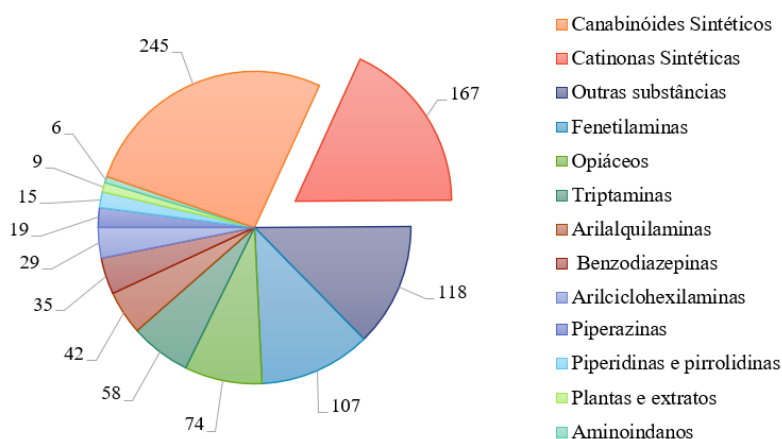
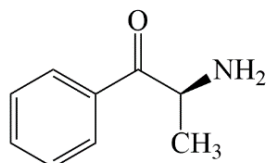


Figura 1.1 - Número de NSP monitorizadas pelo EWS da UE, por categoria, detetadas até ao final de 2022.

1.2. Catinonas Sintéticas – Mercado e Prevalência

As catinonas sintéticas são análogas da catinona natural, o principal alcalóide psicoativo presente na planta Khat (*Catha edulis*), uma espécie nativa da Península Arábica e da zona leste de África [21]. As suas folhas e caules são comumente mascaradas devido às suas propriedades estimulantes e consumidas como parte de uma tradição cultural e social dos habitantes destas regiões, tendo-se propagado a países vizinhos com a migração [22,23]. Apesar dos estudos para identificar os compostos que são responsáveis pelas propriedades estimulantes da Khat se tenham iniciado em 1887, apenas em 1975 foi determinada a estrutura da catinona (Figura 1.2) [24].



S-(-)-2-amino-1-fenilpropan-1-ona

Figura 1.2 - Estrutura química da catinona natural presente na planta Khat.

Paralelamente, alguns anos antes desta catinona natural ser identificada surgiram algumas catinonas sintéticas com o intuito de serem comercializadas pelos potenciais farmacológicos que apresentavam (Figura 1.3). Em 1928 surge a metcatinona como potencial medicamento antidepressivo e, em 1929, a mefedrona é sintetizada pela primeira vez [25,26]. Em 1958, foi comercializada a dietilcatinona como supressora de apetite e, pouco depois, a pirovalerona com potencial para o tratamento da letargia e fadiga crónica, bem como supressora de apetite [26–28]. Em meados da década de 1980 surge a bupropiona (3'-Cl-TBC) também como medicamento antidepressivo, auxílio na cessação do tabagismo e supressor de apetite [29–31], e em 1996 a metilona foi desenvolvida como antidepressivo e para o tratamento de Parkinson [32]. Devido aos efeitos adversos, ao potencial de abuso e à dependência, todas estas catinonas foram retiradas do mercado, com exceção da bupropiona, também conhecida comercialmente como Zyban® ou Wellbutrin®, que manteve o propósito para o qual foi desenvolvida, sendo ainda usada no tratamento da Perturbação de Hiperatividade e Défice de Atenção (PHDA) e no tratamento na dependência de substâncias psicoativas [33,34].

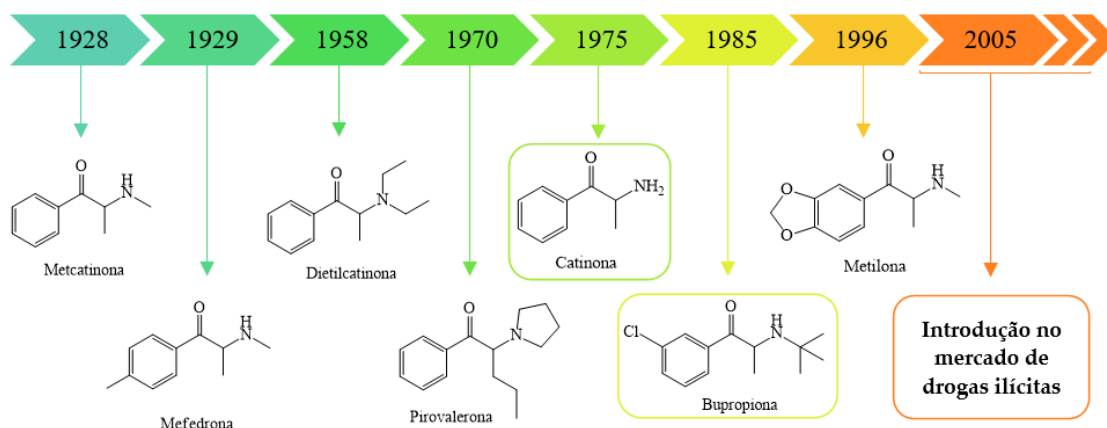


Figura 1.3 - Evolução cronológica do desenvolvimento de catinonas sintéticas com potencial farmacológico, destacando-se a bupropiona como a única catinona que permanece disponível comercialmente (amarelo) e a identificação da estrutura da catinona na planta khat em 1975 (verde).

A partir de 2005 as catinonas sintéticas começaram a surgir em mercados de drogas recreativas e mais tarde em *smartshops*. Inicialmente, a sua popularidade deveu-se à falsa concepção de que estas substâncias eram seguras devido à ausência de controlo legal e à facilidade de aquisição a baixo custo. Outras razões desse sucesso deveram-se aos preços elevados das alternativas tradicionais, como a anfetamina, o MDMA (metilenodioximetanfetamina) e a cocaína, associadas à indisponibilidade e diminuição da pureza destas [35].

A primeira catinona a ser reportada ao EMCDDA foi a metilona, em 2005, que surgiu no mercado de substâncias ilícitas como alternativa à droga anfetamina MDMA, usualmente conhecida como *ecstasy*, marcando o surgimento de uma variedade crescente de novas catinonas sintéticas consumidas pelos efeitos psicoativos [32].

De 2005 até 2014-2015, verificou-se um crescimento exponencial de catinonas sintéticas monitorizadas e apreendidas, abrandando nos anos subsequentes até à atualidade (Figura 1.4a). Deduz-se que o aumento constatado a partir de 2008 se deve, por um lado, aos “fóruns” de droga que iam surgindo na internet que facilitaram a divulgação e compra deste tipo de NSP, e por outro lado a menor disponibilidade e pureza das outras substâncias de abuso. O decréscimo observado posteriormente resultou do esforço dos diferentes países, dentro e fora da UE, ao terem implementado medidas e legislação, cada vez mais eficazes no controlo da circulação destas substâncias [20,36].

Relativamente às apreensões de catinonas foram registadas 0,75 toneladas em 2019 e estas aumentaram para 3,3 toneladas em 2020, continuando a ser relatadas grandes apreensões em 2021 e 2022 (Figura 1.4b). Este aumento deveu-se principalmente a apreensões de elevadas quantidades de *N*-etil-hexedrona (NEH), 3'-MMC (3'-metilmetcatinona) e 3'-CMC (3'-cloro-*N*-metilcatinona) (Figura 1.4c). As duas últimas, que foram reportadas pela primeira vez em 2012 e 2014

respetivamente, são os isómeros *meta* de drogas controladas internacionalmente, nomeadamente, mefedrona (4'-MMC, 4'-metilmetcatinona) e clefedrona (4'-CMC, 4'-cloro-*N*-metilcatinona) [20,37].

Como referido anteriormente, até 2020 o principal país responsável pela produção em massa de catinonas sintéticas era a China, contudo, a imposição de novos controlos legais que englobam a 3'-MMC e a 3'-CMC levou a que grande parte das catinonas sintéticas apreendidas em 2020 tivesse origem na Índia, possivelmente por interrupção do fornecimento oriundo da China, causada pela pandemia de COVID-19 [37,38]. No entanto, na Europa suspeita-se que haja um aumento da produção de catinonas sintéticas devido ao maior número de dismantelamentos de locais de produção ilícita e a quantidade de precursores químicos apreendidos [18,19].

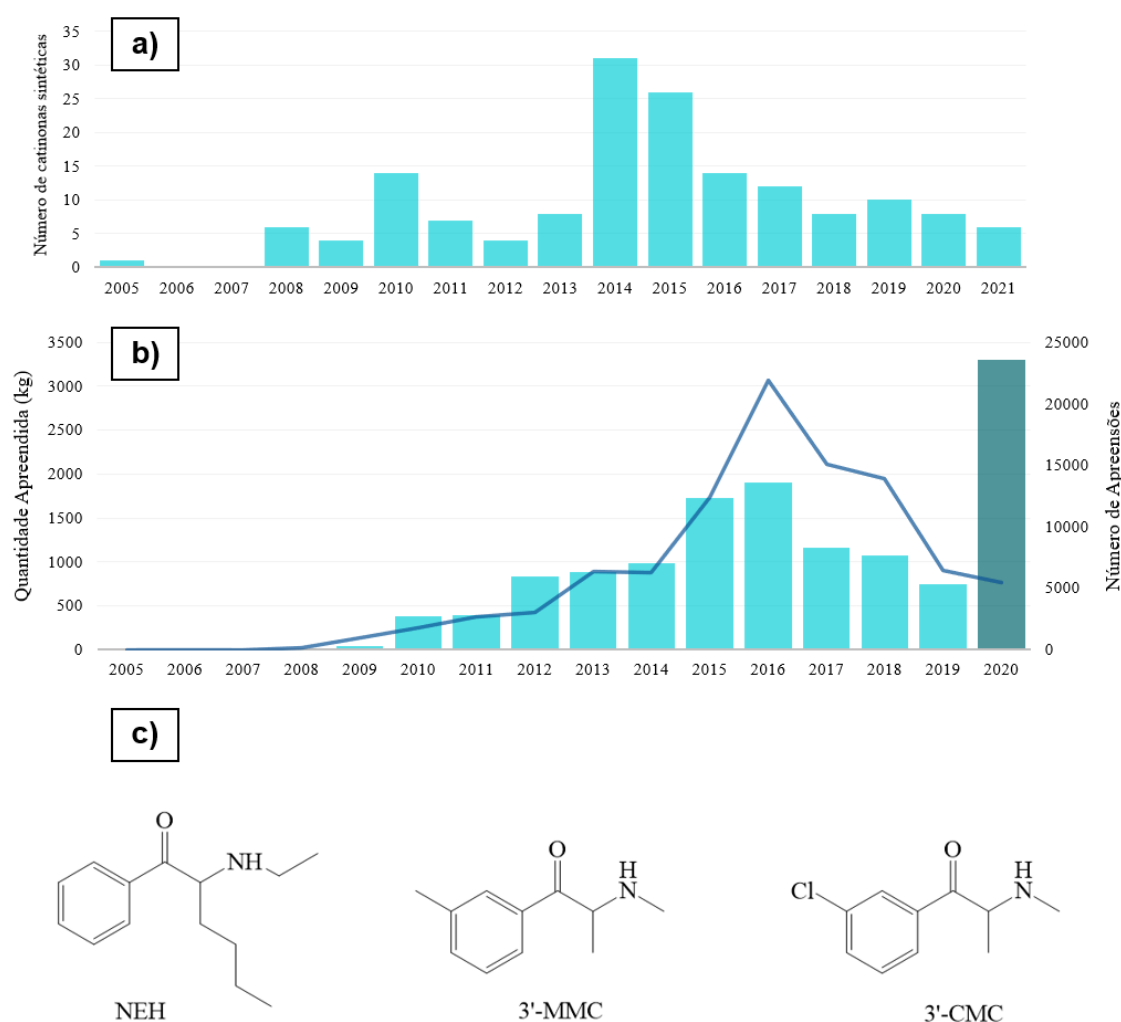


Figura 1.4 - Dados estatísticos relativos às catinonas sintéticas na Europa desde 2005. (a) Número de catinonas sintéticas notificadas pela primeira vez, (b) Número e quantidade de apreensões de catinonas na Europa, e (c) Estrutura química das catinonas mais apreendidas em 2020: *N*-etil-hexedrona (NEH), 3'-metilmetcatinona (3'-MMC) e 3'-cloro-*N*-metilcatinona (3'-CMC) [19,20].

O aumento da quantidade e variedade de catinonas sintéticas e outras NSP detetadas nos mercados de drogas ilícitas cria uma elevada preocupação junto das autoridades devido à escassez de conhecimentos sobre os seus efeitos e da percepção dos potenciais danos associados ao seu consumo, agravado pelo facto de terem surgido misturas destas com outras substâncias psicoativas, o que promove um aumento do risco de overdoses fatais e reações adversas [9,37].

1.3. Estrutura das catinonas sintéticas

A catinona natural e os seus derivados sintéticos são alcalóides com uma estrutura química relacionada com as anfetaminas, cuja diferença reside na presença de um grupo carbonilo na posição β da cadeia aminoalquílica ligada ao anel aromático, tal como se pode verificar na Figura 1.5 [24,39].

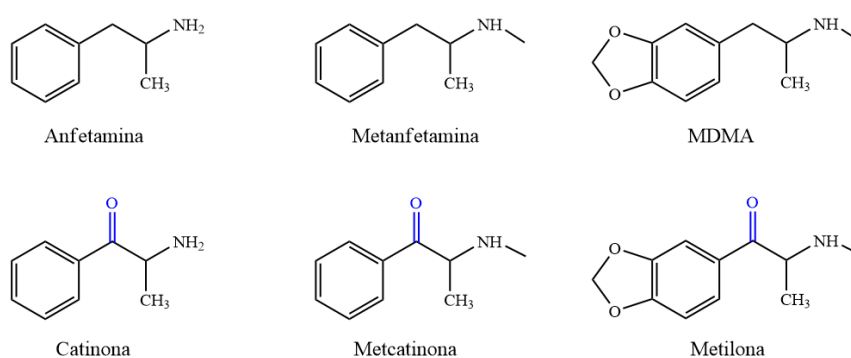


Figura 1.5 - Estruturas químicas das catinonas e das anfetaminas destacando-se a azul o grupo carbonilo, específico das catinonas, na posição β da cadeia aminoalquílica.

A diversidade de derivados das catinonas advém da possibilidade de sintetizar novos compostos pela adição ou modificação de diferentes substituintes na estrutura principal da catinona (Figura 1.6), podendo ocorrer em 4 locais diferentes, nomeadamente na cadeia alquílica lateral (R_1), no grupo amino (R_2/R_3), e/ou no anel aromático (R_4).

Consoante os diferentes tipos de substituintes existentes na estrutura é possível dividir as catinonas em 4 diferentes grupos: **i**) catinonas cujos substituintes do grupo amino (R_2/R_3) são cadeias alquílicas e o anel aromático pode ou não conter substituinte (R_4), como exemplos temos a mefedrona e a clefedrona; **ii**) catinonas que têm um grupo pirrolidilo (R_2/R_3) e, com ou sem substituintes no anel aromático (R_4), como é o caso da 4'-cloro- α -pirrolidinovalerofenona (4'-Cl-PVP) e da α -pirrolidinovalerofenona (α -PVP); **iii**) catinonas que têm um grupo 3,4-metilenodioxilo no anel aromático (R_4), exemplificados pela etilona e butilona; **iv**) catinonas que consistem numa combinação dos 2 últimos grupos em que as catinonas apresentam um grupo 3,4-metilenodioxilo e um grupo pirrolidilo, como se verifica para a 3,4-metilenodioxipirovalerona (MDPV) [24,40].

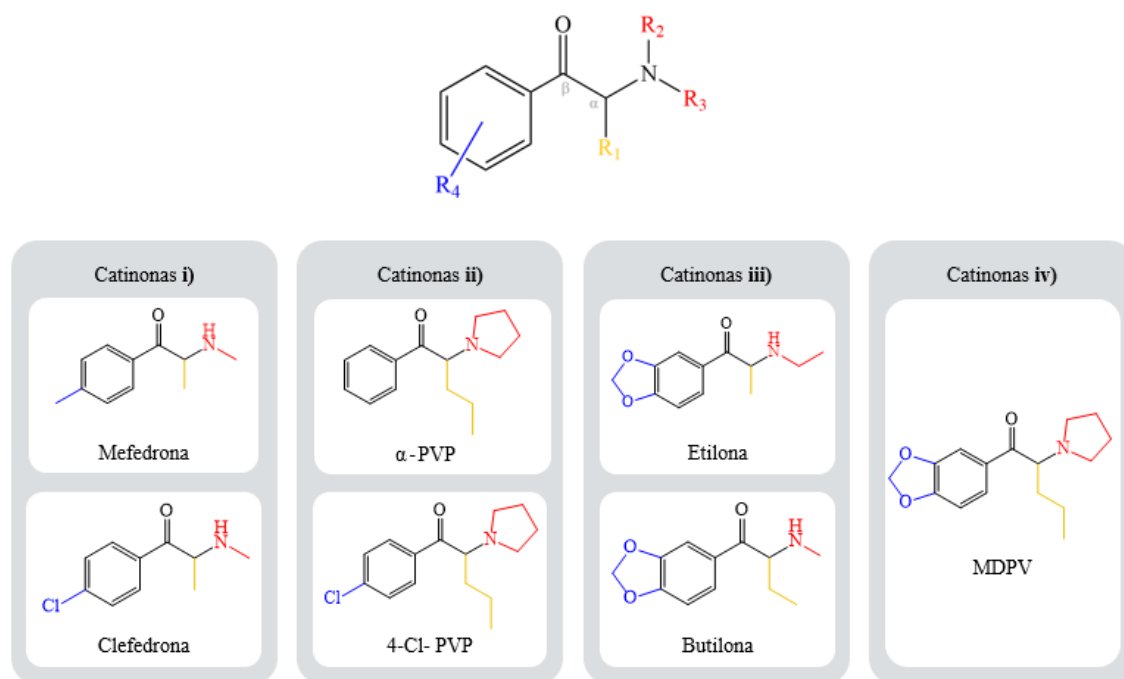


Figura 1.6 - Estrutura geral das catinonas sintéticas com os potenciais locais de substituição e respectivos grupos destacados: a amarelo as substituições no carbono α da cadeia lateral (R_1), a vermelho substituições no grupo amino (R_2/R_3) e a azul as substituições no anel aromático (R_4).

Regra geral, as catinonas sintéticas surgem nos mercados recreativos como misturas de estereoisómeros por terem um estereocentro no carbono em posição α em relação ao grupo carbonilo, e a sua síntese nos laboratórios ilícitos não ser estereoespecífica. Cada um dos enantiómeros presente nas misturas pode variar em termos de potência e afinidade em relação aos seus alvos farmacológicos [39,41].

1.4. Farmacologia e efeitos adversos associados ao consumo

A diversidade de catinonas sintéticas, resultante das possíveis modificações nos grupos referidos no ponto anterior, pode promover diferenças nos seus efeitos, nomeadamente nas suas propriedades e/ou interações. Consoante a estrutura das catinonas, o modo como interagem com o organismo pode ser diferenciado, afetando distintamente na sua cinética e dinâmica. Assim, como ocorre com outros compostos farmacológicos, o modo como são administradas, a facilidade com que são distribuídas e metabolizadas é influenciada pela capacidade de se ligarem a proteínas plasmáticas e dos tecidos, pelo fluxo sanguíneo, pela permeabilidade capilar e pelo pH local [40,42]. Em geral, já foi demonstrado em 2 estudos *in vivo* com ratos *Spargue-Dawley* que as catinonas sintéticas tendem a fazer ligações fracas com as proteínas plasmáticas, no entanto, estes estudos *in vivo* com animais podem não refletir adequadamente o comportamento destas substâncias em humanos [43,44]. Por exemplo, no caso do fármaco bupropiona verificou-se que este tende a fazer ligações fortes com as proteínas plasmáticas humanas [45,46].

As catinonas são normalmente vendidas como um pó branco ou acastanhado encontrando-se igualmente sob a forma de comprimidos e cápsulas [39]. Foram citadas diversas vias de administração nomeadamente inserção retal, injeção intravenosa, injeção intramuscular, inserção ocular, mas a inalação e ingestão oral são as vias mais usuais para o seu consumo, podendo os utilizadores, por vezes, recorrer à administração simultânea através de vias distintas [24,41,47,48]. Quando ingeridas oralmente, as catinonas sintéticas, tal como outras substâncias, poderão entrar na circulação sanguínea sistémica por absorção através da barreira gastrointestinal (BGI) sendo posteriormente distribuídas para órgãos altamente irrigados como o cérebro, os pulmões, o fígado e os rins. A capacidade de induzirem os seus efeitos a nível do cérebro depende da sua capacidade de permeação através da BGI, e posteriormente através da barreira hematoencefálica (BHE) [42]. A BHE é uma membrana semipermeável altamente seletiva, que protege o sistema nervoso central (SNC) de substâncias tóxicas presentes no sangue, exemplificada na Figura 1.7.

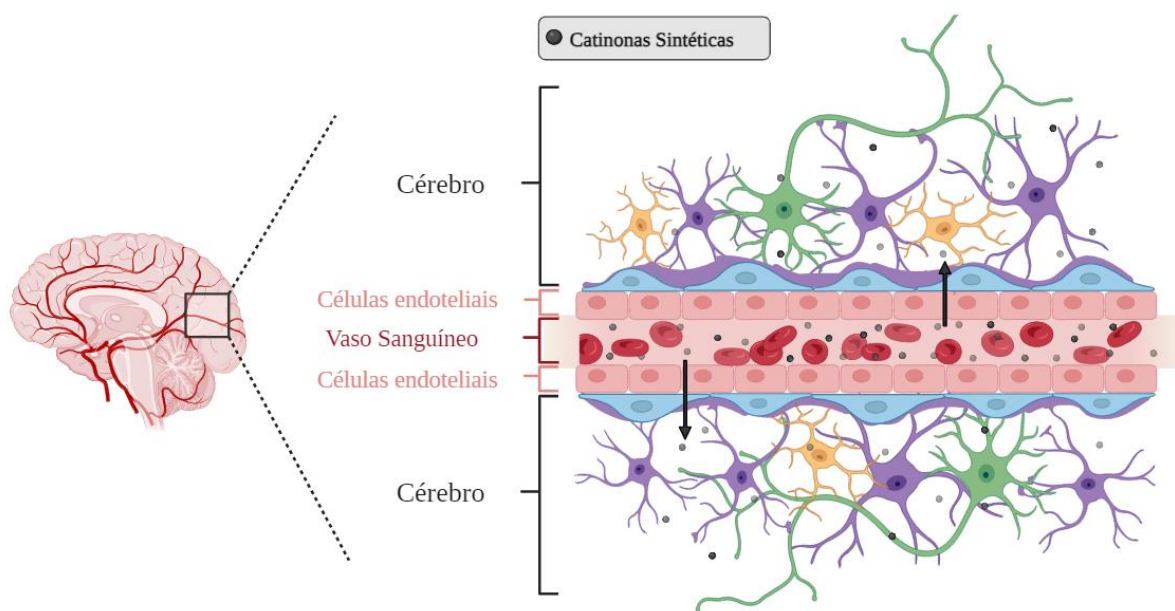


Figura 1.7 - Permeação de catinonas sintéticas através da barreira hematoencefálica (BHE). Adaptado de [49].

A extensão com que as catinonas sintéticas conseguem permear através da BGI ainda não foi extensivamente estudada, no entanto, existem estudos recentes no qual a permeabilidade é investigada para pares de enantiómeros, verificando-se uma elevada mas diferenciada permeabilidade dos enantiómeros através desta barreira [50,51].

Foi reportado que a presença de um grupo carbonilo nas catinonas provoca um aumento da polaridade, resultando numa diminuição da capacidade de atravessarem a BHE relativamente às anfetaminas, o que poderá justificar a menor potência das catinonas e a razão pelo qual estas são consumidas em doses mais elevadas e/ou com maior frequência [24,52].

A elevada capacidade das catinonas atravessarem a BHE foi demonstrada *in vivo* em ratos *Spargue-Dawley* [43,44,53–55] e ratos *Wistar* [56], e *in vitro* em células endoteliais microvasculares cerebrais humanas hBMVEC [57] e TY09 [58]. Embora se tenha verificado que uma diminuição da polaridade da catinona facilita a permeação através da BHE, nomeadamente para catinonas com um grupo pirrolidilo (catinonas ii – ver Figura 1.6) [58], estudos mais recentes reportaram o oposto [53,54]. Estes últimos estudos sugerem que as catinonas são transportadas através da BHE por processos mediados, tendo-se constatado que catinonas com maior polaridade e a presença de átomos de flúor permeiam mais facilmente que catinonas com longas cadeias alquílicas ligada ao carbono α (R₁ – ver Figura 1.6) [53,54].

Quando uma substância é ingerida oralmente, o fígado é o principal órgão na metabolização e destoxificação do organismo juntamente com os rins, pele e intestinos, para eliminar substâncias tóxicas ou estranhas como fármacos, toxinas e/ou drogas [59]. Consequentemente é também um dos órgãos mais suscetíveis a danos e insuficiências [59]. A hepatotoxicidade de alguns derivados de catinonas sintéticas já foi demonstrada em estudos *in vitro* com diferentes linhas celulares humanas de hepatócitos (HepG2 e HepaRG) e ainda *in vivo* com células hepáticas de ratos, onde se constataram diferentes toxicidades consoante a estrutura da catinona [59–63]. Além disso, já foi demonstrado *in vitro* em células HepG2 um aumento da citotoxicidade com o aumento do número de grupos metilo substituintes no anel aromático (R₄ – ver Figura 1.6), bem como para o aumento do comprimento da cadeia alquílica do grupo carbonilo (R₁ – ver Figura 1.6) [63].

De modo a facilitar a eliminação destas substâncias, reduzir o seu tempo de vida e, como tal, o tempo de exposição e evitar a sua acumulação, as substâncias ingeridas sofrem modificações bioquímicas, alterações estruturais e/ou são decompostos em moléculas mais pequenas. As vias metabólicas a partir das quais ocorrem estas modificações podem ser divididas em duas fases: fase I e fase II [64].

As reações na fase I da metabolização consistem em reações de oxidação e redução ou clivagem do grupo funcional [64]. No fígado existem diversas famílias de enzimas encarregues destas reações de metabolização, sendo a famílias dos citocromos (CYP) a mais frequentemente associada ao processo da metabolização de drogas. Em estudos anteriores [65–67], referem-se especificamente os citocromos CYP450, nomeadamente o CYP2D6, o CYP2B6, o CYP2C19 e o CYP3A4 como sendo maioritariamente responsáveis nos processos de biotransformação de catinonas sintéticas. Note-se que os metabolitos produzidos na fase I podem ser potencialmente mais tóxicos do que a respetiva catinona [32,68]. A fase II do metabolismo é responsável pela conjugação das catinonas sintéticas ou dos metabolitos de fase I com outras moléculas endógenas, resultando em compostos mais polares e como tal mais hidrofílicos, o que facilita a sua excreção por via renal e/ou biliar [64].

Os efeitos adversos do consumo de catinonas foram ainda reportados como afetando vários outros sistemas. São comumente consumidas devido aos efeitos psicoativos que produzem, como a sensação de euforia, aumento da empatia, aumento do desejo sexual e do estado de alerta [24,26]. Concomitantemente os efeitos secundários do seu consumo provocam alucinações, paranóia, agressividade, ansiedade, convulsões, tonturas, tremores entre outros efeitos exemplificados na Tabela 1.1. Além disso podem induzir dependência, coma e morte, e a abstinência leva a distúrbios do sono, fadiga, depressão e desejo pela droga [26,39,69].

Tabela 1.1 - Efeitos adversos associados ao consumo de catinonas sintéticas [26,68].

Sistema cardiovascular	taquicardia, dispneia, arritmia, dificuldade em respirar
Sistema gastrointestinal	vômito, náusea, dor abdominal, perda de apetite, insuficiência hepática
Sistema renal	lesão renal, hiponatremia, hipercalemia, hiperuricemia
Sistema nervoso central (Neurológico)	parkinsonismo, midríases, cefaleias, insônia, estado mental alterado, colapso, sonolência, distonia
Sistema nervoso central (Psiquiátrico)	agitação, confusão, ataques de pânico, despersonalização, automutilação, pensamentos suicidas, distúrbios cognitivos, loquacidade
Outros	hipertermia, erupção cutânea, rabdomiólise

1.5. Mecanismos de Ação no SNC

No sistema nervoso central, as sinapses transmitem o impulso nervoso entre neurónios ou entre neurónios e outras células efectoras, e coordenam respostas do organismo a estímulos. Para que a informação seja transmitida é transformada num sinal elétrico provocando um potencial de acção no neurónio pré-sináptico. Quando um potencial de ação percorre um neurónio provoca a despolarização da sua membrana e ativa os canais iónicos de Ca^{2+} promovendo a libertação de neurotransmissores, por exocitose das vesículas onde se encontram armazenadas, para a fenda sináptica existente entre neurónios. Os neurotransmissores por sua vez ligam-se a receptores presentes no neurónio pós-sináptico ou na célula efectora, permitindo assim a formação de um novo potencial de ação e transmissão do impulso nervoso [70].

A propagação deste sinal termina com a eliminação dos neurotransmissores da fenda sináptica. Esta etapa é fundamental e pode ocorrer através da sua recaptura para o neurónio pré-sináptico por proteínas transportadoras específicas de cada neurotransmissor, através da sua degradação enzimática ou por captação por células da glia [70,71].

Existem diversos neurotransmissores que determinam o tipo de sinapse, nomeadamente o efeito sobre o neurónio pós-sináptico, podendo estimulá-lo ou inibi-lo. Além disso, cada neurotransmissor tem um papel diferente no SNC e pode afetar, por exemplo o humor, o comportamento e processos fisiológicos [70]. Quanto à sua classificação, os diferentes tipos de neurotransmissores, podem ser agrupados, por exemplo, com base na sua estrutura química: as aminas como a noradrenalina,

dopamina e serotonina (monoaminas) e ainda a histamina e a adrenalina; ésteres como a acetilcolina; e os aminoácidos como GABA (ácido gama-aminobutírico) e o glutamato [72].

O consumo de substâncias psicoativas pode interferir nos diferentes mecanismos subjacentes à neurotransmissão como, por exemplo, na libertação dos neurotransmissores na fenda sináptica, na ligação aos seus recetores no neurónio pós-sináptico ou na célula efectora, ou mesmo no mecanismo de eliminação dos neurotransmissores na fenda sináptica, e é frequentemente associado à disfunção dos neurotransmissores de monoaminas [73].

Os efeitos provocados pelo consumo de catinonas sintéticas são semelhantes a outros psicostimulantes conhecidos, atuando no sistema nervoso central (SNC) ao interagirem com proteínas transportadoras de monoaminas, como a noradrenalina (NAT), serotonina (SERT) e dopamina (DAT) [74–76]. O aumento da concentração extracelular de monoaminas na fenda sináptica pode ocorrer pela estimulação ou libertação prematura de neurotransmissores das vesículas onde estão armazenados, inibindo a sua recaptação no neurónio pré-sináptico, ou devido à interação das catinonas sintéticas com os transportadores vesiculares de monoamina (VMAT₂) interferindo na sua recaptação para as vesículas (Figura 1.8) [26,77,78]. Como resultado ocorre uma sinalização entre células neuronais mais prolongada sendo, contudo, a afinidade e a seletividade das interações dependente do tipo de derivado de catinona.

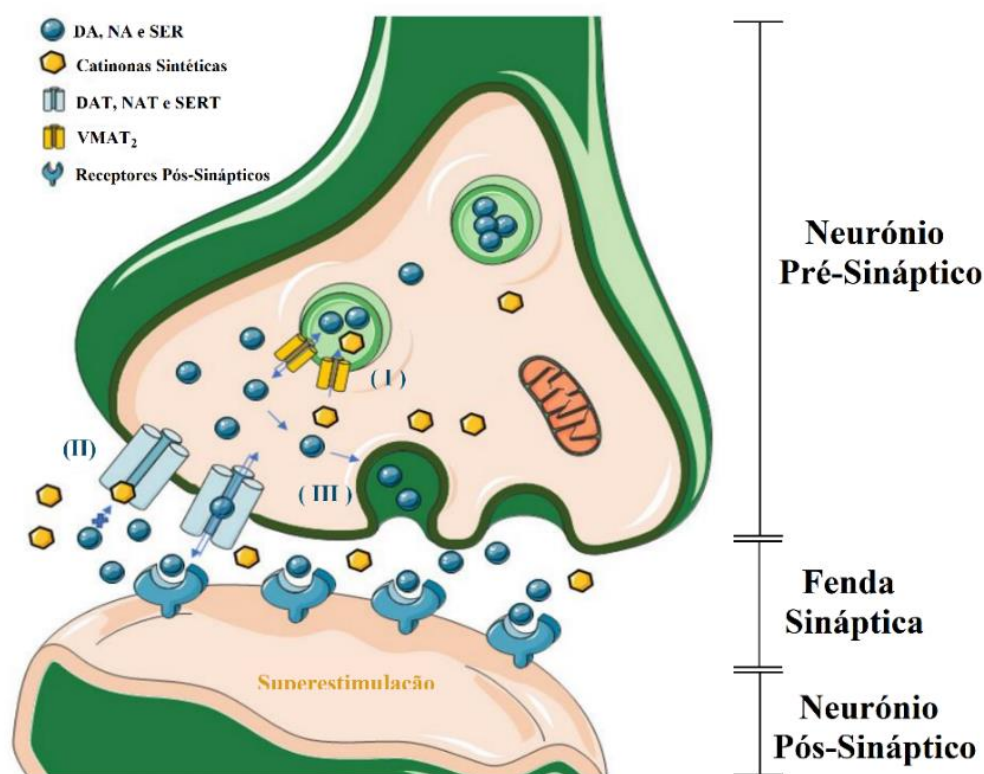


Figura 1.8 - Modos de ação das catinonas sintéticas no sistema nervoso central (SNC) [79].

Apesar de ainda escassos, já existem estudos *in vitro* que comprovam uma afinidade das catinonas sintéticas para com as proteínas transportadoras e recetores de monoaminas o que sugere uma toxicidade semelhante ou até superior às anfetaminas [24]. Assim, consoante o mecanismo de ação as catinonas podem ser classificadas por semelhança a drogas ilícitas conhecidas, tal como exemplificado na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 - Classificação das catinonas sintéticas de acordo com a mecanismo de ação com efeito semelhante a cocaína-MDMA, metanfetamina e pirovaleronas [24,58,75,76,80].

Efeito semelhante	Mecanismo de ação	Exemplos de catinonas
Cocaína-MDMA	Induz libertação de SER e atuam como inibidor não seletivo de monoaminas	mefedrona, butilona, metilona
Metanfetamina	Induz libertação de DA e inibe recaptção de catecolaminas	catinona, metcatinona
Pirovaleronas	Não induz libertação de monoaminas. Atua como inibidor fraco de recaptção de SER e um inibidor potente de recaptção de catecolaminas	α -PVP, MDPV

A dependência de drogas está interligada à interação complexa do sistema colinérgico com o sistema de dopaminérgico [81], sendo o sistema dopaminérgico o mais tipicamente associado a drogas aditivas [70,82]. No entanto, o sistema colinérgico já foi implicado na dependência de nicotina sugerindo assim a possibilidade de também estar envolvido nos efeitos associados ao consumo de anfetaminas e outras drogas ilícitas [70,83]. O sistema colinérgico tem como neurotransmissor a acetilcolina (ACh) presente em diversas partes do sistema nervoso, nomeadamente, no sistema nervoso central (SNC), no sistema nervoso periférico (SNP) e na junção neuromuscular, estando envolvida no processamento sensorial e motor, sono, humor, resposta ao stresse, atenção, excitação, memória, motivação e recompensa [81,84]. O sistema dopaminérgico, cujo neurotransmissor é a dopamina (DA), faz igualmente parte do SNC e SNP, estando envolvido em várias funções cerebrais incluindo controlo motor, cognição recompensa, e motivação [85]. Este sistema é reconhecido por desempenhar um papel importante no desenvolvimento de dependências dada a sua importância na recompensa e motivação [82,85].

1.6. O sistema colinérgico e a acetilcolinesterase

A maioria dos processos fisiológicos são influenciados por múltiplos sistemas de neurotransmissores e pela interação complexa entre o sistema colinérgico e dopaminérgico. A desregulação entre estes dois sistemas também está associada a vários distúrbios neurológicos e psiquiátricos, incluindo a doença de Parkinson, Alzheimer e esquizofrenia [81,86,87].

À semelhança das sinapses monoaminérgicas, nas sinapses colinérgicas o impulso nervoso estimula a libertação da acetilcolina (ACh) das vesículas onde se encontram armazenadas por despolarização da membrana, ligando-se aos recetores presentes no neurónio pós-sináptico (Figura 1.9). A ACh

pode ligar-se a receptores nicotínicos (nAChR), associados ao SNC, atuando especificamente nos músculos esqueléticos, ou ligar-se a receptores muscarínicos (mAChR) influenciando o SNP e os músculos lisos e cardíacos [88]. A ACh na fenda sináptica é posteriormente hidrolisada por ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) em colina e acetato, permitindo que os neurónios colinérgicos retornem ao seu estado de repouso após a transmissão do impulso nervoso [88,89].

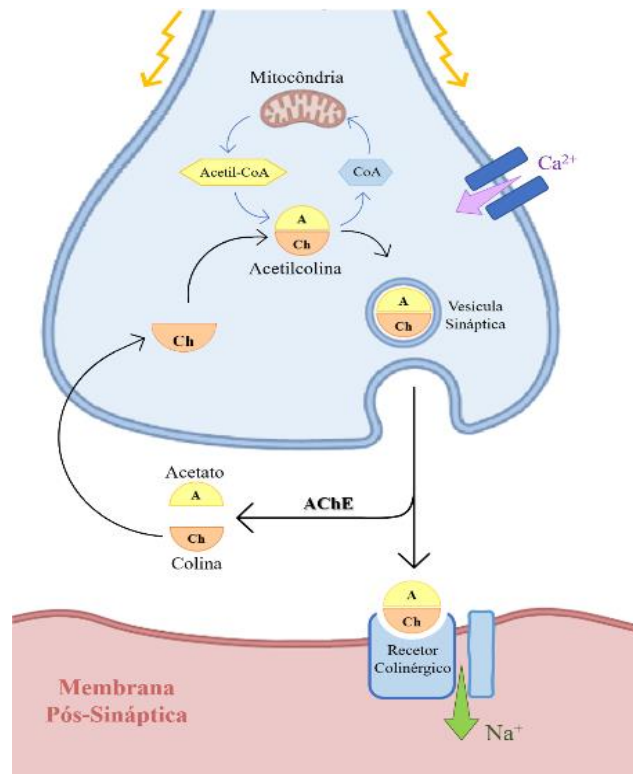


Figura 1.9 - Representação esquemática da sinapse colinérgica.

A acetilcolinesterase (AChE) é estruturalmente caracterizada por apresentar um centro catalítico aniônico (CAS) composto por 3 aminoácidos - serina, ácido glutâmico e histidina – também designada por tríada catalítica e por um centro catalítico aniônico periférico (PAS) à entrada do centro ativo, formando assim uma cavidade alongada normalmente designada por “garganta” (Figura 1.10) [90,91]. Adicionalmente, possui diversos aminoácidos hidrofóbicos ao longo da cavidade do seu centro ativo permitindo que um determinado composto como a ACh primeiro contacte com PAS sendo posteriormente conduzida até ao centro catalítico [88].

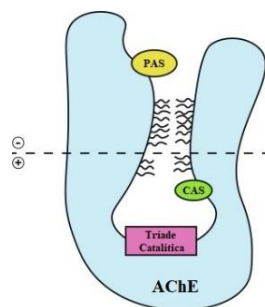


Figura 1.10 - Visão esquemática do centro ativo da enzima AChE [92].

A AChE é assim essencial para o bom funcionamento do SNC ao ser responsável pela terminação normal do impulso nervoso, pois a sua inibição pode induzir uma sobrestimulação dos recetores, devido ao aumento de concentração e tempo de interação do neurotransmissor na fenda sináptica, dado não ser possível hidrolisar a ACh [89].

Alguns dos inibidores reversíveis da AChE têm tido interesse terapêutico para tratamento de doenças neurodegenerativas, como por exemplo a doença de Alzheimer e Parkinson, mas uma inibição irreversível desta enzima está associada aos efeitos tóxicos que eventualmente conduzem à neurodegeneração e, potencialmente, à morte [89].

O excesso de ACh, por inibição prolongada da AChE, foi ainda reportado como podendo causar diversos efeitos entre os quais cefaleias, insónias, vertigens, confusão e fadiga, ou, em casos mais graves, depressão do sistema nervoso central, resultando em fala arrastada, convulsões, coma e depressão respiratória [93].

No contexto geral de drogas de abuso, o conhecimento sobre os efeitos que estas têm sob a enzima acetilcolinesterase é ainda escasso. Num estudo compararam-se grupos de indivíduos saudáveis contra indivíduos consumidores de várias drogas (heroína, haxixe, entre outras), tendo-se verificado que o grupo que consumia drogas apresentava uma maior atividade desta enzima no cérebro [94]. Tal facto também foi verificado *in vivo* com ratos *Spargue-Dawley* para a resina de *Cannabis sativa*, onde se verificou um aumento da atividade desta enzima [95]. Para a cocaína e para as anfetaminas foi estudado o efeito sobre a libertação da acetilcolina, tendo-se verificado que ocorre um aumento da libertação deste neurotransmissor após o consumo destas substâncias ilícitas, não existindo, no entanto, informação relativamente ao seu efeito sobre a AChE [96,97]. Atualmente também não existem informações disponíveis quanto ao efeito das catinonas sintéticas sobre a atividade da AChE.

1.7. Métodos *in silico*

O contínuo surgimento de uma diversidade de catinonas e outras NSP, leva à necessidade da determinação dos seus efeitos biológicos e da sua toxicidade, e conseqüentemente da sua regulação, no entanto, a rapidez com que novos derivados destas drogas aparecem no mercado impõe uma elevada dificuldade na avaliação de risco associado ao seu consumo. Atualmente, há ainda dificuldades técnicas e necessidade de investimento para o desenvolvimento de metodologias analíticas adequadas para avaliar os efeitos e o potencial tóxico das catinonas; os estudos farmacológicos e toxicológicos disponíveis são ainda escassos e morosos dificultando o estabelecimento de tratamentos adequados, em casos de incidentes ou intoxicações [98].

De modo a complementar estudos *in vitro* e a auxiliar no aumento do conhecimento farmacológico sobre as catinonas, pode recorrer-se a métodos *in silico*. Neste caso, ferramentas computacionais auxiliares permitem aceder a uma quantidade de previsões, com um custo e tempo mais reduzidos.

Estas ferramentas podem ajudar a elucidar, com base em certas características estruturais, o potencial tóxico e o efeito de compostos sobre determinados alvos biológicos [99]. Os resultados preliminares destes estudos *in silico* podem orientar ensaios experimentais, direcionando os custos para uma finalidade justificável, estimar propriedades de derivados ainda não sintetizados ou conduzir à síntese de novos compostos com alterações químicas estruturais que resultem numa modificação do potencial tóxico e/ou efeito [99,100].

Entre a infinidade de ferramentas computacionais disponíveis no campo dos métodos *in silico*, incluem-se softwares para gerar descritores moleculares, pacotes estatísticos para produzir modelos preditivos, bancos de dados compartilhados sobre propriedades químicas e toxicidade, além de ferramentas que simulam sistemas biológicos e dinâmica molecular (*docking*), entre outros [98,100]. Estes softwares aproveitam informações existentes em bases de dados ou derivadas da estrutura molecular para fazer previsões sobre as propriedades de um dado composto, o que permite correlacionar a estrutura química de um composto com os potenciais alvos biológicos, por exemplo, a previsão da absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) deste composto no organismo [101].

2. Enquadramento

Este trabalho foi realizado no âmbito do protocolo de colaboração entre a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) e o laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária (LPC-PJ), tendo sido desenvolvido nos centros de investigação BioISI e CQE da FCUL e no centro de investigação MARE do Politécnico de Leiria.

Dada a diversidade de catinonas sintéticas e a rapidez com que estas surgem no mercado, associada à falta de informações toxicológicas e farmacológicas sobre as mesmas, há uma grande necessidade de prever o impacto do consumo destas substâncias na saúde pública e compreender os seus potenciais efeitos citotóxicos e neurológicos.

Apesar de escassos, começam a surgir estudos que demonstram o potencial neurotóxico e hepatotóxico das catinonas sintéticas [60,102,103]. Contudo, atualmente ainda não existem estudos disponíveis sobre o efeito de catinonas sintéticas ao nível das sinapses colinérgicas, nomeadamente sobre a enzima AChE, relacionada com a propagação do sinal nervoso na fenda sináptica das junções neuromusculares e sinapses colinérgicas.

Assim, este trabalho consistiu na avaliação de derivados clorados de catinonas sintéticas relativamente à sua citotoxicidade *in vitro* em linhas celulares humanas de hepatocarcinoma HepG2 e de neuroblastoma SH-SY5Y e, à sua capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE). De modo a poder correlacionar as atividades com a estrutura, as catinonas eleitas para este estudo (Figura 2.1) podem ser divididas em 8 famílias de catinonas cloradas: as cloro-*N*-metilcatinonas (CMC, **1-3**), as cloro-*N*-etilcatinonas (CEC, **4-6**), as cloro-*N*-butilcatinonas (CBC, **7-9**), as cloro-pirrolidilcatinonas (Cl-PPP, **10-12**), as cloro-*N,N*-dimetilcatinonas (CDC, **13-15**), as cloro-*N,N*-dietilcatinonas (Cl-DEC, **16-17**), as cloro-*N*-isopropilcatinonas (CIC, **18-19**) e as cloro-*tert*-butilcatinonas (Cl-TBC, **20-21**), todas com uma estrutura química semelhante consistindo em propiofenonas que diferem apenas no tipo de grupo amino em posição 2 e na posição do átomo de cloro no anel aromático (regioisómeros *orto* -Cl na posição 2', *meta* -Cl na posição 3', e *para* -Cl na posição 4'); e ainda uma catinona não clorada, a 4'-metilmetcatinona (4'-MMC, **22**), usualmente designada como mefedrona, também uma propiofenona com um grupo metilamino em posição 2 e um grupo metilo em posição *para* (4') no anel aromático. A mefedrona (**22**) é uma das substâncias mais populares usadas como uma alternativa barata a outras drogas, que prevalece no mercado apesar do seu estatuto de substância ilícita [20,104]. Apesar de se conhecerem os seus efeitos citotóxicos em diversas linhas celulares [57,63,103,105–108] foi, neste trabalho, avaliado pela primeira vez, o seu efeito na atividade enzimática da AChE.

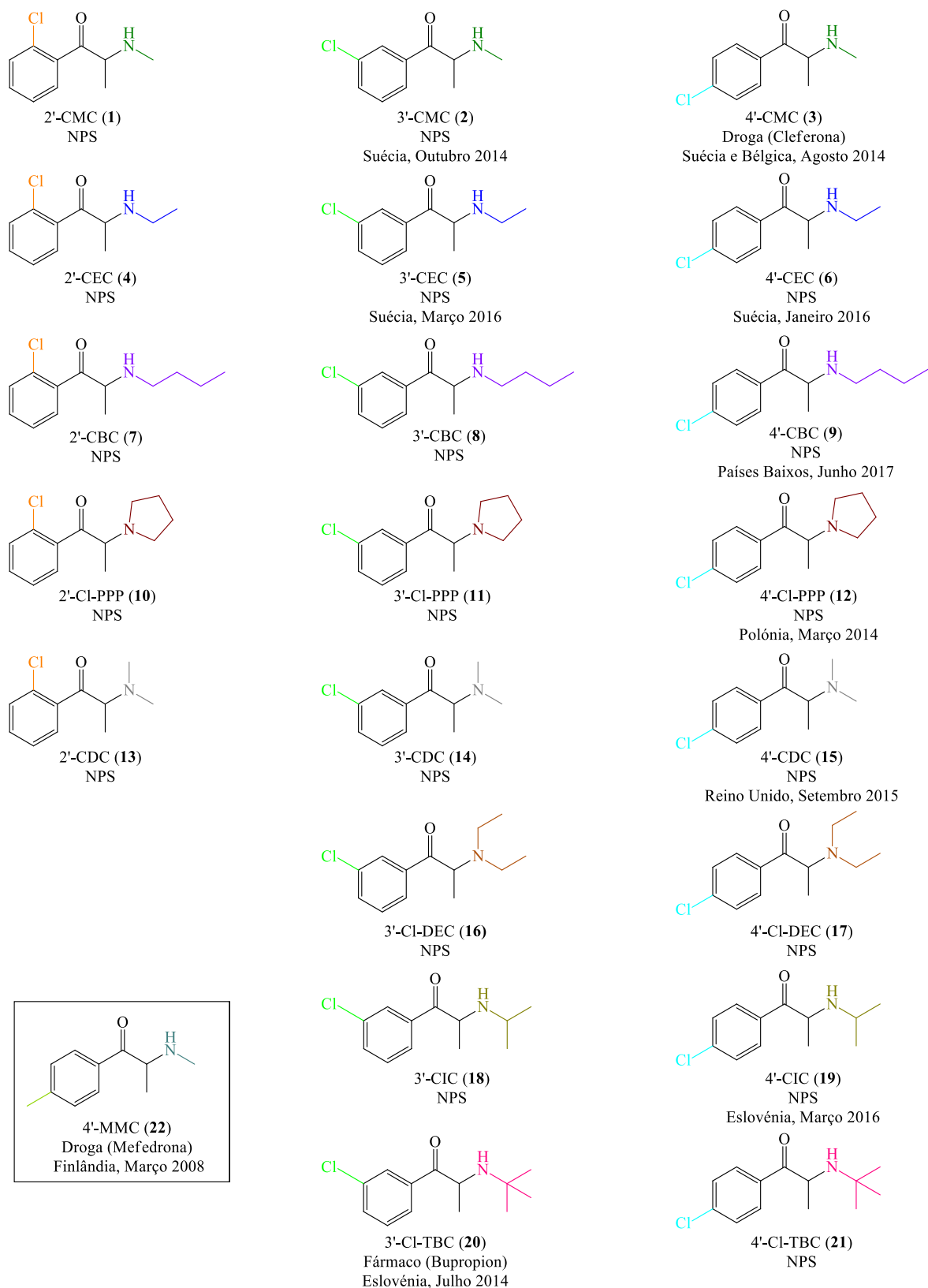


Figura 2.1 - Estrutura das cloro-catinonas estudadas no âmbito deste trabalho e respetivo estatuto legal atual, e local e data da primeira vez que foram reportadas ao EMCDDA, destacando-se a mefedrona como a única catinona não-clorada [109–113].

Note-se que, das catinonas selecionadas para este estudo, pretendeu-se englobar as já reportadas ao EMCDDA (**2-3, 5-6, 9, 12, 15, 19, 20, 22**), juntamente com os alguns dos seus isómeros ainda não apreendidos (**1, 4, 7-8, 10-11, 13-14, 16-17, 18 e 21**), mas que se prevê que possam surgir brevemente nos mercados de drogas ilícitas.

É de salientar que em 2017, a 3'-CMC (**2**), a 4'-CMC (**3**), a 3'-CEC (**5**) e a 4'-CEC (**6**) constavam entre as catinonas mais apreendidas na Europa, sendo que desde 2020 aumentaram significativamente as quantidades de 3'-CMC (**2**) e 4'-CMC (**3**) apreendidas [15,19,37]. A 3-CMC (**2**) foi associada a 10 casos fatais entre 2019 e 2021 e em apenas 4 casos não se verificou misturas com outras substâncias psicoativas. Destes 10 casos, 7 ocorreram na Polónia e 3 casos na Suécia [114]. Foi ainda reportada 1 intoxicação não fatal em Espanha associada ao consumo combinado com outras substâncias psicoativas [114]. Entre 2015 e 2017 na Polónia, a 4-CMC (**3**) foi associada a 9 casos de intoxicação não fatal detetados em operações policiais e em acidentes rodoviários, e 5 casos de intoxicações fatais[115]. Em todos os casos, à excepção de um dos casos não fatais, os indivíduos apresentavam mais do que uma substância psicoativa no organismo variando entre álcool, anfetaminas, derivados de cannabis e de benzodiazepinas [115]. A 4-CEC (**6**) foi associada a 2 casos fatais de overdose entre 2017 e 2019 [116].

Ainda em 2017, na Polónia, foi reportado um caso de intoxicação fatal com uma mistura de NPS na qual foram identificadas a 4'-CMC (**3**) e a 4'-CIC (**19**) [117]. Apesar de notificada pela primeira vez em 2015, a 4'-CDC (**15**) foi apreendida em 2019 na China [110,118]. Além disso, entre 2015 e 2019, a 4'-CDC (**15**) foi identificada numa intoxicação não fatal na China numa mistura de substâncias psicoativas com a 4'-CEC (**6**), 4'-CMC (**3**), mefedrona (**22**), anfetaminas, entre outros. Também neste artigo são mencionadas outras intoxicações não fatais com 4'-CMC (**3**), 4'-CEC (**6**) e mefedrona (**22**) em misturas e isolados [119].

A 3'-Cl-TBC (**20**), a única catinona disponível legalmente como fármaco e utilizada como antidepressivo e auxiliar na cessação do tabagismo, já foi reportada nos mercados de drogas ilícitas em 2014 [29–31,111]. Apesar deste medicamento não ser um grande alvo de abuso também foram reportados alguns casos de intoxicação fatal [120–125].

A mefedrona (**22**), uma das primeiras e mais populares catinonas disponíveis neste tipo de mercados de drogas ilícitas, foi reportada pela primeira vez em Março de 2008 na Finlândia, tendo-se difundindo rapidamente para outros países da EU, nomeadamente, para a Dinamarca em Maio e para o Reino Unido em Outubro [109]. A primeira intoxicação fatal associada à mefedrona (**22**), ocorreu em 2008 na Suécia. Desde então foi associada a diversos casos de intoxicação. Apenas no Reino Unido foram relatados 90 casos fatais entre 2009 e 2011 [126]. Em geral na Europa, entre 2010 e 2014 ocorreram pelo menos 18 casos fatais dos quais 9 foram atribuídos exclusivamente a

esta catinona, e muitos casos foram ainda associados a uma mistura com outras drogas de abuso [127].

Destaca-se ainda que a 4'-CMC (**3**) e a mefedrona (**22**) por constarem na lista das convenções das Nações Unidas são drogas ilícitas, e em Portugal também o são todos os seus isómeros no qual se incluem as cloro-catinonas **1** e **2** [13].

Entre as catinonas reportadas (**2-3, 5-6, 9, 12, 15, 19, 20, 22**) apenas a 3'-CEC (**5**), a 4'-CBC (**9**) e 4'-Cl-PPP (**12**), não têm casos de intoxicação documentados na literatura. No entanto, a 4'-CBC (**9**) foi apreendida pela primeira vez na Europa em 2017, e a 4'-Cl-PPP (**12**) foi reportada ao EMCDDA, em 2014 [111,113]. Desde então não existem registos bibliográficos para estas catinonas.

O presente trabalho pretende contribuir para o aumento do conhecimento quanto ao efeito que as catinonas sintéticas provocam a nível das células do fígado, das células neuronais e da atividade enzimática da AChE. Pretende ainda analisar como pequenas variações na estrutura influenciam os efeitos biológicos encontrados.

3 Materiais e Métodos

3.1 Reagentes e Solventes

Os solventes e reagentes utilizados na síntese das cationonas foram adquiridos comercialmente e utilizados sem purificação prévia, nomeadamente, o 2'-clorobenzonitrilo (98%, Aldrich C24795-100G), a 3'-cloropropiofenona (98%, Aldrich 248193-50G), a 4'-cloropropiofenona (98%, Aldrich C69209-100G), a butilamina (99,5%, Sigma Aldrich 471305-250mL), o ácido bromídrico (48%, Sigma-Aldrich 244260-100ML), o bromo molecular para síntese (Sigma-Aldrich 8.20171.0250), brometo de etilmagnésio (C_2H_5MgBr) 3.0 M em éter dietílico (Aldrich 189871-100ML), o acetato de etilo ($\geq 99,5\%$, Honeywell Riedel-de Haën 33211-2.5L), o benzeno ($\geq 99,5\%$, Merck 1.01782.2500) e o *n*-Hexano (98% VWR Chemicals 24577.367 5L), diclorometano ($\geq 99,9\%$, Honeywell Riedel-de Haën 32222-2.5L) e a acetona ($\geq 99,8\%$, Carlo Erba 400962; $\geq 99,5\%$, Honeywell Riedel-de Haën 32201-2.5).

As soluções de NaOH 5M e HCl 6M utilizadas para o *work-up* da reação já se encontravam previamente preparadas. As fases orgânicas foram secas com sulfato de magnésio anidro (99,5%, Alfa Aesar 33337- 500G).

Para a precipitação das cationonas sintetizadas sob a forma de sal foi utilizada uma solução etérea de HCl preparada a partir da reação de cloreto de sódio ($NaCl \geq 99,0\%$, Honeywell Fluka 793566-1KG, Sigma-Aldrich 746398-1KG) com ácido sulfúrico concentrado (95-97%, Honeywell Fluka 30743-2.5L) e éter dietílico ($\geq 99,8\%$, Honeywell Riedel-de Haën 32203-2.5L).

O tetrahidrofurano (THF) ($\geq 99,9\%$, Carlo Erba 487303) e o éter dietílico foram sujeitos a uma pré-secagem com hidreto de cálcio e hidróxido de sódio ou de potássio, respetivamente, durante pelo menos 2 dias. Posteriormente foram destilados sob atmosfera inerte utilizando benzofenona (99%, Alfa Aesar A10739-1000G) como indicador, segundo o método descrito em [128].

Como solventes deuterados necessários para as análises de RMN foram usados clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) (99,8% Aldrich 151823-100G) e dimetilsulfóxido deuterado ($DMSO-d_6$) (99,9% Aldrich 151874-25G).

Para os ensaios da determinação da inibição enzimática foi utilizada a acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (AChE) (C3389-500UN), o iodeto de acetilcolina (AChI) ($\geq 98\%$, A5751-5G) foram obtidos da Sigma. As soluções tampão usadas foram preparadas com sais tris(hidroximetil)-aminometano (Tris) (99,8%, Merck 1.08382-500G), com cloreto de sódio (99,5%, Panreac 131659.1211-1000G) e, com cloreto de magnésio hexahidratado (99%, Riedel-de Haën 31413-500G). Como substrato utilizou-se 5-5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) (99%, Alfa Aesar A14331-5G).

As células HepG2 foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) (Lonza, BE12-702F - 500ML) suplementado com soro fetal bovino (FBS) (Biowest, S181BH-500ML), uma solução antibiótico-antimicótico de penicilina-streptomicina 100x (Sigma, A5955-100ML) e L-glutamina 200 mM (Corning, 25-005-C1-100ML, Lonza 17-605E-100ML), sendo ainda necessário uma solução PBS 1x (Corning, 21-040-CV-500ML) e tripsina 10x (Lonza, BE02-007E-100ML) durante o manuseamento das células..

As células SH-SY5Y foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) F-12 (Biowest) suplementado com soro fetal bovino (FBS) (Biowest), uma solução antimicótico (Lonza), tendo sido necessário bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (Panreac) para preparação prévia do meio de cultura. Para diferenciar as células foi ainda necessária uma de solução ácido retinóico (RA) ($\geq 98\%$, Sigma) e 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Merck). Além destes utilizou-se ainda tripsina-EDTA 1x (Biowest) para manter e manusear as células durante as culturas e ensaios.

Para os ensaios de viabilidade celular em ambas as linhas celulares foram utilizados como reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) adquirido da VWR (ultra puro 0793-1G), e como solvente o metanol ($\geq 99,8\%$ Honeywell Riedel-de Haën 32213-2.5L) e o DMSO para a linha celular HepG2 e SH-SY5Y, respetivamente.

3.2 Linhas Celulares Humanas

A avaliação do potencial citotóxico das diferentes catinonas sintetizadas foram testadas em duas linhas celulares tumorais humanas, nomeadamente as HepG2 (ECACC 85011430) adquiridas de *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, e as SH-SY5Y (ACC 209, DSMZ) adquiridas de *Leibniz Institute DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*.

As células HepG2 são provenientes do carcinoma hepatocelular humano com características morfológica e funcionalmente semelhantes a hepatócitos, células primárias do fígado [129]. Nomeadamente secretam diversas proteínas plasmáticas, como a albumina e plasminogénio [130]. Como tal, são extensivamente utilizados como modelo para avaliar a toxicidade e metabolismo de diversos compostos *in vitro* [129].

As células SH-SY5Y são provenientes de neuroblastoma humano e são um subclone derivado das células SK-N-SH originalmente de um neuroblastoma metastático da medula óssea [131]. Estas células são amplamente usadas em testes *in vitro* como modelo para determinar a toxicidade de diferentes compostos [59,102,103], uma vez que apresentam características de neurónios dopaminérgicos com expressão de DAT e a capacidade de sintetizar dopamina e noradrenalina, dado que expressam tirosina e dopamina β -hidroxilases [132]. Esta linha celular é amplamente utilizada devido à possibilidade de se poder induzir a sua diferenciação em tipos específicos de

neurónios, como neurónios adrenérgicos, colinérgicos e dopaminérgicos, através do uso de diferentes métodos [133]. Tipicamente são diferenciadas com RA e TPA de modo a obter células com um fenótipo mais pronunciado e semelhante a neurónios secundários, com maiores projeções citoplasmáticas (neuritos) e interrupção do crescimento celular [132].

3.3 Equipamentos

Para a preparação das amostras para os ensaios biológicos todas as pesagens foram efectuadas numa balança OHAUS® PIONEER PX224M ($\pm 0,0001$ g). Foram ainda utilizadas diversas placas de agitação como AGIMATIC-N, VELP científica e P SELECTA durante a síntese, bem como um evaporador rotativo Büchi rotavapor R-200 com um banho térmico Büchi Heating Bath B-490, uma bomba de pressão Büchi Vac® V-500 e um controlador de pressão Büchi Vacuum Controller B-721 para evaporação de solventes.

Para acompanhar o progresso das reações durante a síntese das catinonas foi utilizada a técnica de cromatografia em camada fina (TLC) em placas de sílica gel F₂₅₄ em alumínio 20x20 da Merck (1.05554.0001) e visualizadas numa câmara CAMAG série 29010 com uma luz ultravioleta a 254 nm.

As catinonas sintetizadas foram caracterizados através de espectros de RMN de protão (RMN ¹H) e de carbono (RMN ¹³C), obtidos num espectrofotómetro Bruker 400 Ultrashield a 25 °C e a uma frequência de 400,13 MHz e 100,61 MHz, respetivamente, sendo posteriormente analisados através do software TopSpin 4.1.3. No processamento de dados, os desvios químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm), e tiveram-se como referência os valores dos sinais residuais dos solventes deuterados usados: CDCl₃ (δ_H 7,26 e δ_C 77,16) e DMSO-*d*₆ (δ_H 2,50 e δ_C 39,52) [134]. As constantes de acoplamento (*J*) foram expressas em Hertz (Hz). Para as atribuições dos sinais de RMN ¹³C e RMN ¹H foram ainda realizadas experiências de RMN bidimensionais de correlação espectroscópica homonuclear de ¹H-¹H (COSY) e correlação espectroscópica heteronuclear de ¹³C-¹H (HSQC e HMBC).

Nos ensaios da determinação da atividade enzimática foi utilizada uma balança VWR LA 124i ($\pm 0,0001$ g) e um espectrofotómetro Shimadzu UV-160A UV-VIS.

Para os ensaios biológicos com a linha celular HepG2 o manuseamento foi feito numa câmara de fluxo laminar (*Class II biohazard safety cabinet*) ESCO, tendo sido mantidas numa incubadora de CO₂ Sanyo. O crescimento celular foi controlado com um hematócitómetro (*Marienfeld Improved Double Neubauer*, prof.: 0,100 mm; 0,0025 mm²) e um microscópio invertido Matic AE21. Os resultados dos ensaios testados foram obtidos através do leitor de microplacas Tecan Sunrise Remote A-502.

Para a linha celular SH-SY5Y utilizou-se uma câmara de fluxo laminar (*Class II biohazard safety cabinet*) Telstar, uma incubadora de CO₂ Memmert, um microscópio invertido Primovert e um leitor de microplacas Epoch 2 da Biotek.

3.4 Preparação das catinonas

A síntese das catinonas sintéticas CBC (**7**, **8** e **9**) foi realizada em 3 passos reacionais tal como esquematizado na Figura 3.1: formação da cetona de partida (apenas para o 2'-CBC (**7**) dado que não existe comercialmente), formação da bromocetona e, sem ser purificada, formação da catinona pretendida sob a forma de sal de cloridrato. As restantes catinonas já se encontravam previamente sintetizadas no âmbito de diferentes projetos da FCUL [135].

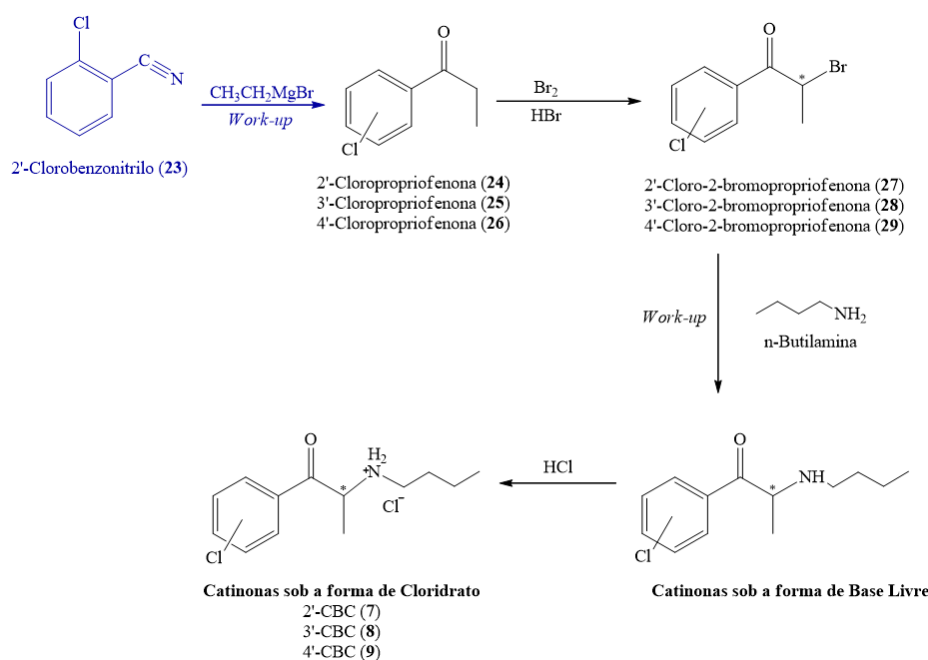


Figura 3.1 - Esquema reacional geral da síntese das catinonas na forma de cloridrato, destacado a azul o passo adicional de síntese da 2'-cloropropiofenona (**24**).

3.4.1. Síntese da 2'-Cloropropiofenona

A síntese da cetona 2'-cloropropiofenona (**24**) foi realizada de acordo com o procedimento experimental descrito por Meltzer *et al.* [136] e de um procedimento adaptado [137], no qual a cetona foi preparada por alquilação de um composto nitrílico comercialmente disponível seguido de hidrólise ácida. Na Tabela 3.1 constam as quantidades utilizadas de 2'-clorobenzonitrilo (**23**) usado e de 2'-cloropropiofenona (**24**) obtido juntamente com o rendimento da reação.

A uma solução de 2'-clorobenzonitrilo (**23**) em éter seco adicionou-se gota-a-gota, sob atmosfera inerte, uma solução de brometo de etilmagnésio (reagente de Grignard), em excesso 20%, durante aproximadamente 40 minutos, à temperatura ambiente. A solução obtida foi vertida sobre 20 g de gelo ao qual se adicionou, gota a gota e sob agitação, 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. A reação de hidrólise decorreu durante a noite tendo-se verificado a formação de 2 fases ambas amarelas. As

fases foram separadas, reservando-se a fase orgânica (fase orgânica 1). A fase aquosa foi lavada, primeiro com 3x25 mL de éter dietílico, recolhendo-se a fase orgânica (fase orgânica 2) e de seguida com 3x20 mL de diclorometano, reservando-se fase orgânica (fase orgânica 3). Cada fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e evaporadas sob vácuo. Para a fase orgânica 1 obteve-se um óleo laranja acastanhado, para a fase orgânica 2 um óleo alaranjado e na fase orgânica 3 um sólido amarelo. Realizaram-se espetros de RMN ¹H em CDCl₃ e juntaram-se as frações com 2'-clorobenzonitrilo (**23**), encontrando-se os espetros em anexo (Figura A.1-Figura A.6).

Tabela 3.1 - Quantidade de 2'-clorobenzonitrilo (**23**) usado, de 2'-cloropropiofenona (**24**) obtido e rendimento da reação.

2'-Clorobenzonitrilo (23) (g; mmol)	2'-Cloropropiofenona (24) (g; mmol)	Rendimento (η)
5,1131; 37,17	3,3081; 19,62	52 %

2'-Cloropropiofenona (1-(2-clorofenil)-propan-1-ona) (**24**): Óleo amarelo. RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz), δ (ppm): 7,43-7,31 (4H, m, H-3'/H-4'/H-5'/H-6'), 2,95 (2H, q, *J*=7,2 Hz, H-2), 1,21 (3H, t, *J*=7,3 Hz, H-3). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 204,41 (C-1); 139,77 (C-1'); 131,57 (C-4'); 130,84 (C-2'); 130,57 (C-3'); 128,80 (C-6'); 127,00 (C-5'); 36,38 (C-2); 8,31 (C-3).

3.4.2. Síntese das α-Bromocetonas

As α-bromocetonas (**27**, **28**, **29**) foram sintetizadas por halogenação das respetivas cetonas em meio ácido segundo os trabalhos de Santali *et al.* [138] e Kalendra *et al.* [139]. Na Tabela 3.2 constam, para cada reação, as quantidades de cloropropiofenonas usadas e respetivo tempo de reação, quantidade de bromocetonas obtidas com o respetivo rendimento.

Para uma solução em diclorometano da cloropropiofenona pretendida adicionou-se, sob agitação, uma gota de HBr e uma gota de Br₂ de modo a iniciar a reação. Após a cor laranja ter dissipado foi-se adicionando gota a gota um equivalente de Br₂, controlando de modo que a cor da solução dissipasse entre cada adição. A reação decorreu ao longo de aproximadamente 1 hora tendo sido acompanhada por TLC com um eluente de hexano:benzeno numa proporção 4:1. Com a reação completa a mistura reacional foi seca obtendo-se sempre um óleo laranja. As α-bromocetonas foram caracterizadas por RMN em CDCl₃ e DMSO-*d*₆, encontrando-se os espetros em anexo (Figura A.7-Figura A.42).

Tabela 3.2 - Condições e quantidades de reagente e de produto para as sínteses das bromocetonas e respectivo rendimento.

Cetona de Partida	Quantidade (g; mmol)	Tempo de reação	Bromocetona	Quantidade (g; mmol)	Rendimento (η)
2'-cloropropiofenona (24)	3,3081; 19,62	2h10	2'-cloro-2-bromopropiofenona (27)	4,1236; 16,66	85 %
3'-cloropropiofenona (25)	5,0384; 29,88	3h20	3'-cloro-2-bromopropiofenona (28)	7,3215; 29,58	99 %
4'-cloropropiofenona (26)	5,0072 ; 29,69	1h40	4'-cloro-2-bromopropiofenona (29)	7,0691; 28,56	96 %

2'-Cloro-2-bromopropiofenona (27): Óleo amarelo-alaranjado, RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz), δ (ppm): 7,51 (1H, d, *J*=7,0 Hz, H-6'), 7,42 (2H, m, *J*=4,7 Hz, H-3'/H-4'), 7,34 (1H, m, H-5'), 5,25 (1H, q, *J*=6,7 Hz, H-2), 1,90 (3H, d, *J*=6,7 Hz, H-3). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 197,04 (C-1), 137,30 (C-1'), 132,18 (C-4'), 130,71 (C-2'), 130, 34 (C-3'), 130,20 (C-6'), 127,08 (C-5'), 46,26 (C-2), 19,84 (C-3). RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ (ppm): 7,79 (1H; dd; *J*=7,6 Hz/ 1,3 Hz; H-6'); 7,59-7,53 (2H; m; H-3'/ H-4'); 7,47 (1H; td; *J*=7,2 Hz/ 1,6 Hz; H-5'); 5,58 (1H; q; *J*=6,6 Hz; H-2); 1,79 (3H; d; *J*=6,6 Hz; H-3). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz), δ (ppm): 194,96 (C-1); 136,17 (C-1'); 132,75 (C-4'); 130,84 (C-2'); 130,49 (C-3'); 129,17 (C-6'); 127,23 (C-5'); 47,33 (C-2); 19,70 (C-3).

3'-Cloro-2-bromopropiofenona (28): Óleo amarelo-alaranjado, RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz), δ (ppm): 8,00 (1H, sl, H-2'), 7,90 (1H, dd, *J* =7,8 Hz, H- 6'), 7,57 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-4'), 7,44 (1H, t, *J* =7,9 Hz, H-5'), 5,22 (1H, q, *J* =6,6 Hz, H-2), 1,91 (3H, d, *J*=6,6 Hz, H-3). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 192,18 (C-1); 135,71 (C-1'); 135,20 (C-3'); 133,71 (C- 4'); 130,15 (C-5'); 129,10 (C-2'); 127,08 (C-6'); 41,38 (C-2); 20,07 (C-3). RMN ¹H (DMSO- *d*₆, 400 MHz), δ (ppm): 8,05 (1H; sl; H-2'); 7,99 (1H; d; *J*=7,8 Hz; H-6'); 7,75 (1H; d; *J*=8,0 Hz; H-4'); 7,60 (1H; t; *J*=7,9 Hz; H-5'); 5,86 (1H; q; *J*=6,5 Hz; H-2); 1,78 (3H; d; *J*=6,5 Hz; H-3). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz), δ (ppm): 192,52 (C-1); 135,80 (C-1'); 133,78 (C-3'); 133,48 (C-4'); 130,88 (C-5'); 128,40 (C-2'); 127,50 (C-6'); 43,31 (C-2); 19,76 (C-3).

4'-Cloro-2-bromopropiofenona (29): Óleo amarelo-alaranjado, RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz), δ (ppm): 7,97 (2H, d, *J*=7,4 Hz, H-2'/H-6'), 7,46 (2H, d, *J*=7,4 Hz, H-3'/H-5'), 5,23 (1H, q, *J*=5,2 Hz, H-2), 1,90 (3H, d, *J*=5,3 Hz, H-3). RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 192,28 (C-1); 140,30 (C-4'); 132,47 (C-1'); 130,49 (C-2'/C-6'); 129,23 (C-3'/C-5'); 41,38 (C-2); 20,12 (C-3). RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ (ppm): 8,05 (2H; d; *J*=8,5 Hz; H-2'/H-6'); 7,63 (2H; d; *J*=8,4 Hz; H-3'/H-5'); 5,82 (1H; q; *J*=6,4 Hz; H-2); 1,77 (3H; d; *J* = 6,4 Hz; H-3). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz), δ (ppm): 192,61 (C-1); 138,70 (C-4'); 133,56 (C-1'); 130,77 (C-2'/C-6'); 129,02 (C-3'/C-5'); 43,22 (C-2); 19,83 (C-3).

3.4.3. Síntese das Cloro-*N*-butilcatinonas

Para a síntese das catinonas recorreu-se ao método descrito por Hyde *et al.*[25]. Na Tabela 3.3 constam, para cada reação, as quantidades de reagentes usados e catinonas obtidas, tempo de reação e o respetivo rendimento.

Começou-se por preparar, em banho de gelo, uma solução 50% (v/v) de butilamina em THF seco. A bromocetona pretendida foi dissolvida em THF seco e colocada em banho de gelo. Adicionou-se a amina fria gota a gota e sob agitação numa proporção 1:2 de bromocetona para a amina. Terminada a adição deixou-se reagir sob agitação à temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h. A reação foi acompanhada por TLC com uma solução de eluente hexano: acetato de etilo 49:1.

De seguida procedeu-se ao *work-up* da reação de acordo com o descrito por Santali *et al.* [138] adaptado de Camilleri *et al.* [140]. Verificou-se que para a primeira reação de obtenção da 4'-bromocetona (**29**) se formou um precipitado correspondente à precipitação da amina em excesso, sendo necessário filtrar previamente ao *work-up*. A mistura reacional foi seca num evaporador rotativo obtendo-se um óleo castanho-escuro. O óleo seco foi dissolvido em diclorometano e, de seguida, adicionou-se HCl 6M até se verificar mudança de pH \approx 1 e separaram-se as fases. A fase orgânica foi reservada (fase orgânica 1) e a fase aquosa foi lavada 3 x 20 mL de diclorometano. Separaram-se as fases e reservou-se a fase orgânica (fase orgânica 2). À fase aquosa adicionou-se NaOH 5M até se verificar mudança de pH \approx 10 e lavou-se a solução 3 x 20 mL de diclorometano. Novamente separaram-se as fases tendo a fase orgânica sido reservada (fase orgânica 3). Todas as fases orgânicas foram secas com sulfato de magnésio anidro e filtradas, e o solvente evaporado no evaporador rotativo. Para a fase orgânica 1 obteve-se um óleo castanho-escuro e para as fases orgânicas 2 e 3 obtiveram-se cristais/precipitados castanhos.

De modo a obter as catinonas na forma de cloridrato, teve-se por base o método descrito por Meltzer *et al.*[136]. Assim, a cada fase orgânica adicionou-se ácido clorídrico etéreo 3M até precipitar e posteriormente filtrou-se sob vácuo. O precipitado foi lavado com diclorometano seguido de solução fria de éter: cetona 1:1, e por fim, acetona fria, até se obter um sólido branco. Tanto para a 4'-CBC (**9**) como para a 3'-CBC (**8**) foi possível obter um pó branco. Depois de seco sob vácuo caracterizaram-se as catinonas sintetizadas por RMN em DMSO-*d*₆ uma vez que se verificou não ser possível dissolver em CDCl₃, encontrando-se os espetros em anexo (Figura A.43-Figura A.54).

Tabela 3.3 - Condições e quantidades de reagentes e de produto para as sínteses das cationonas e respetivo rendimento.

Bromocetona de Partida	Bromocetona (g; mmol)	Amina (mL; mmol)	Cationona	Cationona (g; mmol)	Rendimento (η)
2'-cloro-2-bromopropiofenona (27)	4,1236; 16,66	3,88; 39,20	2'-CBC (7)	-	-
3'-cloro-2-bromopropiofenona (28)	7,3215; 29,58	5,91; 59,76	3'-CBC (8)	1,1528; 4,18	14 %
4'-cloro-2-bromopropiofenona (29)	7,0691; 28,56	5,85; 59,39	4'-CBC (9)	1,5860; 5,75	20 %

3'-CBC (8) (3'-Clorobutilcatingona; 2-(butilamino)-1-(3-clorofenil)propan-1-ona): Pó branco amorfo. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400MHz), δ (ppm): 9,42 (sl, 1H, NH), 9,02 (sl, 1H, NH), 8,10 (1H, s, H-2'), 8,01 (1H, d, *J*=7,9 Hz, H-6'), 7,83 (1H, d, *J*=8,0 Hz, H-4'), 7,65 (1H, t, *J*=7,9 Hz, H-5'), 5,25 (1H, m, H-2), 2,92 (2H, m, H-1''), 1,66 (2H, m, *J*=7,5 Hz, H-2''), 1,45 (3H, d, *J*=7,2 Hz, H-3), 1,34 (2H, m, *J*=7,4 Hz, H-3''), 0,90 (3H, t, *J*=7,3 Hz, H-4''). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz), 195,59 (C-1), 134,85 (C-1'), 134,56 (C-3'), 134,25 (C-4'), 131,36 (C-5'), 128,52 (C-2'), 127,63 (C-6'), 57,39 (C-2), 45,06 (C-1''), 27,72 (C-2''), 19,41 (C-3''), 15,57 (C-3), 13,60 (C-4'').

4'-CBC (9) (4'-Clorobutilcatingona; 2-(butilamino)-1-(4-clorofenil)propan-1-ona): Pó branco amorfo. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400MHz), δ (ppm): 9,29 (sl, 1H, NH), 8,96 (sl, 1H, NH), 8,08 (2H, d, *J*=8,6 Hz, H-2'/H-6'), 7,70 (2H, d, *J*=8,6 Hz, H-3'/H-5'), 5,23 (1H, q, *J*=7,0 Hz, H-2), 2,99 (1H, H-1''), 2,86 (1H, H-1''), 1,65 (2H, m, H-2''), 1,43 (3H, d, *J*=7,12 Hz, H-3), 1,35 (2H, m, H-3''), 0,90 (3H, t, *J*=7,4 Hz, H-4''). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz), δ (ppm): 195,50 (C-1), 139,81 (C-4'), 131,64 (C-1'), 130,87 (C-2'/C-6'), 129,44 (C-3'/C-5'), 57,30 (C-2), 45,02 (C-1''), 27,70 (C-2''), 19,38 (C-3''), 15,61 (C-3), 13,57 (C-4'').

3.4.4. Síntese do Ácido Clorídrico Etéreo (3M)

Para a síntese do ácido clorídrico etéreo fez-se reagir gota-a-gota 43,83 g (750 mmol) de NaCl, previamente seco na estufa a 100°C durante a noite, com 20 mL (20,82 mL; 375 mmol) de ácido sulfúrico concentrado. Por fim o gás final circula pela montagem presente na Figura 3.2 até que entra em contacto com uma solução de 250 mL (750 mmol) de éter dietílico em banho de gelo, dando origem ao ácido clorídrico desejado.



Figura 3.2 - Montagem para síntese do Ácido Clorídrico Etéreo (3M).

3.5. Ensaio de Inibição da Atividade Enzimática da AChE

Para a determinação da inibição da atividade enzimática da AChE usou-se uma adaptação do método descrito em [141].

O método utilizado para a determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase baseia-se no método colorimétrico de Ellman [142] no qual são usados 2 substratos, a acetiltiocolina (AChI) e o ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) (Figura 3.3). A velocidade de reação enzimática é calculada pela taxa de formação do ião 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) que confere uma tonalidade amarelada à mistura reaccional, quantificada pela leitura da absorvância a 405 nm ao longo do tempo [143].

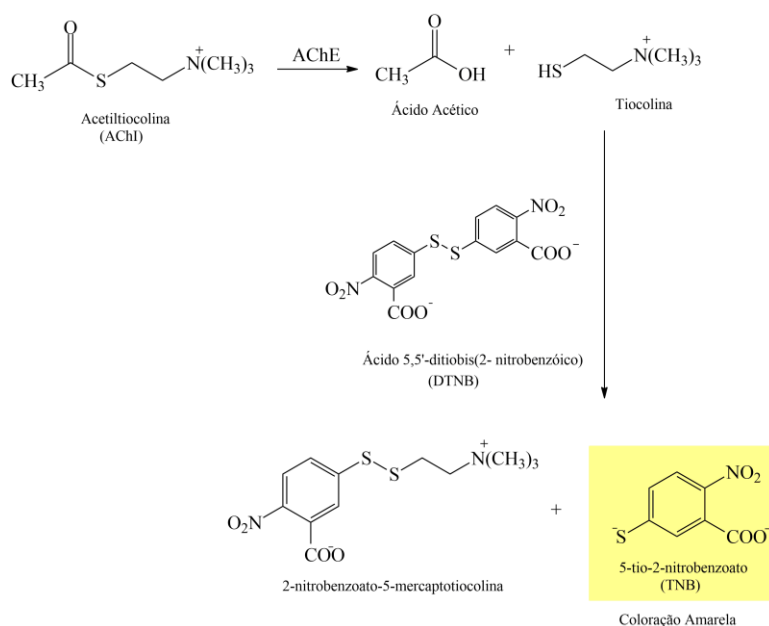


Figura 3.3 - Esquema representativo da reação enzimática da AChE, para a determinação da atividade enzimática através do método de Ellman [143].

Começou-se por determinar a atividade enzimática da solução de enzima AChE que serviu como controlo aos ensaios, na ausência das cationonas. Para tal, adicionou-se 325 µL de tampão Tris 50 mM (pH = 8), 100 µL de água destilada e 25 µL da solução de AChE. A solução foi incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente e de seguida adicionou-se 75 µL de uma solução de AChI (0,33 mg/mL em água destilada) e 475 µL de DTNB (1,2 mg/mL em tampão Tris com sais (0,1 M NaCl e 0,02 M MgCl₂)). Registou-se a absorvância a 405 nm em intervalos de 10 segundos durante 4 minutos contra um ensaio em branco sem enzima, onde a velocidade da reacção ou atividade enzimática corresponde ao declive da curva de progresso nos instantes iniciais. Quando se mostrou necessário ajustou-se a atividade inicial da solução de AChE, v_{controlo} , para estar compreendida entre 0,09-0,10 unidades de absorvância (UI)/min.

Para a determinação da percentagem de inibição da atividade enzimática da AChE pelas cationonas, o procedimento foi idêntico mas na mistura reaccional anterior, os 100 µL de água destilada foram substituídos pelo mesmo volume da solução da cationona a testar. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

A percentagem de inibição da atividade enzimática na presença de cada cationona sintetizada foi determinada pela equação 1, onde I (%) corresponde à percentagem de inibição da AChE na presença de uma cationona, $v_{\text{catingona}}$, a velocidade da reacção na presença de uma cationona e v_{controlo} a velocidade da reacção enzimática na ausência de cationona.

$$I (\%) = 100 - \frac{v_{\text{catingona}}}{v_{\text{controlo}}} \times 100 \quad (1)$$

Para cada cationona foi traçada uma curva dose-resposta utilizando, para tal, um modelo de regressão não linear através do software GraphPad Prism 5 em que se representou a I (%) em função do logaritmo da concentração de cationona, utilizando um modelo de regressão não linear sigmoidal de Hill. Para cada uma das cationonas, determinou-se o IC₅₀, que corresponde à concentração de cationona que inibe 50 % da atividade enzimática.

3.6 Ensaios de avaliação de citotoxicidade em linhas celulares humanas

Para determinação da citotoxicidade das cationonas sintéticas nas linhas celulares recorreu-se ao método colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-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 oxidorreductases 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 (Figura 3.4) [144].

Para quantificar as células viáveis é necessário que os cristais sejam dissolvidos, sendo usualmente utilizadas soluções orgânicas como o DMSO, ou como alternativa o metanol e registados os valores de absorvância a 595 nm [144].

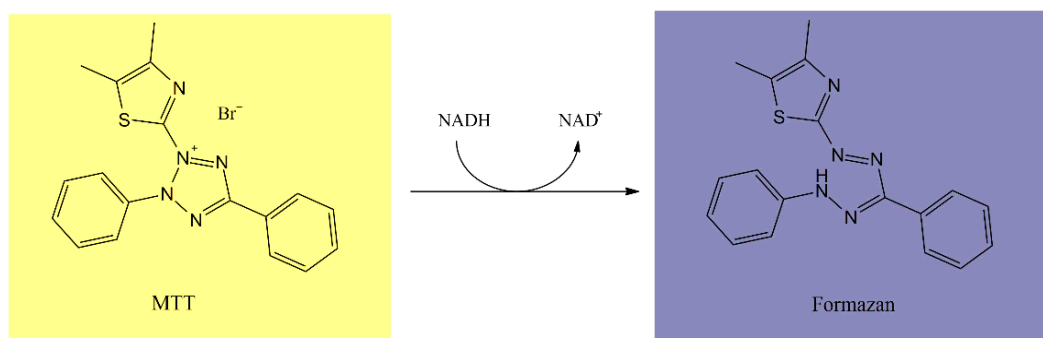


Figura 3.4 - Conversão do MTT em Formazan por desidrogenases presentes em células viáveis.

3.6.1 Cultivo da linha celular HepG2 e ensaios de viabilidade celular

As células foram cultivadas em frascos de cultura T75 e T25 com 75 cm² e 25 cm² de área de crescimento celular usando meio RPMI suplementado com 10% FBS, 2mM L-glutamina e com uma solução de antibiótico-antimicótico (100 U/mL de penicilina-streptomicina e 0,25 µg/mL anfotericina B). As células foram mantidas numa incubadora de CO₂ a uma temperatura constante 37°C e em ambiente húmido com 5% CO₂, e o meio foi renovado a cada 2-3 dias.

Quando as células atingiram a confluência nos frascos de cultura, retirou-se o meio de cultura e lavaram-se as células com uma solução salina de PBS 1x sendo posteriormente incubadas com 1 mL de tripsina x1 durante 5 min a 37 ° C e 5% CO₂. De seguida as células foram suspensas em meio RPMI suplementado e cultivadas em microplacas de 96-poços, a uma concentração de 5 x 10⁴ células/mL, para dar início aos ensaios de viabilidade celular.

As células foram observadas ao microscópio ótico invertido (Figura 3.5) e, após 2-3 dias das células serem inoculadas nas microplacas de 96 poços, atingiram a confluência. O meio de cultura foi retirado e adicionou-se 100 µL em cada poço da microplaca das soluções de cada catinona, nas concentrações desejadas, em meio de cultura suplementado com 2 mM L-glutamina e antibiótico-antimicótico (100 U/mL de penicilina-streptomicina e 0,25 µg/mL anfotericina B) Como controlo negativo, correspondendo a 100% de viabilidade celular, foram usadas células incubadas em meio de cultura na ausência de solução de catinona. As células foram incubadas durante 24 horas e a viabilidade celular posteriormente avaliada, recorrendo ao ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Após 24h de incubação, a solução das catinonas foi removida, as células foram lavadas com a solução salina de PBS 1x e, de seguida, as células foram incubadas durante 2h-3h com 100 µL por poço de uma solução de MTT 0,5 mg/mL preparada em meio de cultura suplementado com 2 mM L-glutamina e antibiótico-antimicótico

(100 U/mL de penicilina-streptomicina e 0,25 µg/mL anfotericina B). Após verificação, ao microscópio, da formação de cristais de formazan, a solução de MTT foi removida e estes foram dissolvidos acrescentado 200 µL de metanol por poço. A absorvância foi registada a 595 nm, com referência a 630 nm, num leitor de microplacas. Os ensaios foram realizados com 6 replicados e para uma gama de concentrações de 0,03 – 6 mM.

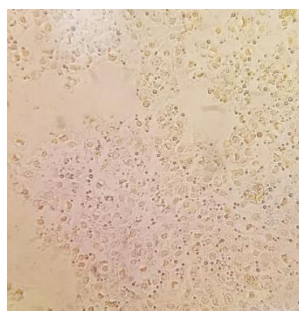


Figura 3.5 - Morfologia das células humanas de hepatocarcinoma HepG2. Observação ao microscópio óptico invertido ampliação (x200).

A citotoxicidade celular foi calculada segundo a equação 2 em relação a um controlo negativo, onde C (%) corresponde à percentagem de citotoxicidade celular na presença de uma catinona, $Abs_{catinona}$, a absorvância na presença de uma catinona e $Abs_{controlo}$ a absorvância na ausência de catinona (controlo negativo).

$$C (\%) = 100 - \frac{Abs_{catinona}}{Abs_{controlo}} \times 100 \quad (2)$$

Para cada catinona foi traçada uma curva dose-resposta utilizando, para tal, 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, utilizando um modelo de regressão não linear sigmoidal de Hill e determinou-se o LC_{50} , que corresponde a 50 % de morte celular.

3.6.2 Cultivo e diferenciação da linha celular SH-SY5Y e ensaios de viabilidade celular

Começou-se por preparar uma solução de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham* e bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) (2,2 g/L) em água Mili-Q num erlenmeyer, e acertou-se o pH a 7,2. A solução de meio foi posteriormente esterilizada, por filtração com uma membrana de poliétersulfona (PES) de 0,2 µm de porosidade, na câmara de fluxo laminar. A partir desta solução preparou-se uma solução de meio de cultura suplementado com 10% FBS, 5 mL de antibiótico-antimicótico, e uma solução de meio com apenas 5 mL de antibiótico-antimicótico.

As culturas foram realizadas de acordo com [145] seguida de uma fase de diferenciação com 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e ácido retinóico (RA) com algumas modificações ao protocolo descrito em [103].

As subculturas foram realizadas em placas de Petri com 21 cm² de área de crescimento celular usando meio de cultura suplementado com 10% FBS e com uma solução de 1% antimicótico. As células foram mantidas numa incubadora com uma temperatura constante de 37°C, em ambiente húmido com 5% de CO₂ e o meio foi renovado a cada 2-3 dias até que se verificasse 80% de confluência, sendo posteriormente tripsinizadas e inoculadas em microplacas de 96 poços, onde foram incubadas nas mesmas condições.

A diferenciação celular foi induzida ao acrescentar-se 200 µL de solução de meio de cultura suplementado com 2,5% FBS e 10 µM de RA em cada poço, incubando-se a uma temperatura constante de 37°C e em ambiente húmido com 5% de CO₂. Após 4 dias procedeu-se à segunda etapa de diferenciação. Primeiro foi retirado o meio de todos os poços e, de seguida, acrescentou-se 200 µL de solução de meio de cultura suplementado com 2,5% FBS, 10 µM de RA e 80 nM de TPA. As células foram novamente incubadas nas mesmas condições e, ao fim de 3 dias verificou-se que as células estavam diferenciadas, tal como se verifica na Figura 3.6.

Incubaram-se as soluções desejadas de catinonas durante 24 horas em meio de cultura suplementado com 2,5% FBS e de seguida realizou-se o ensaio com o MTT em meio de cultura suplementado com antimicótico. Como controlo negativo, correspondendo a 100% de viabilidade celular, foram usadas células incubadas em meio de cultura, na ausência de solução de catinona. Ao fim das 24h removeu-se a solução de catinonas e após as células terem sido lavadas com uma solução salina de PBS 1x adicionou-se a solução de MTT 0,5 mg/mL preparada em meio de cultura suplementado com 2 mM L-glutamina e antimicótico. Incubaram-se as placas até se verificar a formação de cristais de formazan, sendo de seguida removida a solução do MTT e adicionado 100 µL de DMSO por poço, para dissolver os cristais formados. Por fim, procedeu-se à leitura das microplacas num espectrofotómetro a 570 nm. Os ensaios foram realizados de modo independente e em triplicado para uma gama de concentrações entre 0,01-5 mM.

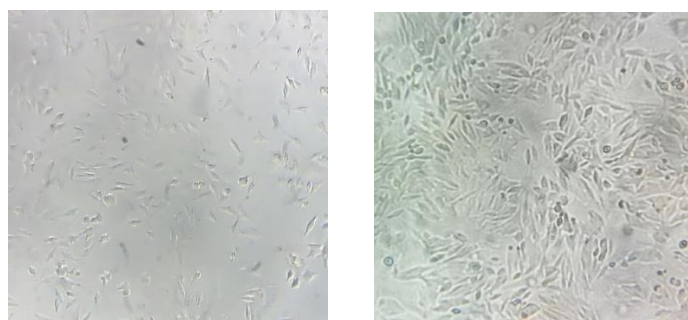


Figura 3.6 - Morfologia das células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y indiferenciadas (à esquerda) e após diferenciação (à direita), observadas ao microscópio óptico invertido (x200).

A citotoxicidade celular foi calculada em relação a um controlo negativo (na ausência de catinona) segundo a equação 2, tal como referido no ponto 3.6.1 para as células HepG2. Para cada catinona foi traçada uma curva dose-resposta utilizando, para tal, um modelo de regressão não linear, através

do software GraphPad Prism 5. A percentagem de citotoxicidade, C (%), foi representada em função do logaritmo da concentração de catinona, utilizando um modelo de regressão não linear sigmoidal de Hill e determinou-se o LC₅₀, que corresponde a 50 % de morte celular.

3.7. Análise estatística de dados

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 $\log EC_{50} = \log EC_F - (1/HillSlope) * \log(F/(100-F))$ e $Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{((LogEC50 - X) * HillSlope)})$ do programa de software GraphPad Prism 5.1, para Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), 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 ou LC₅₀ (*EC₅₀*). Assim, determinaram-se os valores de IC₅₀ e LC₅₀ e respetivo intervalo de confiança ao nível de confiança de 95% ([CI]), os declives ou coeficientes de Hill que fornecem o maior valor absoluto do declive da curva dose-resposta, e a concentração mínima com efeitos adversos observáveis (LOAEL) para todas as catinonas.

Para a análise da variância dos resultados foi aplicada *One-Way ANOVA*, complementadas com *post-hoc* teste de *Tukey* para identificar os resultados de IC₅₀ e LC₅₀ das diferentes catinonas que diferem significativamente entre si. Foram determinadas como diferenças estatísticas não significativas os valores de *p-value* superiores a 0,05 ($p > 0,05$).

3.8. Estudo *In Silico*

Os resultados obtidos foram analisados *in silico* de modo a complementar a avaliação da relação estrutura-atividade das diferentes catinonas testadas. Tal como previamente mencionado, os estudos *in silico* permitem prever as propriedades moleculares e atividades biológicas das catinonas sintéticas usadas neste trabalho através do uso de métodos computacionais, tendo por base a comparação da estrutura e propriedades das diferentes catinonas sintetizadas na forma de cloridrato com substâncias conhecidas estudadas, presentes nos bancos de dados dos servidores.

Neste trabalho foi utilizado o servidor online Molinspiration Cheminformatics [146] que permite estimar as propriedades moleculares como *LogP* (coeficiente de partição octanol-água), TPSA (área superfície polar topológica, expressa em Å²), MM (massa molar, expresso em Da ou g/mol), HBA (número de aceitadores de ligação de hidrogénio) e HBD (número de doadores de ligação de hidrogénio), NRB (número de ligações com rotação), volume (expresso em Å³) e ainda prever a bioatividade para alvos farmacológicos, como receptores acoplados à proteína G (GPCR),

modeladores de canais iônicos (ICM), inibidores de cinases (KI), receptores nucleares (NRL), inibidores de proteases (PI) e enzimas (EI).

O coeficiente de partição octanol-água (*Log P*) é aplicado em estudos de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR) para determinar a hidrofobicidade de uma dada molécula, uma vez que esta afeta a absorção, biodisponibilidade, interações com receptores, metabolismo e toxicidade. É calculado por combinação das contribuições de fragmentos da molécula e fatores de correlação usado para prever a permeabilidade através da membrana celular [147].

A área de superfície polar topológica (TPSA) permite prever as propriedades de transporte de uma molécula correlacionando com a absorção através da BGI, permeabilidade através da monocamada de células Caco-2 e permeação através da BHE. É quantificada através da soma das superfícies ocupadas por átomos polares, usualmente oxigênio e azoto, e com os átomos de hidrogênio a estes ligados [148].

O número de ligações com rotação (NRB) permite prever a biodisponibilidade oral ao determinar a flexibilidade molecular. É definido como qualquer ligação simples que não faz parte de um anel, que está ligado a um átomo não seja de hidrogênio e não seja terminal [149].

Com estes parâmetros avaliou-se a probabilidade das diversas catinonas estudadas serem oralmente biodisponíveis através da regra dos 5, também conhecida como a regra de Lipinski. Esta regra prevê que moléculas com uma massa molecular (MM) inferior a 500 g/mol, um coeficiente de partição octanol/água (*Log P*) inferior a 5, o número dos grupos doadores de ligação por pontes de hidrogênio (HBD) inferior a 5 (grupos OH e NH) e o número dos grupos recetor de ligação por pontes de hidrogênio (HBA) inferior a 10 apresentem uma boa biodisponibilidade oral [150]. A regra de Veber procurou complementar as propriedades discutidas pela regra de Lipinski, e demonstrou que a rigidez da molécula resultante do NR e da TPSA, determinada através da superfícies ocupadas pelos átomos de oxigênio e azoto e pelos átomos de hidrogênio que lhes estão ligados, são outros critérios que vão influenciar a biodisponibilidade oral [149]. Deste modo a regra de Veber pressupõe que moléculas com os valores de TPSA superiores a 140 Å² são dificilmente absorvidas e valores de TPSA inferior a 90 Å² apresentam facilidade de permeação através da BHE, e ainda definiu que o número de ligações rotacionáveis deve ser igual ou menor a 10 para aumentar a permeabilidade [149].

Quanto à bioatividade das catinonas sintéticas para os diferentes alvos farmacológicos, podem ser interpretados como ativos quando o valor de bioatividade for positivo, moderadamente ativos quando o valor de bioatividade se encontra entre -5,0 e 0,0 ou inativos quando estes valores são inferiores a -5,0 [151].

As propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) das catinonas foram ainda analisadas com recurso ao software online admetSAR 2.0 [152]. Este servidor permite averiguar a probabilidade de uma dada substância chegar a diferentes órgãos e alvos biológicos por combinação de métodos computacionais e modelos preditivos para estimar várias propriedades farmacocinéticas e de toxicidade, incluindo permeação da BBB e da BGI de interesse nesta dissertação.

Adicionalmente os resultados obtidos para as catinonas sintéticas, na forma de cloridrato, foram comparados com outros servidores, nomeadamente SwissADME [153] e pkCSM [154] apresentados em anexo nas Tabela A.1 e Tabela A.2.

4. Resultados e Discussão

No presente trabalho foram selecionadas 22 catinonas psicoativas para serem estudadas, de acordo com a estrutura e os critérios já referidos no enquadramento. Das catinonas selecionadas para este estudo, foram testadas 21 catinonas, uma vez que não foi possível sintetizar a 2'-CBC (7). As catinonas estudadas foram agrupadas em 8 conjuntos de regioisómeros: CMC (1-3), CEC (4-6), CBC (8-9), CI-PPP (10-12), CDC (13-15), CI-DEC (16-17), CIC (18-19), CI-TBC (20-21) sendo ainda avaliada a mefedrona (4'-MMC, 22).

A síntese e caracterização das catinonas sintetizadas é apresentada e discutida no ponto 4.1. Os resultados dos ensaios de avaliação das catinonas quanto à sua capacidade de inibição da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) são apresentados e discutidos no ponto 4.2. Os ensaios de citotoxicidade das catinonas foram realizados em células humanas da linha celular do fígado do hepatocarcinoma HepG2 e da linha celular do neuroblastoma SH-SY5Y, e os resultados são apresentados e discutidos nos pontos 4.3 e 4.4, respetivamente. Posteriormente foi realizada uma análise quimioinformática com base na estrutura das catinonas para previsão *in silico* das suas propriedades e potenciais bioatividades no ponto 4.5.

4.1. Preparação das catinonas

A síntese das cloro-*N*-butilcatinonas 3'-CBC (8) e 4'-CBC (9) foi realizada em três passos reacionais, tal como exemplificado na Figura 3.1. Iniciou-se pela formação da α -bromocetona a partir da respetiva cetona, seguindo-se para a obtenção da catinona na forma de base livre resultante da reação da α -bromocetona com amina correspondente, e por fim, obteve-se a catinona sob a forma de cloridrato (sal) através da precipitação com ácido clorídrico etéreo.

A síntese da 2'-CBC (7) exigiu um passo adicional de síntese da cetona de partida, 2'-cloropropiofenona (24), a partir do 2'-clorobenzonitrilo (23) uma vez que esta cetona não se encontra disponível comercialmente.

4.1.1 Síntese da 2'-Cloropropiofenona

Para a síntese da 2-cloropropiofenona (24) primeiramente foi realizada uma alquilação do 2'-clorobenzonitrilo (23) através da adição do reagente de Grignard promovendo, assim, uma reação de adição nucleofílica do carbono nucleofílico do brometo de etilmagnésio ao carbono eletrofílico do grupo nitrilo [136].

O intermediário formado é protonado levando à formação da imina correspondente, que posteriormente sofre nova protonação por adição de ácido sulfúrico à mistura reacional. O ácido provoca protonação do átomo de azoto da imina facilitando o ataque nucleofílico da água. De seguida ocorre a reprotonação do átomo de azoto preferencial ao átomo de oxigénio dado o grupo -NH₂ ser uma base mais forte do que -OH, promovendo a saída do grupo -NH₃ sob a forma de gás.

Consequentemente a desprotonação do grupo carbonilo permite obter a cetona desejada (Figura 4.1) [135,137,155,156].

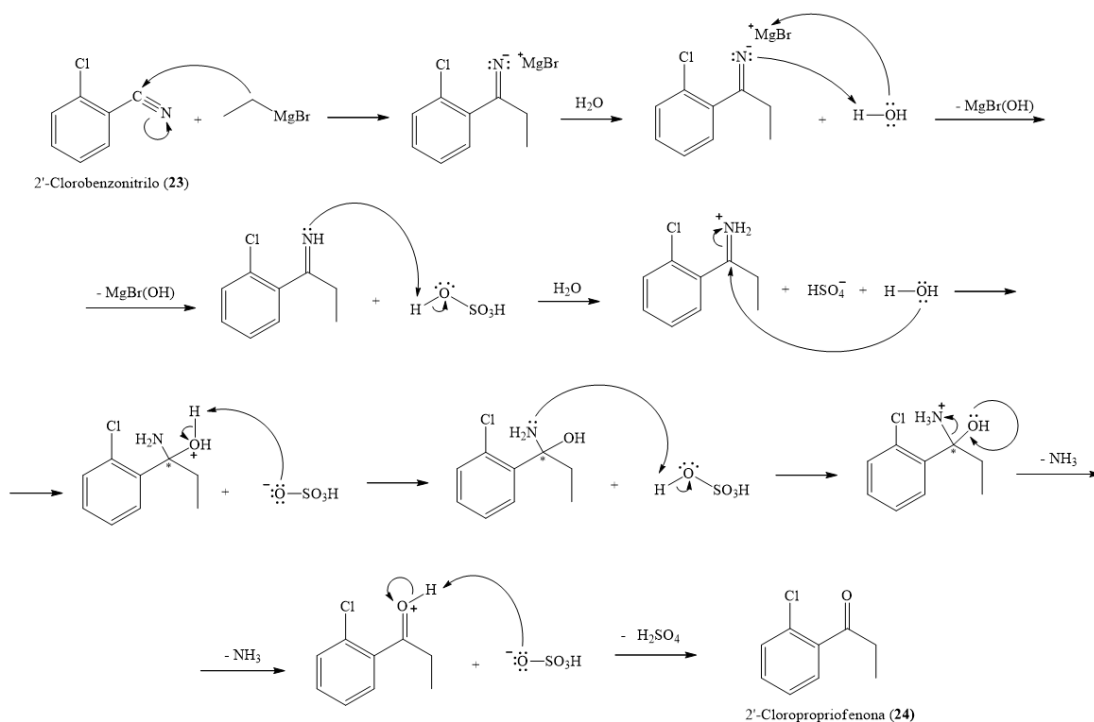


Figura 4.1 - Mecanismo de formação da 2'-cloropropiufenona (**24**) com a adição de H₂O e H₂SO₄.

Depois do *work-up* é confirmada a presença da 2'-cloropropiufenona (**24**) por comparação do espectro de RMN ¹H do produto da reação com o espectro de RMN ¹H do 2'-clorobenzonitrilo (**23**) em CDCl₃. Pela Figura 4.2 verificou-se a presença da cetona (**24**) através do aparecimento de dois sinais a baixo desvio químico, um quarteto a 2,95 ppm e um triplete a 1,20 ppm correspondentes aos prótons H-2 e H-3 do grupo etilo, respectivamente, confirmado através do espectro de COSY devido ao acoplamento entre o sinal do próton H-2 com o sinal do próton H-3.

É de notar que em consequência do desdobramento e sobreposição de sinais não foi possível distinguir os prótons no intervalo da zona aromática, entre 6,0-8,5 ppm [155], pelo que na Figura 4.2 apenas é distinguível um multiplete que integra para 4 prótons. Além disso foi possível verificar que a 2'-cloropropiufenona (**24**) é obtida na forma pura, dado não se observarem outros picos correspondentes a impurezas.

A caracterização e atribuição de sinais ¹H e ¹³C foi realizada com recurso aos espectros de RMN ¹³C, de HSQC e de HMBC em CDCl₃ presentes nas Figura A.1-Figura A.6 em anexo.

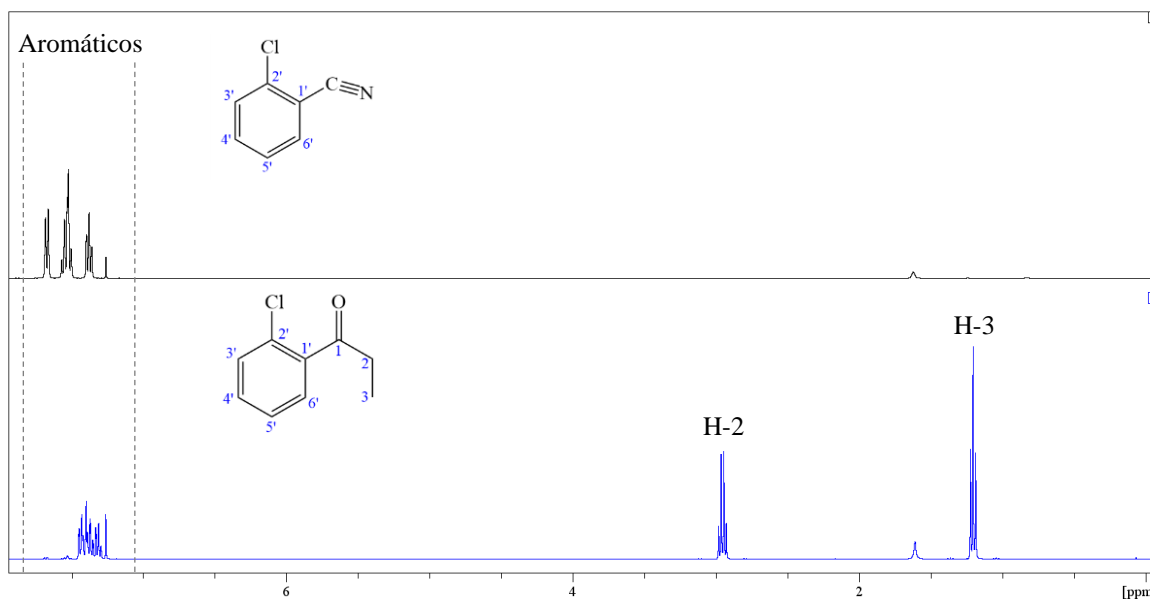


Figura 4.2 - Comparação dos espectros RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da 2'-clorobenzonitrilo (**23**) com a 2'-cloropropiofenona (**24**).

4.1.2 Síntese das α -Bromocetonas

A formação das α -bromocetonas (**27**, **28** e **29**) consistiu numa reação de halogenação da cetona correspondente por adição de bromo molecular em meio ácido, segundo o mecanismo presente na Figura 4.3, catalisada pelo ácido bromídrico. A reação iniciou-se com uma lenta protonação do oxigénio do carbonilo com o ácido levando à formação de um enol, estabilizado por tautomerismo ceto-enólico. De seguida houve um rápido ataque nucleofílico do enol ao bromo molecular, resultando numa mistura de enantiómeros dado que este pode ocorrer por ambas as faces da ligação dupla. Por fim, as α -bromocetonas (**27**, **28** e **29**) foram obtidas por desprotonação do carbonilo resultante da regeneração do ácido [135,137,155,156].

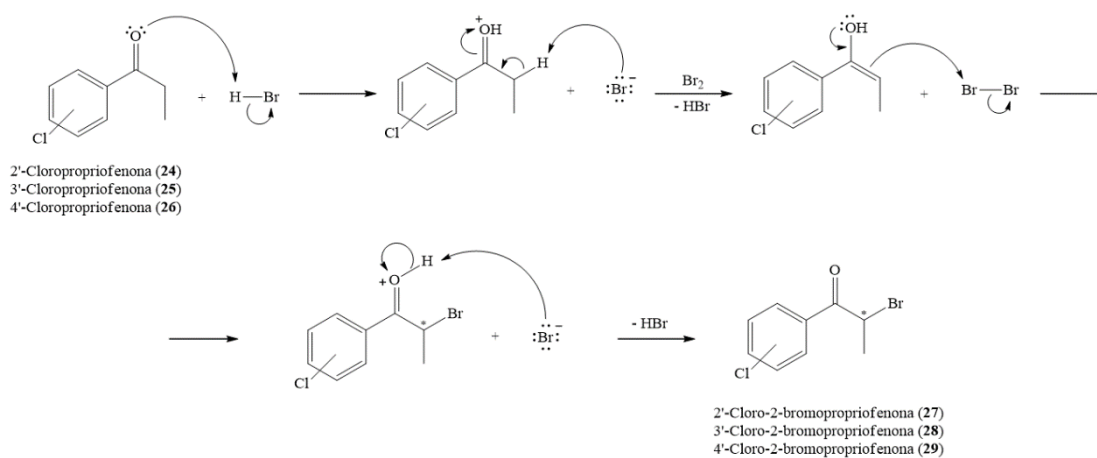


Figura 4.3 - Mecanismo de formação das α -bromocetonas (**27**, **28** e **29**) a partir das respetivas cloropropiofenonas (**24**, **25** e **26**).

A presença das α -bromocetonas na mistura reacional foi confirmada através da comparação entre os espectros de RMN ^1H das cetonas de partida com o das respectivas α -bromocetonas. Através da Figura 4.4, Figura 4.5 e Figura 4.6 verificou-se que o desvio químico correspondentes aos prótons H-3 das cetonas são tripletos que se inserem no intervalo 1,22–1,20 ppm, enquanto os mesmos prótons nas bromocetonas são dupletos presentes num intervalo 1,90–1,89 ppm. Os prótons H-2 das cetonas encontram-se entre 2,98–2,95 ppm ao passo que os prótons H-2 das bromocetonas entre 5,25–5,22 ppm e integram para 1H e 2H, respetivamente. Como tal verificou-se um aumento dos desvios químicos dos prótons alifáticos H-2 e H-3 das cetonas de partida para as bromocetonas devido ao efeito desblindante do átomo de bromo presente na posição α . Este efeito foi verificado com mais intensidade nos prótons mais próximos a este átomo pelo que o desvio químico será maior para os prótons α (H-2). Ainda foi possível denotar uma variação da multiplicidade nos prótons H-3 na qual as cetonas de partida apresentavam um tripleto que foi alterado para duplete nas bromocetonas bem como uma redução da integração dos prótons H-2, confirmando a introdução do átomo de bromo em C-2.

Além destes sinais, verificou-se ainda a presença de um singuleto entre 2,75-2,70 ppm correspondente a um próton germinal a dois átomos de bromo, confirmando a formação de um produto secundário durante a reação, a dibromocetona, com dupla halogenação no carbono α . Contudo, a presença desta não afetou as reações subsequentes.

Também através destas figuras foi possível denotar que para todas as α -bromocetonas sintetizadas apenas o perfil dos sinais correspondentes à zona dos aromáticos difere dado depender da posição do átomo de cloro no anel aromático. A caracterização e atribuição de sinais ^1H e ^{13}C foi realizada para cada bromocetona com recurso aos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , de COSY, de HSQC e de HMBC em CDCl_3 presentes nas Figura A.7-Figura A.24 e Figura A.31-Figura A.36 em anexo.

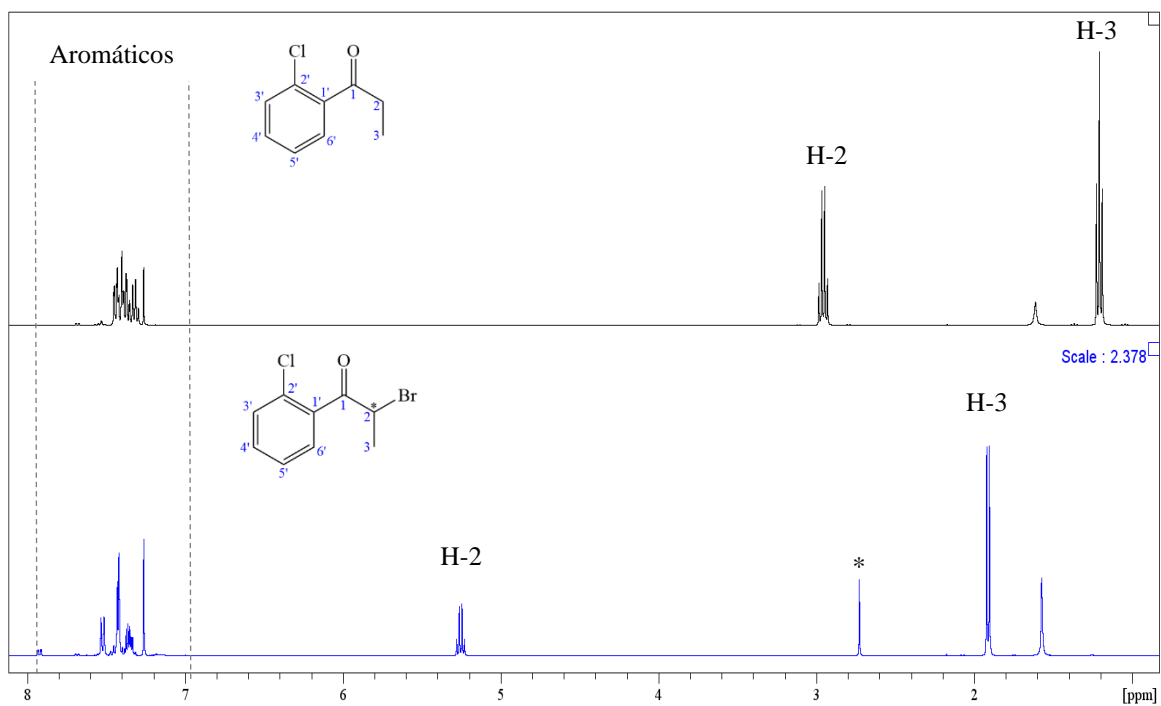


Figura 4.4 - Comparação dos espectros de RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) da 2'-cloropropiofenona (**24**) com a respectiva bromocetona (**27**). * sinal de dibromocetona.

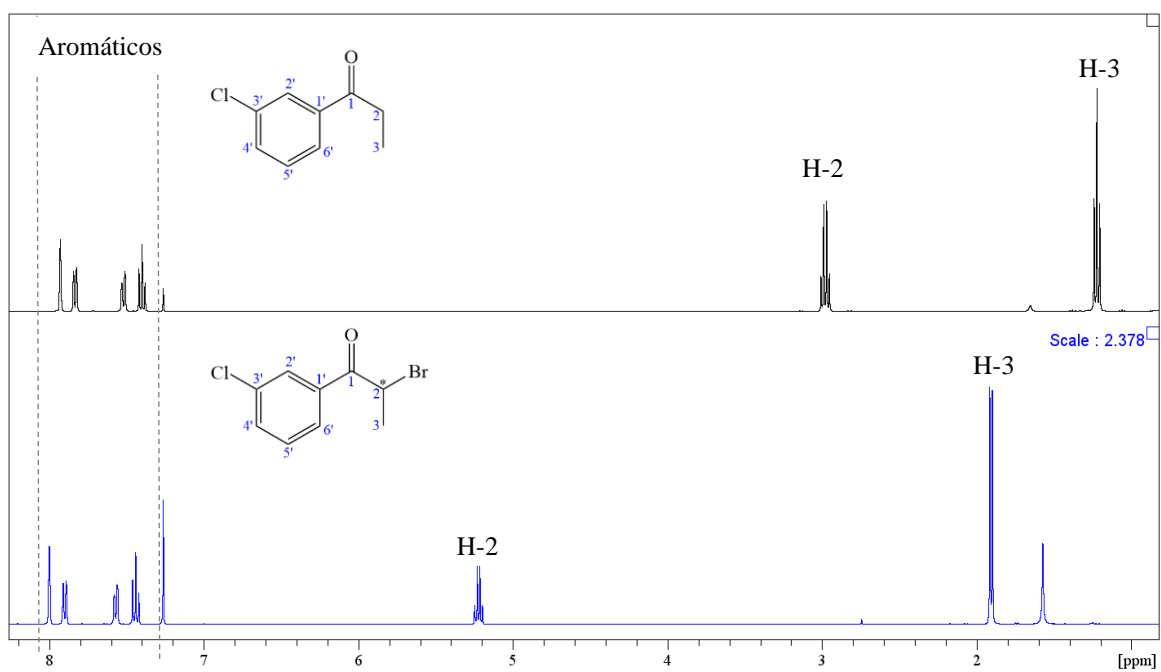


Figura 4.5 - Comparação dos espectros de RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) da 3'-cloropropiofenona (**25**) com a respectiva bromocetona (**28**).

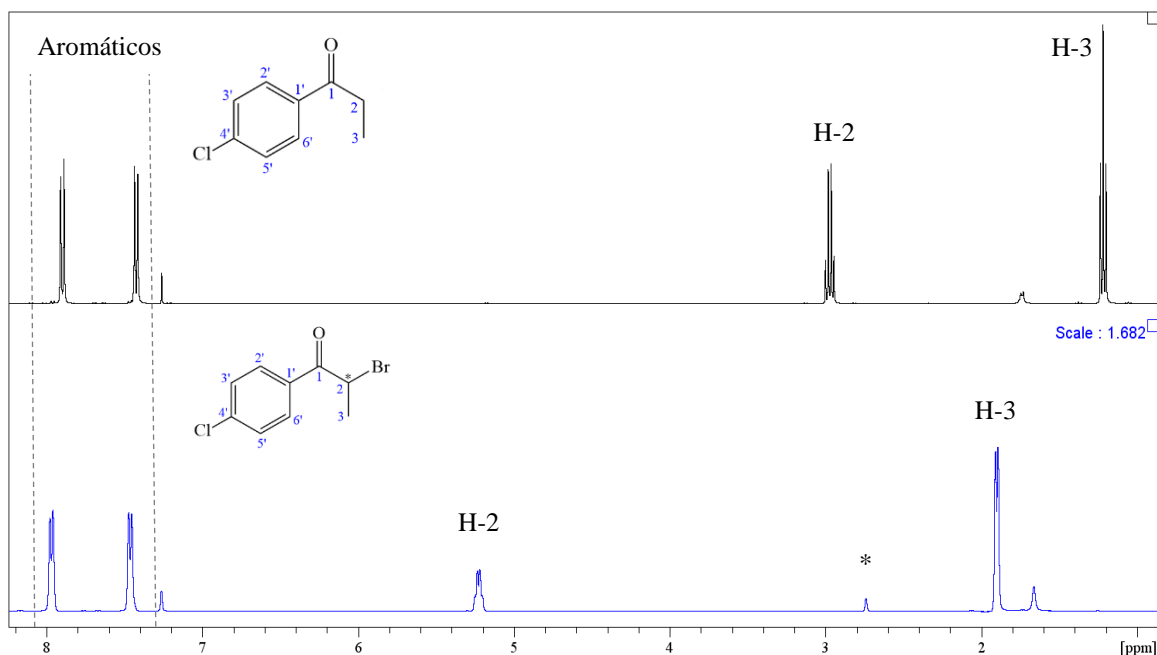


Figura 4.6 - Comparação dos espectros de RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) da 4'-cloropropiofenona (**26**) com a respectiva bromocetona (**29**). * sinais de dibromocetona.

4.1.3 Síntese das Cloro-*N*-butilcatinonas

A mistura final obtida na síntese das α -bromocetonas foi utilizada sem purificação prévia. Assim, esta mistura foi sujeita a uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) com a butilamina, tal como exemplificado na Figura 4.7.

A reação ocorre num único passo onde o nucleófilo, a amina, ataca o carbono α (ao carbonilo) provocando a simultânea expulsão do grupo de saída, o bromo, obtendo-se a catinona na forma de base livre. Esta reação é estereoespecífica e provoca a inversão da configuração no carbono α devido ao ataque de um estereocentro, contudo, dado que se parte de uma mistura de estereoisómeros o produto desta reação é igualmente uma mistura de enantiómeros [135,137,155,156]. Por fim, a adição de ácido clorídrico em solução etérea à mistura reacional permitiu obter as catinonas sob a forma de cloridrato (sal) [135–137].

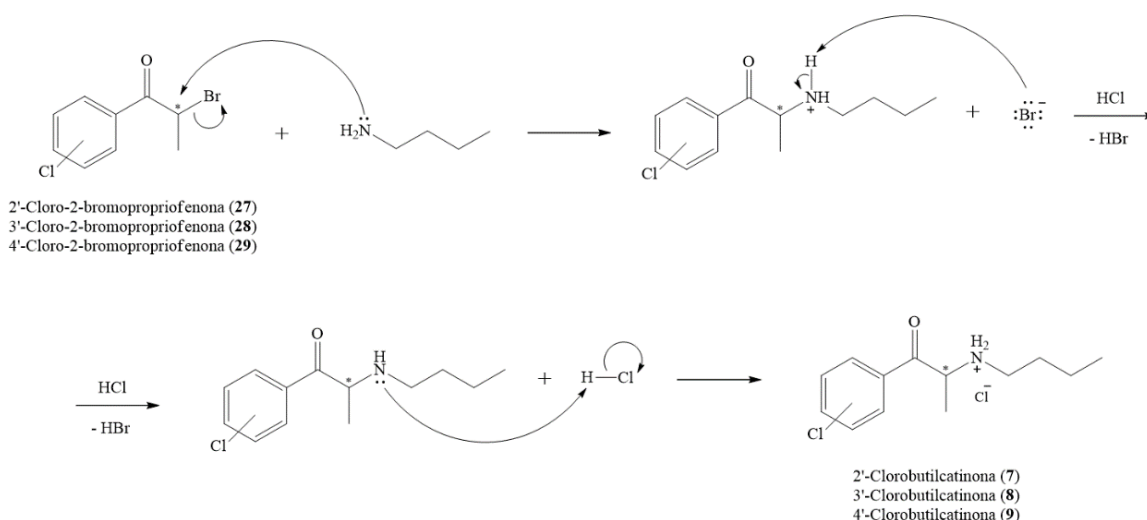


Figura 4.7- Mecanismo de formação das catinonas (7, 8 e 9) na forma de base livre e na forma de cloridrato, a partir das bromocetonas correspondentes (27, 28 e 29).

Não foi possível sintetizar a 2'-CBC (7) possivelmente devido à baixa reatividade da 2'-cloro-2-bromocetona (27) [139]. Dado que a velocidade das reações S_N2 são dependentes do nucleófilo, do eletrófilo e do grupo de saída, e tendo em consideração que o Br^- é um bom grupo de saída, uma vez que o carbono α das bromocetonas é um carbono secundário vai provocar um impedimento estereoquímico e dificultar a aproximação do nucleófilo. Consequentemente pode ocorrer uma diminuição da velocidade da reação. Como tal, a probabilidade do aparecimento de butilcatinonas com o cloro na posição *orto* do anel aromático é reduzida devido à dificuldade de síntese deste tipo de catinonas.

A formação das catinonas foi confirmada através dos espectros de RMN 1H em $DMSO-d_6$ por comparação com espectros das respetivas bromocetonas. Houve necessidade de alterar o solvente devido à baixa solubilidade apresentada pelos isómeros CBC (8-9) em $CDCl_3$. Através dos espectros de RMN 1H verificou-se o surgimento de novos sinais nos espectros das catinonas, correspondendo aos sinais da protonação da amina, e ainda alteração dos desvios químicos dos prótons α .

Procedeu-se ainda à caracterização das catinonas sintetizadas através dos espectros de COSY, HMBC e HSQC, permitindo, assim, atribuir todos os sinais de 1H e ^{13}C . Estas atribuições começaram por ser atribuídas primeiramente à zona alquílica da cadeia principal e posteriormente à região aromática. Através da Figura 4.8 e da Figura 4.9 verifica-se que não houve alterações nos sinais atribuídos previamente, tal como esperado uma vez que a cadeia lateral do carbono α foi a única que sofreu modificações.

A protonação do átomo de azoto levou ao aparecimento de 2 sinais de próton no espectro de RMN 1H correspondentes a H-1'' de ambas as CBC (8-9). Tal deveu-se ao facto destes prótons não serem quimicamente equivalentes e como tal são designados como diastereotópicos.

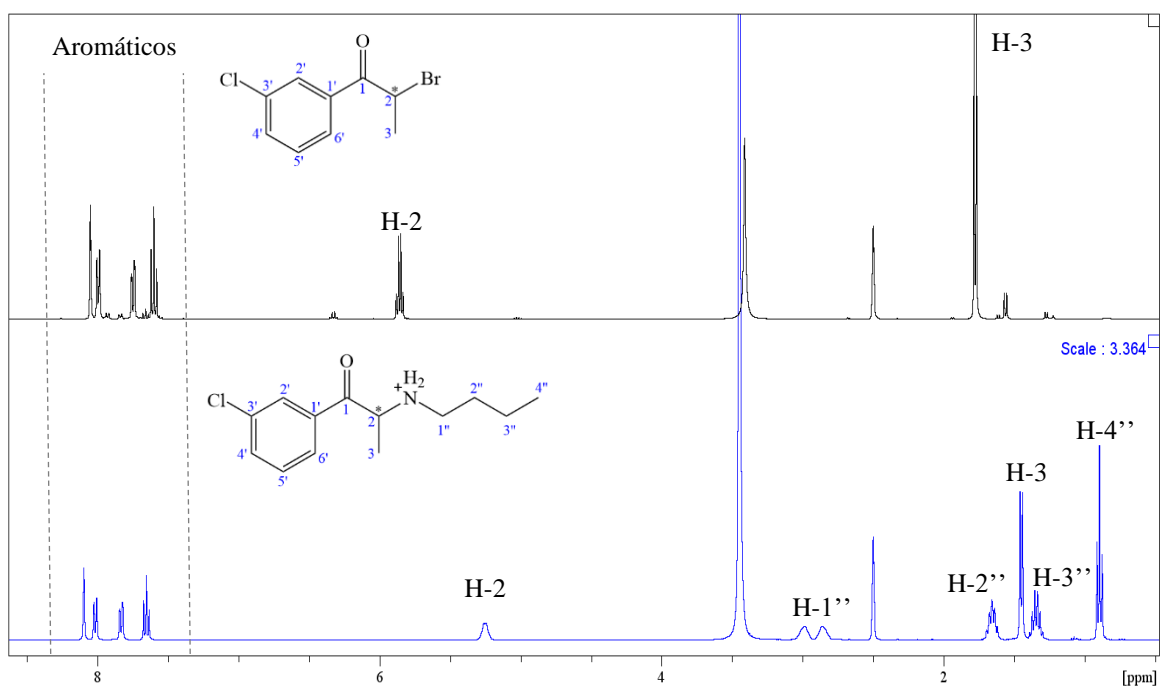


Figura 4.8 - Comparação dos espectros de RMN ¹H (400MHz, DMSO-*d*₆) da 3'-cloro-2-bromopropiofenona (**28**) com a 3'-CBC (**8**).

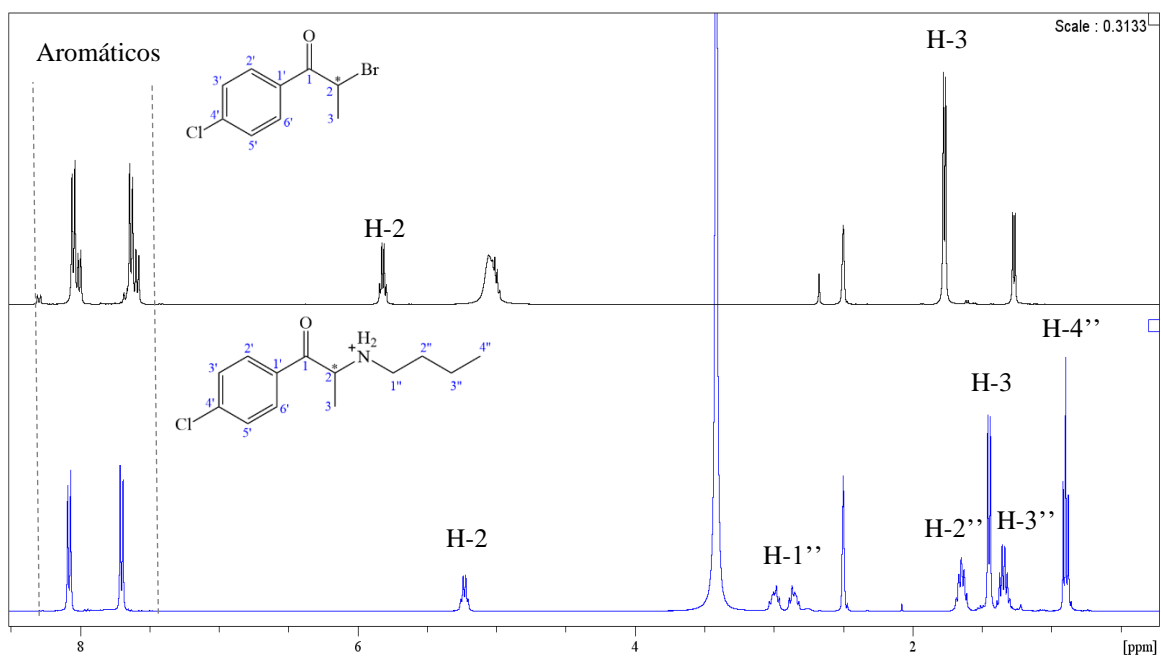


Figura 4.9 - Comparação dos espectros de RMN ¹H (400MHz, DMSO-*d*₆) da 4'-cloro-2-bromopropiofenona (**29**) com a 4'-CBC (**9**).

4.2. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase é uma enzima responsável pela terminação da propagação do impulso nervoso encontrando-se essencialmente nas junções neuromusculares e sinapses colinérgicas. A acetilcolinesterase degrada a acetilcolina, que é neurotransmissor das sinapses do sistema nervoso periférico e da junção neuromuscular. Quando esta enzima é inibida por fatores extrínsecos, a acetilcolina mantém-se na fenda sináptica, o que resulta num prolongamento ou sobrestimulação dos recetores colinérgicos [88].

A acetilcolinesterase é um alvo habitual para o tratamento de disfunções do sistema de neurotransmissão colinérgica, como transtornos do humor e alguns tipos de esquizofrenia, epilepsia, doença de Alzheimer, entre outros [87]. No entanto, compostos químicos que agem aumentando a acetilcolina são reportados como tendo diversos efeitos entre os quais cefaleias, insónia, tonturas, vertigens, confusão e fadiga, ou ainda depressão respiratória, convulsões e coma [89,93].

Para as catinonas sintéticas não foram encontrados dados na bibliografia associados à sua ação sobre a acetilcolinesterase. Adicionalmente, tendo em conta alguns dos efeitos reportados como associados ao consumo destas substâncias [68] e, que a utilização de drogas envolve interações por vezes complexas com e entre vários sistemas de neurotransmissão, neste trabalho foi avaliada a inibição da acetilcolinesterase para as catinonas selecionadas.

Assim, tal como indicado no ponto 3.4, as diferentes catinonas foram testadas numa gama de concentrações entre 0,03 – 2 mM para avaliar a capacidade de inibição da atividade da AChE. As curvas dose-resposta para cada uma das catinonas testadas, agrupadas nos 8 conjuntos de regioisómeros e, para a mefedrona (**22**) estão representadas na Figura 4.10. Os valores obtidos a partir do ajuste do modelo de regressão não linear sigmoidal de Hill encontram-se na Tabela 4.1, nomeadamente os valores do IC_{50} com o respetivo intervalo ao nível de confiança de 95 % ([CI]), Declive de Hill e a concentração mínima com efeitos adversos observáveis (LOAEL). Os valores de R^2 encontrados nos ajustes foram entre 0,947 e 0,996.

A análise estatística *One-way Anova* e o teste de Tukey, que foi realizada para comparação dos valores dos IC_{50} para as catinonas testadas, encontra-se representada na Tabela 4.2. O nível de confiança para os testes estatísticos foi de 95%, tendo sido considerado não significativo um valor de $p > 0,05$.

Tabela 4.1 - Valores da concentração de catinona que inibe 50 % da atividade da AChE (IC₅₀) e respectivos intervalos de confiança [CI], declives de Hill e concentração mínima com efeitos adversos observáveis (LOAEL), exceto para a 4'-CMC (**3**) e a 4'-CI-TBC (**21**). * IC₅₀ ~ 2 mM. Para 2 mM houve 47% inibição.

** IC₅₀ ~ 2 mM. Para 2 mM houve 48% inibição.

Catinona	IC ₅₀ [CI] (mM)	Declive de Hill	LOAEL (mM)
2'-CMC (1)	0,7 [0,4 - 1,3]	2,5	0,250
3'-CMC (2)	0,8 [0,6 - 0,9]	3,7	0,500
4'-CMC (3)	~ 2*	1,5	0,250
2'-CEC (4)	0,6 [0,5 - 0,6]	4,3	0,500
3'-CEC (5)	0,8 [0,5 - 1,2]	1,3	0,250
4'-CEC (6)	1,2 [1,0 - 1,4]	1,2	0,250
3'-CBC (8)	0,4 [0,3 - 0,5]	1,4	0,125
4'-CBC (9)	1,3 [1,0 - 1,8]	5,1	0,100
2'-CI-PPP (10)	0,3 [0,2 - 0,5]	1,5	0,125
3'-CI-PPP (11)	0,4 [0,2 - 0,8]	1,8	0,125
4'-CI-PPP (12)	0,5 [0,3 - 0,7]	1,1	0,250
2'-CDC (13)	0,7 [0,6 - 0,8]	2,5	0,250
3'-CDC (14)	0,9 [0,9 - 1,1]	1,2	0,250
4'-CDC (15)	0,7 [0,7- 0,8]	2,9	0,500
3'-CI-DEC (16)	0,3 [0,1 - 0,6]	0,9	0,063
4'-CI-DEC (17)	0,1 [0,1 - 0,2]	0,8	0,063
3'-CIC (18)	0,2 [0,1 - 0,2]	0,8	0,063
4'-CIC (19)	1,1 [0,7 - 1,7]	2,0	0,375
3'-CI-TBC (20)	1,0 [0,9 - 1,2]	0,9	0,250
4'-CI-TBC (21)	~ 2**	2,7	0,500
Mefedrona (22)	0,8 [0,8 - 0,9]	8,6	0,750

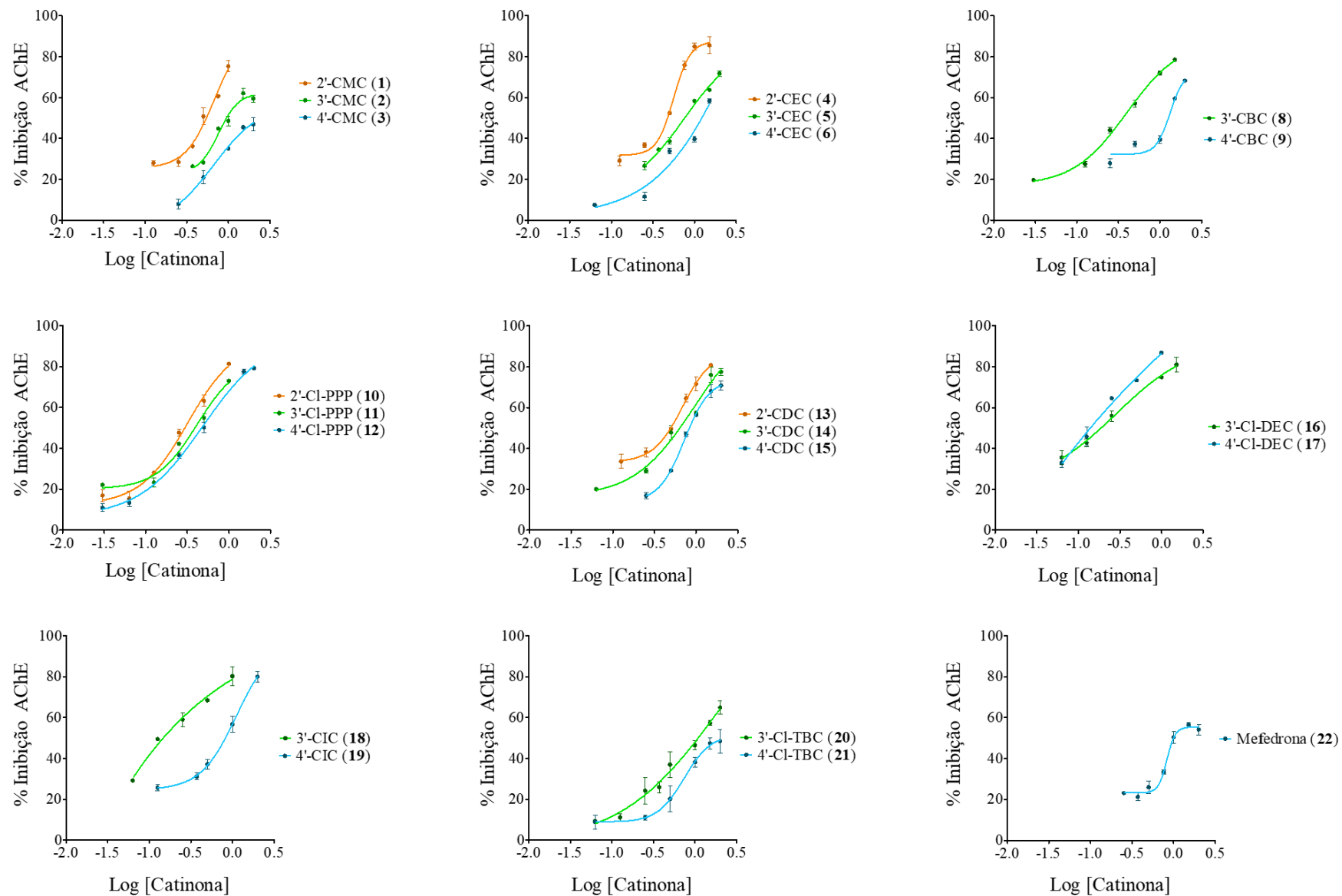


Figura 4.10 - Curvas Dose-Resposta – Percentagem de inibição da AChE para as concentrações testadas das 20 catinonas agrupadas por conjuntos de isômeros e da mefedrona (22). A percentagem inibição para cada concentração é apresentada com a média e o desvio padrão associada aos vários ensaios realizados pelo método de Ellman descrito em [142].

Tabela 4.2 - Resultados da análise estatística realizada aos ensaios da AChE. A verde encontram-se as catinonas da coluna de *A* que apresentam valor de IC₅₀ superior a *B* e a vermelho as catinonas da coluna de *A* que apresentam valor de IC₅₀ inferior a *B*. As correlações estatísticas não significativas (NS) apresentam $p > 0,05$. ND - Não definido.

A \ B	2'-CMC (1)	3'-CMC (2)	4'-CMC (3)	2'-CEC (4)	3'-CEC (5)	4'-CEC (6)	3'-CBC (8)	4'-CBC (9)	2'-Cl-PPP (10)	3'-Cl-PPP (11)	4'-Cl-PPP (12)	2'-CDC (13)	3'-CDC (14)	4'-CDC (15)	3'-Cl-DEC (16)	4'-Cl-DEC (17)	3'-CIC (18)	4'-CIC (19)	3'-Cl-TBC (20)	4'-Cl-TBC (21)	Mefedrona (22)
2'-CMC (1)																					
3'-CMC (2)	NS																				
4'-CMC (3)	>	>																			
2'-CEC (4)	NS	<	<																		
3'-CEC (5)	NS	NS	<	>																	
4'-CEC (6)	>	>	<	>	>																
3'-CBC (8)	<	<	<	<	<	<															
4'-CBC (9)	>	>	<	>	>	NS	>														
2'-Cl-PPP (10)	<	<	<	<	<	<	<	<													
3'-Cl-PPP (11)	<	<	<	<	<	<	<	NS	<	>											
4'-Cl-PPP (12)	<	<	<	<	<	<	<	NS	<	>	NS										
2'-CDC (13)	NS	NS	<	NS	NS	<	>	<	<	>	>	>									
3'-CDC (14)	>	>	<	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>								
4'-CDC (15)	NS	NS	<	>	NS	<	>	<	>	>	>	NS	>	>							
3'-Cl-DEC (16)	<	<	<	<	<	<	<	<	NS	<	<	<	<	<	<						
4'-Cl-DEC (17)	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<					
3'-CIC (18)	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	NS				
4'-CIC (19)	>	>	<	>	>	NS	>	NS	>	>	>	>	NS	>	>	>	>	>			
3'-Cl-TBC (20)	>	>	<	>	>	NS	>	<	>	>	>	>	NS	>	>	>	>	>	NS		
4'-Cl-TBC (21)	>	>	ND	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	
Mefedrona (22)	NS	NS	<	>	NS	<	>	<	>	>	>	NS	NS	NS	>	>	<	<	<	<	

Pela Figura 4.10 foi possível confirmar a existência de uma relação entre a dose de catinona com a resposta observada, verificando-se que um aumento da concentração de todas as catinonas estudadas resulta num aumento da percentagem de inibição da atividade da acetilcolinesterase observada. Para as concentrações testadas, as catinonas que apresentaram uma percentagem máxima de inibição mais elevada foram as 3'-Cl-DEC (16), 2'-CEC (4) e 2'-Cl-PPP (10) com 87%, 85% e 81% de inibição, respetivamente.

Através da Tabela 4.1 verifica-se que os valores de IC₅₀ obtidos variaram entre 0,1 mM a 1,3 mM. Para as catinonas 4'-CMC (3) e 4'-Cl-TBC (21) não foi possível ajustar o modelo, tendo-se obtido para a concentração mais elevada testada de 2 mM, 47% e 48% de inibição da atividade da acetilcolinesterase, respetivamente. Das restantes catinonas, as que apresentaram uma maior capacidade de inibição da atividade da acetilcolinesterase e, portanto, menor valor de IC₅₀, são a 4'-Cl-DEC (17) seguida das 3'-Cl-DEC (16) e da 3'-CIC (18), com IC₅₀ de 0,1 mM, 0,2 mM e 0,3 mM, respetivamente, no entanto, não se verificaram diferenças estatísticas significativas entre os valores de IC₅₀ determinados entre estas últimas (Tabela 4.2). Também foi possível determinar que a catinona com o valor de IC₅₀ mais elevado, e como tal que inibe menos a atividade da

acetilcolinesterase, foi a 4'-CBC (9) com um valor de 1,3 mM, estatisticamente semelhante ao IC₅₀ da 4'-CEC (6) e à 4'-CIC (19), com 1,2 mM e 1,1 mM, respectivamente.

Verificou-se ainda que as curvas dose-resposta das catinonas testadas apresentaram diferenças nos declives ou coeficientes de Hill que são uma medida da inclinação do modelo sigmoidal ajustado [157]. Através da Tabela 4.1, entre as catinonas estudadas verifica-se que a mefedrona (22) é a que apresenta o maior declive, seguida da 4'-CBC (9). Assim, para ambos os casos verificou-se que uma pequena variação na sua concentração pode causar um aumento significativo na inibição da acetilcolinesterase, de 25 % para 50 % no caso da mefedrona (22) e de 40 % para 70 % no caso da 4'-CBC (9), tal como se pode observar na Figura 4.10.

Constatou-se que todas as catinonas estudadas induziram inibição da atividade da acetilcolinesterase para a concentração mínima testada (0,03 - 0,25 mM). Quanto ao valor LOAEL, concentração mínima de catinona com efeitos adversos observáveis, e que representa o limite mínimo a partir do qual se verifica um aumento exponencial da percentagem de inibição da atividade da acetilcolinesterase, verificou-se que para a maioria das catinonas testadas foi a partir de 0,25 mM. Além disso, constatou-se que entre as catinonas testadas, as catinonas com menor IC₅₀, e portanto consideradas mais inibitórias (16, 17 e 18), foram também as que apresentaram um menor valor de LOAEL de 0,063 mM.

De modo a avaliar a relação da estrutura com a capacidade inibitória das catinonas testadas, foram representados os valores do IC₅₀ obtidos, e que constam na Tabela 4.1, tendo as catinonas sido agrupadas de acordo com algumas características estruturais (Figura 4.11), uma vez que diferem na estrutura do grupo amino na posição 2 e na posição do átomo de cloro no anel aromático (regioisómeros *orto* (-Cl em 2'), *meta* (-Cl em 3'), e *para* (-Cl em 4')) tal como previamente ilustrado na Figura 2.1.

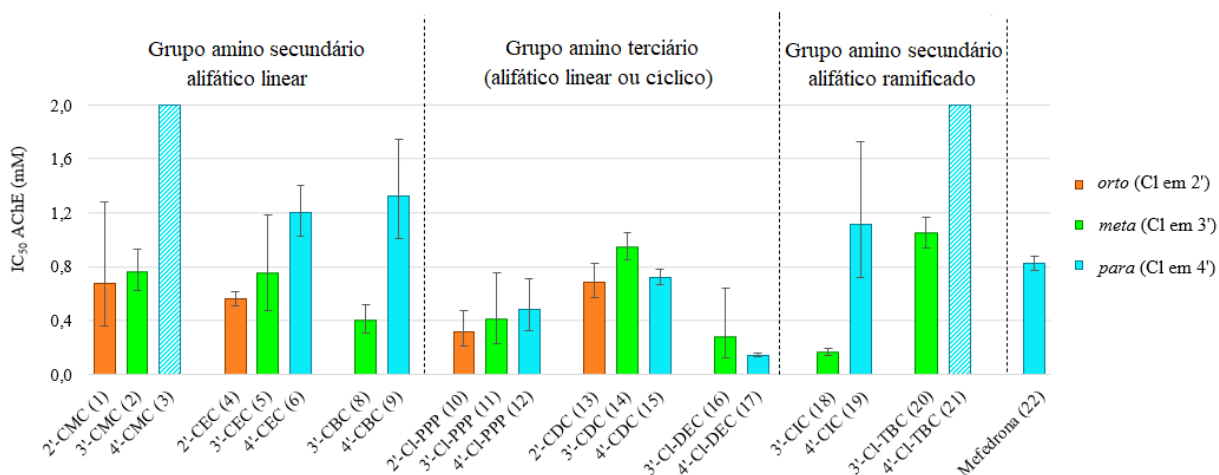


Figura 4.11 - Comparação da capacidade inibição da AChE das diferentes catinonas. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.

Na Figura 4.11 está uma representação geral dos valores de IC_{50} dos regioisômeros *orto*, *meta* e *para* de cada grupo de catinonas estudadas, destacando-se a laranja as catinonas com o átomo de cloro na posição *orto* (2') do anel aromático, a verde as catinonas com o átomo de cloro na posição *meta* (3') e a azul as catinonas com o átomo de cloro na posição *para* (4'). Em geral, verificou-se que as catinonas com o átomo de cloro da posição *orto* (laranja) apresentaram valores de IC_{50} inferiores, e, portanto, uma maior capacidade de inibição de AChE relativamente aos respectivos regioisômeros *meta* (verde) e *para* (azul). No entanto, e uma vez que esta variação da capacidade inibitória com a posição do átomo de cloro na estrutura da catinona não pareceu claramente evidente foi ainda analisada a influência do tipo de grupo amino para cada conjunto de regioisômeros.

Para os 4 isômeros *orto* (Figura 4.11- laranja) analisados (**1**, **4**, **10**, **13**), verificou-se que o isômero 2'-Cl-PPP (**10**) com um grupo pirrolidilo, apresenta maior capacidade de inibição da atividade da AChE, e portanto IC_{50} inferior, relativamente às catinonas com um grupo metilamino (2'-CMC, **1**), etilamino (2'-CEC, **4**) ou dimetilamino (2'-CDC, **13**). Como tal, significa que a introdução de um grupo pirrolidilo, ou seja um grupo amino cíclico, provoca uma maior inibição desta enzima nos isômeros *orto*.

De acordo com os valores de IC_{50} obtidos para os 8 isômeros *meta* (Figura 4.11- verde) analisados (**2**, **5**, **8**, **11**, **14**, **16**, **18** e **20**) verificou-se que as catinonas que apresentam um grupo dietilamino (3'-Cl-DEC, **16**) ou ainda um grupo isopropilamino (3'-CIC, **18**) apresentam uma maior capacidade de inibição da AChE sendo, no entanto, significativamente superior a influência do grupo etilamino. Para os restantes grupos verifica-se que o efeito na atividade inibitória de um grupo butilamino (3'-CBC, **8**) é equivalente à de um grupo pirrolidilo (3'-Cl-PPP, **11**) mas superior aos dos grupos metilamino (3'-CMC, **2**) ou etilamino (3'-CEC, **5**), que por sua vez são ainda superiores ao grupo dimetilamino (3'-CDC, **14**) e ao grupo *tert*-butilamino (3'-Cl-TBC, **20**).

Finalmente, para os 6 isômeros *para* (Figura 4.11-azul) analisados (**6**, **9**, **12**, **15**, **17** e **19**) verificou-se também que a presença de um grupo dietilamino (4'-Cl-DEC, **17**), um grupo amino terciário alifático linear, resulta num maior efeito sobre a inibição da AChE e significativamente superior à presença de um grupo pirrolidilo (4'-Cl-PPP, **12**), que por sua vez é significativamente superior ao grupo dimetilamino (4'-CDC, **15**). Os grupos etilamino (4'-CEC, **6**), butilamino (4'-CBC, **9**) e isopropilamino (4'-CIC, **19**) são significativamente equivalentes mas inferiores aos restantes isômeros. Os resultados sugerem que a introdução de um grupo dietilamino é o que mais influencia a capacidade de inibição da AChE dado que 4'-Cl-DEC (**17**) apresenta um menor valor de IC_{50} .

Uma vez que as catinonas apresentam diferentes comportamentos de acordo com a estrutura do grupo amino em posição 2, analisaram-se os resultados em função das características estruturais deste substituinte, nomeadamente o aumento da sua cadeia alquílica e a ramificação desta cadeia. Além destas comparou-se ainda o átomo do cloro da 4'-CMC (**3**) com o grupo metilo presente na mesma posição na mefedrona (**22**).

Esquematizado na Figura 4.12 está a comparação dos valores de IC₅₀ obtidos para as catinonas que diferem apenas no tamanho da cadeia *N*-alquílica: cloro-*N*-metilcatinonas (CMC, **1-3**), cloro-*N*-etilcatinonas (CEC, **4-6**), cloro-*N*-butilcatinonas (CBC, **8-9**). Verificou-se que o aumento da cadeia apenas influencia a capacidade de inibição da atividade da AChE nas catinonas substituídas com o átomo de cloro na posição *meta* do anel aromático, ocorrendo um aumento da inibição com a 3'-CBC (**8**) relativamente às 3'-CMC (**2**) e 3'-CEC (**5**), e uma vez que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas, entre os valores do IC₅₀ para a 2'-CMC (**1**) e a 2'-CEC (**4**), e ainda entre a 4'-CEC (**6**) e 4'-CBC (**9**).

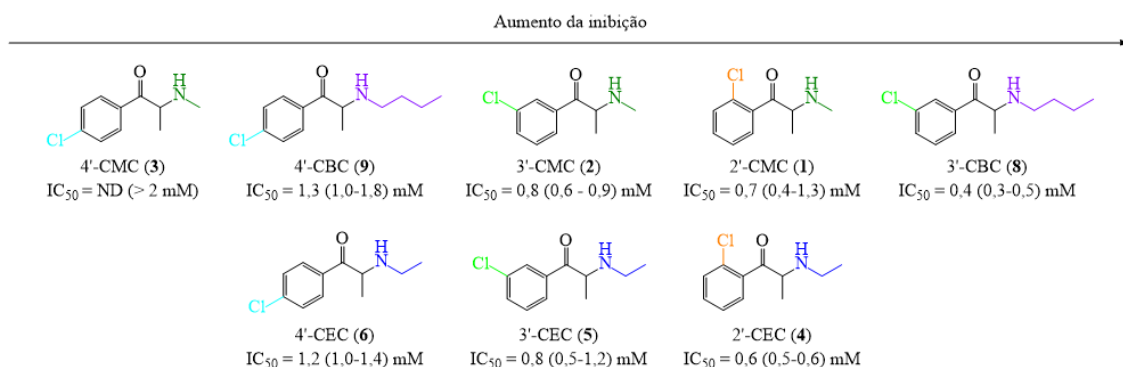


Figura 4.12 - Comparação da capacidade inibição da AChE de catinonas com o aumento da cadeia do grupo amino secundário alifático linear (CMC, 1 carbono, CEC, 2 carbonos e CBC 4 carbonos). Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.

A comparação dos valores de IC₅₀ obtidos para as catinonas com cadeias *N*-alquílicas ramificadas (Figura 4.13), nomeadamente as cloro-*N*-isopropilcatinonas (CIC, **18-19**) e as cloro-*tert*-butilcatinonas (Cl-TBC, **20-21**) mostrou que o aumento da ramificação deste grupo provoca uma diminuição da capacidade inibitória da AChE, tanto para as catinonas com o átomo de cloro no anel aromático *meta* (**18** e **20**) como para os seus regioisómeros *para* (**19** e **21**). Além disso, a 3'-CIC (**18**) com o átomo de cloro na posição *meta* apresentou uma maior capacidade de inibição com um IC₅₀ de 0,2 mM, relativamente às restantes catinonas (**19-21**). Contudo, comparando as catinonas *N*-alquílicas lineares com as *N*-alquílicas ramificadas é possível verificar que a 3'-CIC (**18**) (0,2 mM – Figura 4.13) tem uma maior capacidade de inibição que a 3'-CBC (**8**) (0,4 mM – Figura 4.12).

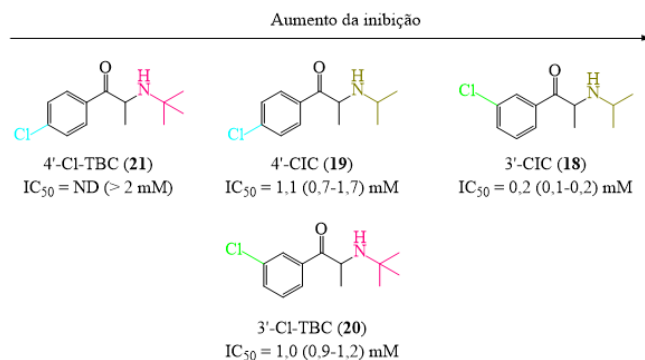


Figura 4.13 - Comparação da capacidade inibição da AChE das cationonas com cadeias *N*-alquílicas ramificadas. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.

Comparou-se de igual modo os valores dos IC₅₀ (Figura 4.14) das cationonas com cadeias *N,N*-dialquílicas, ou seja, as cloro-pirrolidilcatingonas (Cl-PPP, **10-12**), as cloro-*N,N*-dimetilcatingonas (CDC, **13-15**) e as cloro-*N,N*-dietilcatingonas (Cl-DEC, **16-17**). De um modo geral, aqui manifestou-se mais evidente que um aumento da cadeia lateral do grupo amino, resulta numa maior inibição da atividade da AChE.

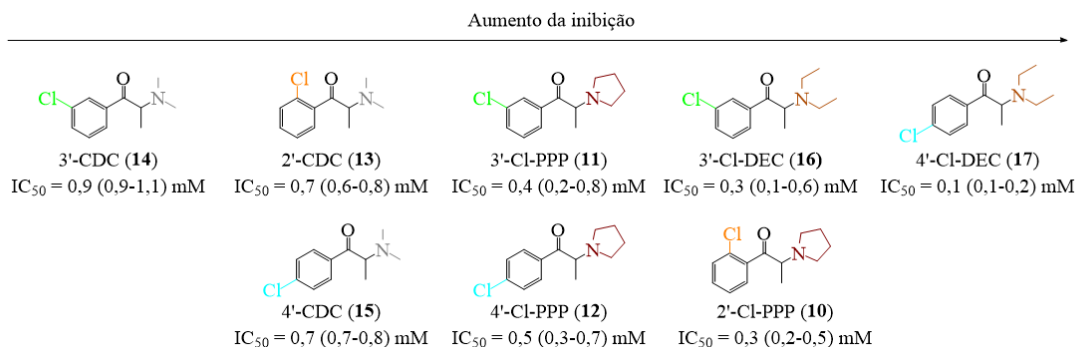


Figura 4.14 - Comparação da capacidade inibição da AChE de diferentes cationonas contendo grupos amino terciários alifáticos ou cíclicos. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.

Se por um lado é evidente que as cationonas *N,N*-dialquílicas com 1 carbono em cada uma das cadeias, como as cloro-*N,N*-dimetilcatingonas (CDC, **13-15**), têm menor efeito na capacidade de inibição da enzima, tendo sido obtidos valores de IC₅₀ de 0,7mM e 0,9 mM, por outro lado, para as cationonas com *N,N*-dialquílicas com um número total de 4 carbonos no grupo amino, nomeadamente os isómeros 2'-Cl-PPP (**12**) e Cl-DEC (**16-17**), obtiveram-se valores de IC₅₀ inferiores (0,1 – 0,3 mM) aos obtidos para as cationonas com 4 carbonos na cadeia alifática linear, como a 3'-CBC (**8**) (0,4 mM – Figura 4.12), e estatisticamente semelhantes aos isómeros Cl-PPP (**13-14**).

Verificou-se ainda relativamente à catinona Cl-DEC substituída com o átomo de cloro na posição *meta* (3'-Cl-DEC, **16**) com IC₅₀ de 0,3 mM, que o seu isómero com o átomo de cloro na posição *para* (4'-Cl-DEC, **17**) apresentou uma maior inibição, com o menor IC₅₀ (0,1 mM) relativamente às restantes catinonas, e semelhante ao obtido com a cloro-*N*-isopropilcatinona (3'-CIC, **18**) (0,2 mM na Figura 4.13) com um grupo amino secundário alifático ramificado.

Por fim, foi ainda possível analisar o efeito do tipo de substituinte no anel aromático, ao se comparar os valores obtidos para o IC₅₀ da 4'-CMC (**3**) com a mefedrona (**22**). Apesar de não se ter determinado o valor de IC₅₀ para a 4'-CMC (**3**), os resultados sugerem que será aproximadamente ou superior a 2 mM, e como tal, deduz-se que o átomo de cloro no anel aromático poderá apresentar uma menor capacidade inibitória da atividade da AChE relativamente ao grupo metilo presente na mesma posição do anel aromático da mefedrona (**22**).

Em suma, relativamente à inibição da AChE pode concluir-se que a capacidade de inibição está associada à natureza do grupo amino substituído na posição 2, sendo que a inibição será maior com o aumento da cadeia alifática e com a diminuição da ramificação para catinonas *N*-alquiladas verificando-se ainda, que um maior número de átomos de carbono na cadeia alifática de catinonas *N,N*-dialquílicas têm maior efeito inibitório da enzima. Além disso, verificou-se que comparando ambas as catinonas classificadas como drogas (**3**, **22**), a substituição de um grupo metilo por um átomo de cloro no anel aromático parece reduzir a capacidade de inibição da enzima.

4.3. Efeito das catinonas sobre a viabilidade das células hepáticas HepG2

O fígado é conhecido como sendo um dos principais órgãos afetados pelo consumo de catinonas e outras drogas ilícitas, dado que este desempenha um papel vital em vários processos metabólicos tendo como uma das principais funções a eliminação de xenobióticos, tornando-o num alvo óbvio de toxicidade [59]. As linhas celulares HepG2, tal como mencionado em 3.2, são as mais utilizadas para estudos de hepatotoxicidade uma vez que exibem as características de células hepáticas naturalmente presentes no fígado, designadas por hepatócitos [129,158]

De modo a averiguar a toxicidade das 21 catinonas (**1-22**) usadas neste trabalho, exceto a 2'-CBC (**7**) que como referido não foi sintetizada, realizou-se um estudo de viabilidade das linhas celulares do hepatocarcinoma (HepG2) quando expostas às catinonas numa ampla gama de concentrações entre 0,3 – 6 mM, tal como descrito em 3.6.1. As células foram incubadas em contacto com as diferentes catinonas durante 24h e a sua viabilidade celular analisada pelo método do MTT. Na Figura 4.15 estão representadas as curvas dose-resposta para a percentagem de citotoxicidade ou morte celular obtida para diferentes concentrações das catinonas usadas neste trabalho, agrupadas nos 8 conjuntos de regioisómeros e, para a mefedrona (**22**).

A partir das curvas dose-resposta (Figura 4.15), ajustadas ao modelo de regressão não linear sigmoidal de Hill, determinaram-se os valores de LC_{50} que representam a concentração à qual cada catinona induz 50% de morte celular, comparativamente a células controlo que não estiveram em contacto com a catinona. Foram também determinados, o respetivo intervalo de confiança do valor do LC_{50} ao nível de confiança de 95% ([CI]), o Declive de Hill e a concentração mínima com efeitos citotóxicos observáveis (LOAEL), que se encontram na Tabela 4.3. Obtiveram-se valores de R^2 no ajuste compreendidos entre 0,915 e 0,991.

A análise estatística *One-way ANOVA* e o teste de Tukey foram realizados para comparação dos valores dos LC_{50} para as catinonas testadas, e os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 4.4. O nível de confiança para os testes estatísticos foi de 95%, tendo sido considerado como não significativo um valor de $p > 0,05$.

Tabela 4.3 - Valores de concentração da catinona que induz 50% de morte celular (LC_{50}) e respetivos intervalos de confiança [CI], declives de Hill e concentração mínima com efeitos citotóxicos observáveis (LOAEL), após 24h de exposição das células hepáticas HepG2.

Catinona	LC_{50} [CI] (mM)	Declive de Hill	LOAEL (mM)
2'-CMC (1)	2,6 [2,5 – 2,7]	6,8	2,0
3'-CMC (2)	3,1 [3,1 – 3,2]	21,2	2,5
4'-CMC (3)	2,9 [2,8 – 3,0]	19,5	2,5
2'-CEC (4)	1,5 [1,4 – 1,7]	3,8	1,0
3'-CEC (5)	2,2 [2,0 – 2,4]	3,1	1,5
4'-CEC (6)	2,4 [1,9 – 3,2]	2,1	1,5
3'-CBC (8)	1,18 [1,16 – 1,20]	13,1	1,0
4'-CBC (9)	0,8 [0,8 – 0,9]	4,1	0,5
2'-CI-PPP (10)	4,2 [3,9 – 4,5]	6,4	2,5
3'-CI-PPP (11)	3,3 [3,3 – 3,4]	38,7	3,0
4'-CI-PPP (12)	2,5 [2,2 – 2,8]	2,7	1,0
2'-CDC (13)	3,7 [3,4 – 4,4]	6,2	2,5
3'-CDC (14)	4,5 [4,4 – 4,6]	16,4	4,0
4'-CDC (15)	5,7 [5,4 – 5,9]	19,9	5,0
3'-CI-DEC (16)	2,7 [2,6 – 2,7]	35,0	2,5
4'-CI-DEC (17)	3,1 [3,0 – 3,1]	11,3	2,5
3'-CIC (18)	1,3 [1,2 – 1,3]	4,7	0,7
4'-CIC (19)	2,80 [2,76 – 2,84]	35,6	2,5
3'-CI-TBC (20)	1,9 [1,8 – 1,9]	11,6	1,5
4'-CI-TBC (21)	1,2 [1,2 – 1,3]	8,9	1,0
Mefedrona (22)	3,4 [3,3 – 3,5]	10,5	3,0

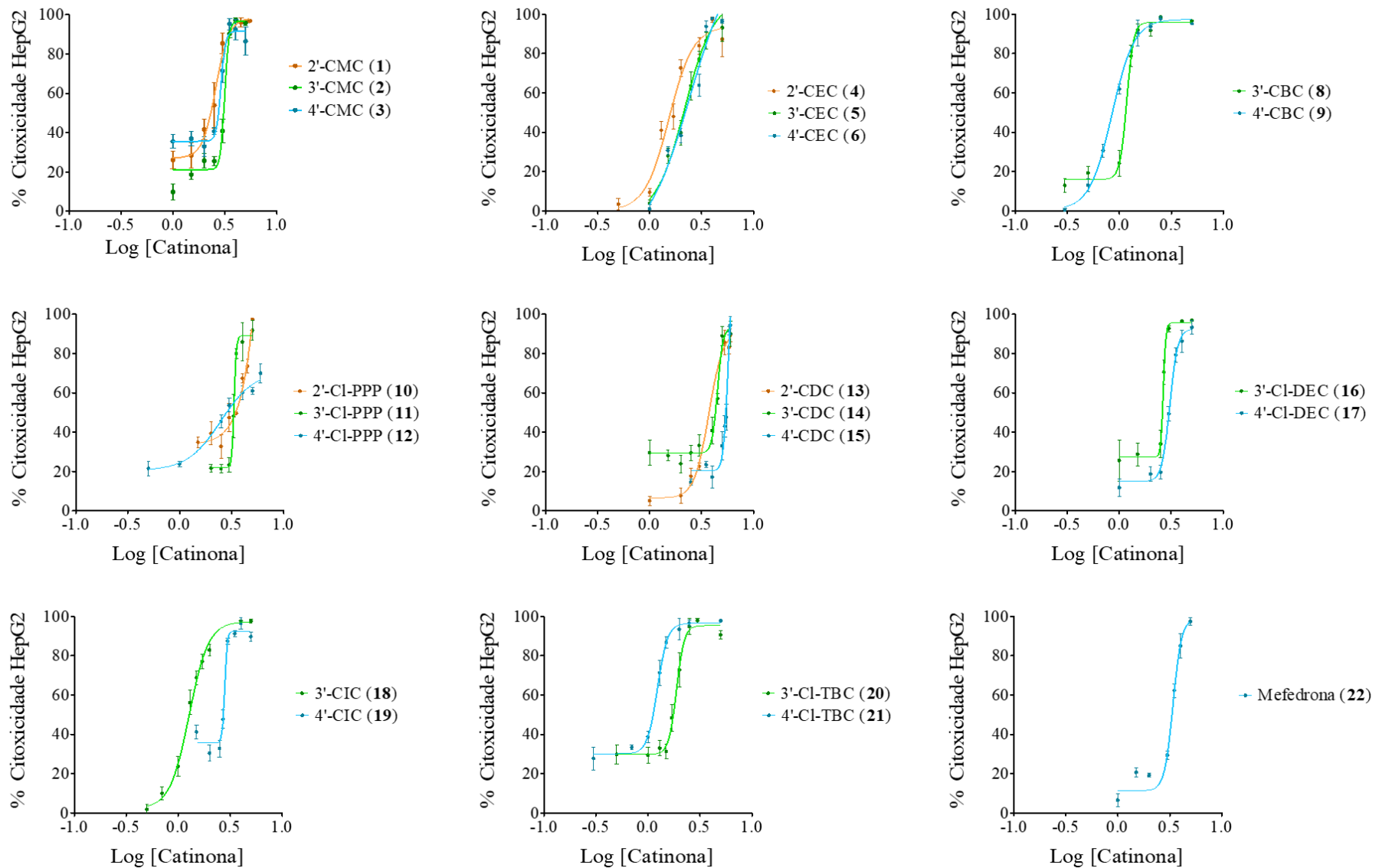


Figura 4.15 - Curvas Dose-Resposta – Percentagem de citotoxicidade das 21 catinonas estudadas agrupadas por conjuntos de isômeros e obtidas do método de redução por MTT em células hepáticas indiferenciadas HepG2 realizadas após uma exposição de 24h. A percentagem de toxicidade é apresentada com a média e o desvio padrão de cada ensaio, realizado pelo menos uma vez com 6 replicados.

Tabela 4.4 - Resultados da análise estatística realizada aos ensaios da HepG2. A verde encontram-se as catinonas da coluna de A que apresentam valor de LC₅₀ superior a B e a vermelho as catinonas da coluna de A que apresentam valor de LC₅₀ inferior a B. As correlações estatísticas não significativas (NS) apresentam $p > 0,05$.

A \ B	2'-CMC (1)	3'-CMC (2)	4'-CMC (3)	2'-CEC (4)	3'-CEC (5)	4'-CEC (6)	3'-CBC (8)	4'-CBC (9)	2'-Cl-PPP (10)	3'-Cl-PPP (11)	4'-Cl-PPP (12)	2'-CDC (13)	3'-CDC (14)	4'-CDC (15)	3'-Cl-DEC (16)	4'-Cl-DEC (17)	3'-CIC (18)	4'-CIC (19)	3'-Cl-TBC (20)	4'-Cl-TBC (21)	Mefedrona (22)
2'-CMC (1)																					
3'-CMC (2)	>																				
4'-CMC (3)	>	<																			
2'-CEC (4)	<	<	<																		
3'-CEC (5)	<	<	<	>																	
4'-CEC (6)	<	<	<	>	>																
3'-CBC (8)	<	<	<	<	<	<															
4'-CBC (9)	<	<	<	<	<	<	<														
2'-Cl-PPP (10)	>	>	>	>	>	>	>	>													
3'-Cl-PPP (11)	>	>	>	>	>	>	>	>	>	<											
4'-Cl-PPP (12)	<	<	<	>	>	NS	>	>	>	<	<										
2'-CDC (13)	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>										
3'-CDC (14)	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>									
4'-CDC (15)	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>								
3'-Cl-DEC (16)	>	<	<	>	>	>	>	>	<	<	>	<	<	<							
4'-Cl-DEC (17)	>	NS	>	>	>	>	>	>	<	<	>	<	<	<	>						
3'-CIC (18)	<	<	<	<	<	<	>	>	<	<	<	<	<	<	<	<					
4'-CIC (19)	>	<	<	>	>	>	>	>	<	<	>	<	<	<	<	<	<	>			
3'-Cl-TBC (20)	<	<	<	>	<	<	>	>	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<		
4'-Cl-TBC (21)	<	<	<	<	<	<	>	>	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	
Mefedrona (22)	>	>	>	>	>	>	>	>	<	NS	>	<	<	<	>	>	>	>	>	>	>

Pelas curvas dose-resposta na Figura 4.15 foi possível verificar que para todas as catinonas existe uma relação dose-resposta, isto é, o aumento da sua concentração resultou num aumento da percentagem de morte observada nas células hepáticas HepG2 e ainda, verificou-se que para todos os casos, exceto a 4'-Cl-PPP (12), se obteve uma resposta máxima produzida pela catinona superior a 90 %.

Através da Tabela 4.3 verificou-se que os valores de LC₅₀ obtidos variam entre 0,8 mM a 5,7 mM, sendo que a catinona que apresentou o maior citotoxicidade e, portanto, menor valor de LC₅₀ corresponde à 4'-CBC (9) com 0,8 mM, e a que apresentou maior valor de LC₅₀ foi a 4'-CDC (15) com 5,7 mM.

Constatou-se ainda que as curvas dose-resposta das catinonas testadas apresentaram diferenças nos declives de Hill, que são uma medida da inclinação do modelo sigmoidal ajustado [157]. Através da Tabela 4.3, entre as catinonas estudadas verificou-se que a 3'-Cl-PPP (11), a 3'-Cl-DEC (16) e a 4'-CIC (19) apresentam o maior declive. Assim, com um ligeiro aumento da

concentração destas catinonas, verificou-se um aumento súbito da morte celular, de 23% para 86% no caso da 3'-Cl-PPP (**11**), de 34% para 93% no caso da 3'-Cl-DEC (**16**) e de 33% para 88% no caso da 4'-CIC (**19**), tal como se pode observar na Figura 4.15.

Constatou-se que em geral as catinonas estudadas induziram citotoxicidade nas células hepáticas para a concentração mínima testada (0,3 - 2,5 mM). Quanto à concentração mínima de catinona com efeitos adversos observáveis (LOAEL), e que representa o limite mínimo a partir do qual se verifica um aumento exponencial da percentagem de citotoxicidade, verificou-se que para a maioria das catinonas testadas foi a partir de 2,5 mM. Constatou-se ainda que as catinonas mais citotóxicas e portanto com menores valores de LC₅₀ são também as que apresentaram um menor valor de LOAEL, nomeadamente a 4'-CBC (**9**) a 0,5 mM e a 3-CIC (**18**) a 0,7 mM.

Para avaliar a relação da estrutura com a citotoxicidade das catinonas testadas, foram representados os valores do LC₅₀ obtidos e que constam na Tabela 4.5, para as diferentes catinonas agrupadas de acordo com algumas características estruturais (Figura 4.16), uma vez que as catinonas apresentam estruturas diferentes entre si relativamente ao grupo amino e à posição do átomo de cloro no anel aromático (regioisómeros *orto* (2'), *meta* (3') e *para* (4')).

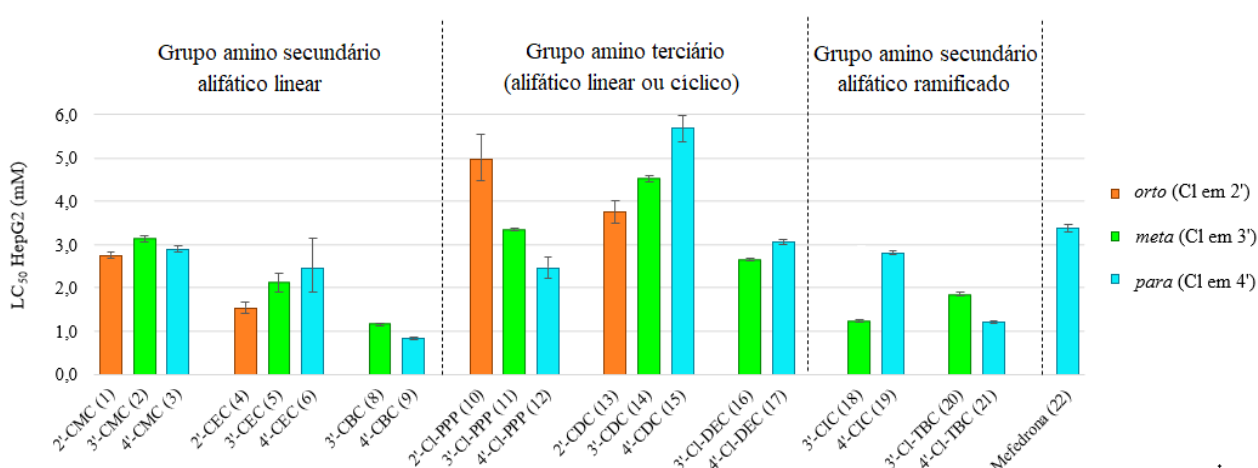


Figura 4.16 - Comparação dos LC₅₀ das diferentes catinonas para as células HepG2. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.

A Figura 4.16 consiste numa representação geral dos valores de LC₅₀ dos regioisómeros *orto* (2'), *meta* (3') e *para* (4') de cada uma das catinonas estudadas, destacando-se a laranja as catinonas estudadas com o cloro na posição do anel aromático *orto*, a verde as catinonas com o átomo de cloro na posição *meta* e a azul todas com o átomo de cloro na posição *para*. Para as famílias das cloro-pirrolidilcatinonas (Cl-PPP, **10-12**), das cloro-*N*-butilcatinonas (CBC, **8-9**) e das cloro-*tert*-butilcatinonas (Cl-TBC, **20-21**) verificou-se uma maior citotoxicidade para os isómeros *para* (azul), sendo que a citotoxicidade parece diminuir quando o átomo de cloro se encontra na posição *orto* (laranja). No entanto, para as famílias CEC (**4-5**), CDC (**13-15**), Cl-DEC (**16-17**) e CIC (**18-19**) o aumento da citotoxicidade dá-se na ordem inversa, sendo os isómeros substituídos

com o átomo de cloro na posição *para* (azul) os menos tóxicos, com maiores valores de LC₅₀. No caso das cloro-*N*-metilcatinonas (CMC, **1-3**) não se verificou um padrão de citotoxicidade relativamente à posição do átomo de cloro no anel aromático.

Dada a variedade de comportamentos verificados para a posição do átomo de cloro no anel aromático da catinona analisou-se a influência do tipo de grupo amina para cada conjunto de regioisômeros. Para os 4 isômeros *orto* (**1, 4, 10 e 13**) analisados na Figura 4.16 (laranja), verificou-se que a catinona com um grupo etilamino (2'-CEC, **4**) é a que possui um valor de LC₅₀ inferior, aumentando sucessivamente para as catinonas com um grupo metilamino (2'-CMC, **1**), dimetilamino (2'-CDC, **13**) e pirrolidilo (2'-Cl-PPP, **10**). Como tal, a existência de grupos amina secundários alifáticos lineares e, em particular, o grupo etilamino tem um maior efeito sobre a citotoxicidade em células hepáticas HepG2.

De acordo com os valores de LC₅₀ obtidos para os 8 isômeros *meta* (**2, 5, 8, 11, 14, 16, 18 e 20**) destacados na Figura 4.16 (verde), verificou-se que o menor valor de LC₅₀, e como tal a maior citotoxicidade, se obteve para a cloro-*N*-butilcatinona com o grupo butilamino (3'-CBC, **8**). Ainda se verificou que a citotoxicidade diminuiu para as catinonas com um grupo isopropilamino (3'-CIC, **18**) seguido do grupo *tert*-butilamino (3'-Cl-TBC, **20**) e foi sucessivamente inferior para os grupos etilamino (3'-CEC, **5**), dietilamino (3'-Cl-DEC, **16**), metilamino (3'-CMC, **2**), pirrolidilo (3'-Cl-PPP, **11**) e dimetilamino (3'-CDC, **14**).

Por fim, para os 6 isômeros *para* (**6, 9, 12, 15, 17 e 19**) analisados na Figura 4.16 (azul) verificou-se que segue a tendência verificada para a inibição da AChE, em que também a presença de um grupo butilamino (4'-CBC, **9**) resulta num aumento da citotoxicidade, sendo esta a catinona que apresentou o menor valor LC₅₀ das catinonas estudadas. Os valores de LC₅₀ tendem a aumentar, e como tal a citotoxicidade é sucessivamente inferior para as catinonas com os grupos *tert*-butilamino (4'-Cl-TBC, **21**), etilamino (4'-CEC, **6**), pirrolidilo (4'-Cl-PPP, **12**), isopropilamino (4'-CIC, **19**), metilamino (4'-CMC, **3**), dietilamino (3'-Cl-DEC, **16**) e dimetilamino (4'-CDC, **15**).

As catinonas foram ainda agrupadas de acordo com a estrutura do grupo amina em posição 2, tal como referido anteriormente no ponto 4.2.

Na Figura 4.17 está esquematizado a comparação dos valores de LC₅₀ obtidos para as catinonas que diferem no tamanho da cadeia *N*-alquílica, nomeadamente, as cloro-*N*-metilcatinonas (CMC, **1-3**), as cloro-*N*-etilcatinonas (CEC, **4-6**), e as cloro-*N*-butilcatinonas (CBC, **8-9**). Verificou-se que, de um modo geral, a citotoxicidade é influenciada pelo aumento da cadeia alifática linear do grupo amina, sendo a 4'-CBC (**9**) seguida da 3'-CBC (**8**) as catinonas com menor valor de LC₅₀ de 0,5 mM e 1,18 mM, respetivamente, e portanto as mais citotóxicas, e a

3'-CMC (**2**) a menos citotóxica com um LC₅₀ de 3,1 mM, seguida da 4'-CMC (**3**) com um LC₅₀ de 2,9 mM.

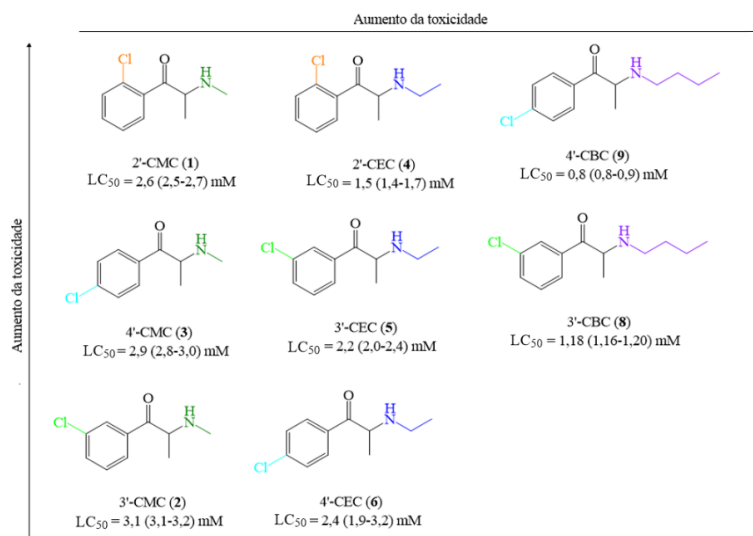


Figura 4.17 - Comparação dos LC₅₀ de cationonas com o aumento da cadeia do grupo amino secundário alifático linear (CMC, 1 carbono, CEC, 2 carbonos e CBC 4 carbonos), em células HepG2. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.

Na Figura 4.18 encontram-se esquematizados a comparação dos valores de LC₅₀ obtidos para as cationonas com cadeias *N*-alquílicas ramificadas, nomeadamente as cloro-*N*-isopropilcatingonas (**18-19**) e as cloro-*tert*-butilcatingonas (**20-21**). Verificou-se que para o átomo de cloro na posição *para* do anel aromático o grupo *tert*-butilo (4'-Cl-TBC, **21**) apresenta uma maior citotoxicidade relativamente ao grupo isopropilo (4'-CIC, **19**), contudo esta ordem inverte quando o átomo de cloro se encontra na posição *meta* no anel aromático, pelo que o tipo de ramificação parece não influenciar a citotoxicidade.

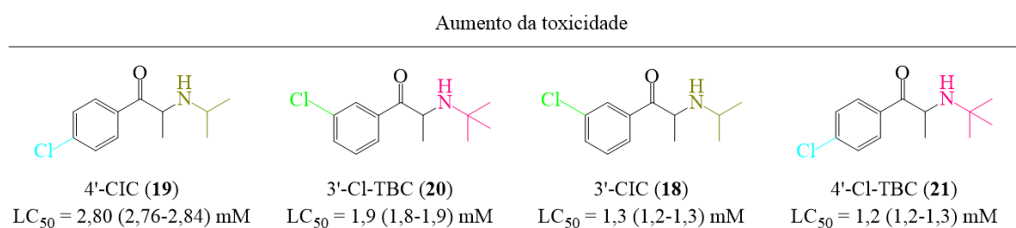


Figura 4.18 - Comparação dos LC₅₀ das cationonas com cadeias *N*-alquílicas ramificadas, em células HepG2. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.

Comparando as cationonas com cadeias *N*-alquílicas lineares (Figura 4.17) com as *N*-alquílicas ramificadas (Figura 4.18) é possível verificar que as CBC (**8-9**) são mais citotóxicas que as Cl-TBC (**20-21**) e CIC (**18-19**), isto é, a 4'-CBC (**9**) com um LC₅₀ de 0,8 mM continua a ser mais citotóxica do que a 4'-Cl-TBC (**21**) com um LC₅₀ de 1,2mM, e a 3'-CBC (**8**) com um LC₅₀ de 1,18 mM é mais citotóxica do que a 3'-CIC (**18**) com um LC₅₀ de 1,3 mM.

Para as catinonas com um grupo amino terciário, ou seja, as cloro-pirrolidilcatinonas (Cl-PPP, **10-12**), as cloro-*N,N*-dimetilcatinonas (CDC, **13-15**) e as cloro-*N,N*-dietilcatinonas (Cl-DEC, **16-17**), verificou-se através da Figura 4.19 que, em geral, o aumento da cadeia lateral do grupo amino leva igualmente ao aumento da citotoxicidade. Assim, denota-se que as catinonas *N,N*-dialquílicas lineares, com 1 carbono em cada uma das cadeias do grupo amino (CDC, **13-15**) foram as que apresentaram maior LC₅₀ de 5,7 mM (4'-CDC, **15**), 4,5 mM (3'-CDC, **14**) e 3,7 mM (2'-CDC, **13**), e como tal, menor citotoxicidade. Para as catinonas com o átomo de cloro na posição *para* do anel aromático verificou-se que a 4'-Cl-PPP (**12**) com um grupo amino cíclico composto por 4 carbonos apresentou maior citotoxicidade (2,5 mM) relativamente à 4'-Cl-DEC (**17**) composta por um grupo amino de cadeia *N,N*-dialquílica linear composto por 4 carbonos (3,1 mM). Esta ordem é invertida para estas catinonas com o átomo de cloro na posição *meta* do anel aromático.

Verificou-se ainda que as catinonas com um grupo amino secundário (Figura 4.19) são menos citotóxicas do que nos casos anteriores com catinonas com cadeias *N*-alquílicas ramificadas (Figura 4.18). Contudo, apesar das CBC (**8-9**) serem as mais citotóxicas (Figura 4.17) verificou-se que 4'-Cl-PPP (**12**) com um LC₅₀ de 2,5 mM é estatisticamente idêntica à 4'-CEC (**6**) com um LC₅₀ de 2,4 mM, bem como a 4'-Cl-DEC (**17**) é estatisticamente idêntica à 3'-CMC (**6**), ambas com um LC₅₀ de 3,1 mM.

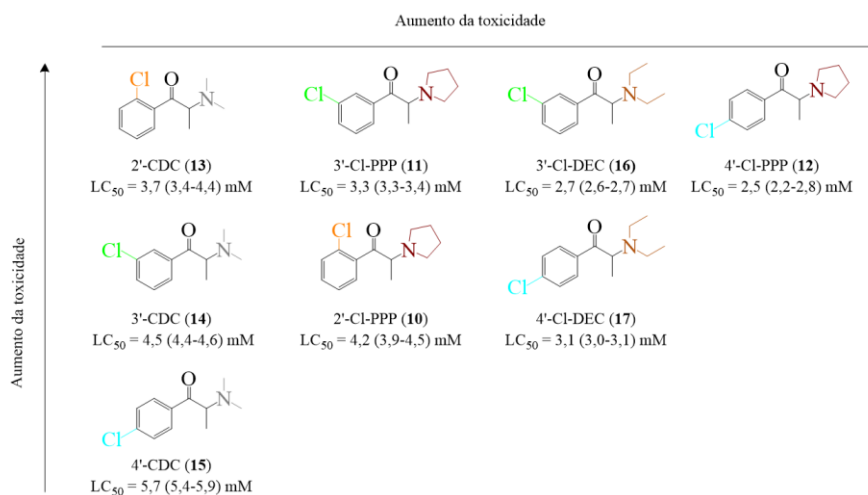


Figura 4.19 - Comparação dos LC₅₀ de diferentes catinonas contendo grupos amino terciários alifáticos ou cíclicos, em células HepG2. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.

Além destas comparações foi analisado o efeito do tipo de substituinte do anel aromático, ao se comparar a 4'-CMC (**3**) com a mefedrona (**22**). Como tal os resultados sugerem que o átomo de cloro provoca um aumento da toxicidade em relação ao grupo metilo presente na mefedrona (**22**) uma vez que o valor de LC₅₀ obtido para a 4'-CMC (**3**) foi de 2,9 (2,8 – 3,0) mM em relação aos 3,4 (3,3 – 3,5) mM. De salientar que a citotoxicidade da mefedrona (**22**) em células HepG2 já foi

quantificada [63]. Apesar do IC_{50} obtido experimentalmente divergir do IC_{50} presente na literatura ($1,28 \pm 0,03$ mM), esta discrepância pode ser justificada dado que o meio de cultura usado nos estudos anteriores foi diferente. Tal variação pode afetar o metabolismo e consequentemente a atividade das células devido à diferente composição dos meios DMEM e RPMI, traduzindo-se em valores de citotoxicidade diferentes [158].

Em suma, relativamente citotoxicidade nas células HepG2 pode concluir-se que está associada à natureza do grupo amino substituído na posição 2. Para a linha celular HepG2 se verificou que a inibição será maior com o aumento da cadeia alifática para catinonas *N*-alquílicas e catinonas *N,N*-dialquílicas. Quanto à ramificação para catinonas *N*-alquiladas, apesar de não influenciarem os resultados de citotoxicidade de modo distinto, influenciam menos a citotoxicidade do que catinonas *N*-alquílicas lineares. Por fim, ao se comparar a 4'-CMC (**3**) com a mefedrona (**22**) verificou-se que substituindo o grupo metilo por um átomo de cloro no anel aromático a citotoxicidade aumentou.

4.4. Efeito das catinonas sobre a viabilidade das células neuronais SH-SY5Y

As catinonas são substâncias psicostimulantes das quais já existem publicados alguns estudos que comprovam os seus efeitos neurotóxicos a nível dos transportadores de monoaminas presentes nas células neuronais, interagindo com estes à semelhança de outras drogas ilícitas com diferentes potências e efeitos [54,58,107,159–161]. As linhas celulares SH-SY5Y, tal como mencionado em 3.2, são usadas como modelo para determinar a toxicidade uma vez que apresentam características de neurónios dopaminérgicos sendo ainda possível induzir a sua diferenciação para neurónios com as características pretendidas.

Os estudos de viabilidade descritos em 3.6.2 permitiram avaliar o potencial citotóxico das catinonas sobre as células neuronais diferenciadas. Após as células SH-SY5Y terem sido diferenciadas com TPA-RA durante um total de 6 dias, foram colocadas em contacto durante 24h com as 21 catinonas (**1-22**), com excepção da 2'-CBC (**7**) não sintetizada, para diferentes concentrações numa gama de 0,05 – 5 mM, e a sua viabilidade celular analisada pelo método do MTT.

Na Figura 4.20 estão representadas as curvas dose-resposta para a percentagem de citotoxicidade obtida para diferentes concentrações das catinonas usadas neste trabalho, agrupadas nos 8 conjuntos de regioisómeros e, para a mefedrona (**22**). A partir destas curvas, ajustadas ao modelo de regressão não linear sigmoidal de Hill determinaram-se os valores de LC_{50} que representam a concentração à qual cada catinona induz 50% de morte celular comparativamente a células controlo que não estiveram em contacto com a catinona. Foram também determinados, o respetivo intervalo de confiança do valor do LC_{50} ao nível de confiança de 95% ([CI]), o Declive de Hill e

a concentração mínima com efeitos citotóxicos observáveis (LOAEL), que se encontram na Tabela 4.5, tendo-se obtido valores de R^2 do ajuste compreendidos entre 0,825 e 0,971.

A análise estatística *One-way ANOVA* e o teste de Tukey foram realizados para comparação dos valores dos LC_{50} para as catinonas testadas, e os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 4.6 O nível de confiança para os testes estatísticos foi de 95%, tendo sido considerado como não significativo um valor de $p > 0,05$.

Tabela 4.5 - Valores de concentração da catinona que induz 50% de morte celular (LC_{50}) e respetivos intervalos de confiança [CI], declives de Hill e concentração mínima com efeitos citotóxicos observáveis (LOAEL), após 24h de exposição das células neuronais SH-SY5Y.

Catinona	LC_{50} [CI] (mM)	Declive de Hill	LOAEL (mM)
2'-CMC (1)	1,7 [1,2 - 2,5]	4,3	1,0
3'-CMC (2)	2,3 [1,8 - 2,9]	2,5	1,0
4'-CMC (3)	1,3 [0,9 - 1,9]	1,6	0,1
2'-CEC (4)	1,6 [1,3 - 2,0]	4,4	0,5
3'-CEC (5)	1,3 [0,8 - 2,3]	1,7	0,5
4'-CEC (6)	1,3 [1,0 - 1,7]	3,4	0,1
3'-CBC (8)	0,7 [0,5 - 1,0]	1,4	0,1
4'-CBC (9)	0,6 [0,4 - 1,0]	10,5	0,5
2'-CI-PPP (10)	1,6 [1,2 - 1,9]	2,4	0,5
3'-CI-PPP (11)	2,5 [2,0 - 2,9]	1,7	0,1
4'-CI-PPP (12)	1,8 [1,2 - 2,5]	0,9	0,5
2'-CDC (13)	1,3 [1,1 - 1,5]	12,4	1,0
3'-CDC (14)	1,8 [1,2 - 2,7]	6,3	1,0
4'-CDC (15)	1,5 [1,1 - 2,1]	5,6	1,0
3'-CI-DEC (16)	1,2 [1,0 - 1,5]	4,3	1,0
4'-CI-DEC (17)	1,0 [1,0 - 1,1]	17,4	1,0
3'-CIC (18)	1,6 [1,2 - 2,1]	4,4	1,0
4'-CIC (19)	1,4 [1,0 - 2,0]	4,5	1,0
3'-CI-TBC (20)	1,0 [0,9 - 1,2]	3,5	0,5
4'-CI-TBC (21)	1,3 [1,1 - 1,7]	2,4	0,5
Mefedrona (22)	2,1 [1,4 - 3,1]	2,3	0,5

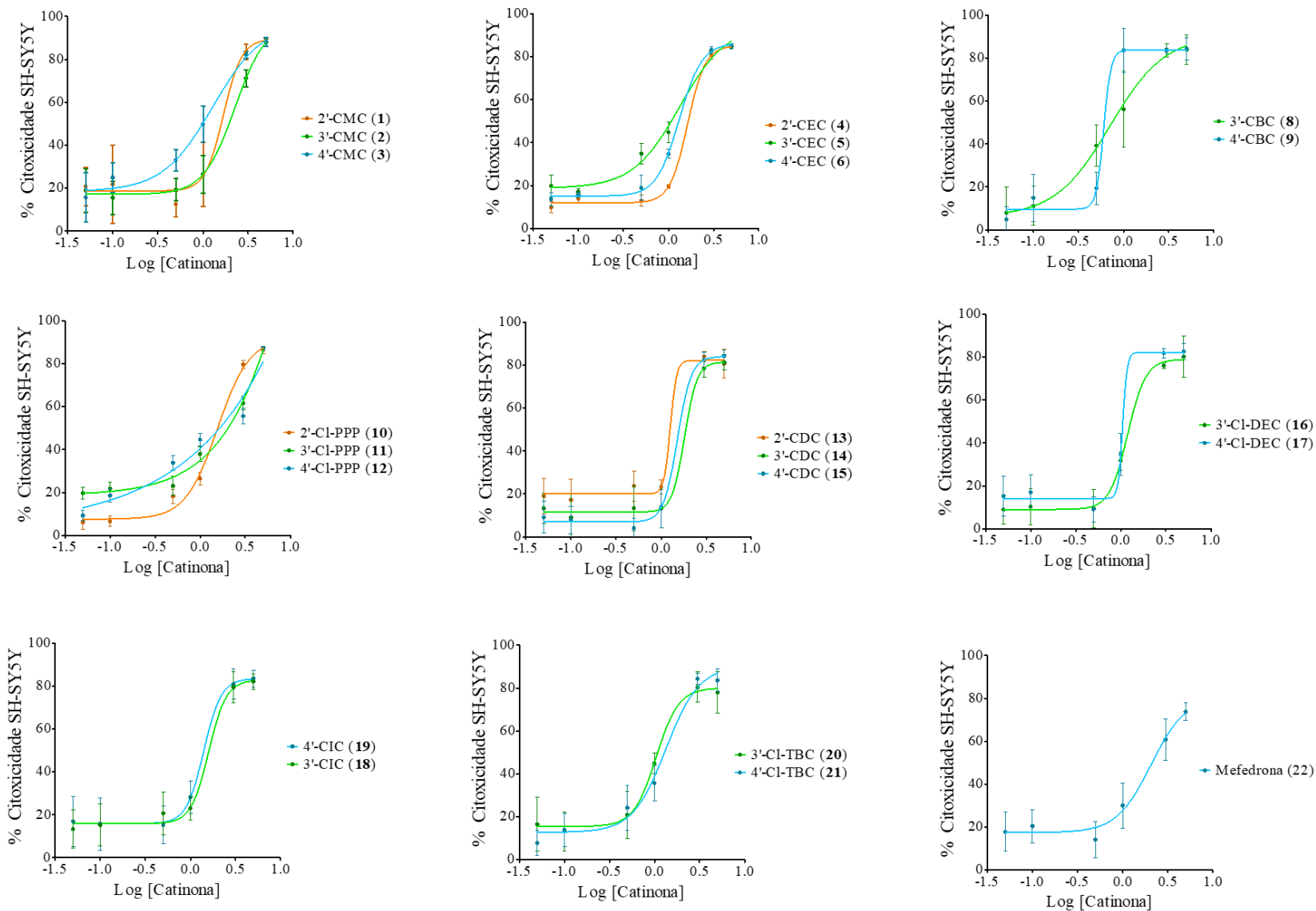


Figura 4.20 - Curvas Dose-Resposta – Percentagem de citotoxicidade das 21 catinonas estudadas agrupadas por conjuntos de isômeros e obtidas do método de redução por MTT em células neuronais diferenciadas SH-SY5Y realizadas após uma exposição de 24h. A percentagem de citotoxicidade é apresentada com a média e o desvio padrão de cada ensaio, realizado por 3 ensaios independentes em triplicado.

Tabela 4.6 - Resultados da análise estatística realizada aos ensaios da SH-SY5Y. A verde encontram-se as catinonas da coluna de *A* que apresentam valor de LC₅₀ superior a *B* e a vermelho as catinonas da coluna de *A* que apresentam valor de LC₅₀ inferior a *B*. As correlações estatísticas não significativas (NS) apresentam $p > 0,05$.

A \ B	2'-CMC (1)	3'-CMC (2)	4'-CMC (3)	2'-CEC (4)	3'-CEC (5)	4'-CEC (6)	3'-CBC (8)	4'-CBC (9)	2'-Cl-PPP (10)	3'-Cl-PPP (11)	4'-Cl-PPP (12)	2'-CDC (13)	3'-CDC (14)	4'-CDC (15)	3'-Cl-DEC (16)	4'-Cl-DEC (17)	3'-CIC (18)	4'-CIC (19)	3'-Cl-TBC (20)	4'-Cl-TBC (21)	Mefedrona (22)	
2'-CMC (1)																						
3'-CMC (2)	>																					
4'-CMC (3)	<	<																				
2'-CEC (4)	NS	<	>																			
3'-CEC (5)	<	<	NS	<																		
4'-CEC (6)	<	<	NS	<	NS																	
3'-CBC (8)	<	<	<	<	<	<																
4'-CBC (9)	<	<	<	<	<	<	<															
2'-Cl-PPP (10)	NS	<	>	NS	>	>	>	>														
3'-Cl-PPP (11)	>	NS	>	>	>	>	>	>	>													
4'-Cl-PPP (12)	NS	<	>	NS	>	>	>	>	>	>	<											
2'-CDC (13)	<	<	NS	<	NS	NS	>	>	>	<	<	<										
3'-CDC (14)	NS	<	>	>	>	>	>	>	>	<	NS	>										
4'-CDC (15)	NS	<	>	NS	>	>	>	>	NS	<	<	>	<									
3'-Cl-DEC (16)	<	<	NS	<	NS	NS	>	>	>	<	<	<	NS	<	<							
4'-Cl-DEC (17)	<	<	<	<	<	<	>	>	<	<	<	<	<	<	<	<						
3'-CIC (18)	NS	<	>	NS	>	>	>	>	NS	<	NS	>	<	NS	>	>						
4'-CIC (19)	<	<	NS	<	NS	NS	>	>	NS	<	<	NS	<	NS	>	>	<					
3'-Cl-TBC (20)	<	<	<	<	<	<	>	>	<	<	<	<	<	<	<	NS	<	<				
4'-Cl-TBC (21)	<	<	NS	<	NS	NS	>	>	<	<	<	NS	<	<	NS	>	<	NS	>			
Mefedrona (22)	>	NS	>	>	>	>	>	>	>	<	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>	>

Através das curvas-dose resposta na Figura 4.20 foi possível verificar que para todas as catinonas existe uma relação dose-resposta, significando assim que o aumento da concentração de catinona resultou num aumento percentagem de morte (citotoxicidade) observada nas células neuronais SH-SY5Y.

Através da Tabela 4.5 verificou-se que os valores de LC₅₀ variaram entre 0,6 mM a 2,5 mM. As catinonas que apresentaram maior citotoxicidade nas células neuronais e, portanto, menor valor de LC₅₀, correspondem à 4'-CBC (9) seguida do seu regioisómero 3'-CBC (8), com 0,6 mM e 0,7 mM, respetivamente. Verifica-se ainda que as catinonas com o valor de LC₅₀ mais elevado, e como tal, que apresentaram menor citotoxicidade nesta linha celular foram a 3'-Cl-PPP (11) estatisticamente semelhante (Tabela 4.6) à 3'-CMC (2) com o valor de LC₅₀ de 2,5 mM e 2,3 mM, respetivamente, seguida da mefedrona (22) com o valor de LC₅₀ igual a 2,1 mM. Verificou-se ainda que para todas as catinonas testadas, exceto a mefedrona (22), obteve-se uma resposta máxima produzida superior a 80%, sendo que as CMC (1-3) foram as que obtiveram a resposta máxima produzida mais elevada de 88%.

Relativamente aos declives de Hill, que são uma medida da inclinação do modelo sigmoidal ajustado [157], verificou-se que a 4'-Cl-DEC (17), a 2'-CDC (13) e a 4'-CBC (9) são as catinonas com valores mais elevados, e como tal apresentam um risco acrescido de toxicidade ao fazer pequenas variações de concentração. De notar que a 4'-CBC (9) foi simultaneamente a catinona mais citotóxica nestas células, neste caso verificou-se que uma pequena variação na sua concentração causou um aumento significativo na citotoxicidade sobre as células neuronais, nomeadamente de 19% para 84 % de morte celular, tal como se pode observar na Figura 4.20.

Verificou-se ainda que todas as catinonas estudadas induziram citotoxicidade para a concentração mínima testada de 0,05 mM. Foi ainda analisada a LOAEL que representa o limite mínimo a partir do qual se verifica um aumento exponencial da percentagem de toxicidade, que na maioria dos casos foi de 0,5 mM ou superior. A 4'-CMC (3), a 4'-CEC (6), a 3'-CBC (8) e a 3'-Cl-PPP (11) são as catinonas cujo aumento de citotoxicidade ocorre a concentrações mais baixas, com um LOAEL de 0,1 mM.

Para avaliar a relação da estrutura com a citotoxicidade das catinonas testadas, foram representados os valores do LC₅₀ obtidos e que constam na Tabela 4.5, para as diferentes catinonas agrupadas de acordo com algumas características estruturais (Figura 4.21), uma vez que as catinonas apresentam estruturas diferentes entre si relativamente ao grupo amino e à posição do átomo de cloro no anel aromático (regioisómeros *orto* (2'), *meta* (3') e *para* (4')).

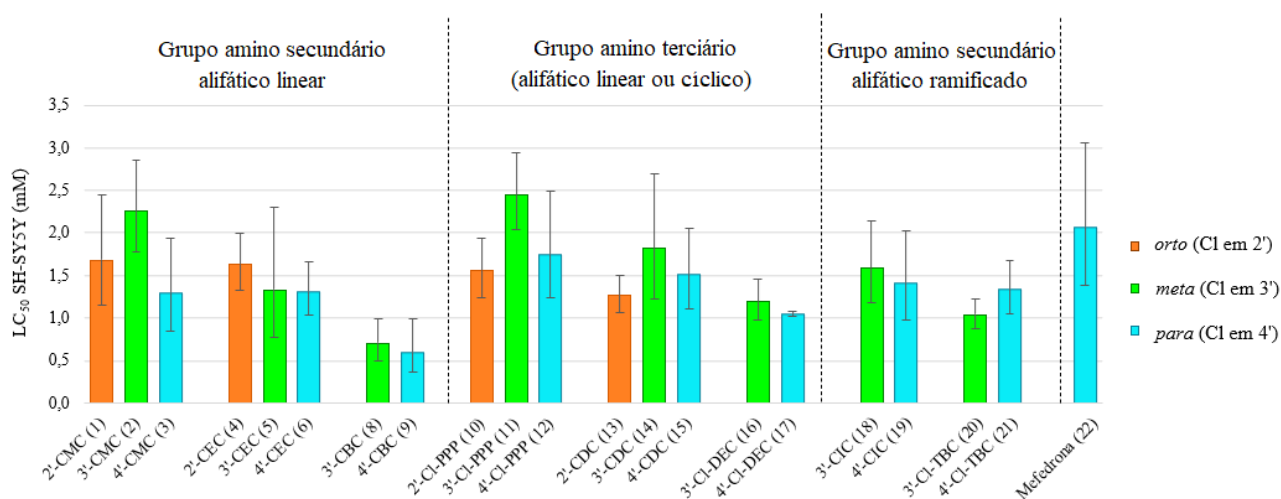


Figura 4.21 - Comparação dos LC₅₀ das diferentes catinonas para as células SH-SY5Y. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.

A Figura 4.21 consiste numa representação geral dos valores de LC₅₀ dos regioisómeros *orto* (2'), *meta* (3') e *para* (4') de cada uma das catinonas estudadas, destacando-se a laranja as catinonas estudadas com o cloro na posição do anel aromático *orto*, a verde as catinonas com o átomo de cloro na posição *meta* e a azul todas com o átomo de cloro na posição *para*. Para a grande maioria das catinonas denota-se que o átomo de cloro na posição *meta* (verde) do anel aromático torna

esse isômero o menos citotóxico do seu grupo, exceptuando-se para as CEC (**4-6**) e Cl-TBC (**20-21**) no qual os isômeros menos citotóxicos são a 2'-CEC (**4**) (isômeros *orto*-laranja) e a 4'-Cl-TBC (**21**) (isômero *para*-azul), respetivamente. Dada a variedade de comportamentos verificados para a posição do átomo de cloro no anel aromático da catinona analisou-se a influência do tipo de grupo amino para cada conjunto de regioisômeros.

Para os 4 isômeros *orto* (**1, 4, 10 e 13**) analisados na Figura 4.21 (laranja) e com auxílio da Tabela 4.6, as catinonas com um grupo metilamino (2'-CMC, **1**), etilamino (2'-CEC, **4**) e pirrolidilo (2'-Cl-PPP, **10**) apresentam valores de LC₅₀ significativamente semelhantes e ligeiramente superiores, ou seja, apresentam uma menor citotoxicidade relativamente à catinona com um grupo dimetilamino (2'-CDC, **13**), pelo que neste caso foi difícil avaliar o efeito das modificações na estrutura sobre a citotoxicidade em células neuronais SH-SY5Y.

Assim, para os 8 isômeros *meta* (**2, 5, 8, 11, 14, 16, 18 e 20**) analisados na Figura 4.21 (verde) e através da Tabela 4.6, verificou-se quanto aos valores de LC₅₀ que a presença de um grupo metilamino (3'-CMC, **2**) é equivalente à de um grupo pirrolidilo (3'-Cl-PPP, **11**), e são superiores (menos citotóxicos) a um grupo dimetilamino (3'-CDC, **14**) que por sua vez é superior a um grupo isopropilamino (3'-CIC, **18**). Os grupos etilamino (3'-CEC, **5**) e dietilamino (3'-Cl-DEC, **16**) são significativamente equivalentes e superiores ao grupo *tert*-butilamino (3'-Cl-TBC, **20**) e superiores ainda ao grupo butilamino (3'-CBC, **8**). Como tal, os resultados sugerem que um grupo butilamino tem uma maior influência na citotoxicidade das células neuronais estudadas relativamente aos restantes isômeros *meta*. Além disso, para estes isômeros de cadeias *N*-alquílicas, verificou-se uma tendência decrescente no valor de LC₅₀, ou seja, um aumento da citotoxicidade com o aumento da cadeia alifática dos grupos amino.

Por fim, para os 6 isômeros *para* (**6, 9, 12, 15, 17 e 19**) analisados na Figura 4.21 (azul) e através da Tabela 4.6, verificou-se que a presença de um grupo butilamino (4'-CBC, **9**) resulta num aumento da citotoxicidade. A influência dos grupos metilamino (4'-CMC, **3**), etilamino (4'-CEC, **6**), isopropilamino (4'-CIC, **19**) e *tert*-butilamino (4'-Cl-TBC, **21**) é significativamente equivalente sendo mais citotóxicos do que o grupo dimetilamino (4'-CDC, **15**) e por sua vez é mais citotóxico que o grupo pirrolidilo (4'-Cl-PPP, **12**). À semelhança dos isômeros *meta*, também para os isômeros *para* o grupo butilamino apresentam uma maior influência na citotoxicidade nas células neuronais estudadas.

As catinonas foram ainda agrupadas de acordo com a estrutura do grupo amino em posição 2, tal como referido anteriormente nos pontos 4.2 e 4.3.

Na Figura 4.22 está esquematizado a comparação dos valores de LC₅₀ obtidos para as catinonas que diferem no aumento da cadeia do grupo amino (cadeia *N*-alquílica), nomeadamente, as cloro-*N*-metilcatinonas (CMC, **1-3**), as cloro-*N*-etilcatinonas (CEC, **4-6**), e as

cloro-*N*-butilcatinonas (CBC, **8-9**). Verificou-se que, em geral, a citotoxicidade é influenciada pelo aumento da cadeia *N*-alquílica do grupo amino. Para o átomo de cloro na posição *meta* do anel aromático, verificou-se que a 3'-CBC (**8**) apresentou menor valor de LC₅₀, e como tal, maior citotoxicidade, seguida da 3'-CEC (**5**) e da 3'-CMC (**2**). O mesmo comportamento também se verificou para as catinonas substituídas com o átomo de cloro na posição *para* do anel aromático, ocorrendo um aumento desta citotoxicidade para a 4'-CBC (**9**) relativamente à 4'-CMC (**3**) e à 4'-CEC (**6**), uma vez que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os valores do LC₅₀ para estas últimas (1,3 mM), e ainda entre a 2'-CMC (**1**) e a 2'-CEC (**4**) com 1,7 mM e 1,6 mM, respectivamente.

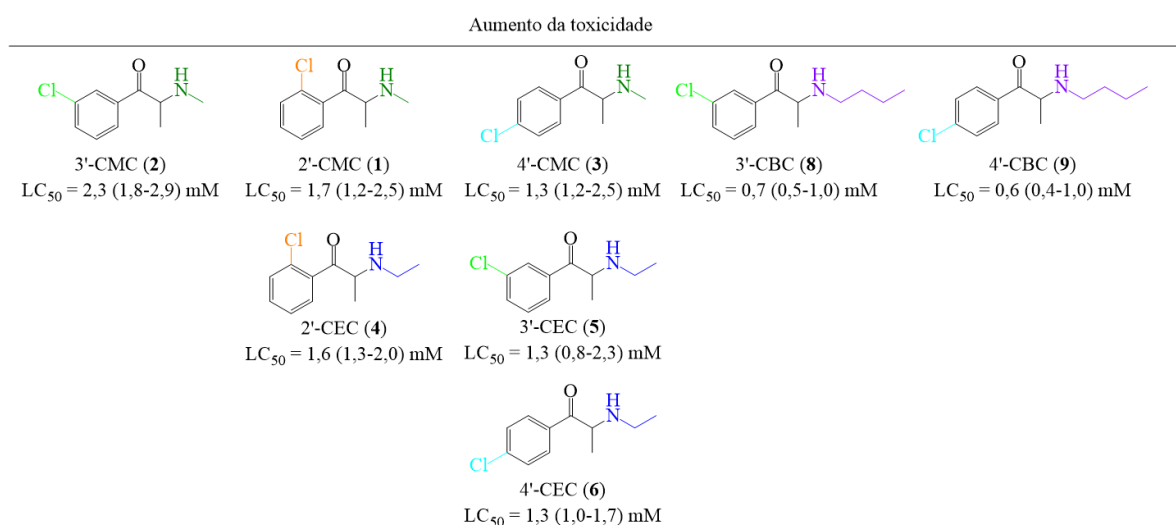


Figura 4.22 - Comparação dos LC₅₀ de catinonas com o aumento da cadeia do grupo amino secundário alifático linear (CMC, 1 carbono, CEC, 2 carbonos e CBC 4 carbonos), em células SH-SY5Y. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.

Na Figura 4.23 verificou-se a influência do aumento da ramificação para as catinonas com cadeias *N*-alquílicas ramificadas, através da comparação dos valores de LC₅₀ obtidos para as cloro-*N*-isopropilcatinonas (CIC, **18-19**) para as cloro-*tert*-butilcatinonas (Cl-TBC, **20-21**). Verificou-se que o aumento da ramificação da cadeia apenas influenciou a citotoxicidade nas células SH-SY5Y para catinonas substituídas com o átomo de cloro na posição *meta* do anel aromático, dado que a 3'-Cl-TBC (**20**) apresenta um menor valor de LC₅₀ (1,0 mM), sendo portanto mais citotóxica, relativamente à 3'-CIC (**18**) (1,6 mM), e uma vez que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas, entre os valores do LC₅₀ para a 4'-CIC (**19**) e a 4'-Cl-TBC (**21**).

Contudo, comparando as catinonas de cadeias *N*-alquílicas lineares com as ramificadas é possível verificar que a 3'-Cl-TBC (**20**) (1,0 mM – Figura 4.22) tem uma menor citotoxicidade quando comparada com a 3'-CBC (**8**) e a 4'-CBC (**9**) (0,7 mM e 0,6 mM, respectivamente – Figura 4.23).

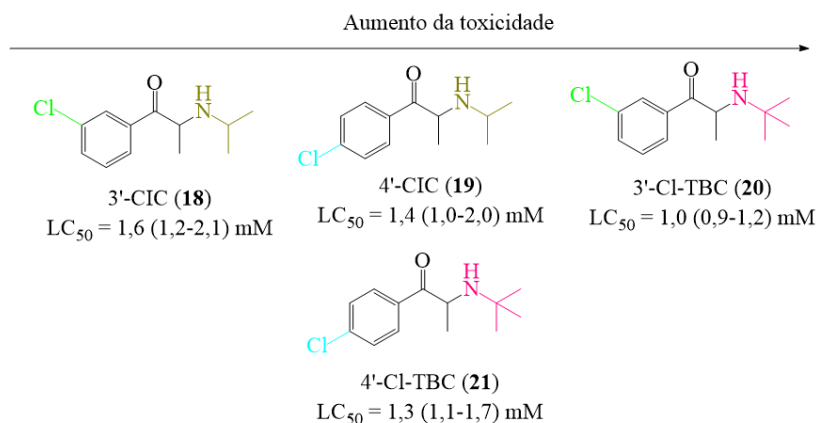


Figura 4.23 - Comparação dos LC₅₀ de catinonas com diferentes graus de ramificação do grupo amino, em células HepG2. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.

Para as catinonas com cadeias *N,N*-dialquílicas, ou seja, as cloro-pirrolidilcatinonas (Cl-PPP, **10-12**), as cloro-*N,N*-dimetilcatinonas (CDC, **13-15**) e as cloro-*N,N*-dietilcatinonas (Cl-DEC, **16-17**) a citotoxicidade foi analisada pela Figura 4.24. Verificou-se, em geral, que o aumento da cadeia alifática do grupo amino, leva igualmente ao aumento da citotoxicidade. Contudo, a presença de um grupo pirrolidilo (grupo amino cíclico de 4 carbonos) nas catinonas Cl-PPP (**10-12**) influenciou menos a toxicidade do que os grupos amino lineares de 4 carbonos. Assim, para as catinonas com o átomo de cloro na posição *para* do anel aromático verificou-se que a 4'-Cl-DEC (**17**) apresenta o menor valor de LC₅₀ de 1,0 mM e portanto maior citotoxicidade, relativamente à 4'-CDC (**15**) com um LC₅₀ de 1,5 mM, e por sua vez maior citotoxicidade em relação à 4'-Cl-PPP (**12**) cujo LC₅₀ é 1,8 mM. Esta tendência também é verificada para os regioisômeros *orto* (**10, 13**) e *meta* (**11, 14 e 16**).

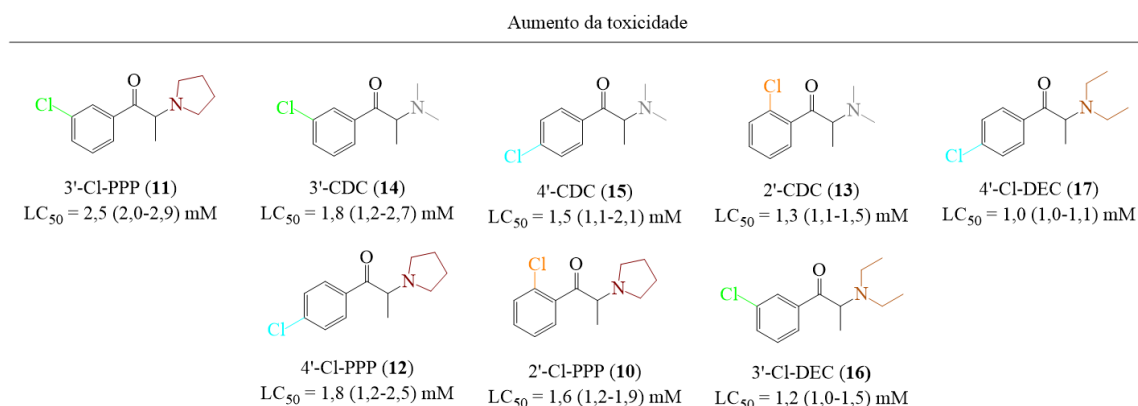


Figura 4.24 - Comparação dos LC₅₀ de diferentes catinonas contendo grupos amino terciários alifáticos ou cíclicos, em células SH-SY5Y. Os resultados são apresentados em média ± intervalo de confiança.

Foram ainda comparadas a 4'-CMC (**3**) com a mefedrona (**22**) dado diferirem apenas no tipo de substituinte do anel aromático na posição *para*. Assim, foi possível verificar que apesar dos valores de LC₅₀ serem semelhantes, 4'-CMC (**3**) com 1,3 [1,2 - 2,5] mM e mefedrona (**22**) com

2,1 [1,4 -3,1] mM, são estatisticamente diferentes o que permite evidenciar que o átomo de cloro presente na 4'-CMC (**3**) provoca um ligeiro aumento da toxicidade relativamente ao grupo metilo presente na mefedrona (**22**). De notar que os resultados obtidos para a mefedrona (**22**) encontram-se em concordância com a literatura, no qual foi reportada uma citotoxicidade em células SH-SY5Y diferenciadas com RA-TPA de $LC_{50} = 2,87$ [2,69 - 3,05] mM [103].

Em suma, relativamente citotoxicidade nas células neuronais SH-SY5Y pode concluir-se que está associada à natureza do grupo amino substituído na posição 2. À semelhança dos resultados obtidos para citotoxicidade nas células HepG2, também para a linha celular SH-SY5Y se verificou que a inibição será maior com o aumento da cadeia alifática para cationas *N*-alquílicas e cationas *N,N*-dialquílicas, diferenciando-se apenas para as Cl-PPP (**10-12**), sugerindo que um grupo amino cíclico diminui a citotoxicidade em relação a cadeias *N,N*-dialquílicas lineares. Quanto à ramificação para cationas *N*-alquiladas, ao contrário do que ocorreu para a linha celular das HepG2, verificou-se que um aumento da ramificação resulta num aumento da citotoxicidade. Por fim, verificou-se que ao se comparar as duas cationas que variam apenas no grupo presente no anel aromático, 4'-CMC (**3**) e mefedrona (**22**), a presença de um átomo de cloro nesta posição aumentou a citotoxicidade verificada para esta linha celular relativamente ao grupo metilo, tal como verificado para a linha celular HepG2.

4.5. Estudos *in silico*

Os resultados obtidos experimentalmente sugerem, na maioria dos casos, que um aumento da cadeia alquílica do grupo amino nas cationas se traduz em valores mais reduzidos quer de IC_{50} e LC_{50} , e conseqüentemente num aumento, quer da sua capacidade inibitória sobre a atividade da acetilcolinesterase, quer da toxicidade nas linhas celulares testadas. Tendo em conta que o aumento da cadeia alquílica poderá influenciar na polaridade das cationas ou noutras características moleculares, procurou-se fundamentar os resultados experimentais obtidos com a previsão das características físico-químicas das diferentes cationas, recorrendo a ferramentas computacionais.

De modo a complementar os resultados obtidos experimentalmente realizou-se a previsão *in silico* das propriedades físico-químicas e da farmacocinéticas das cationas estudadas, os parâmetros recolhidos encontram-se na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Resultados preditivos das propriedades moleculares das diferentes catinonas sintéticas analisadas (**1-22**). Massa Molecular (**MM**), Coeficiente de partição octanol/água (**Log P**), Nº aceitadores de ligação de hidrogénio (**HBA**), Nº doadores de prótons (**HBD**), Nº ligações com rotação (**NRB**), Área de superfície polar topológica (**TPSA**), probabilidade de permeabilidade através da barreira hematoencefálica (**BHE**), probabilidade de permeabilidade através da barreira gastrointestinal (**BGI**).

Catinonas	MM (g/mol)	Log P	HBA	HBD	NRB	TPSA (Å ²)	Volume (Å ³)	BHE	BGI
2'-CMC (1)	198,67	-0,78	2	2	3	33,68	179,89	0,777	0,989
3'-CMC (2)	198,67	-0,75	2	2	3	33,68	179,89	0,850	0,987
4'-CMC (3)	198,67	-0,73	2	2	3	33,68	179,89	0,850	0,987
2'-CEC (4)	212,70	-0,40	2	2	4	33,68	196,69	0,852	0,993
3'-CEC (5)	212,70	-0,38	2	2	4	33,68	196,69	0,900	0,992
4'-CEC (6)	212,70	-0,35	2	2	4	33,68	196,69	0,900	0,992
3'-CBC (8)	240,75	0,69	2	2	6	33,68	230,30	0,975	0,993
4'-CBC (9)	240,75	0,71	2	2	6	33,68	230,30	0,975	0,993
2'-CI-PPP (10)	238,73	-0,27	2	1	3	21,51	222,21	0,900	0,977
3'-CI-PPP (11)	238,73	-0,25	2	1	3	21,51	222,21	0,875	0,968
4'-CI-PPP (12)	238,73	-0,23	2	1	3	21,51	222,21	0,875	0,968
2'-CDC (13)	212,70	-0,68	2	1	3	21,51	198,97	0,825	0,943
3'-CDC (14)	212,70	-0,65	2	1	3	21,51	198,97	0,900	0,926
4'-CDC (15)	212,70	-0,63	2	1	3	21,51	198,97	0,900	0,926
3'-CI-DEC (16)	240,75	0,10	2	1	5	21,51	232,57	0,825	0,943
4'-CI-DEC (17)	240,75	0,12	2	1	5	21,51	232,57	0,825	0,943
3'-CIC (18)	226,72	-0,01	2	2	4	33,68	213,28	0,900	0,990
4'-CIC (19)	226,72	0,01	2	2	4	33,68	213,28	0,900	0,990
3'-CI-TBC (20)	240,75	0,43	2	2	4	33,68	229,52	0,950	0,986
4'-CI-TBC (21)	240,75	0,46	2	2	4	33,68	229,52	0,950	0,986
Mefedrona (22)	178,25	-0,96	2	2	3	33,68	182,92	0,800	0,983

Verificou-se que todas as catinonas estudadas apresentaram valores de MM entre 178,25 e 240,75 g/mol, *Log P* contidos num intervalo entre -0,96 e 0,71, número de aceitadores de hidrogénio (HBA) igual a 2 e número de doadores de ligação de hidrogénio entre 1 e 2, pelo que cumprem os requisitos da regra de Lipinski tal como descrito no ponto 3.8, e portanto, apresentam uma boa biodisponibilidade se ingeridas por via oral. Através da regra de Veber, que visa complementar a regra de Lipinski, verificou-se que todas as catinonas apresentaram valores de TPSA inferiores a 90 Å² e um número de ligações com rotação (NRB) entre 3 e 6. Como tal, apresentam, possivelmente, uma elevada capacidade de permeabilidade através da BHE e de atuar ao nível do SNC. Verificou-se ainda que, as catinonas com um grupo amino terciário alifático linear ou cíclico (**10-17**) são as que apresentam valores mais baixos de TPSA, de 21,51 Å².

Neste sentido, através do software AdmetSAR 2.0, como se pode constatar na Tabela 4.7, todas as catinonas apresentam uma elevada probabilidade de serem absorvidos e atravessarem as

barreiras seletivas, nomeadamente a barreira hematoencefálica (BHE) e a barreira gastrointestinal (BGI). A 2'-CMC (**1**) foi a catinona que apresentou a menor probabilidade de atravessarem a BHE com aproximadamente de 78% (0,777), sendo as CBC (**8-9**) e as Cl-TBC (**20-21**) as que apresentam uma melhor probabilidade de 98% (0,975) e 95% (0,950), respetivamente. Todas as catinonas apresentaram ainda uma probabilidade superior a 93% (0,926) de atravessarem a barreira BGI.

O *Log P*, coeficiente de partição octanol-água, tal como mencionado no ponto 3.8, representa a lipofilicidade/hidrofobicidade de uma molécula, e como tal é um parâmetro habitualmente usado em estudos para determinar a sua capacidade de permear por difusão através da membrana lipídica das células [162]. Assim, quanto maior o valor de *Log P*, mais lipofílica é a molécula e mais facilmente esta atravessa a membrana celular [163]. De modo a compreender o efeito da lipofilicidade das catinonas estudadas sobre os efeitos biológicos analisados, compararam-se os valores de IC_{50} (Tabela 4.1) e LC_{50} (Tabela 4.3 e Tabela 4.5) com os valores de *Log P* (Tabela 4.7) obtidos através do Software Molinspiration Cheminformatics [123], e representados na Figura 4.25, Figura 4.26 e Figura 4.27.

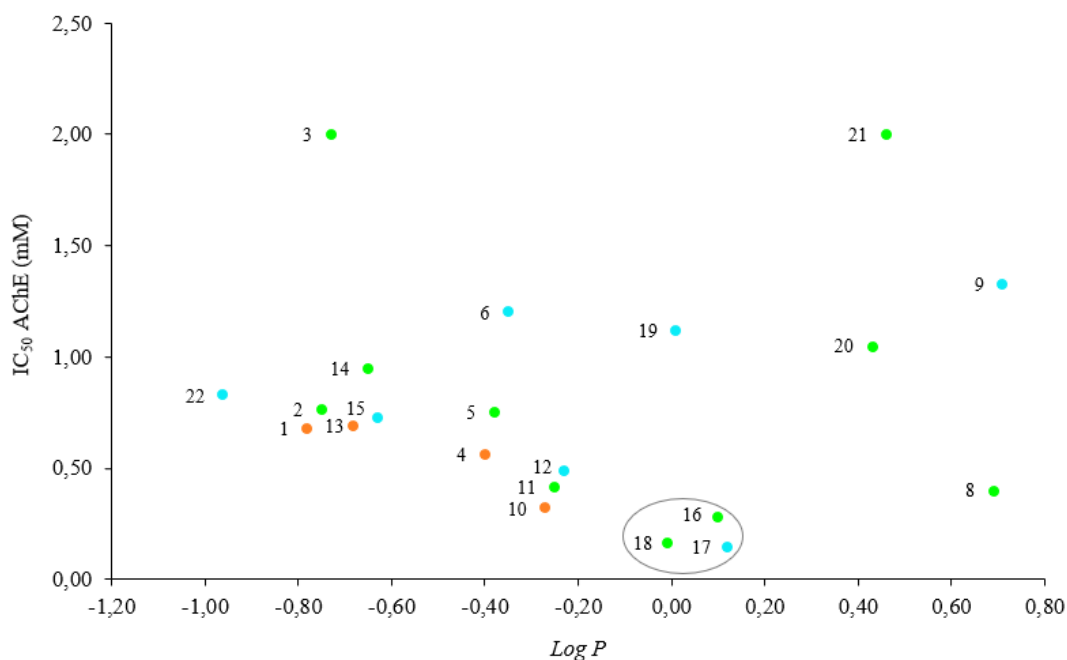


Figura 4.25 - Representação dos valores de IC_{50} em relação ao *Log P* para os ensaios de inibição da atividade da AChE.

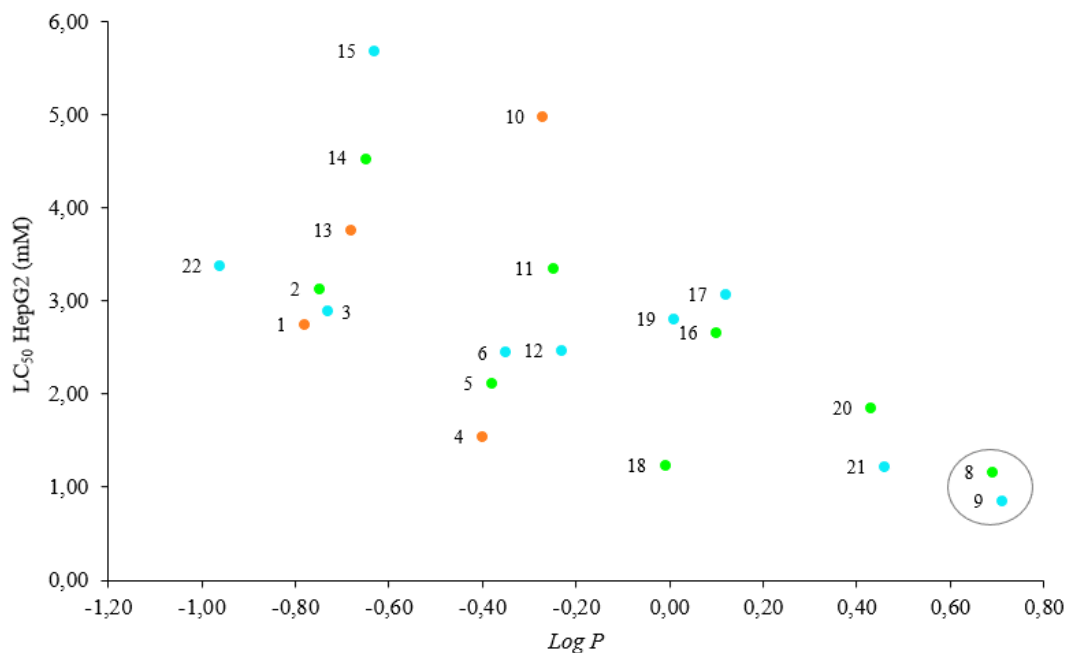


Figura 4.26 - Representação dos valores de LC₅₀ em relação ao Log P para os ensaios biológicos com as linhas celulares HepG2.

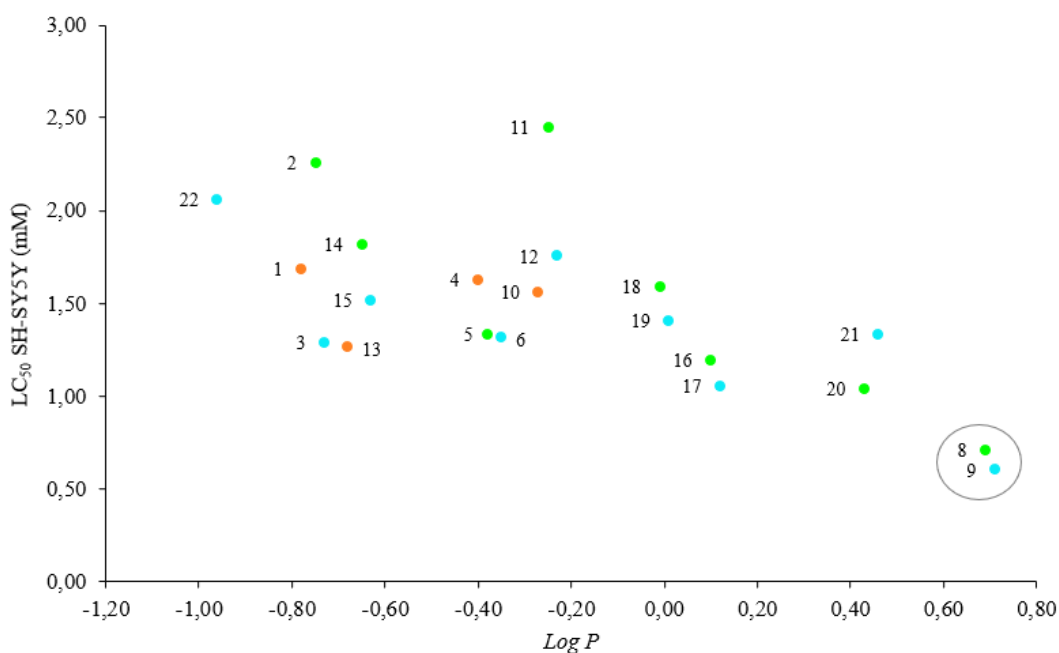


Figura 4.27 - Representação dos valores de LC₅₀ em relação ao Log P para os ensaios biológicos com as linhas celulares SH-SY5Y.

Verificou-se, em geral, que as catinonas com maior capacidade inibitória da AChE (**16, 17 e 18**) foram as que apresentaram Log P mais próximo de 0 (Figura 4.25). Por observação da Tabela 4.7 verificou-se que estas catinonas foram também as que apresentaram volumes mais elevados, (232,57 Å³ a 213,28 Å³), e maior flexibilidade com os valores de NRB mais elevados (4 e 5).

Para ambas as linhas celulares, a 4'-CBC (9) e a 3'-CBC (8) são as catinonas com menor valor de LC_{50} , e como tal, são as mais citotóxicas. Através da Figura 4.26 e da Figura 4.27, constatou-se que este grupo de isómeros apresenta os valores mais elevados de $Log P$. Os resultados possivelmente sugerem uma maior afinidade por tecidos lipídicos, como o sistema nervoso central (SNC) devido à sua lipofilicidade, o que pode levar à sua acumulação em tecidos e órgãos específicos [163–165].

Foram ainda efetuados estudos *in silico* para previsão das atividades biológicas das catinonas estudadas de modo a poder extrair maior informação relativamente a estes compostos na sua interação com o organismo (Tabela 4.8). Analisaram-se como possíveis alvos biológicos das catinonas sintéticas, receptores da proteína G (GPCR), os receptores nucleares (NRL), canais iónicos (ICM), cinases (KI), proteases (PI) e enzimas (EI). O potencial das catinonas apresentarem este tipo de efeitos de interação ou inibição, foram obtidos com recurso ao software online Molinspiration [146].

Tabela 4.8 - Resultados preditivos da bioatividade das catinonas estudadas (1-22) em relação aos alvos biológicos: Receptores acoplados à proteína G (GPCR), Modulador de canal iónico (ICM), Inibidor de cinase (KI), Ligante de receptor nuclear (NRL), Inibidor de protease (PI) e Inibidor de enzima (EI).

Catinonas	GPCR	ICM	KI	NRL	PI	EI
2'-CMC (1)	-0,745	-0,191	-1,055	-1,037	-1,171	-0,496
3'-CMC (2)	-0,600	-0,207	-1,092	-1,185	-1,050	-0,481
4'-CMC (3)	-0,616	-0,224	-1,068	-1,168	-1,053	-0,480
2'-CEC (4)	-0,608	-0,130	-1,032	-0,893	-1,160	-0,391
3'-CEC (5)	-0,474	-0,144	-1,066	-1,030	-1,047	-0,377
4'-CEC (6)	-0,489	-0,160	-1,044	-1,014	-1,050	-0,376
3'-CBC (8)	-0,247	-0,041	-0,755	-0,857	-0,708	-0,205
4'-CBC (9)	-0,259	-0,055	-0,736	-0,843	-0,711	-0,204
2'-CI-PPP (10)	-0,374	0,005	-0,743	-0,710	-0,775	-0,232
3'-CI-PPP (11)	-0,256	-0,007	-0,773	-0,830	-0,676	-0,220
4'-CI-PPP (12)	-0,269	-0,021	-0,754	-0,816	-0,679	-0,220
2'-CDC (13)	-0,624	-0,135	-0,905	-0,885	-1,022	-0,407
3'-CDC (14)	-0,490	-0,149	-0,940	-1,023	-0,909	-0,393
4'-CDC (15)	-0,505	-0,165	-0,918	-1,006	-0,913	-0,393
3'-CI-DEC (16)	-0,287	-0,063	-0,793	-0,753	-0,787	-0,239
4'-CI-DEC (17)	-0,300	-0,077	-0,774	-0,739	-0,790	-0,238
3'-CIC (18)	-0,449	-0,184	-0,799	-0,838	-0,786	-0,385
4'-CIC (19)	-0,463	-0,199	-0,778	-0,823	-0,789	-0,384
3'-CI-TBC (20)	-0,312	-0,252	-0,786	-0,819	-0,778	-0,424
4'-CI-TBC (21)	-0,324	-0,266	-0,767	-0,804	-0,781	-0,424
Mefedrona (22)	-0,691	-0,343	-1,105	-1,186	-1,078	-0,519

Tendo em consideração os parâmetros de bioatividade previamente discutidos no ponto 3.8, através da Tabela 4.8 verificou-se que todas as catinonas são previstas como moderadamente ativas para os diferentes alvos biológicos, uma vez que os valores obtidos foram superiores a -5.

A 2'-Cl-PPP (**12**) foi a única catinona que apresentou um valor superior a 0 para ICM e, como tal é prevista como moduladora de canais iônicos. Uma vez que, canais iônicos são proteínas de membrana para transporte seletivo de íons, têm particular importância a nível neuronal e muscular, na transmissão do impulso nervoso e na contração muscular [166]. Os compostos modeladores destes canais podem afetar o fluxo de íons nas células, portanto, todas as catinonas, e em específico 2'-Cl-PPP (**12**) poderão, de acordo com os resultados obtidos, previsivelmente ter efeito sobre o SNC ou SNP por interação com os canais iônicos. Caso isso ocorra nas células neuronais pré-sinápticas, isto pode afetar a libertação dos neurotransmissores e o efeito sobre recetores de nicotínicos de acetilcolina (nAChR) e o recetor de serotonina (SER) [167]. Note-se que a interação do fármaco 3'-Cl-TBC (**20**) com os recetores nAChR e SER já foram descritos e também a inibição dos transportadores de norepinefrina (NET) e de dopamina (DAT) [168]. Para as restantes catinonas aqui estudadas não há ainda resultados experimentais, mas este tipo de interações previstas pode justificar alguns efeitos reportados sobre os consumidores destas substâncias de abuso.

Segundo os resultados obtidos na Tabela 4.8, as catinonas podem ainda atuar em vários alvos biológicos afetando a sua atividade. Os receptores acoplados à proteína G representam a maior família de proteínas de membrana humanas e desempenham um papel fundamental na sinalização celular atuando como reguladores da cascata de sinalização em diversos processos fisiológicos, sendo responsáveis por transmitir estímulos extracelulares para o interior da célula [169,170]. Uma vez que as cinases são essenciais na regulação de funções celulares, como por exemplo a diferenciação, o metabolismo e a sobrevivência, os seus inibidores são usualmente utilizados para interromper o ciclo celular e a divisão de células [171]. Os ligantes de receptores nucleares são essenciais na regulação da expressão de genes, uma vez que regulam a transcrição por ativação dos receptores nucleares [172]. Os inibidores de protease consistem em enzimas que inibem a hidrólise da ligação peptídica, afetando processos biológicos essenciais na digestão de alimentos, degradação lisossomal, e cascatas de sinalização [173].

Embora as previsões *in silico* possam fornecer informações e previsões valiosas, necessitam de verificação experimental. Quer as previsões obtidas *in silico* do possível efeito sobre todos estes alvos, quer os resultados obtidos experimentalmente neste trabalho, sugerem que o consumo das catinonas estudadas pode ter consequências fisiológicas complexas, o que torna a sua elucidação extremamente importante para controlar o seu consumo.

5. Considerações Finais e Perspetivas Futuras

O surgimento constante de novas catinonas sintéticas continua a levantar preocupações devido à escassa informação relativa às suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, e sobre o impacto que tem sobre algumas funções biológicas, contribuindo para uma ameaça pública acrescida.

Este trabalho teve por objetivo a avaliação da toxicidade *in vitro* de catinonas sintéticas em linhas celulares de hepatocarcinoma (HepG2) e em linhas celulares diferenciadas de neuroblastoma (SH-SY5Y) e ainda, pela primeira vez, a avaliação da capacidade inibitória enzimática da acetilcolinesterase (AChE).

No total foram testadas 21 de 22 catinonas estipuladas, das quais 19 foram adquiridas de projetos paralelos realizados na FCUL. Foram sintetizadas com sucesso 3'-CBC (8) e a 4'-CBC (9) tendo-se obtido 1,15 g e 1,58 g, respetivamente, correspondentes a 14% e 21% de rendimento. Não foi possível sintetizar a 2'-CBC (7) presumivelmente devido à baixa reatividade da 2'-cloro-2-bromopropiofenona (27).

A capacidade inibitória da acetilcolinesterase foi testada para concentrações 0,03 – 2 mM tendo-se obtido valores de IC₅₀ entre [0,1 – 1,3] mM. Das diversas catinonas estudadas, a 4'-Cl-DEC (17) foi a que apresentou maior inibição.

Para a linha celular HepG2, a citotoxicidade foi avaliada num intervalo de 0,3 – 6 mM, tendo-se observado valores de LC₅₀ entre [0,8 – 5,7] mM. Verificou-se que a 4'-CBC (9) foi a catinona que apresentou maior citotoxicidade para esta linha celular.

Para a linha celular SH-SY5Y, a citotoxicidade foi avaliada num intervalo de 0,05 – 5 mM obtendo-se valores de LC₅₀ compreendidos entre [0,6 – 2,5] mM, tendo-se observado que também para esta linha celular a 4'-CBC (9) foi a catinona mais citotóxica.

De um modo geral, procurou-se determinar qual o efeito da posição do átomo de cloro no anel aromático e o efeito da variação da cadeia lateral do grupo amino das diferentes catinonas, através da comparações de características estruturais semelhantes.

Assim, para o ensaio com a AChE, verificou-se que a posição do átomo na posição *orto* possibilita uma maior capacidade de inibição da enzima. Adicionalmente, denotou-se que o aumento das cadeias *N*-alquílicas e *N,N*-dialquílicas e uma menor ramificação da cadeia lateral do grupo amino se traduz num maior efeito inibitório sobre a atividade da AChE.

Quanto aos estudos de citotoxicidade em linhas celulares não se constatou nenhum padrão de relação entre a posição do átomo de cloro no anel aromático e a citotoxicidade para a linha celular das HepG2, no entanto, para a linha celular das SH-SY5Y verificou-se que, em geral, os isómeros *meta* exibem uma menor citotoxicidade relativamente ao restantes regioisómeros. Além disso,

constatou-se que o aumento da cadeia alifática do grupo amino, em ambas as linhas celulares, se traduz num aumento do seu potencial citotóxico, tanto para catinonas com um grupo amino secundário (*N*-alquílicas) como para um grupo amino terciário (*N,N*-dialquílicas). Para as SH-SY5Y verificou-se ainda que ocorre uma maior citotoxicidade com o aumento da ramificação do grupo amino. Relativamente aos substituintes no anel aromático denotou-se que, para as duas linhas celulares, a presença de um átomo de cloro aumenta a citotoxicidade relativamente ao grupo metilo na mesma posição, por comparação da 4'-CMC (**3**) com a mefedrona (**22**), respetivamente. Assim, neste trabalho constatou-se que a estrutura química das catinonas sintéticas está relacionada com a forma como interagem com diferentes alvos biológicos e potencialmente com alguns efeitos inerentes ao seu consumo.

O estudo realizado foi complementado com ensaios *in silico*. As previsões das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas das diferentes catinonas, sugerem que todas as catinonas são facilmente absorvidas oralmente e apresentam características propícias que lhes permitem atravessar as barreiras hematoencefálica e gastrointestinal. Adicionalmente, previu-se que a sua polaridade pode estar associada aos efeitos biológicos experimentalmente determinados.

Este trabalho contribuiu para alargar o conhecimento sobre os efeitos de toxicidade inerentes ao consumo das catinonas sintéticas, sobre os quais ainda existe pouca informação. Verificou-se que a sua estrutura influencia o modo como interagem com o organismo.

Atendendo aos resultados obtidos, futuramente seria importante que se realizassem outros estudos biológicos, como por exemplo: *docking* sobre locais de interação das catinonas na acetilcolinesterase de modo a compreender o mecanismo inibitório; mecanismos subjacentes aos efeitos tóxicos das catinonas determinadas como mais citotóxicas, nomeadamente as CBC (**8-9**), por já existirem estudos que demonstram que os mecanismos subjacentes à toxicidade de algumas catinonas, em células neuronais e hepáticas, se deva principalmente ao stress oxidativo, disfunção mitocondrial, e à depleção de ATP [60,174,175]; e investigar os efeitos dessas substâncias ao nível do metabolismo celular através de estudos de metabolómica. Além disso, tendo em consideração os resultados obtidos *in silico*, seria de todo o interesse estudar ainda os regioisómeros Cl-PPP (**10-12**) como moduladores dos canais iónicos.

6. Referências

- [1] World Health Organization (WHO). Drugs (psychoactive), (Acedido a 27 de Agosto de 2022). <https://www.who.int/health-topics/drugs-psychoactive>
- [2] Müller, C.P., Schumann, G. (2011) Drugs as instruments: A new framework for non-addictive psychoactive drug use, *Behavioral and Brain Sciences*, 34(6), 293–310. <https://doi.org/10.1017/S0140525X11000057>
- [3] Kadam, K. (2019) New Psychoactive Substances: An Emerging Epidemic, , 86–91. <https://doi.org/10.4103/aip.aip>
- [4] UNODC. Single convention on narcotic drugs, 1961, (Acedido a 29 de Agosto de 2022). <https://www.unodc.org/unodc/en/treaties/single-convention.html>
- [5] UNODC. Convention on Psychotropic Substances, 1971, (Acedido a 29 de Agosto de 2022). <https://www.unodc.org/unodc/en/treaties/psychotropics.html>
- [6] UNODC. United Nations Convention against Illicit Traffic in Narcotic Drugs and Psychotropic Substances, 1988, (Acedido a 29 de Agosto de 2022). <https://www.unodc.org/unodc/en/treaties/illicit-trafficking.html>
- [7] UNODC. Legal Framework for Drug Trafficking, (Acedido a 29 de Agosto de 2022). <https://www.unodc.org/unodc/en/drug-trafficking/legal-framework.html>
- [8] UNODC. Treaties, (Acedido a 29 de Agosto de 2022). <https://www.unodc.org/unodc/en/treaties/index.html>
- [9] Majchrzak, M., Celiński, R., Kuś, P., Kowalska, T., Sajewicz, M. (2018) The newest cathinone derivatives as designer drugs: an analytical and toxicological review, *Forensic Toxicology*, 36(1), 33–50. <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0385-6>
- [10] UNODC. (2013) The Challenge of New Psychoactive Substances: Global SMART Programme, United Nations publication, Vienna.
- [11] Shafi, A., Berry, A.J., Sumnall, H., Wood, D.M., Tracy, D.K. (2020) New psychoactive substances: a review and updates, *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 10. <https://doi.org/10.1177/2045125320967197>
- [12] UNODC. (2021) World Drug Report 2021, United Nations publication, Vienna.
- [13] Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro, *Diário da República n.º 18/1993, Série I-A de 1993-01-22*. Ministério da Saúde, Lisboa. p. 234–52.
- [14] Decreto-Lei n.º 54/2013, de 17 de abril, *Diário da República n.º 75/2013, Série I de 2013-04-17*. Ministério da Saúde, Lisboa. p. 2250–4.
- [15] EMCDDA-Europol. (2019) EU Drug Markets Report 2019, Publications Office of the European Union, Luxembourg. <https://doi.org/10.2810/766585>

- [16] Maurer, H., Brandt, S. (2018) *New Psychoactive Substances: Pharmacology, Clinical, Forensic and Analytical Toxicology (Handbook of Experimental Pharmacology)*, 1st Edition. Springer, Cham, Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-10561-7>
- [17] SICAD. Ponto Focal do OEDT, (Acedido a 26 de Fevereiro de 2023). <https://www.sicad.pt/PT/RelacoesInternacionais/SitePages/PontoFocalOEDT.aspx>
- [18] EMCDDA. (2022) *European Drug Report 2022: Trends and Developments*, Publications Office of the European Union, Luxemburgo. <https://doi.org/10.2810/21871>
- [19] EMCDDA. (2023) *European Drug Report 2023: Trends and Developments*, <https://doi.org/10.2810/161905>
- [20] EMCDDA. (2022) *New psychoactive substances: 25 years of early warning and response in Europe. An update from the EU Early Warning System*, Publications Office of the European Union, Luxemburgo. <https://doi.org/10.2810/882318>
- [21] Getasetegn, M. (2016) Chemical composition of *Catha edulis* (khat): a review, *Phytochemistry Reviews*, 15(5), 907–20. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9435-z>
- [22] Odenwald, M., Neuner, F., Schauer, M., Elbert, T., Catani, C., Lingenfelder, B., Hinkel, H., Häfner, H., Rockstroh, B. (2005) Khat use as risk factor for psychotic disorders: A cross-sectional and case-control study in Somalia, *BMC Medicine*, 3(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-3-5>
- [23] Nakajima, M., Molla, K., Belachew, B., Mohammed, A., Hassan, A., Kroll, J., al’Absi, M. (2017) Khat Use is Associated with Tobacco, Alcohol, and Illicit Drug Use: A Cross-Sectional Examination in the United States, *Journal of Psychoactive Drugs*, 49(5), 413–9. <https://doi.org/10.1080/02791072.2017.1342155>
- [24] Valente, M.J., Guedes De Pinho, P., De Lourdes Bastos, M., Carvalho, F., Carvalho, M. (2014) Khat and synthetic cathinones: A review, *Archives of Toxicology*, 88(1), 15–45. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1163-9>
- [25] Hyde, J.F., Browning, E., Adams, R. (1928) Synthetic Homologs of d,I- Ephedrine, *Journal of the American Chemical Society*, 50(8), 2287–92. <https://doi.org/10.1021/ja01395a032>
- [26] Prosser, J.M., Nelson, L.S. (2012) The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones, *Journal of Medical Toxicology*, 8(1), 33–42. <https://doi.org/10.1007/s13181-011-0193-z>
- [27] Ioannides-Demos, L.L., Piccenna, L., McNeil, J.J. (2011) Pharmacotherapies for Obesity: Past, Current, and Future Therapies, Halperneditor *Journal of Obesity*, 2011, 179674. <https://doi.org/10.1155/2011/179674>
- [28] Onakpoya, I.J., Heneghan, C.J., Aronson, J.K. (2016) Post-marketing withdrawal of anti-obesity medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review, *BMC Medicine*, 14(1), 191. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0735-y>

- [29] Patel, K., Allen, S., Haque, M.N., Angelescu, I., Baumeister, D., Tracy, D.K. (2016) Bupropion: a systematic review and meta-analysis of effectiveness as an antidepressant, *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 6(2), 99–144. <https://doi.org/10.1177/2045125316629071>
- [30] Howes, S., Hartmann-Boyce, J., Livingstone-Banks, J., Hong, B., Lindson, N. (2020) Antidepressants for smoking cessation, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2021(4). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000031.pub5>
- [31] Saunders, K.H., Umashanker, D., Igel, L.I., Kumar, R.B., Aronne, L.J. (2018) Obesity Pharmacotherapy, *Medical Clinics of North America*, 102(1), 135–48. <https://doi.org/10.1016/J.MCNA.2017.08.010>
- [32] Kelly, J.P. (2011) Cathinone derivatives: A review of their chemistry, pharmacology and toxicology, *Drug Testing and Analysis*, 3(7–8), 439–53. <https://doi.org/10.1002/dta.313>
- [33] Verbeeck, W., Bekkering, G.E., Van den Noortgate, W., Kramers, C. (2017) Bupropion for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in adults, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10(10). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009504.pub2>
- [34] Costa, R., Oliveira, N.G., Dinis-Oliveira, R.J. (2019) Pharmacokinetic and pharmacodynamic of bupropion: integrative overview of relevant clinical and forensic aspects, *Drug Metabolism Reviews*, 51(3), 293–313. <https://doi.org/10.1080/03602532.2019.1620763>
- [35] Carhart-Harris, R.L., King, L.A., Nutt, D.J. (2011) A web-based survey on mephedrone, *Drug and Alcohol Dependence*, 118(1), 19–22. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2011.02.011>
- [36] Paul, M.J., Chisolm, M.S., Johnson, M.W., Vandrey, R.G., Dredze, M. (2016) Assessing the Validity of Online Drug Forums as a Source for Estimating Demographic and Temporal Trends in Drug Use, *Journal of Addiction Medicine*, 10(5), 324–30. <https://doi.org/10.1097/ADM.0000000000000238>
- [37] UNODC. (2022) World Drug Report 2022, United Nations publication, Vienna.
- [38] Arillotta, D., Guirguis, A., Corkery, J.M., Scherbaum, N., Schifano, F. (2021) Covid-19 pandemic impact on substance misuse: A social media listening, mixed method analysis, *Brain Sciences*, 11(7), 907. <https://doi.org/10.3390/brainsci11070907>
- [39] Coppola, M., Mondola, R. (2012) Synthetic cathinones: Chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as “bath salts” or “plant food”, *Toxicology Letters*, . 211(2), 144–9. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2012.03.009>
- [40] Soares, J., Costa, V.M., Bastos, M. de L., Carvalho, F., Capela, J.P. (2021) An updated review on synthetic cathinones, *Archives of Toxicology*, 95(9), 2895–940. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03083-3>
- [41] Paillet-Loilier, M., Cesbron, A., Le Boisselier, R., Bourguine, J., Debruyne, D. (2014) Emerging drugs of abuse: current perspectives on substituted cathinones, *Substance Abuse and Rehabilitation*, 26(5), 37–52. <https://doi.org/10.2147/sar.s37257>

- [42] Marshall, G., Raveendran, R.R. (2019) Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology (General and Molecular Pharmacology: Principles of Drug Action), 1st Edition. Springer, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9779-1>
- [43] López-Arnau, R., Martínez-Clemente, J., Carbó, M., Pubill, D., Escubedo, E., Camarasa, J. (2013) An integrated pharmacokinetic and pharmacodynamic study of a new drug of abuse, methylone, a synthetic cathinone sold as «bath salts», *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 45, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.04.007>
- [44] Martínez-Clemente, J., López-Arnau, R., Carbó, M., Pubill, D., Camarasa, J., Escubedo, E. (2013) Mephedrone pharmacokinetics after intravenous and oral administration in rats: Relation to pharmacodynamics, *Psychopharmacology*, 229(2), 295–306. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3108-7>
- [45] Findlay, J.W.A., Van, J., Fleet, W., Smith, P.G., Butz, R.F., Hinton, M.L., Blum, M.R., Schroeder, D.H. (1981) Pharmacokinetics of Bupropion, a Novel Antidepressant Agent, Following Oral Administration to Healthy Subjects, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 21(2), 127–35. <https://doi.org/10.1007/BF00637513>
- [46] U.S. Food and Drug Administration (FDA). (2009) Wellbutrin® (bupropion hydrochloride), *GlaxoSmithKline*.
- [47] Schifano, F., Albanese, A., Fergus, S., Stair, J.L., Deluca, P., Corazza, O., Davey, Z., Corkery, J., Siemann, H., Scherbaum, N., Farre', M., Torrens, M., Demetrovics, Z., Ghodse, A.H., Mapping, P.W., Groups, R.R. (2011) Mephedrone (4-methylmethcathinone; 'meow meow'): chemical, pharmacological and clinical issues, *Psychopharmacology*, 214(3), 593–602. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2070-x>
- [48] Néfaù, T., Charpentier, E., Elyasmino, N., Duplessy-Garson, C., Levi, Y., Karolak, S. (2015) Drug analysis of residual content of used syringes: A new approach for improving knowledge of injected drugs and drug user practices, *International Journal of Drug Policy*, 26(4), 412–9. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGPO.2014.09.010>
- [49] Smith, A. (2023) Neurovascular Unit of the Mammalian Brain 5 x 5 in. , (Acedido a 8 de Novembro de 2023). <https://app.biorender.com/profile/ASmithVala/templates/64ac6fb758a00565db679bf0>
- [50] Almeida, A.S., Silva, B., Remião, F., Fernandes, C. (2023) Assessment of the Permeability of 3,4-Methylenedioxypyrovalerone (MDPV) across the Caco-2 Monolayer for Estimation of Intestinal Absorption and Enantioselectivity, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/ijms24032680>
- [51] Silva, B., Silva, R., Fernandes, C., Guedes de Pinho, P., Remião, F. (2020) Enantioselectivity on the absorption of methylone and pentedrone using Caco-2 cell line: Development and validation of an UHPLC method for cathinones quantification, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 395, 114970. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2020.114970>

- [52] Zawilska, J.B., Wojcieszak, J. (2013) Designer cathinones—An emerging class of novel recreational drugs, *Forensic Science International*, 231(1–3), 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.04.015>
- [53] Grecco, G.G., Kisor, D.F., Magura, J.S., Sprague, J.E. (2017) Impact of common clandestine structural modifications on synthetic cathinone “bath salt” pharmacokinetics, *Toxicology and Applied Pharmacology*, . 328, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.05.010>
- [54] Fabregat-Safont, D., Barneo-Muñoz, M., Carbón, X., Hernández, F., Martínez-García, F., Ventura, M., Stove, C.P., Sancho, J. V, Ibáñez, M. (2021) Understanding the pharmacokinetics of synthetic cathinones: Evaluation of the blood–brain barrier permeability of 13 related compounds in rats, *Addiction Biology*, 26(3). <https://doi.org/10.1111/adb.12979>
- [55] Novellas, J., López-Arnau, R., Carbó, M., Pubill, D., Camarasa, J., Escubedo, E. (2015) Concentrations of MDPV in rat striatum correlate with the psychostimulant effect, *Journal of Psychopharmacology*, 29(11), 1209–18. <https://doi.org/10.1177/0269881115598415>
- [56] Štefková, K., Židková, M., Horsley, R.R., Pinterová, N., Šíchová, K., Uttl, L., Balíková, M., Danda, H., Kuchař, M., Páleníček, T. (2017) Pharmacokinetic, Ambulatory, and Hyperthermic Effects of 3,4-Methylenedioxy-N-Methylcathinone (Methylone) in Rats, *Frontiers in Psychiatry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2017.00232>
- [57] Buzhdygan, T.P., Rodrigues, C.R., McGary, H.M., Khan, J.A., Andrews, A.M., Rawls, S.M., Ramirez, S.H. (2021) The psychoactive drug of abuse mephedrone differentially disrupts blood-brain barrier properties, *Journal of Neuroinflammation*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02116-z>
- [58] Simmler, L.D., Buser, T.A., Donzelli, M., Schramm, Y., Dieu, L.H., Huwyler, J., Chaboz, S., Hoener, M.C., Liechti, M.E. (2013) Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro, *British Journal of Pharmacology*, 168(2), 458–70. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02145.x>
- [59] Wojcieszak, J., Andrzejczak, D., Woldan-Tambor, A., Zawilska, J.B. (2016) Cytotoxic Activity of Pyrovalerone Derivatives, an Emerging Group of Psychostimulant Designer Cathinones, *Neurotoxicity Research*, 30(2), 239–50. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9640-6>
- [60] Valente, M.J., Araújo, A.M., Bastos, M. de L., Fernandes, E., Carvalho, F., Guedes de Pinho, P., Carvalho, M. (2016) Characterization of hepatotoxicity mechanisms triggered by designer cathinone drugs (β -keto amphetamines), *Toxicological Sciences*, 153(1), 89–102. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw105>
- [61] Araújo, A.M., Valente, M.J., Carvalho, M., Dias da Silva, D., Gaspar, H., Carvalho, F., de Lourdes Bastos, M., Guedes de Pinho, P. (2015) Raising awareness of new psychoactive substances: chemical analysis and in vitro toxicity screening of ‘legal high’ packages containing synthetic cathinones, *Archives of Toxicology*, 89(5), 757–71. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1278-7>

- [62] Valente, M.J., Araújo, A.M., Silva, R., Bastos, M. de L., Carvalho, F., Guedes de Pinho, P., Carvalho, M. (2016) 3,4-Methylenedioxypropylone (MDPV): in vitro mechanisms of hepatotoxicity under normothermic and hyperthermic conditions, *Archives of Toxicology*, 90(8), 1959–73. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1653-z>
- [63] Gaspar, H., Bronze, S., Oliveira, C., Victor, B.L., Machuqueiro, M., Pacheco, R., Caldeira, M.J., Santos, S. (2018) Proactive response to tackle the threat of emerging drugs: Synthesis and toxicity evaluation of new cathinones, *Forensic Science International*, 290, 146–56. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.07.001>
- [64] Tekade, R. (2022) Pharmacokinetics and Toxicokinetic Considerations (Advances in Pharmaceutical Product Development and Research), 1st Edition. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2021-0-01019-1>
- [65] Pedersen, A.J., Reitzel, L.A., Johansen, S.S., Linnet, K. (2013) In vitro metabolism studies on mephedrone and analysis of forensic cases, *Drug Testing and Analysis*, 5(6), 430–8. <https://doi.org/10.1002/dta.1369>
- [66] Tyrkkö, E., Andersson, M., Kronstrand, R. (2016) The Toxicology of New Psychoactive Substances: Synthetic Cathinones and Phenylethylamines, *Therapeutic Drug Monitoring*, 38(2), 190–216. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000263>
- [67] Nelson, M.E., Bryant, S.M., Aks, S.E. (2014) Emerging drugs of abuse, *Disease-a-Month*, 60(3), 110–32. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2014.01.001>
- [68] Hohmann, N., Mikus, G., Czock, D. (2014) Effects and Risks Associated with Novel Psychoactive Substances: mislabeling and sale as bath salts, spice, and research chemicals, *Deutsches Arzteblatt International*, 111(9), 139–47. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0139>
- [69] Krotulski, A.J., Mohr, A.L.A., Papsun, D.M., Logan, B.K. (2018) Dibutylone (bk-DMBDB): Intoxications, Quantitative Confirmations and Metabolism in Authentic Biological Specimens, *Journal of Analytical Toxicology*, 42(7), 437–45. <https://doi.org/10.1093/jat/bky022>
- [70] World Health Organization (WHO). (2004) Neuroscience of Psychoactive Substance Use and Dependence, WHO Press, Geneva.
- [71] Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L., LaMantia, A.S., McNamara, J., Williams, S.M. (2018) Neurotransmitter Release and Removal, *Neuroscience*, 6th Edition. Sinauer Associates, New York.
- [72] Kumar, P., Bataineh, Y., Salem, M. (2020) Neurotransmitters and Their Receptors - State of the Art, *Frontiers in Pharmacology of Neurotransmitters*, Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3556-7_1
- [73] Jitcă, G., Ősz, B.E., Tero-Vescan, A., Vari, C.E. (2021) Psychoactive drugs—from chemical structure to oxidative stress related to dopaminergic neurotransmission. A review, *Antioxidants*, 10(3), 1–28. <https://doi.org/10.3390/antiox10030381>

- [74] Cozzi, N. V., Sievert, M.K., Shulgin, A.T., Jacob, P., Ruoho, A.E. (1999) Inhibition of plasma membrane monoamine transporters by β -ketoamphetamines, *European Journal of Pharmacology*, 381(1), 63–9. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00538-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00538-5)
- [75] Luethi, D., Kolaczynska, K.E., Docci, L., Krähenbühl, S., Hoener, M.C., Liechti, M.E. (2018) Pharmacological profile of mephedrone analogs and related new psychoactive substances, *Neuropharmacology*, 134, 4–12. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2017.07.026>
- [76] Baumann, M.H., Partilla, J.S., Lehner, K.R., Thorndike, E.B., Hoffman, A.F., Holy, M., Rothman, R.B., Goldberg, S.R., Lupica, C.R., Sitte, H.H., Brandt, S.D., Tella, S.R., Cozzi, N. V., Schindler, C.W. (2013) Powerful Cocaine-Like Actions of 3,4-Methylenedioxypropylamphetamine (MDPV), a Principal Constituent of Psychoactive ‘Bath Salts’ Products, *Neuropsychopharmacology*, 38(4), 552–62. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.204>
- [77] Baumann, M.H., Walters, H.M., Niello, M., Sitte, H.H. (2018) Neuropharmacology of synthetic cathinones, *Handbook of Experimental Pharmacology*, 252, 113–42. https://doi.org/10.1007/164_2018_178
- [78] Altun, B., Çok, İ. (2020) Psychoactive bath salts and neurotoxicity risk, *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(2), 235–41. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2018.40820>
- [79] Almeida, A.S., Silva, B., de Pinho, P.G., Remião, F., Fernandes, C. (2022) Synthetic Cathinones: Recent Developments, Enantioselectivity Studies and Enantioseparation Methods, *Molecules*, 27(7). <https://doi.org/10.3390/molecules27072057>
- [80] López-Arnau, R., Martínez-Clemente, J., Pubill, D., Escubedo, E., Camarasa, J. (2012) Comparative Neuropharmacology of Three Psychostimulant Cathinone Derivatives: Butylone, Mephedrone and Methylone, *British Journal of Pharmacology*, 167(2), 407–20. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01998.x>
- [81] Gawel, K., Jenda, M., Kotlinska, J.H. (2012) The role of acetylcholine in drug addiction, *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 25(2), 212–7. <https://doi.org/10.12923/j.2084-980X/25.2/a.23>
- [82] Wise, R.A., Jordan, C.J. (2021) Dopamine, behavior, and addiction, *Journal of Biomedical Science*, 28(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00779-7>
- [83] Subramaniyan, M., Dani, J.A. (2015) Dopaminergic and cholinergic learning mechanisms in nicotine addiction, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1349(1), 46–63. <https://doi.org/10.1111/nyas.12871>
- [84] Sofuoglu, M., Mooney, M. (2009) Cholinergic Functioning in Stimulant Addiction: Implications for Medications Development, *CNS drugs*, 23(11), 939–52. <https://doi.org/10.2165/11310920-000000000-00000>
- [85] Klein, M.O., Battagello, D.S., Cardoso, A.R., Hauser, D.N., Bittencourt, J.C., Correa, R.G. (2019) Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39(1), 31–59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>

- [86] Acharya, S., Kim, K.M. (2021) Roles of the functional interaction between brain cholinergic and dopaminergic systems in the pathogenesis and treatment of schizophrenia and parkinson's disease, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4299. <https://doi.org/10.3390/ijms22094299>
- [87] Amalric, M., Pattij, T., Sotiropoulos, I., Silva, J.M., Sousa, N., Ztaou, S., Chiamulera, C., Wahlberg, L.U., Emerich, D.F., Paolone, G. (2021) Where Dopaminergic and Cholinergic Systems Interact: A Gateway for Tuning Neurodegenerative Disorders, *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15, 661973. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.661973>
- [88] Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.J. (2006) Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi, *Natural Product Reports*, 23(2), 181–99. <https://doi.org/10.1039/b508966m>
- [89] Colović, M.B., Krstić, D.Z., Lazarević-Pašti, T.D., Bondžić, A.M., Vasić, V.M. (2013) Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology, *Current neuropharmacology*, 11(3), 315–35. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>
- [90] Johnson, G., Moore, S.W. (2006) The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design, *Current pharmaceutical design*, 12(2), 217–25. <https://doi.org/10.2174/138161206775193127>
- [91] Roca, C., Requena, C., Sebastián-Pérez, V., Malhotra, S., Radoux, C., Pérez, C., Martínez, A., Antonio Páez, J., Blundell, T.L., Campillo, N.E. (2018) Identification of new allosteric sites and modulators of AChE through computational and experimental tools, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 1034–47. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1476502>
- [92] Richbart, S.D., Merritt, J.C., Nolan, N.A., Dasgupta, P. (2021) Acetylcholinesterase and human cancers, *Advances in Cancer Research*, 152, 1–66. <https://doi.org/10.1016/BS.ACR.2021.05.001>
- [93] Lott, E., Jones EB. (2022) Cholinergic Toxicity, *StatPearls Publishing*. (Acedido a 5 de Junho de 2023). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539783/>
- [94] Javed, T., Habib, R., Ghafoor, S., Rumman, B., Awan, S., Ntepe, L.J.M., Batool, S., Nurulain, S.M. (2019) Association of status of acetylcholinesterase and ACHE gene 3' UTR variants (rs17228602, rs17228616) with drug addiction vulnerability in pakistani population, *Chemico-Biological Interactions*, 308, 130–6. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.036>
- [95] Abdel-Salam, O.M.E., Youness, E.R., Khadrawy, Y.A., Sleem, A.A. (2016) Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and paraoxonase 1 activities in rats treated with cannabis, tramadol or both, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(11), 1089–94. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.09.009>
- [96] Williams, M.J., Adinoff, B. (2008) The Role of Acetylcholine in Cocaine Addiction, *Neuropsychopharmacology*, 33(8), 1779–97. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301585>
- [97] Arnold, H.M., Fadel, J., Sarter, M., Bruno, J.P. (2001) Amphetamine-stimulated cortical acetylcholine release: role of the basal forebrain, *Brain Research*, 894(1), 74–87. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03328-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03328-X)

- [98] Rodrigues, C.H.P., Bruni, A.T. (2019) In silico toxicity as a tool for harm reduction: A study of new psychoactive amphetamines and cathinones in the context of criminal science, *Science and Justice*, Forensic Science Society. 59(3), 234–47. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2018.11.006>
- [99] de Melo, E.B., Martins, J.P.A., Rodrigues, C.H.P., Bruni, A.T. (2020) In silico Risk Assessment Studies of New Psychoactive Substances Derived from Amphetamines and Cathinones, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 31(5), 927–40. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190258>
- [100] Raies, A.B., Bajic, V.B. (2016) In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 6(2), 147–72. <https://doi.org/10.1002/wcms.1240>
- [101] Madden, J.C., Enoch, S.J., Paini, A., Cronin, M.T.D. (2020) A Review of In Silico Tools as Alternatives to Animal Testing: Principles, Resources and Applications, *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 48(4), 146–72. <https://doi.org/10.1177/0261192920965977>
- [102] Valente, M.J., Bastos, M. de L., Fernandes, E., Carvalho, F., Guedes de Pinho, P., Carvalho, M. (2017) Neurotoxicity of β -Keto Amphetamines: Deathly Mechanisms Elicited by Methylone and MDPV in Human Dopaminergic SH-SY5Y Cells, *ACS Chemical Neuroscience*, 8(4), 850–9. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.6b00421>
- [103] Soares, J., Costa, V.M., Gaspar, H., Santos, S., de Lourdes Bastos, M., Carvalho, F., Capela, J.P. (2019) Structure-cytotoxicity relationship profile of 13 synthetic cathinones in differentiated human SH-SY5Y neuronal cells, *NeuroToxicology*, 75, 158–73. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.08.009>
- [104] UNODC. (2022) Synthetic Drugs in East and Southeast Asia Latest developments and challenges 2022: Global SMART Programme, Vienna.
- [105] den Hollander, B., Sundström, M., Pelander, A., Siltanen, A., Ojanperä, I., Mervaala, E., Korpi, E.R., Kankuri, E. (2015) Mitochondrial respiratory dysfunction due to the conversion of substituted cathinones to methylbenzamides in SH-SY5Y cells, *Scientific Reports*, 5(1), 14924. <https://doi.org/10.1038/srep14924>
- [106] den Hollander, B., Sundström, M., Pelander, A., Ojanperä, I., Mervaala, E., Korpi, E.R., Kankuri, E. (2014) Keto Amphetamine Toxicity—Focus on the Redox Reactivity of the Cathinone Designer Drug Mephedrone, *Toxicological Sciences*, 141(1), 120–31. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu108>
- [107] Martínez-Clemente, J., López-Arnau, R., Abad, S., Pubill, D., Escubedo, E., Camarasa, J. (2014) Dose and Time-Dependent Selective Neurotoxicity Induced by Mephedrone in Mice, *PLoS ONE*, 9(6), e99002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099002>
- [108] Soares, J., Costa, V.M., Gaspar, H., Santos, S., Bastos, M. de L., Carvalho, F., Capela, J.P. (2020) Adverse outcome pathways induced by 3,4-dimethylmethcathinone and 4-methylmethcathinone in differentiated human SH-SY5Y neuronal cells, *Archives of Toxicology*, 94(7), 2481–503. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02761-y>

- [109] EMCDDA, Europol. (2009) EMCDDA–Europol 2008 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA - In accordance with Article 10 of Council Decision 2005/387/JHA on the information exchange, risk-assessment and control of new psychoactive substances, Publications Office of the European Union.
- [110] EMCDDA, Europol. (2016) EMCDDA–Europol 2015 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA – In accordance with Article 10 of Council Decision 2005/387/JHA on the information exchange, risk assessment and control of new psychoactive substances, Implementation reports, Publications Office of the European Union, Luxembourg. <https://doi.org/10.2810/932574>
- [111] EMCDDA, Europol. (2015) EMCDDA–Europol 2014 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA – In accordance with Article 10 of Council Decision 2005/387/JHA on the information exchange, risk assessment and control of new psychoactive substances, Implementation reports, Publications Office of the European Union, Luxembourg. <https://doi.org/10.2810/112317>
- [112] EMCDDA, Europol. (2017) EMCDDA–Europol 2016 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA – In accordance with Article 10 of Council Decision 2005/387/JHA on the information exchange, risk assessment and control of new psychoactive substances, Implementation reports, Publications Office of the European Union, Luxembourg. <https://doi.org/10.2810/430586>
- [113] EMCDDA, Europol. (2018) EMCDDA–Europol 2017 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA – In accordance with Article 10 of Council Decision 2005/387/JHA on the information exchange, risk assessment and control of new psychoactive substances, Implementation reports, Publications Office of the European Union, Luxembourg. <https://doi.org/10.2810/759319>
- [114] EMCDDA. (2022) Report on the risk assessment of 1-(3-chlorophenyl)-2-(methylamino)propan-1-one (3-chloromethcathinone, 3-CMC) in accordance with Article 5c of Regulation (EC) No 1920/2006 (as amended), (35). <https://doi.org/10.2810/671114>
- [115] Tomczak, E., Woźniak, M.K., Kata, M., Wiergowski, M., Szpiech, B., Biziuk, M. (2018) Blood concentrations of a new psychoactive substance 4-chloromethcathinone (4-CMC) determined in 15 forensic cases, *Forensic Toxicology*, 36(2), 476–85. <https://doi.org/10.1007/s11419-018-0427-8>
- [116] Pieprzycza, E., Skowronek, R., Czekaj, P. (2022) Toxicological Analysis of Intoxications with Synthetic Cathinones, *Journal of Analytical Toxicology*, 46(7), 705–11. <https://doi.org/10.1093/jat/bkab102>
- [117] Nowak, K., Szpot, P., Zawadzki, M. (2021) Fatal intoxication with U-47700 in combination with other NPS (N-ethylhexedrone, adinazolam, 4-CIC, 4-CMC) confirmed by identification and quantification in autopsy specimens and evidences, *Forensic Toxicology*, 39(2), 493–505. <https://doi.org/10.1007/s11419-020-00568-1>

- [118] Cheng, W.C., Wong, W.C. (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, *Forensic Science International*, 298, 268–77. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.03.002>
- [119] Chou, H.-H., Hsieh, C.-H., Chaou, C.-H., Chen, C.-K., Yen, T.-H., Liao, S.-C., Seak, C.-J., Chen, H.-Y. (2021) Synthetic cathinone poisoning from ingestion of drug-laced “instant coffee packets” in Taiwan, *Human & Experimental Toxicology*, 40(9), 1403–12. <https://doi.org/10.1177/0960327121996043>
- [120] Mercerolle, M., Denooz, R., Lachâtre, G., Charlier, C. (2008) A Fatal Case of Bupropion (Zyban) Overdose, *Journal of Analytical Toxicology*, 32, 192–6. <https://doi.org/10.1093/jat/32.2.192>
- [121] Ramcharitar, V., Levine, B.S., Goldberger, B.A., Caplan, Y.H. (1992) Bupropion and alcohol fatal intoxication: Case report, *Forensic Science International*, 56(2), 151–6. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(92\)90173-T](https://doi.org/10.1016/0379-0738(92)90173-T)
- [122] Sartori, S., Brilli, V., Lanzi, C., Praticò, L., Sarcoli, E., Di Milia, M.G., Gambassi, F., Mannaioni, G. (2021) Acute intoxication following massive bupropion sniffing: A case report, *Emergency Care Journal*, 17(4). <https://doi.org/10.4081/ecj.2021.10037>
- [123] Livshits, Z., Sampson, B.A., Howland, M.A., Hoffman, R.S., Nelson, L.S. (2015) Retained drugs in the gastrointestinal tracts of deceased victims of oral drug overdose, *Clinical Toxicology*, 53(2), 113–8. <https://doi.org/10.3109/15563650.2014.992528>
- [124] Friel, P.N., Logan, B.K., Fligner, C.L. (1993) Three Fatal Drug Overdoses Involving Bupropion, *Journal of Analytical Toxicology*, 17(7), 436–8. <https://doi.org/10.1093/jat/17.7.436>
- [125] Spiller, H.A., Bottei, E., Kalin, L. (2008) Fatal bupropion overdose with post mortem blood concentrations, *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 4(1), 47–50. <https://doi.org/10.1007/s12024-007-0030-5>
- [126] Majchrzak, M., Celiński, R., Kuś, P., Kowalska, T., Sajewicz, M. (2018) The newest cathinone derivatives as designer drugs: an analytical and toxicological review, *Forensic Toxicology*, 36(1), 33–50. <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0385-6>
- [127] Zaami, S., Giorgetti, R., Pichini, S., Pantano, F., Marinelli, E., Busardò, F.P. (2018) Synthetic cathinones related fatalities: an update, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(1), 268–74. https://doi.org/10.26355/eurrev_201801_14129
- [128] Armarego, WLF., Chai, CLL. (2017) Purification of Laboratory Chemicals, 8th Edition. Butterworth-Heinemann.
- [129] Arzumanian, V.A., Kiseleva, O.I., Poverennaya, E. V. (2021) The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>

- [130] UK Health security Agency. ECACC General Cell Collection: Hep G2, (Acedido a 12 de Janeiro de 2023). https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85011430&collection=ecacc_gc
- [131] DSMZ. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: SH-SY5Y ACC 209, (Acedido a 12 de Janeiro de 2023). <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-209>
- [132] Kovalevich, J., Langford, D. (2013) Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology, *Methods in Molecular Biology*, 1078, 9–21. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2
- [133] Agholme, L., Lindström, T., Kågedal, K., Marcusson, J., Hallbeck, M. (2010) An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons, *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(4), 1069–82. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091363>
- [134] Fulmer, G.R., Miller, A.J.M., Sherden, N.H., Gottlieb, H.E., Nudelman, A., Stoltz, B.M., Bercaw, J.E., Goldberg, K.I. (2010) NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist, *Organometallics*, 29(9), 2176–9. <https://doi.org/10.1021/om100106e>
- [135] Ferro, R. (2022) Síntese de N-alquilamino 2', 3'-ou 4'-Cloropropiofenonas e Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para a sua Identificação em Diversas Matrizes, Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- [136] Meltzer, P.C., Butler, D., Deschamps, J.R., Madras, B.K. (2006) 1-(4-Methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (pyrovalerone) analogues: A promising class of monoamine uptake inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(4), 1420–32. <https://doi.org/10.1021/jm050797a>
- [137] Júlio, S. (2019) Identificação, Síntese e Quantificação de Novas Substâncias Psicoativas, Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- [138] Santali, E.Y., Cadogan, A.-K., Daeid, N.N., Savage, K.A., Sutcliffe, O.B. (2011) Synthesis, full chemical characterisation and development of validated methods for the quantification of (±)-4'-methylmethcathinone (mephedrone): A new “legal high”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(2), 246–55. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.05.022>
- [139] Kalendra, D.M., Sickles, B.R. (2003) Diminished Reactivity of Ortho-Substituted Phenacyl Bromides toward Nucleophilic Displacement, *The Journal of Organic Chemistry*, 68(4), 1594–6. <https://doi.org/10.1021/jo011042o>
- [140] Camilleri, A., Johnston, M.R., Brennan, M., Davis, S., Caldicott, D.G.E. (2010) Chemical analysis of four capsules containing the controlled substance analogues 4-methylmethcathinone, 2-fluoromethamphetamine, α -phthalimidopropiophenone and N-ethylcathinone, *Forensic Science International*, 197(1), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.12.048>

- [141] Falé, P.L., Ferreira, C., Rodrigues, A.M., Cleto, P., Amorim Madeira, P.J., Florêncio, M.H., Frazão, F.N., Serralheiro, M.L.M. (2013) Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion, *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(20), 1370–8. <https://doi.org/10.5897/JMPR13.4438>
- [142] Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- [143] Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2005) Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity, *Biomarkers*, 10(5), 360–75. <https://doi.org/10.1080/13547500500264660>
- [144] Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., Kempson, I. (2021) The Mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- [145] Silva, J., Alves, C., Pinteus, S., Susano, P., Simões, M., Guedes, M., Martins, A., Rehfeldt, S., Gaspar, H., Goettert, M., Alfonso, A., Pedrosa, R. (2021) Disclosing the potential of eleanolone for Parkinson's disease therapeutics: Neuroprotective and anti-inflammatory activities, *Pharmacological Research*, 168, 105589. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2021.105589>
- [146] Molinspiration Cheminformatics free web services, Slovensky Grob, Eslováquia, <https://www.molinspiration.com>.
- [147] Molinspiration. (2005) logP-octanol-water partition coefficient calculation, (Acedido a 17 de Setembro de 2022). <http://www.molinspiration.com/services/logp.html>
- [148] Ertl, P., Rohde, B., Selzer, P. (2000) Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties, *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(20), 3714–7. <https://doi.org/10.1021/jm000942e>
- [149] Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.Y., Smith, B.R., Ward, K.W., Kopple, K.D. (2002) Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615–23. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>
- [150] Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1–3), 3–26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
- [151] Flores-Holguín, N., Frau, J., Glossman-Mitnik, D. (2019) Chemical Reactivity Properties and Bioactivity Scores of the Angiotensin II Vasoconstrictor Octapeptide, *Cheminformatics and its Applications*, IntechOpen, Rijeka. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86736>
- [152] Yang, H., Lou, C., Sun, L., Li, J., Cai, Y., Wang, Z., Li, W., Liu, G., Tang, Y. (2019) AdmetSAR 2.0: Web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties, *Bioinformatics*, 35(6), 1067–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty707>

- [153] Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. (2017) SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- [154] Pires, D.E.V., Blundell, T.L., Ascher, D.B. (2015) pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures, *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(9), 4066–72. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>
- [155] Fryhle, C.B., Snyder, S.A., Solomons, G. (2016) Organic Chemistry, 12th Edition. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- [156] Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. (2012) Organic Chemistry, 2nd Edition. Oxford University Press, New York.
- [157] Motulsky, H.J. (2007) Prism 5 Statistics Guide, GraphPad Software Inc., San Diego CA, (Acedido a 27 de Agosto de 2023). <https://www.graphpad.com/>
- [158] Donato, M.T., Tolosa, L., Gómez-Lechón, M.J. (2015) Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells, *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, Springer, New York. p. 77–93. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5
- [159] Ray, A., Chitre, N.M., Daphney, C.M., Blough, B.E., Canal, C.E., Murnane, K.S. (2019) Effects of the second-generation «bath salt» cathinone alpha-pyrrolidinopropiophenone (α -PPP) on behavior and monoamine neurochemistry in male mice, *Psychopharmacology*, 236(3), 1107–17. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5044-z>
- [160] Gannon, B.M., Baumann, M.H., Walther, D., Jimenez-Morigosa, C., Sulima, A., Rice, K.C., Collins, G.T. (2018) The abuse-related effects of pyrrolidine-containing cathinones are related to their potency and selectivity to inhibit the dopamine transporter, *Neuropsychopharmacology*, 43(12), 2399–407. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0209-3>
- [161] Duart-Castells, L., Nadal-Gratacós, N., Muralter, M., Puster, B., Berzosa, X., Estrada-Tejedor, R., Niello, M., Bhat, S., Pubill, D., Camarasa, J., Sitte, H.H., Escubedo, E., López-Arnau, R. (2021) Role of amino terminal substitutions in the pharmacological, rewarding and psychostimulant profiles of novel synthetic cathinones, *Neuropharmacology*, 186, 108475. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108475>
- [162] Bannan, C.C., Calabró, G., Kyu, D.Y., Mobley, D.L. (2016) Calculating Partition Coefficients of Small Molecules in Octanol/Water and Cyclohexane/Water, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(8), 4015–24. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00449>
- [163] Lindsley, C.W. (2014) Lipophilicity, *Encyclopedia of Psychopharmacology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. p. 1–6. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27772-6_7015-1
- [164] Endo, S., Escher, B.I., Goss, K.-U. (2011) Capacities of Membrane Lipids to Accumulate Neutral Organic Chemicals, *Environmental Science & Technology*, 45(14), 5912–21. <https://doi.org/10.1021/es200855w>

- [165] Bourez, S., Van den Daelen, C., Le Lay, S., Poupaert, J., Larondelle, Y., Thomé, J.-P., Schneider, Y.-J., Dugail, I., Debier, C. (2013) The dynamics of accumulation of PCBs in cultured adipocytes vary with the cell lipid content and the lipophilicity of the congener, *Toxicology Letters*, 216(1), 40–6. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.09.027>
- [166] Weir, C.J. (2020) Ion channels, receptors, agonists and antagonists, *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 21(1), 62–8. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2019.10.022>
- [167] Waszkielewicz, A.M., Gunia, A., Szkaradek, N., Soczyska, K., Krupiska, S., Marona, H. (2013) Ion Channels as Drug Targets in Central Nervous System Disorders, *Current Medicinal Chemistry*, 20, 1241–85. <https://doi.org/10.2174/0929867311320100005>
- [168] Wishart, D.S., Feunang, Y.D., Guo, A.C., Lo, E.J., Marcu, A., Grant, J.R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., Maciejewski, A., Gale, N., Wilson, A., Chin, L., Cummings, R., Le, D., Pon, A., Knox, C., Wilson, M. (2018) DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018, *Nucleic acids research*, 46(D1), D1074–82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>
- [169] Latorraca, N.R., Venkatakrishnan, A.J., Dror, R.O. (2017) GPCR Dynamics: Structures in Motion, *Chemical Reviews*, 117(1), 139–55. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00177>
- [170] Tautermann, C.S., Seeliger, D., Kriegl, J.M. (2015) What can we learn from molecular dynamics simulations for GPCR drug design?, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 111–21. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.12.002>
- [171] O'Brien, Z., Moghaddam, M.F. (2017) A Systematic Analysis of Physicochemical and ADME Properties of All Small Molecule Kinase Inhibitors Approved by US FDA from January 2001 to October 2015, *Current Medicinal Chemistry*, 24(29), 3159–84. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170523124441>
- [172] Schupp, M., Lazar, M.A. (2010) Endogenous Ligands for Nuclear Receptors: Digging Deeper, *Journal of Biological Chemistry*, 285(52), 40409–15. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.182451>
- [173] Fear, G., Komarnytsky, S., Raskin, I. (2007) Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs, *Pharmacology & Therapeutics*, 113(2), 354–68. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.09.001>
- [174] Luethi, D., Liechti, M.E., Krähenbühl, S. (2017) Mechanisms of hepatocellular toxicity associated with new psychoactive synthetic cathinones, *Toxicology*, 387, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.004>
- [175] Zhou, X., Bouitbir, J., Liechti, M.E., Krähenbühl, S., Mancuso, R. V. (2020) Para-Halogenation of Amphetamine and Methcathinone Increases the Mitochondrial Toxicity in Undifferentiated and Differentiated SH-SY5Y Cells, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2841. <https://doi.org/10.3390/ijms21082841>

A. Anexos

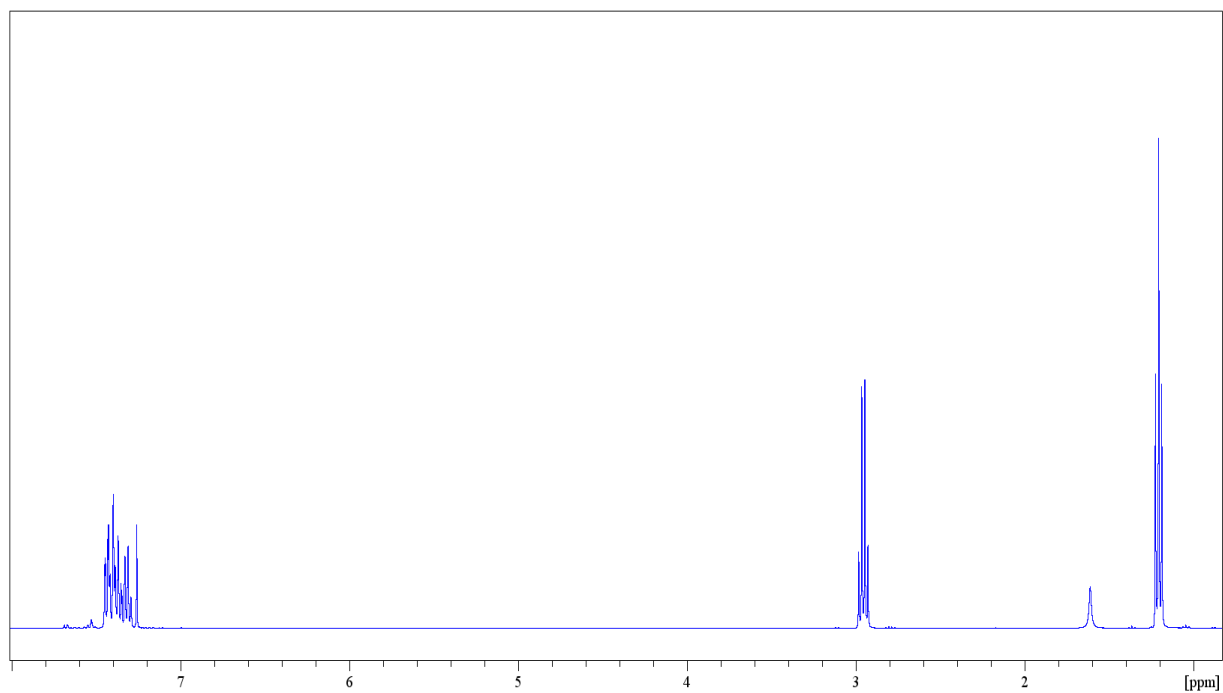


Figura A.1 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3) da 2'-cloropropiufenona (**24**).

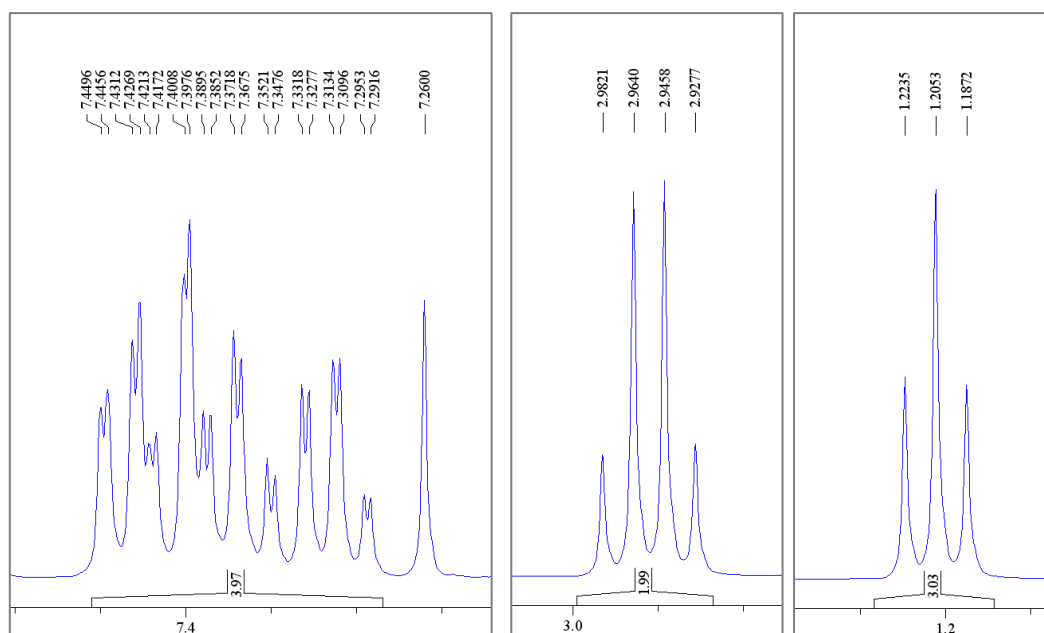


Figura A.2 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3) da 2'-cloropropiufenona (**24**) (ampliação).

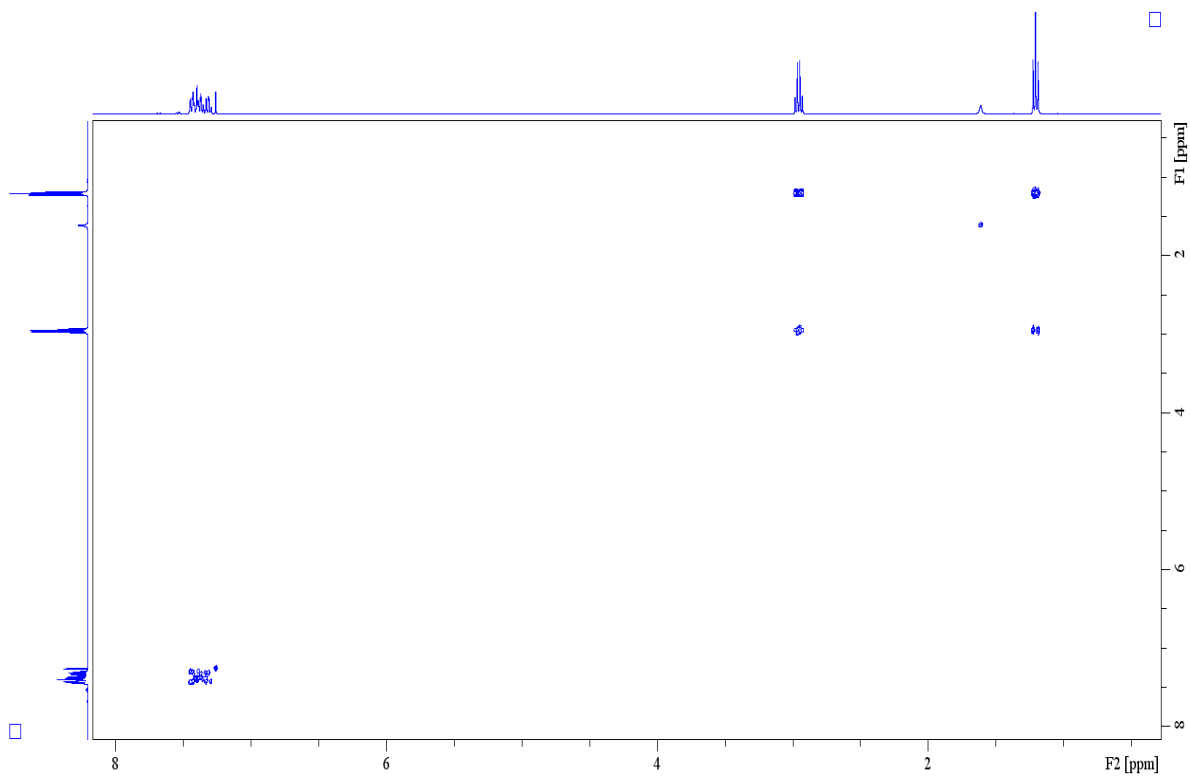


Figura A.3 - Espetro de COSY (CDCl_3) da 2'-cloropropiufenona (**24**).

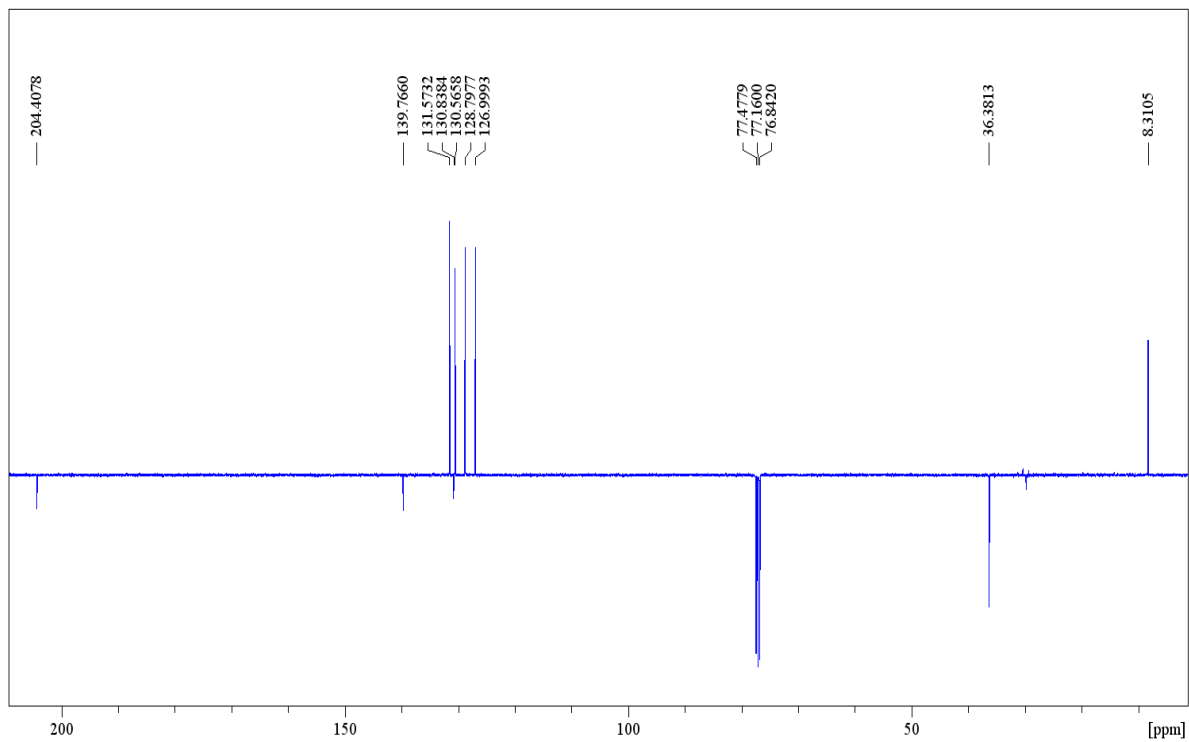


Figura A.4 - Espetro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3) da 2'-cloropropiufenona (**24**).

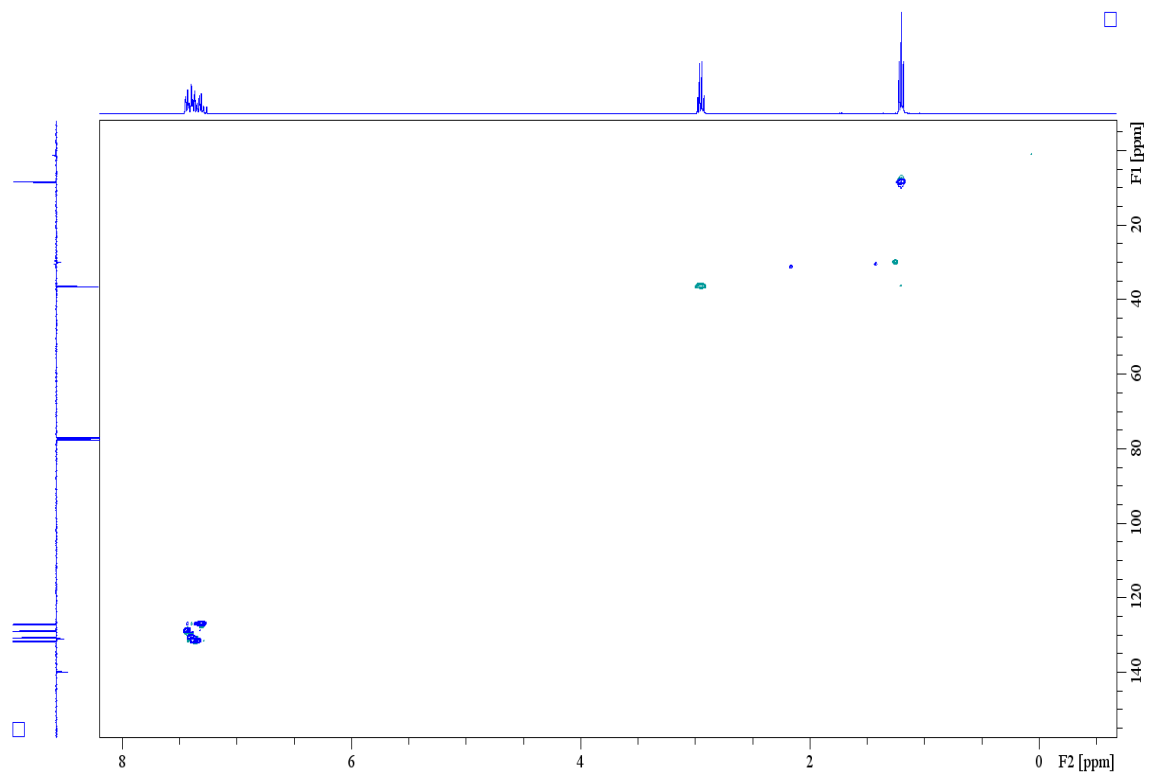


Figura A.5 - Espectro de HSQC (CDCl₃) da 2'-cloropropiufenona (**24**).

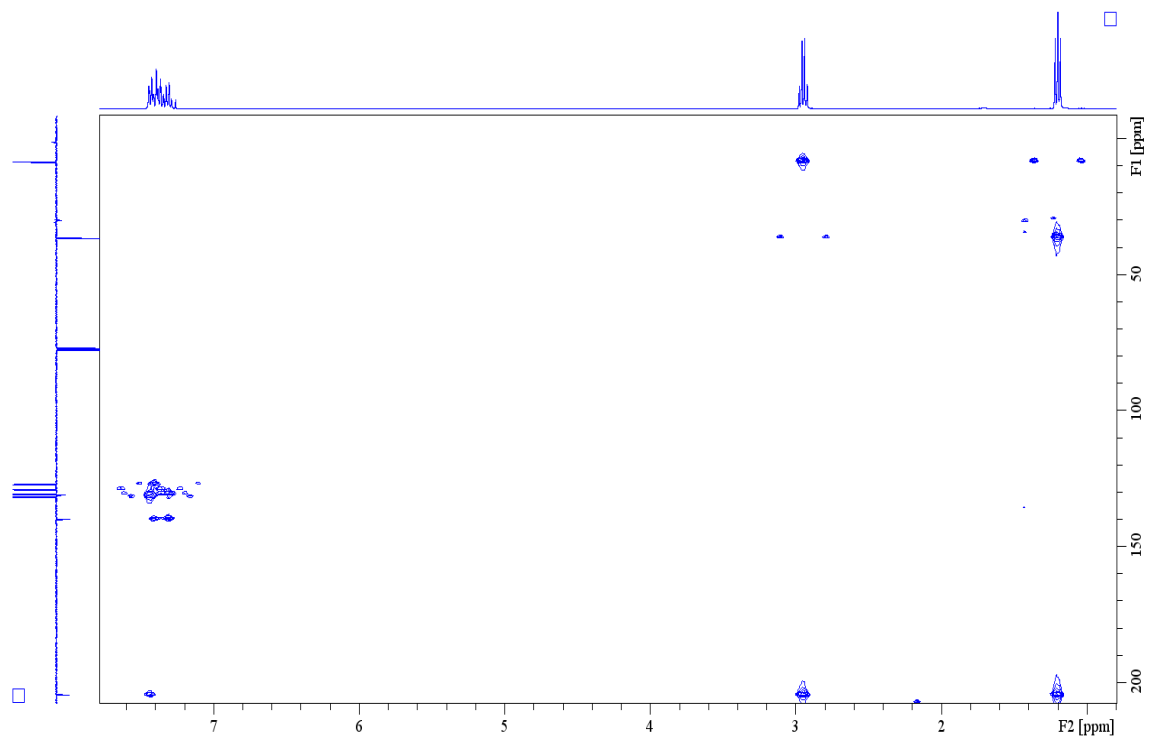


Figura A.6 - Espectro de HMBC (CDCl₃) da 2'-cloropropiufenona (**24**).

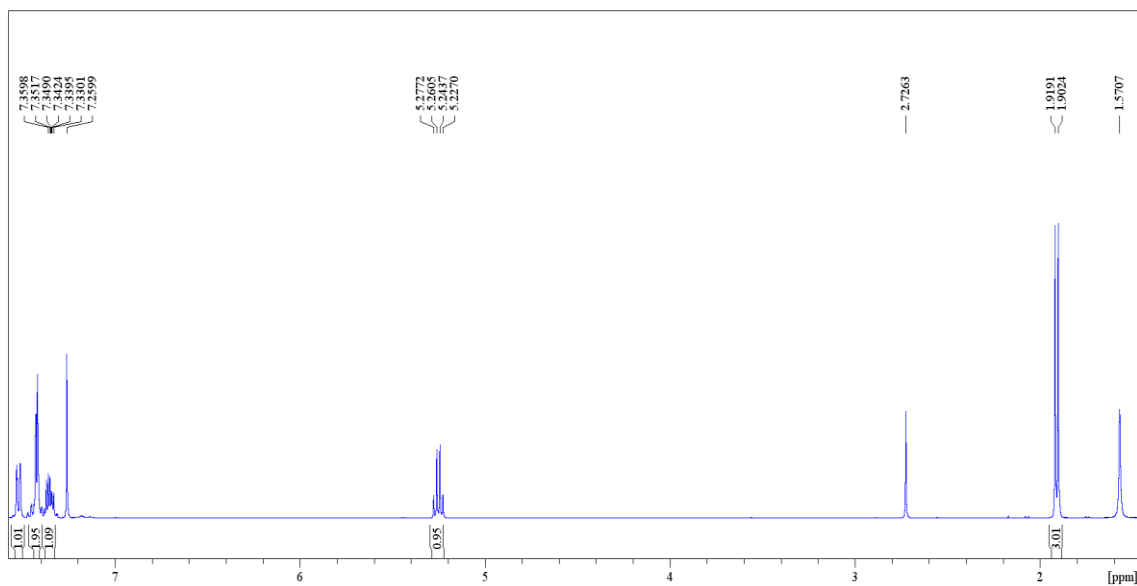


Figura A.7 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) da 2'-cloro-2-bromopropiufenona (**27**).

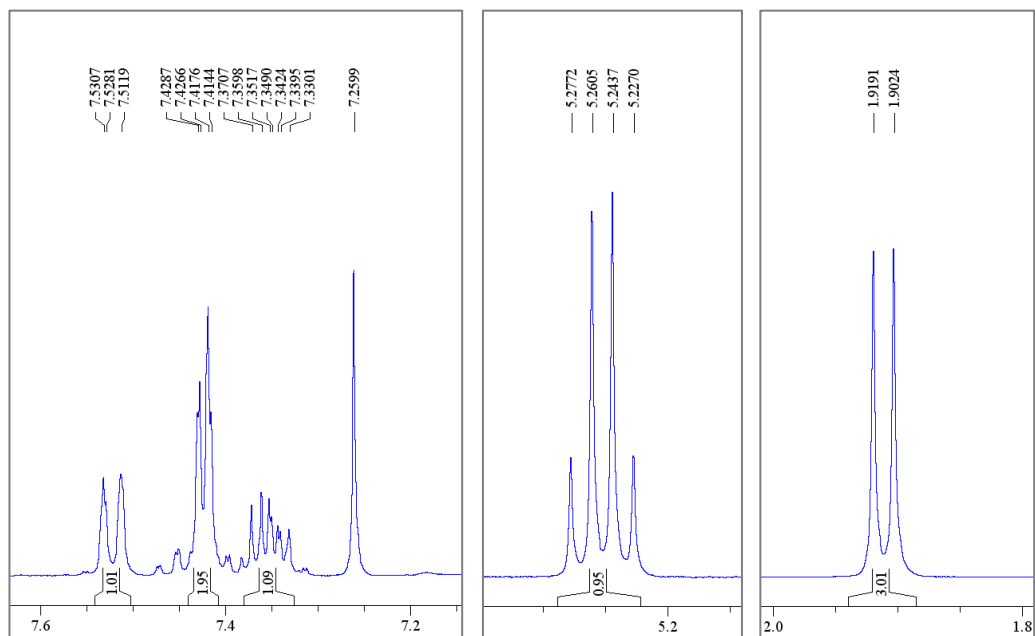


Figura A.8 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) da 2'-cloro-2-bromopropiufenona (**27**) (ampliação).

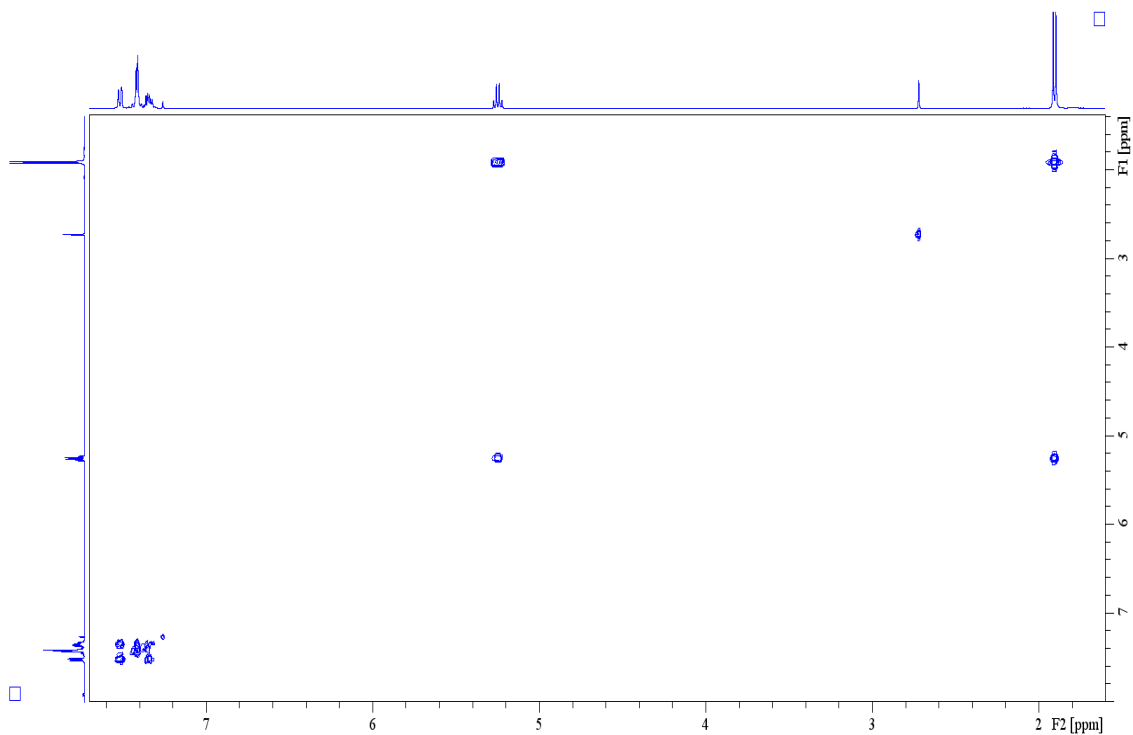


Figura A.9 - Espectro de COSY (CDCl_3) da 2'-cloro-2-bromopropiufenona (**27**).

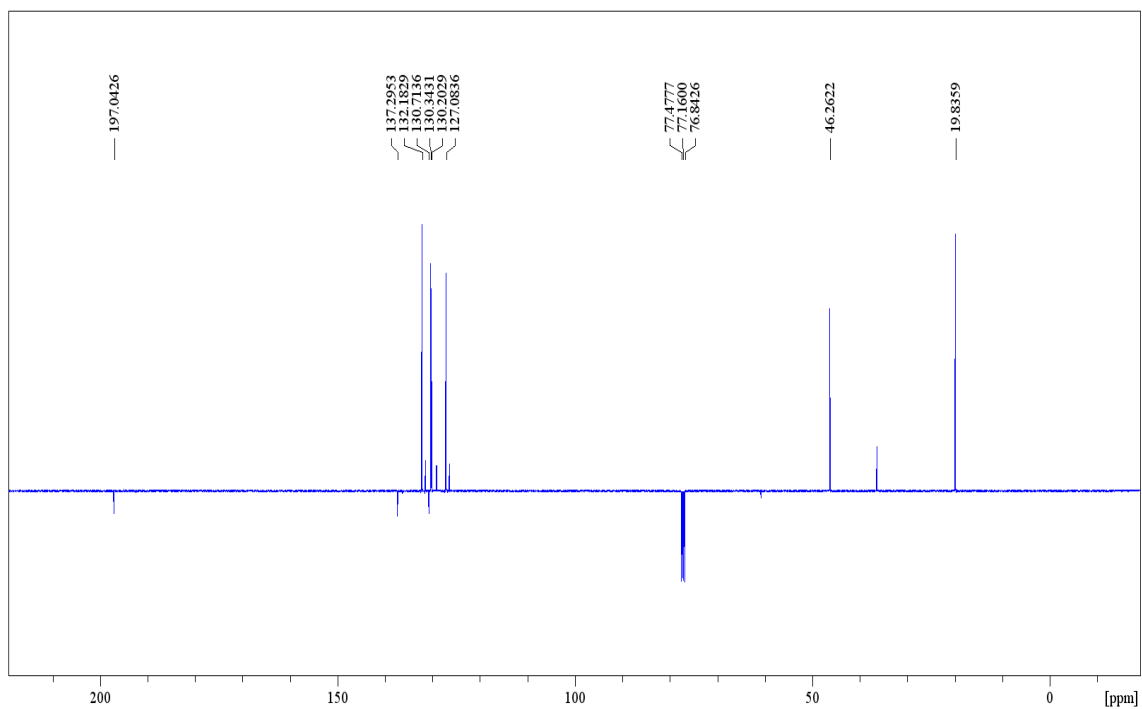


Figura A.10 - Espectro de RMN ¹³C APT (CDCl_3) da 2'-cloro-2-bromopropiufenona (**27**).

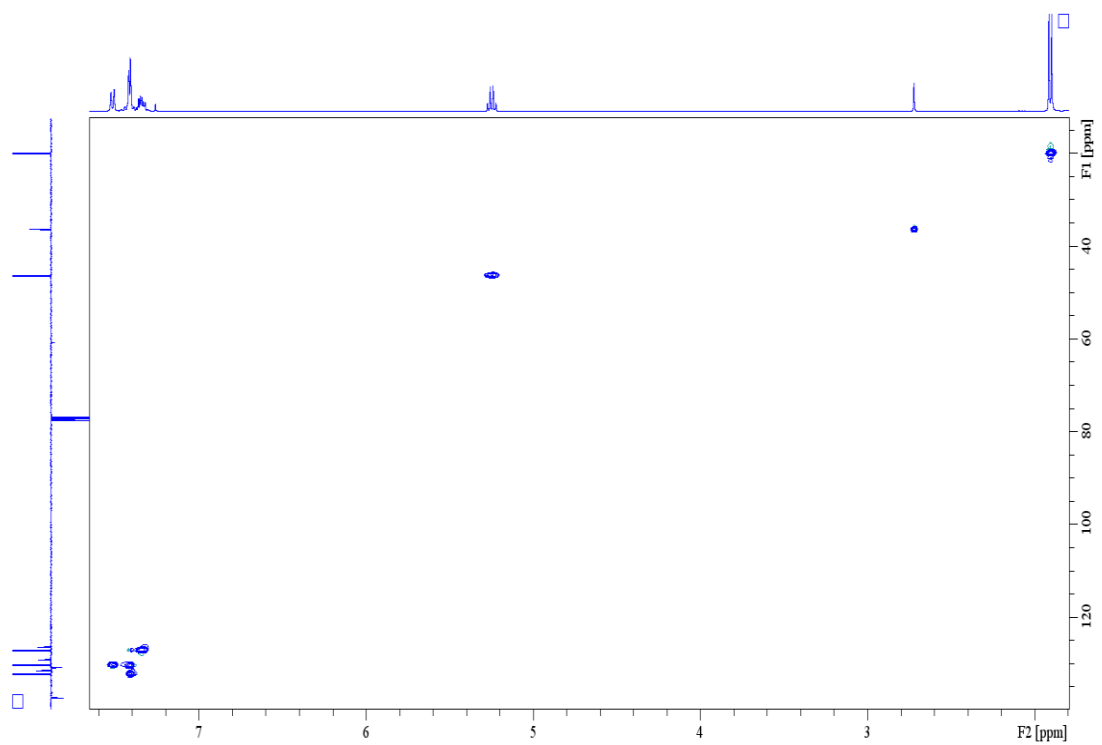


Figura A.11 - Espetro de HSQC (CDCl_3) da 2'-cloro-2-bromopropiofenona (**27**).

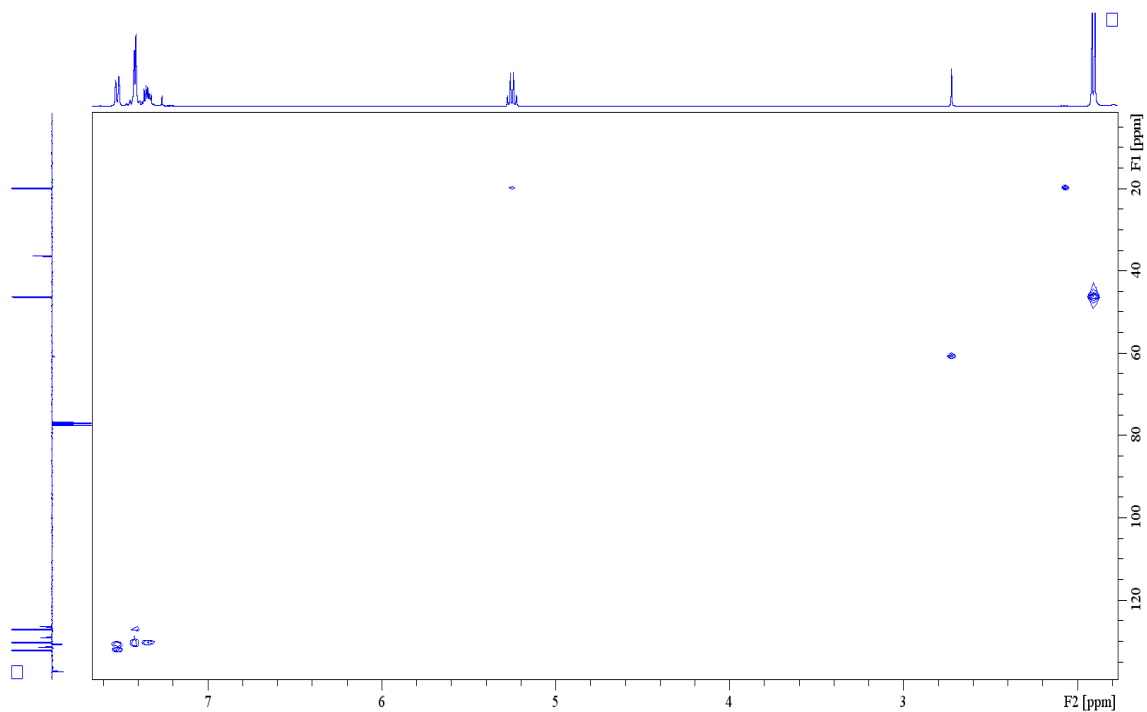


Figura A.12 - Espetro de HMBC (CDCl_3) da 2'-cloro-2-bromopropiofenona (**27**).

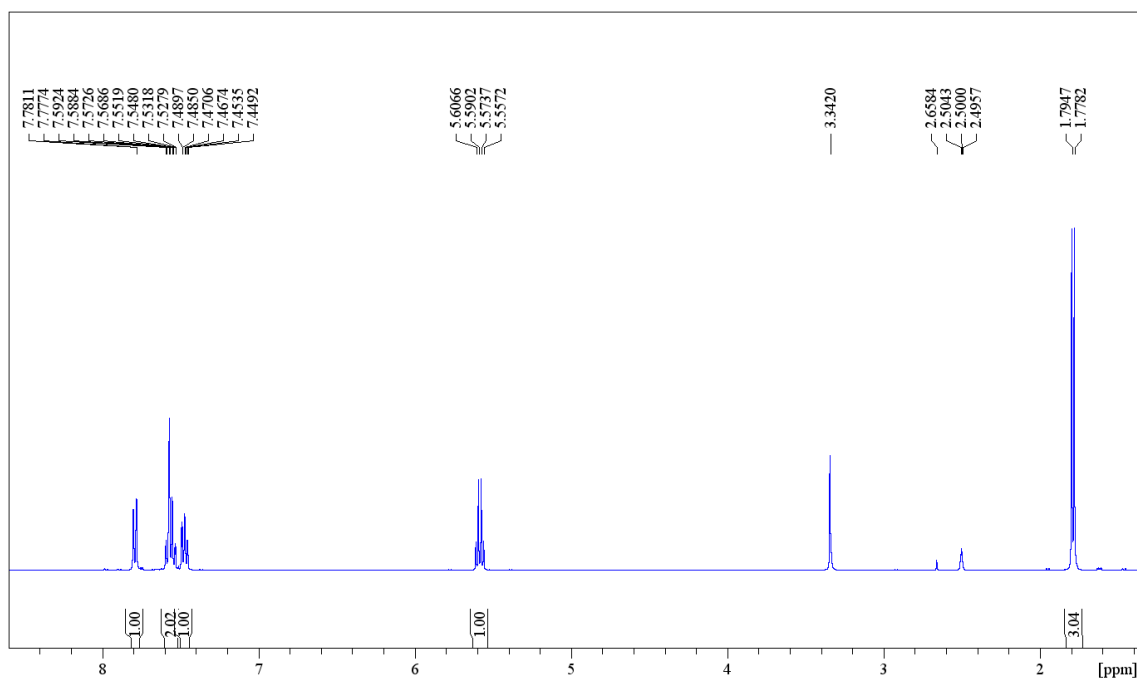


Figura A.13 - Espetro de RMN ^1H (DMSO- d_6) da 2'-cloro-2-bromopropiufenona (**27**).

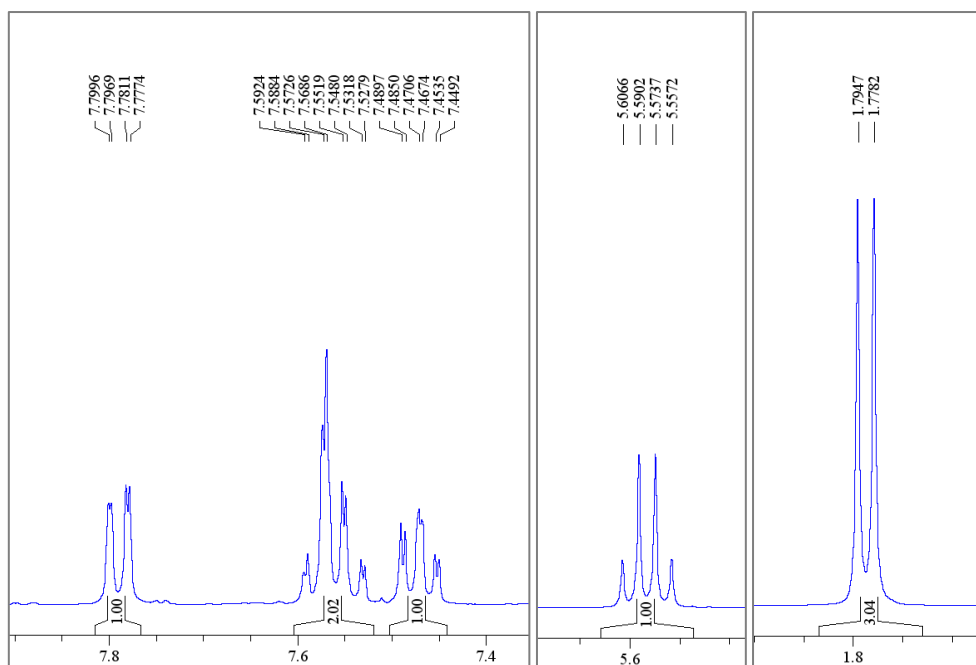


Figura A.14 - Espetro de RMN ^1H (DMSO- d_6) da 2'-cloro-2-bromopropiufenona (**27**) (ampliação).

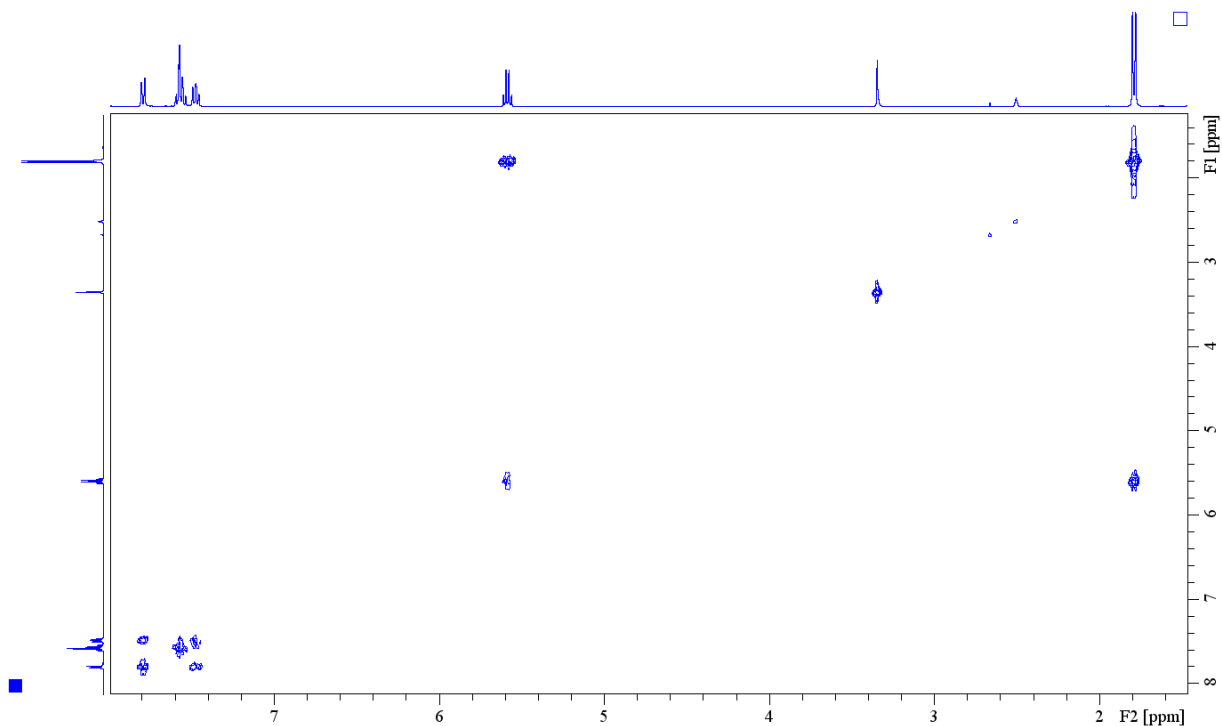


Figura A.15 - Espectro de COSY (DMSO- d_6) da 2'-cloro-2-bromopropiufenona (**27**).

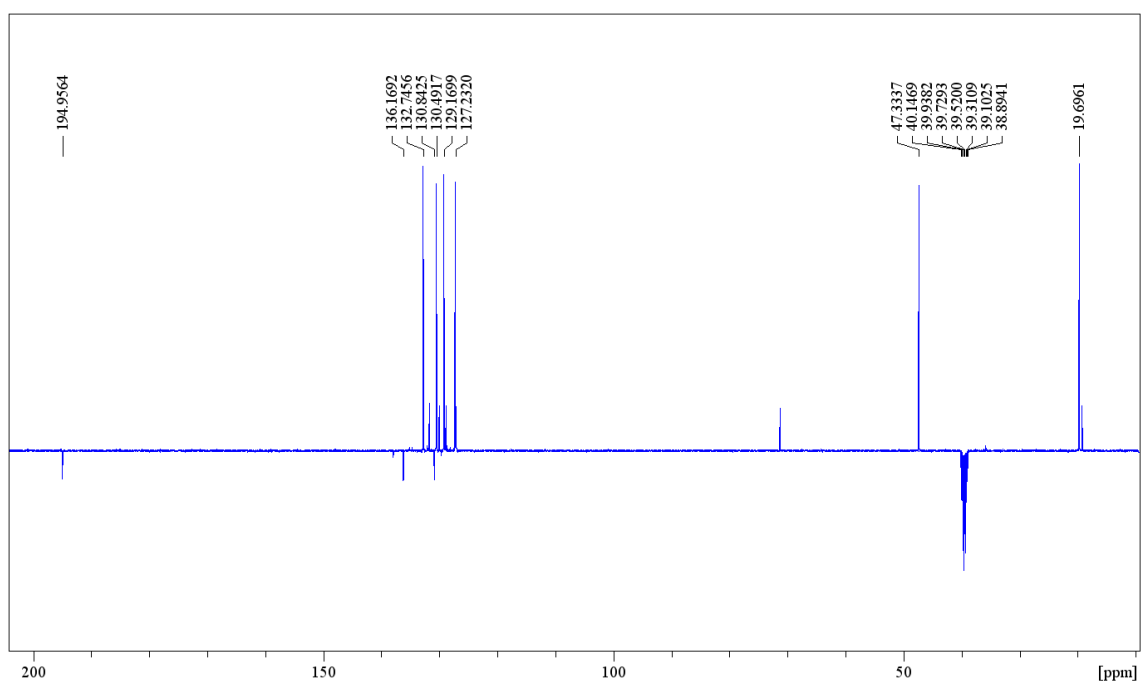


Figura A.16 - Espectro de RMN ^{13}C APT (DMSO- d_6) da 2'-cloro-2-bromopropiufenona (**27**).

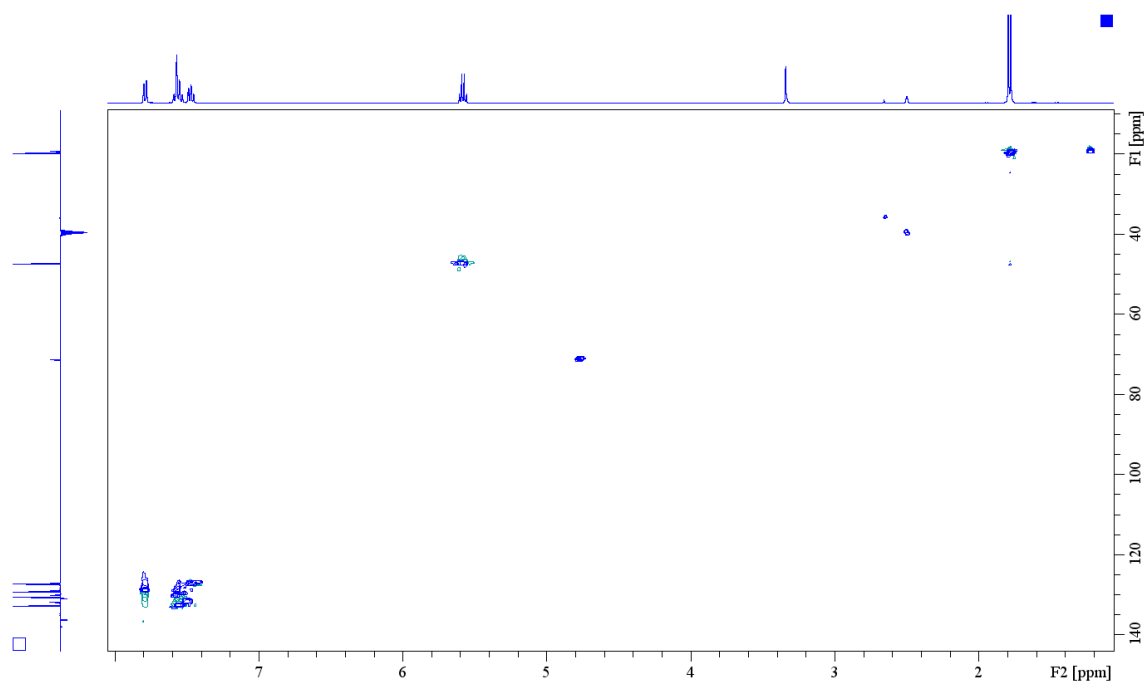


Figura A.17 - Espectro de HSQC (DMSO- d_6) da 2'-cloro-2-bromopropiufenona (**27**).

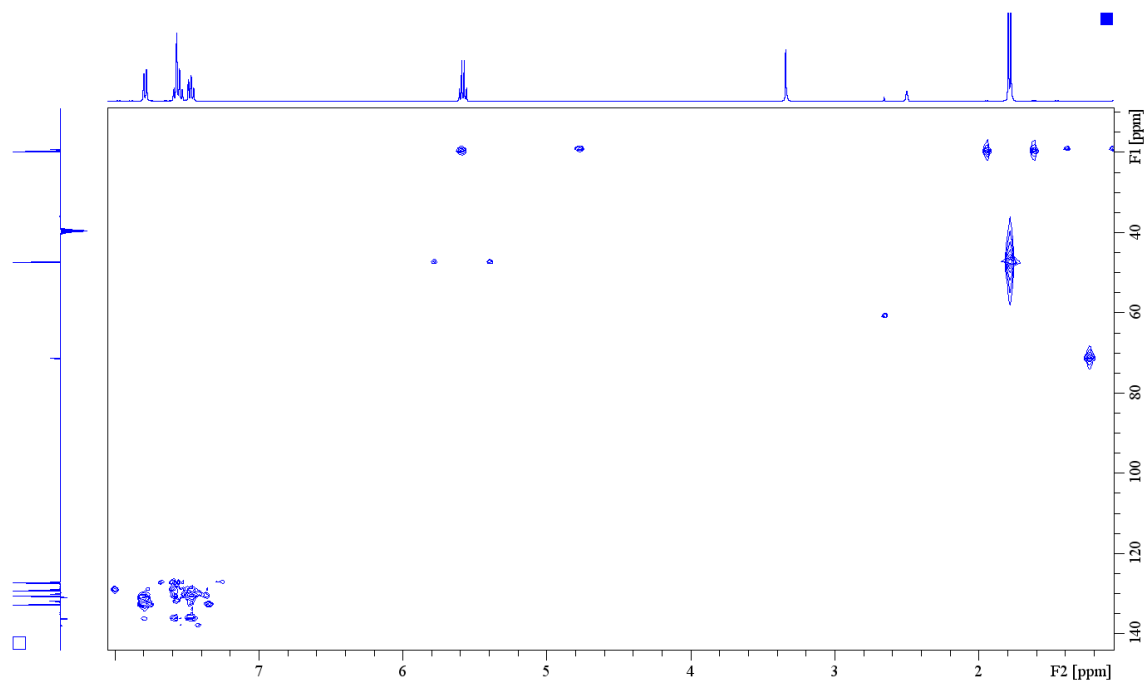


Figura A.18 - Espectro de HMBC (DMSO- d_6) da 2'-cloro-2-bromopropiufenona (**27**).

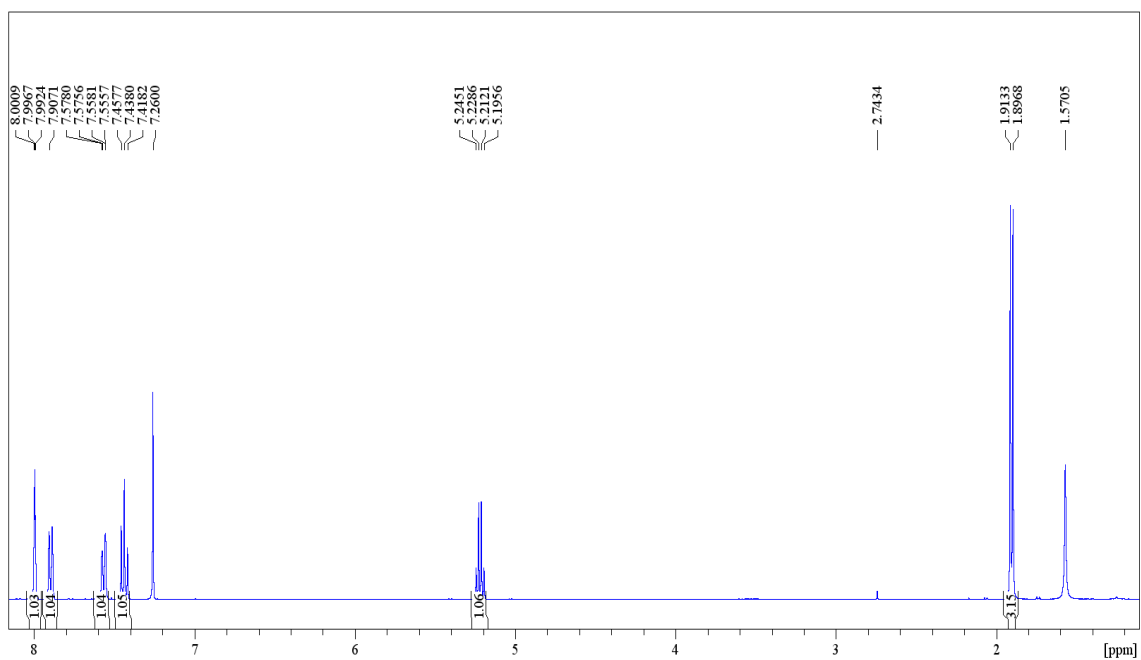


Figura A.19 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) da 3'-cloro-2-bromopropiufenona (**28**).

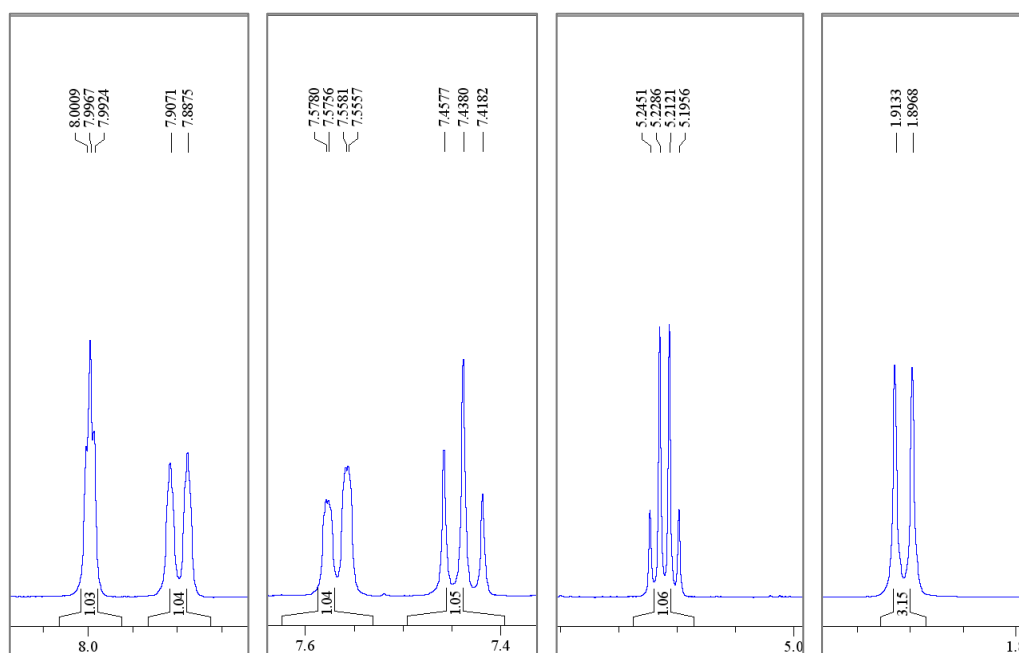


Figura A.20 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) da 3'-cloro-2-bromopropiufenona (**28**) (ampliação).

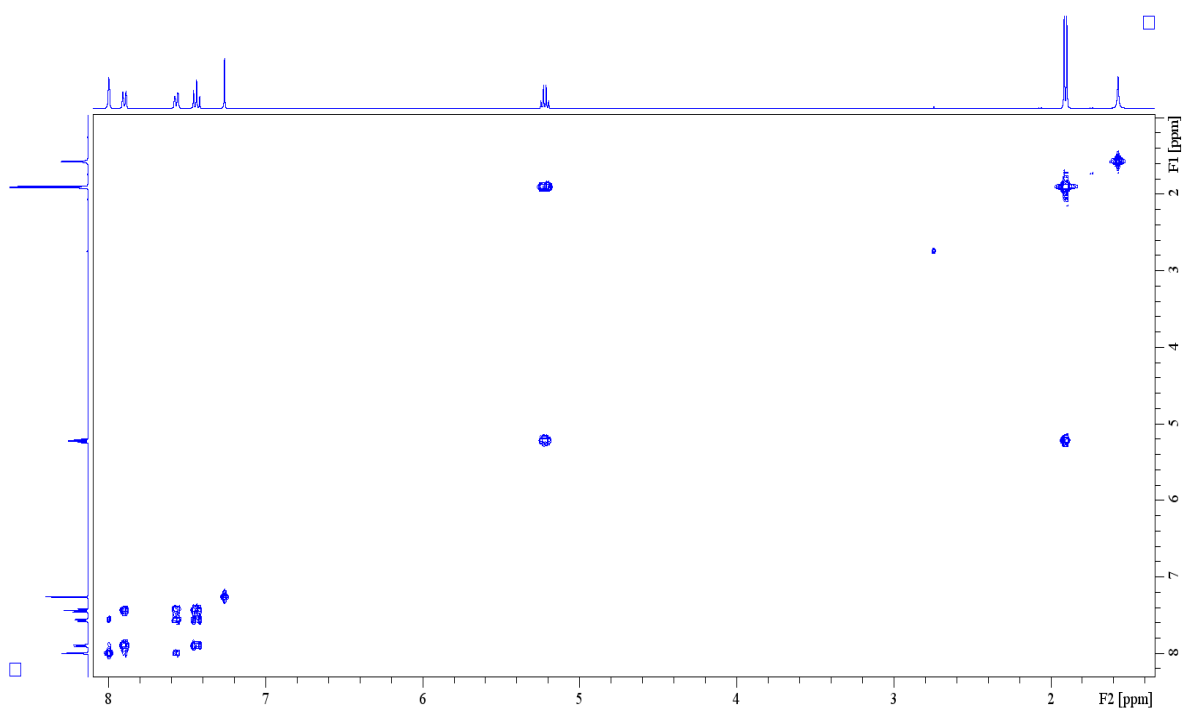


Figura A.21 - Espetro de COSY (CDCl_3) da 3'-cloro-2-bromopropiufenona (**28**).

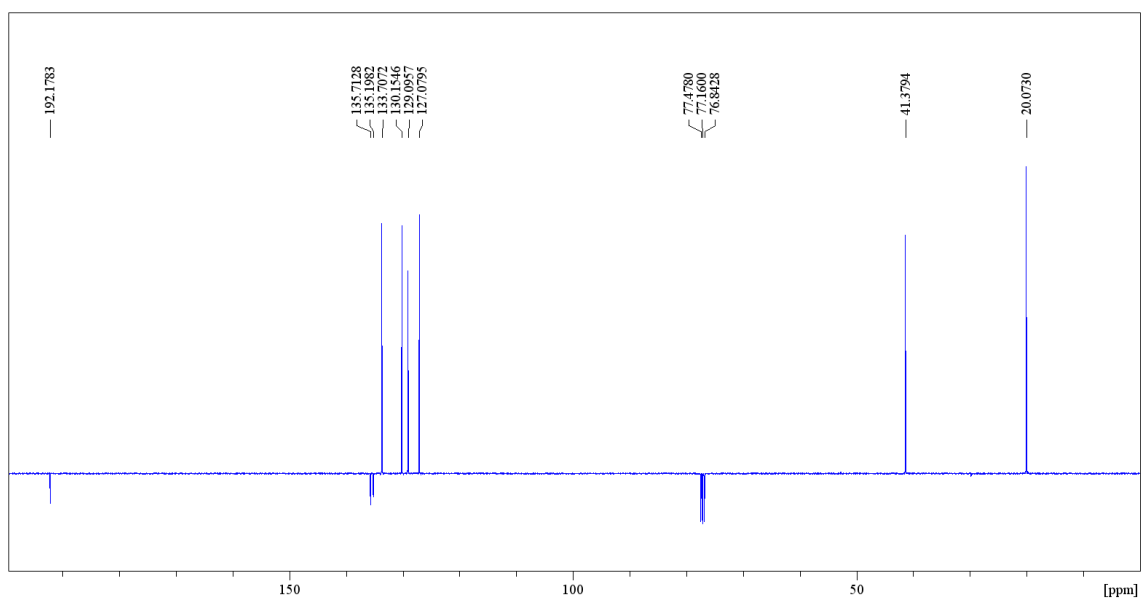


Figura A.22 - Espetro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3) da 3'-cloro-2-bromopropiufenona (**28**).

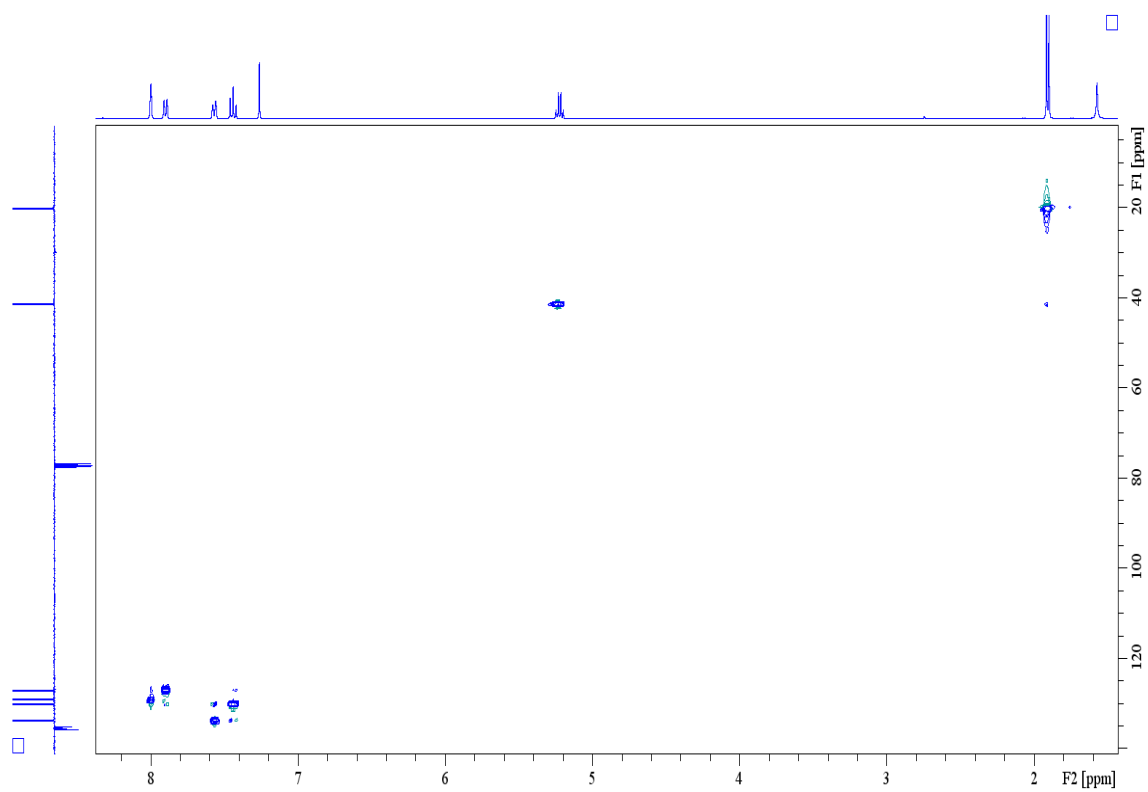


Figura A.23 - Espetro de HSQC (CDCl₃) da 3'-cloro-2-bromopropiofenona (**28**).

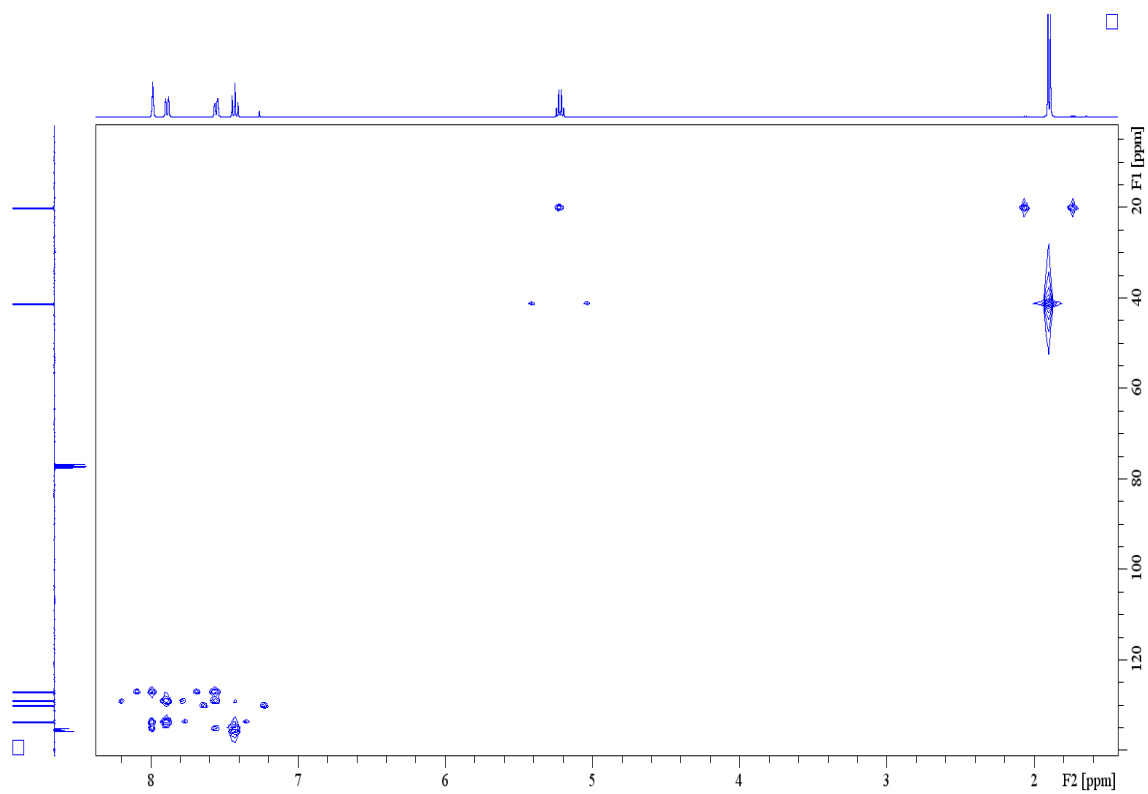


Figura A.24 - Espetro de HMBC (CDCl₃) da 3'-cloro-2-bromopropiofenona (**28**).

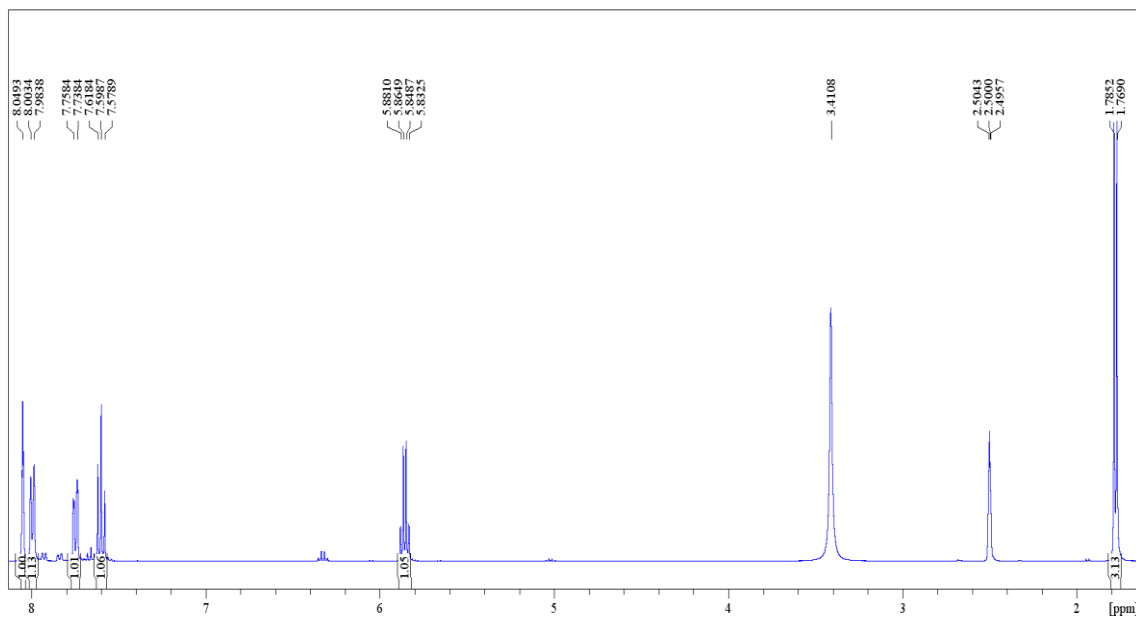


Figura A.25 - Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) da 3'-cloro-2-bromopropiufenona (**28**).

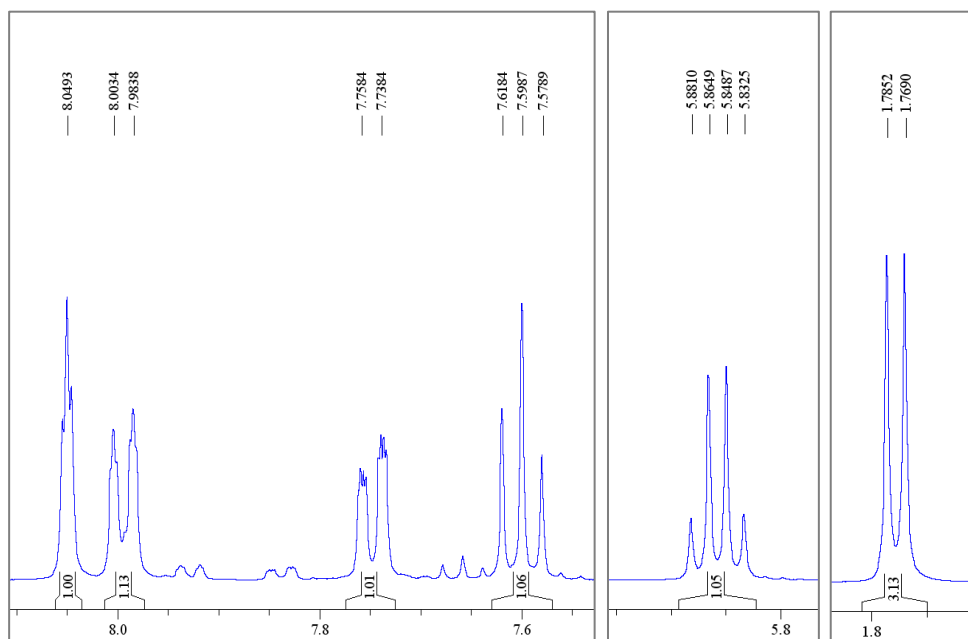


Figura A.26 - Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) da 3'-cloro-2-bromopropiufenona (**28**) (ampliação).

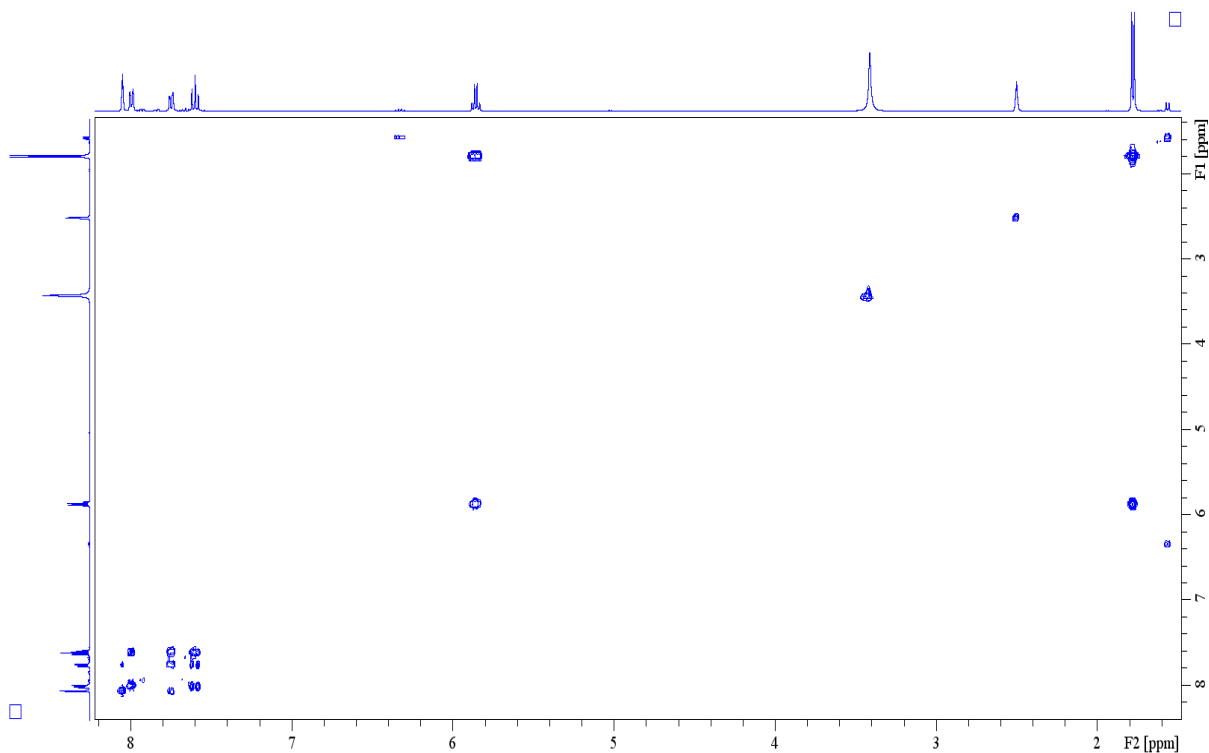


Figura A.27 - Espetro de COSY (DMSO- d_6) da 3'-cloro-2-bromopropiufenona (**28**).

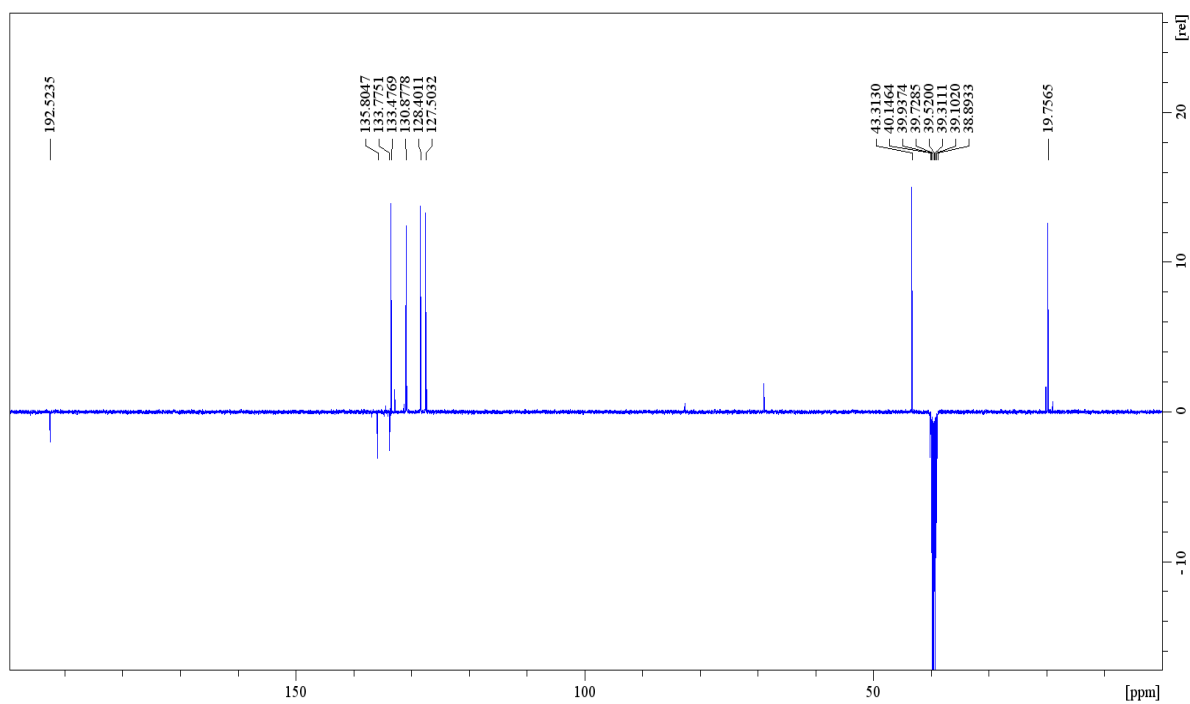


Figura A.28 - Espetro de RMN ^{13}C APT (DMSO- d_6) da 3'-cloro-2-bromopropiufenona (**28**).

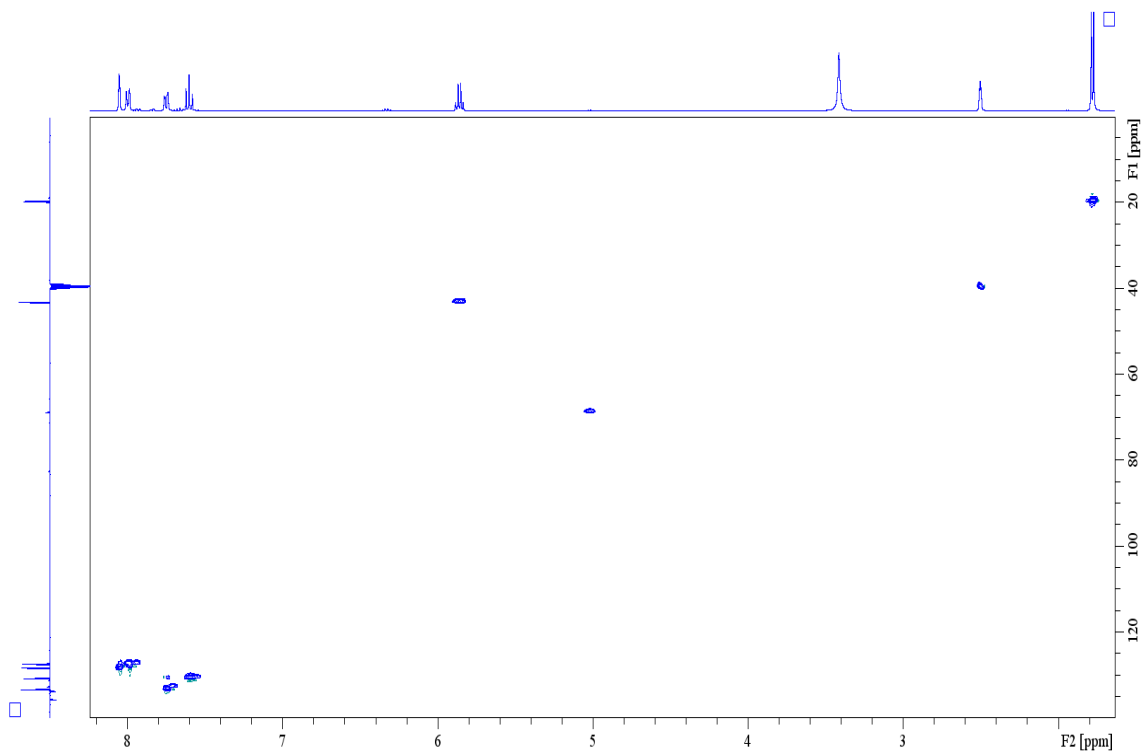


Figura A.29 - Espetro de HSQC (DMSO- d_6) da 3'-cloro-2-bromopropiufenona (**28**).

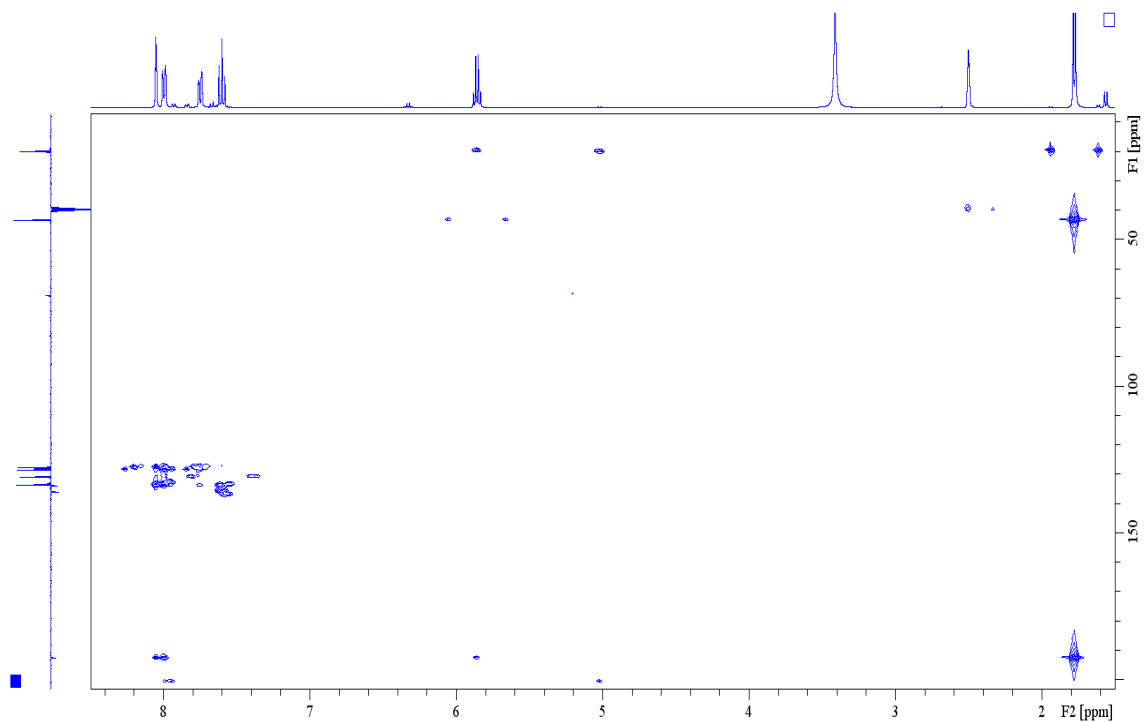


Figura A.30 - Espetro de HMBC (DMSO- d_6) da 3'-cloro-2-bromopropiufenona (**28**).

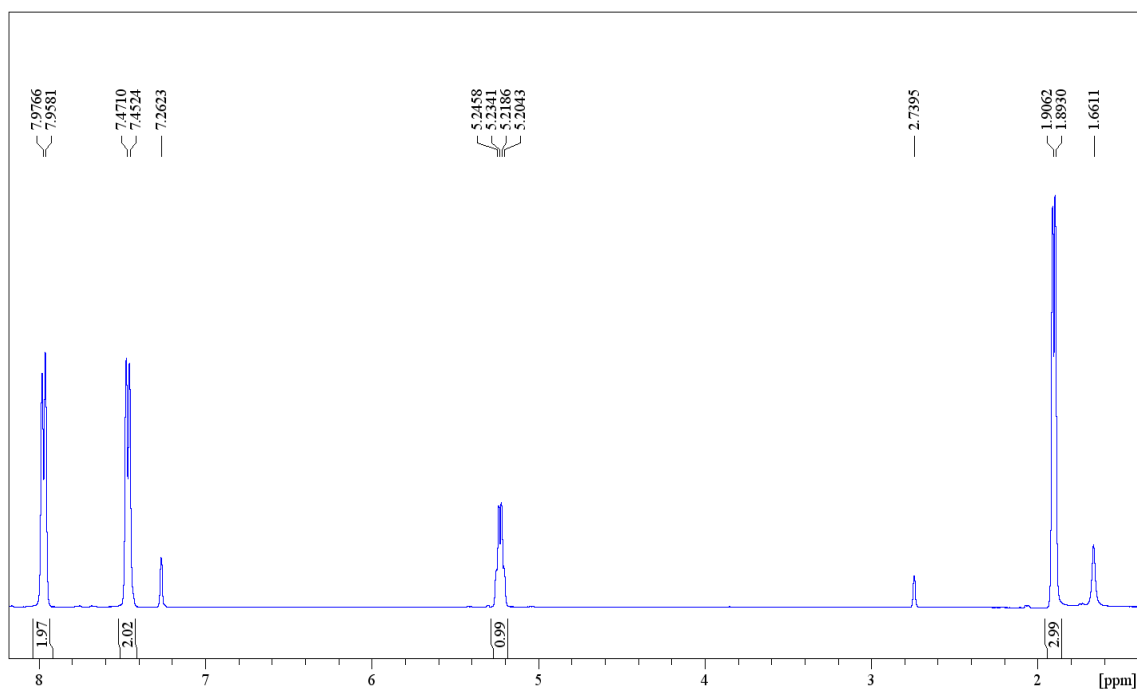


Figura A.31 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3) da 4'-cloro-2-bromopropiufenona (**29**).

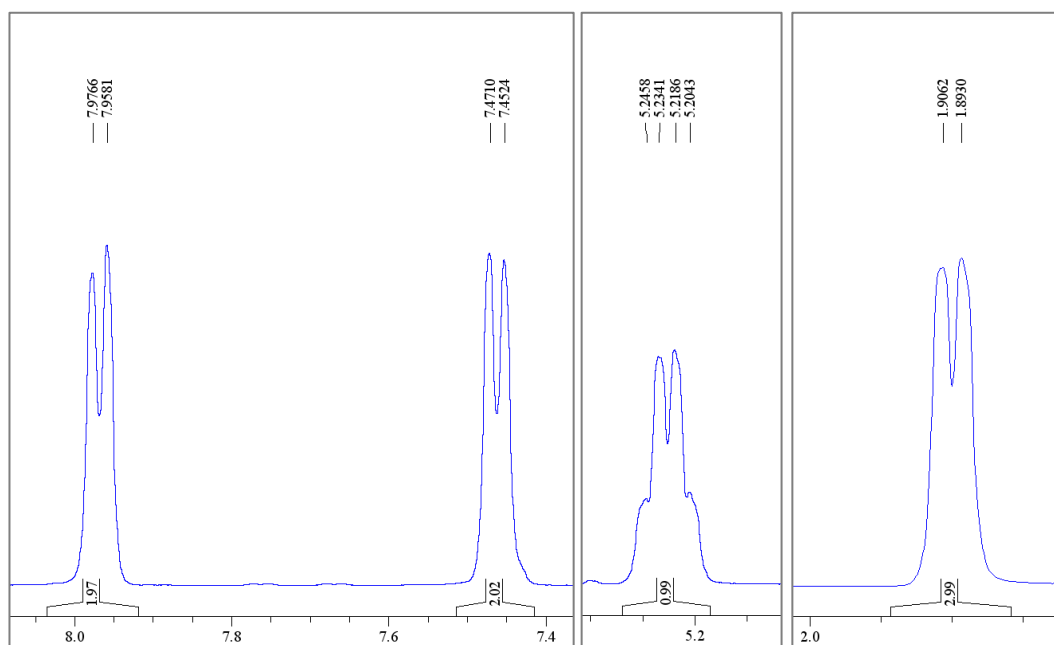


Figura A.32 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3) da 4'-cloro-2-bromopropiufenona (**29**) (ampliação).

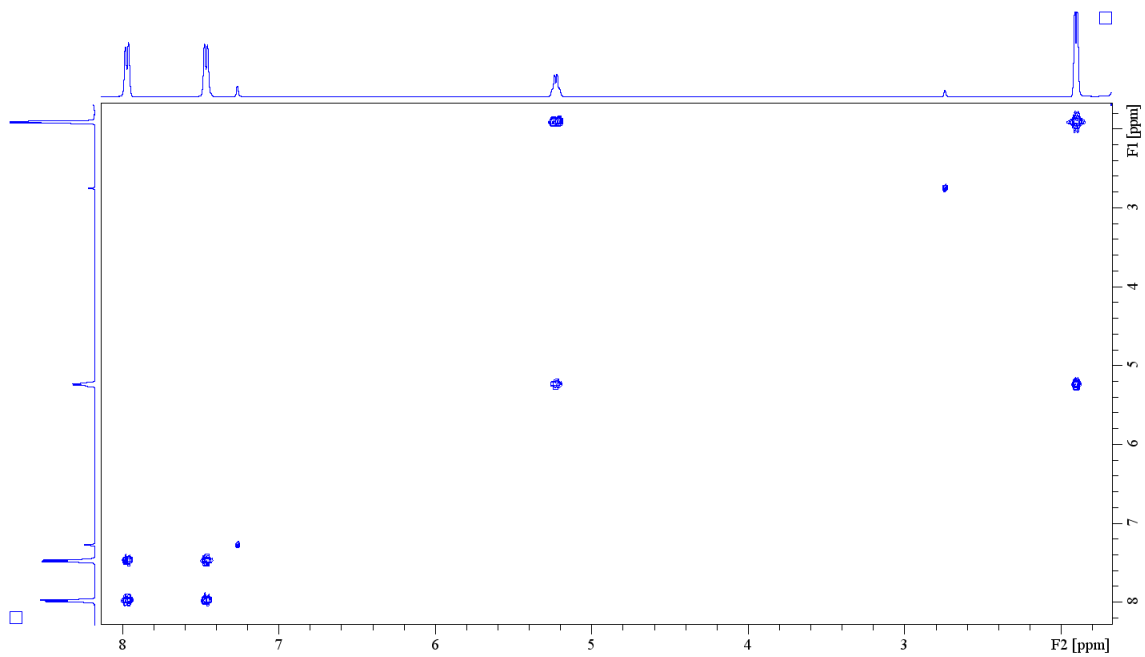


Figura A.33 - Espetro de COSY (CDCl_3) da 4'-cloro-2-bromopropiufenona (**29**).

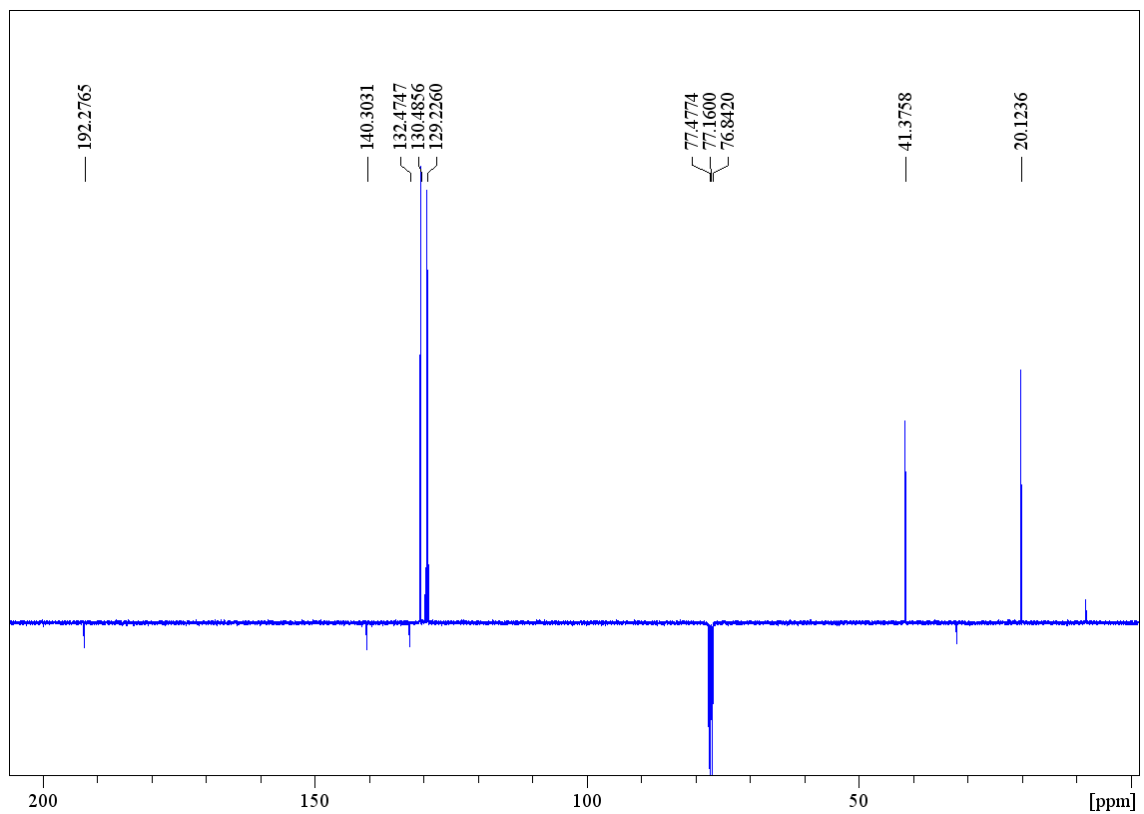


Figura A.34 - Espetro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3) da 4'-cloro-2-bromopropiufenona (**29**).

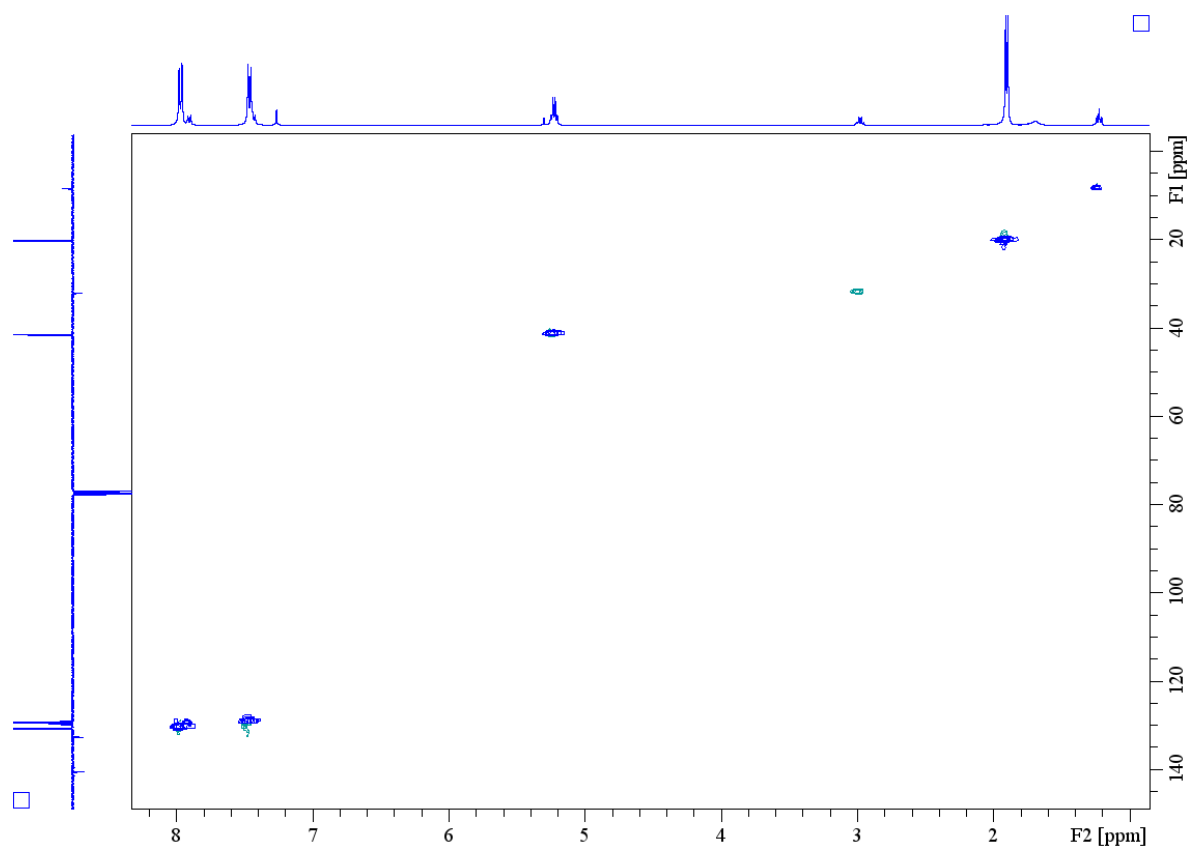


Figura A.35 - Espetro de HSQC (CDCl_3) da 4'-cloro-2-bromopropiufenona (**29**).

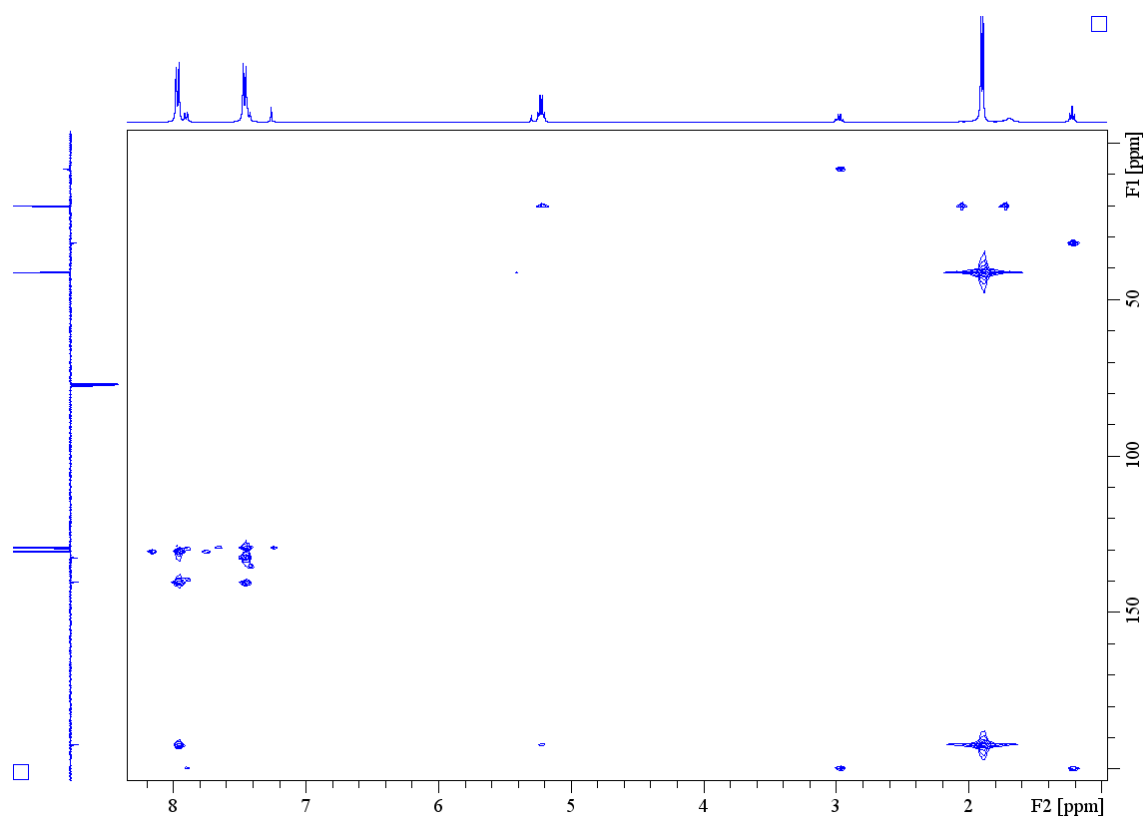


Figura A.36 - Espetro de HMBC (CDCl_3) da 4'-cloro-2-bromopropiufenona (**29**).

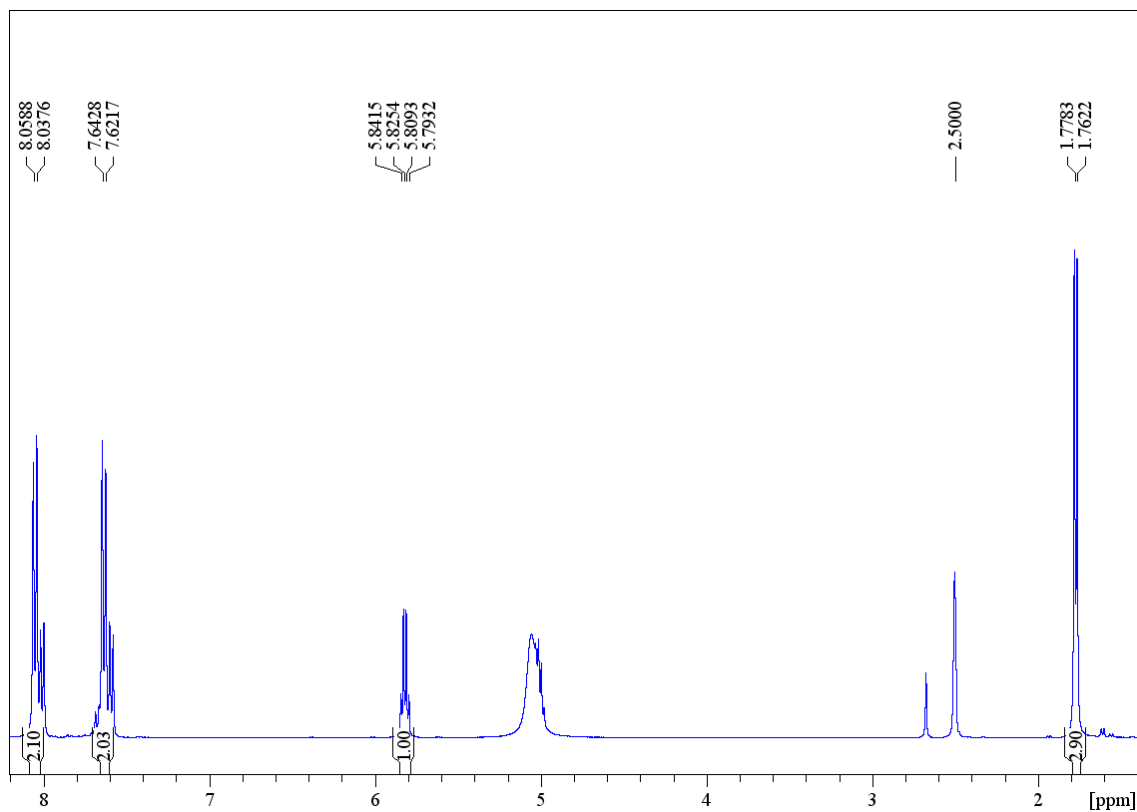


Figura A.37 - Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) da 4'-cloro-2-bromopropiufenona (**29**).

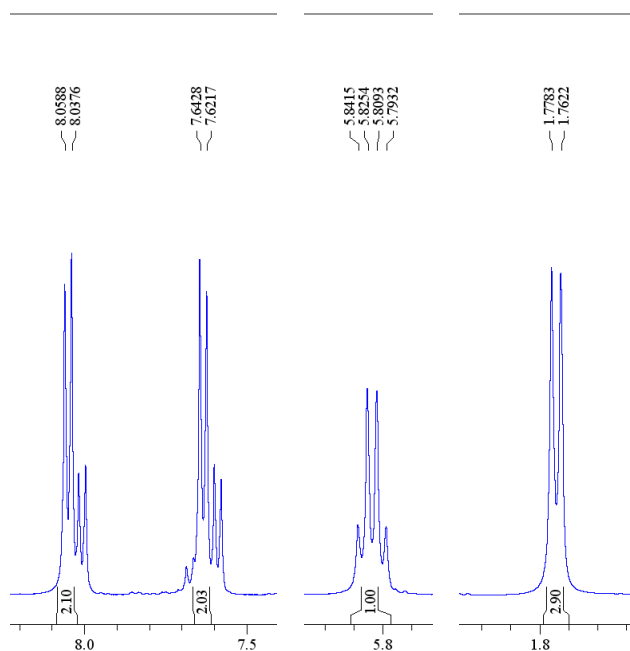


Figura A.38 - Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) da 4'-cloro-2-bromopropiufenona (**29**) (ampliação).

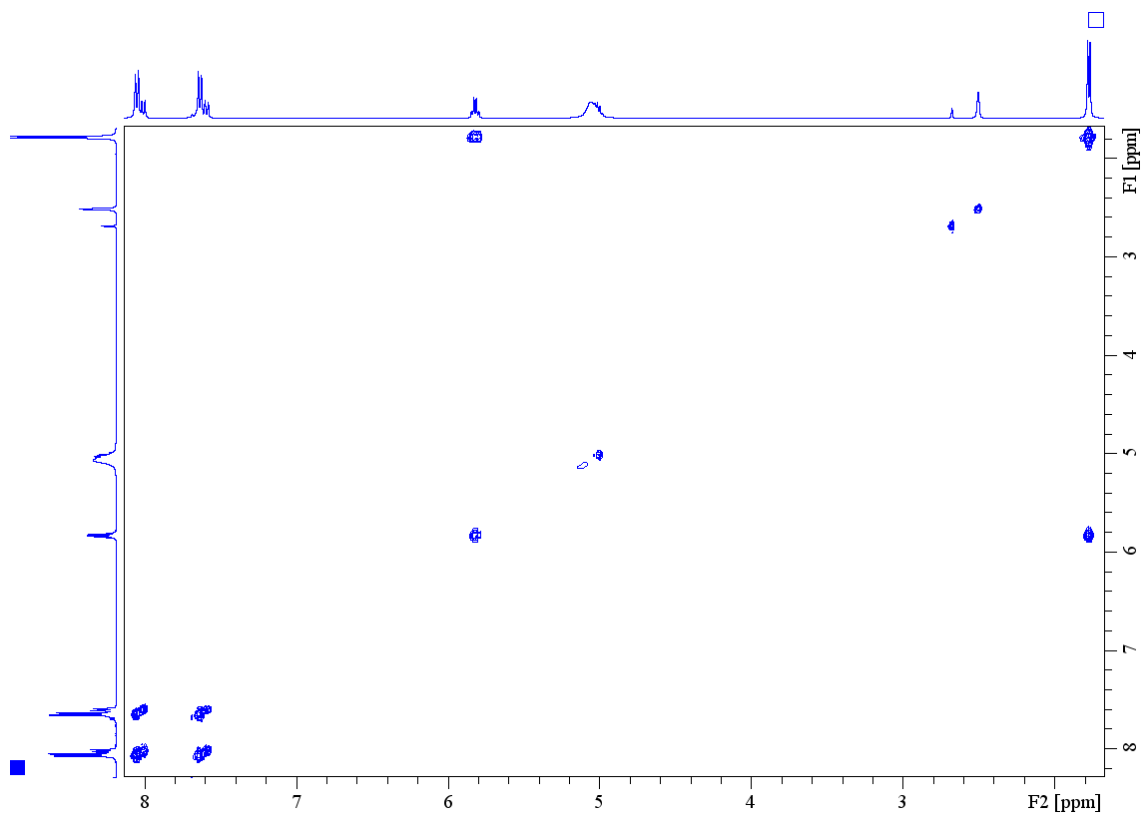


Figura A.39 - Espectro de COSY (DMSO- d_6) da 4'-cloro-2-bromopropiufenona (29).

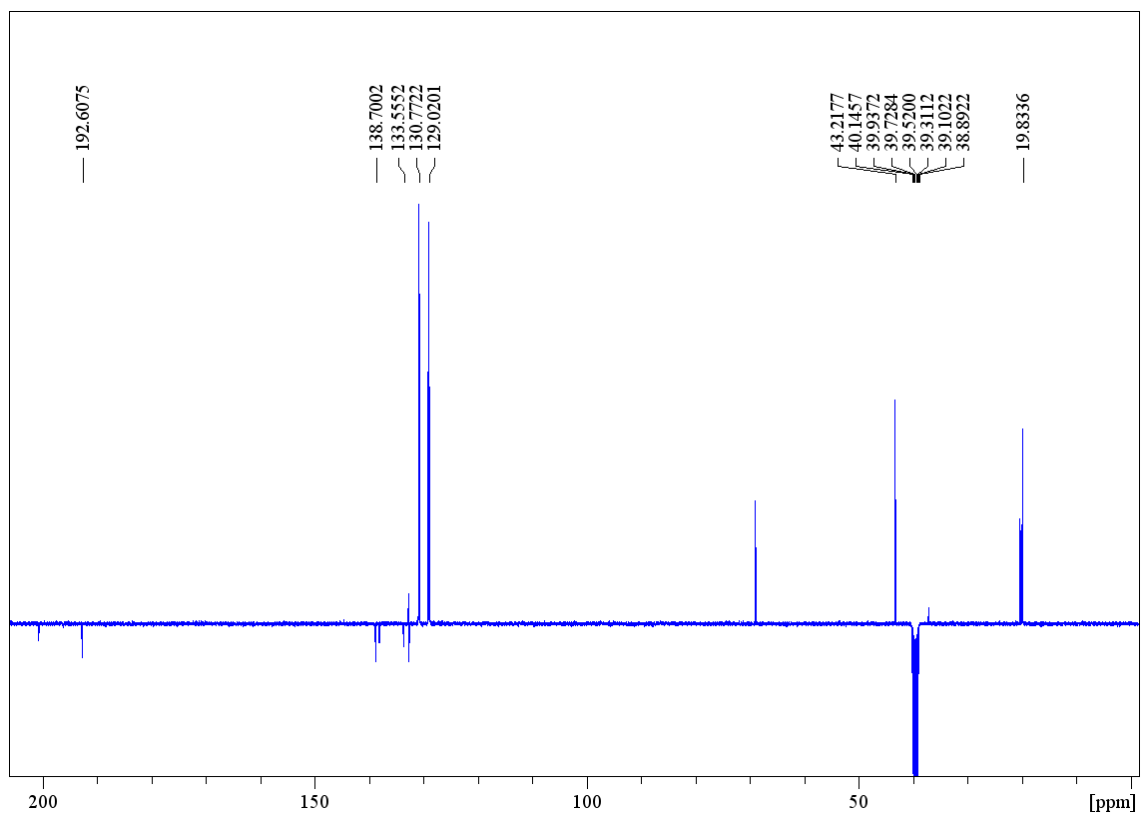


Figura A.40 - Espectro de RMN ^{13}C APT (DMSO- d_6) da 4'-cloro-2-bromopropiufenona (29).

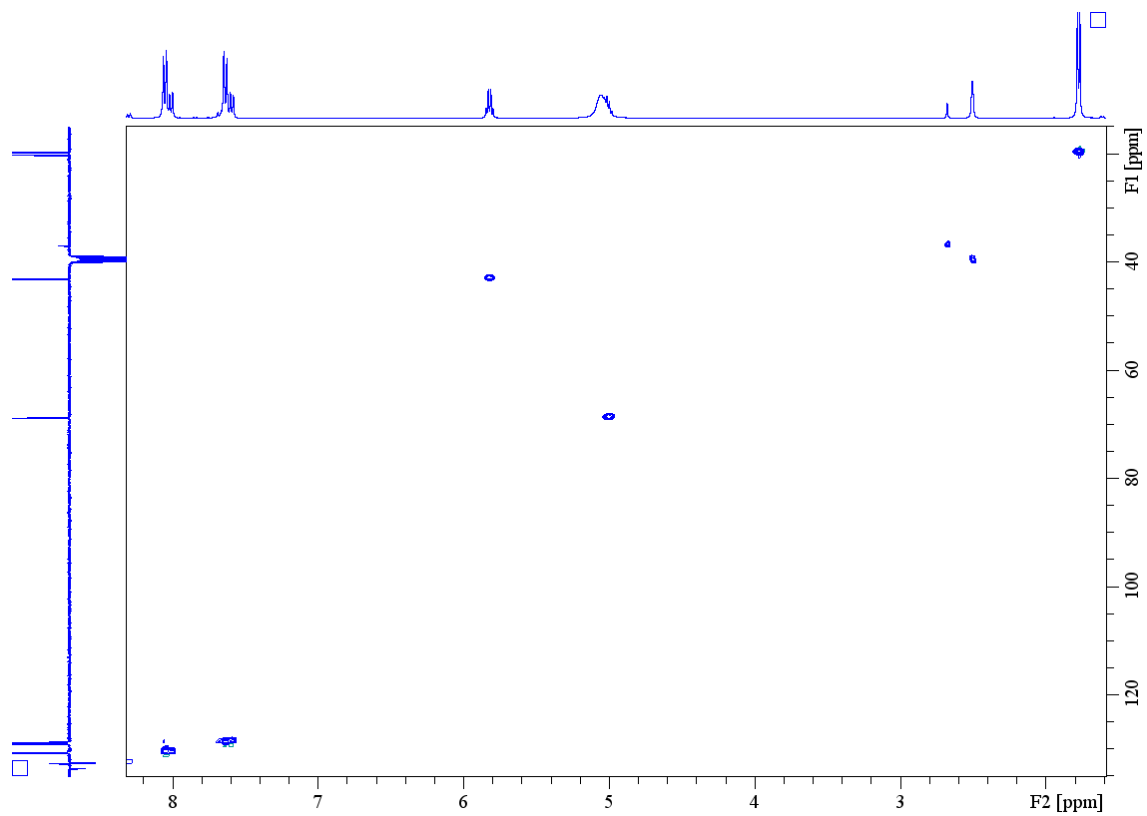


Figura A.41 - Espectro de HSQC (DMSO- d_6) da 4'-cloro-2-bromopropiufenona (**29**).

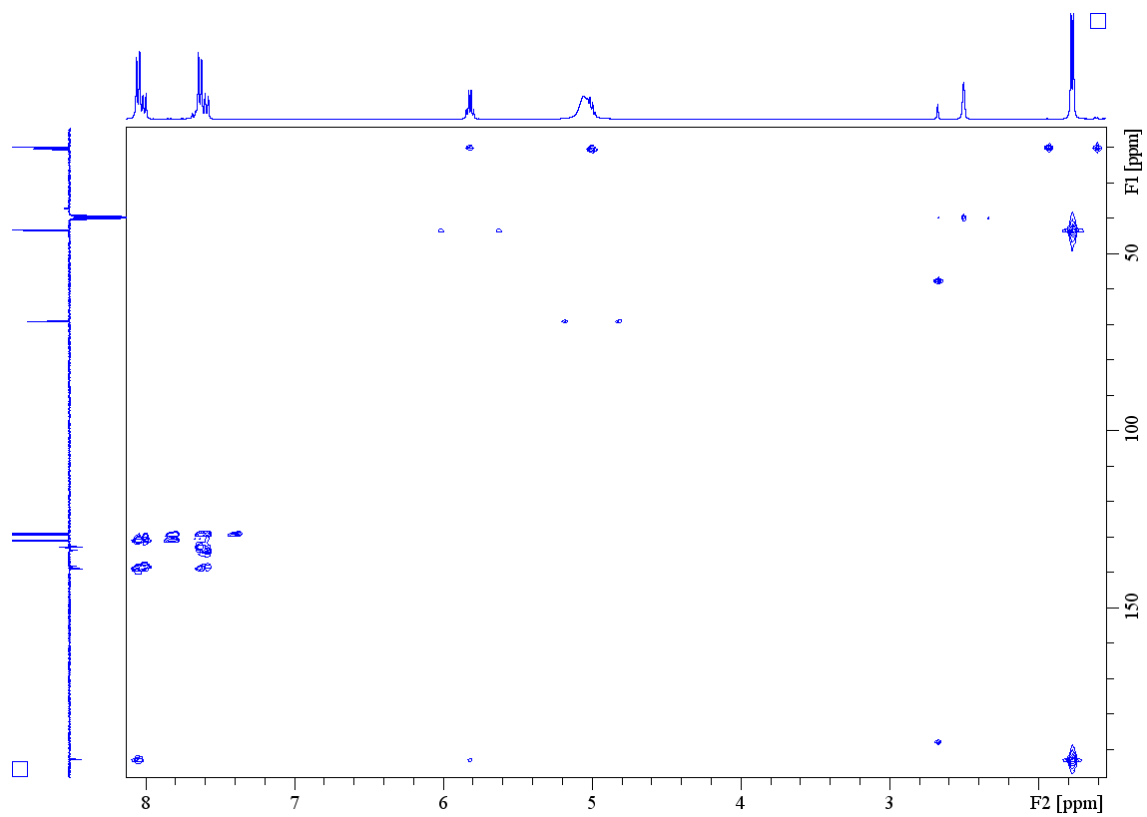


Figura A.42 - Espectro de HMBC (DMSO- d_6) da 4'-cloro-2-bromopropiufenona (**29**).

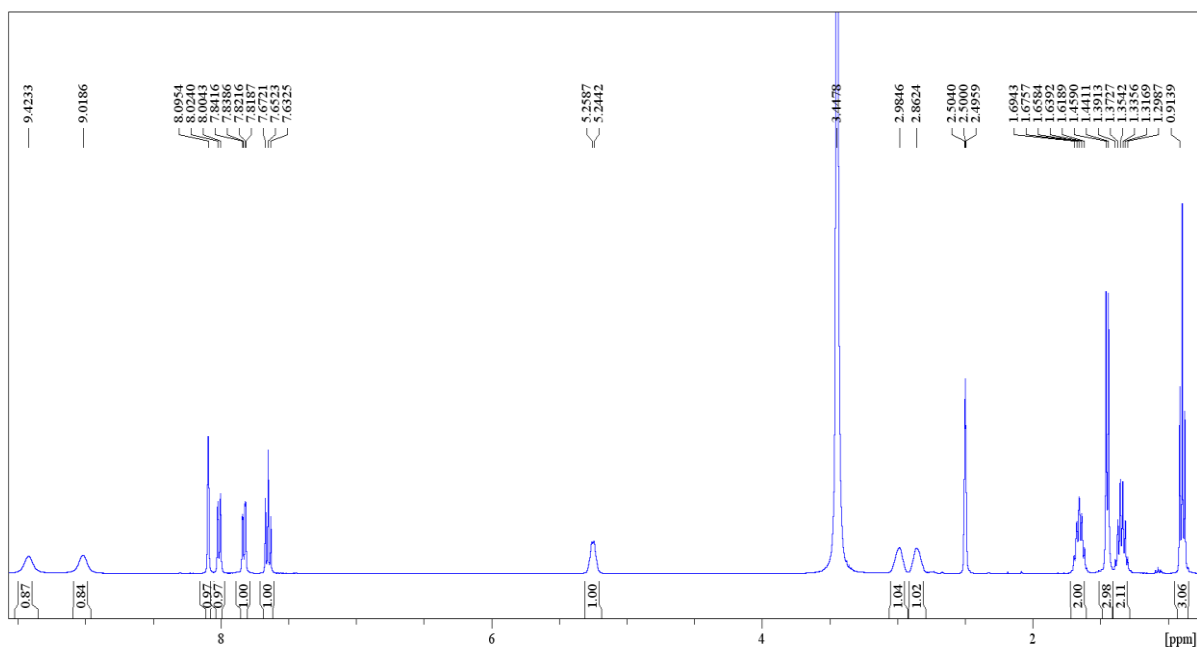


Figura A.43 - Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) da 3'-CBC (**8**).

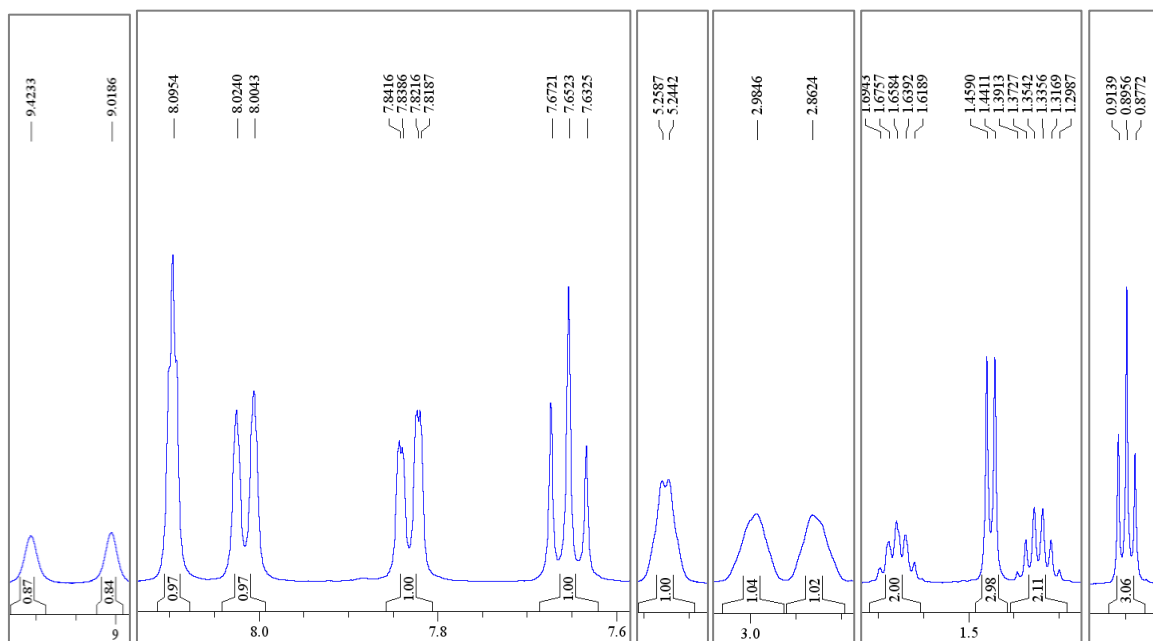


Figura A.44 - Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) da 3'-CBC (**8**) (ampliação).

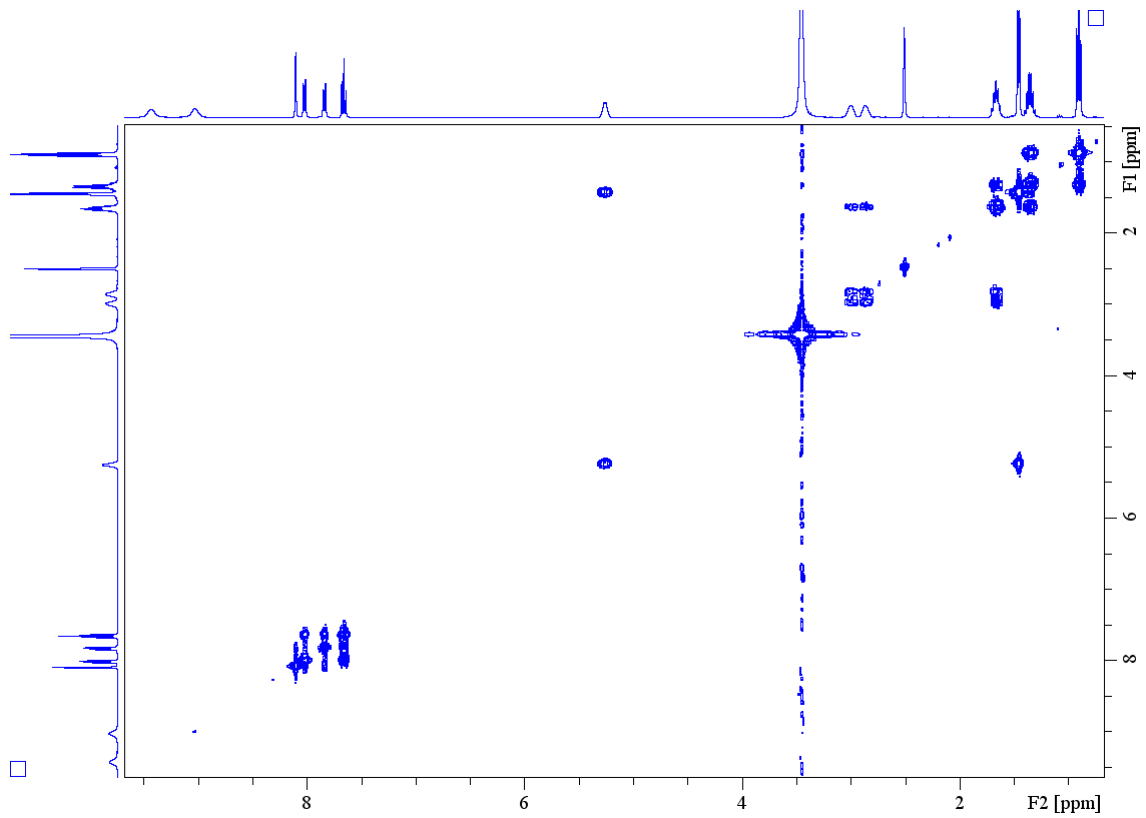


Figura A.45 - Espectro de COSY (DMSO- d_6) da 3'-CBC (8).

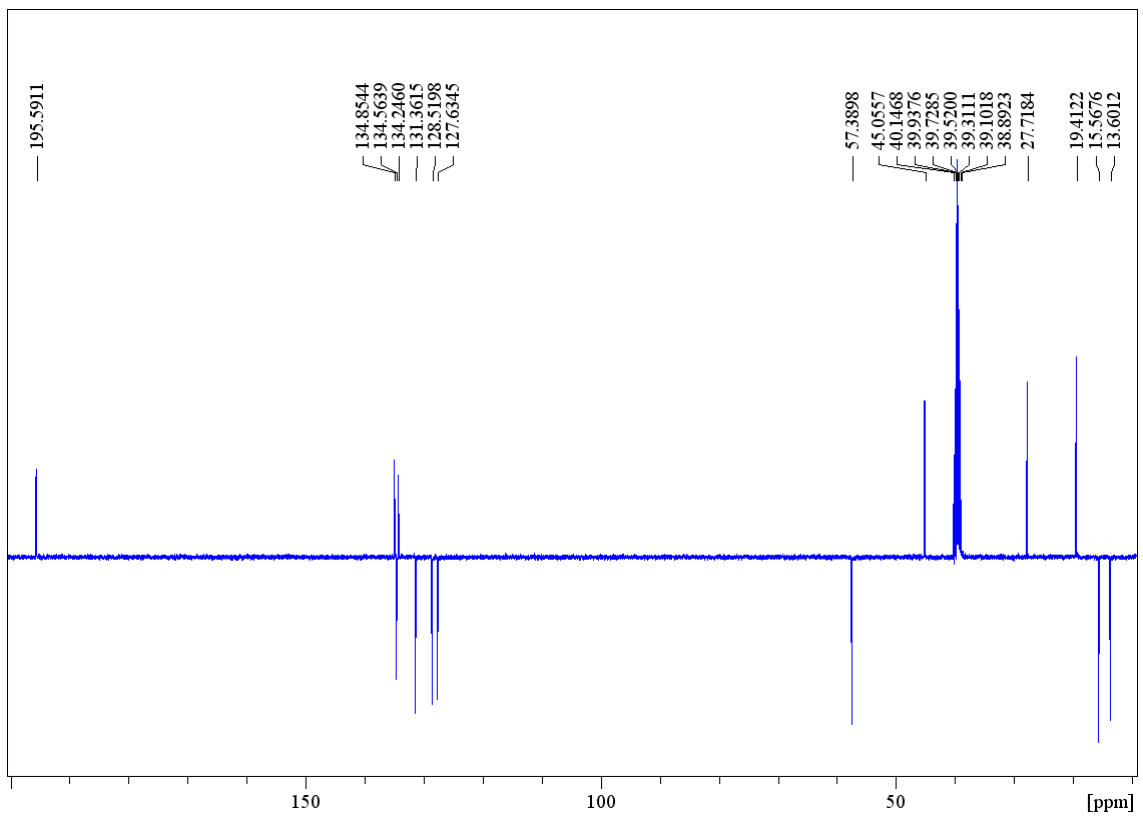


Figura A.46 - Espectro de RMN de ^{13}C APT (DMSO- d_6) da 3'-CBC (8).

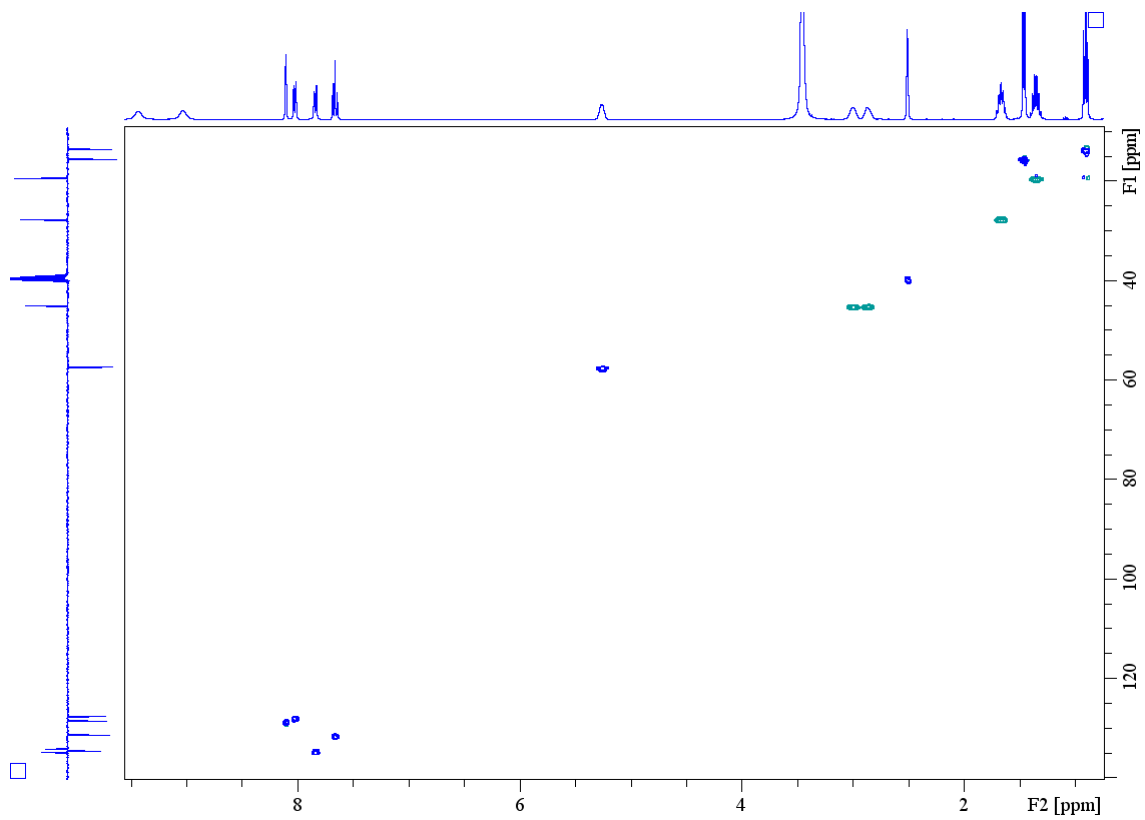


Figura A.47 - Espectro de HSQC (DMSO-*d*₆) da 3'-CBC (**8**).

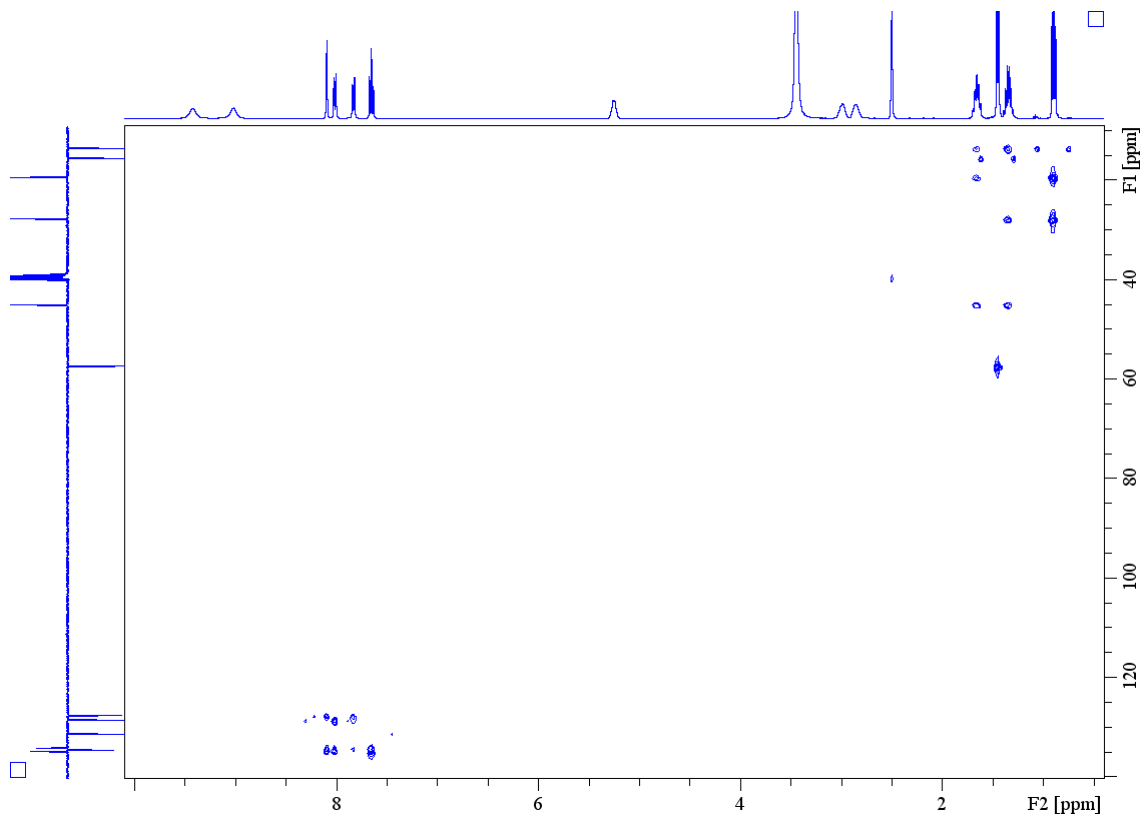


Figura A.48 - Espectro de HMBC (DMSO-*d*₆) da 3'-CBC (**8**).

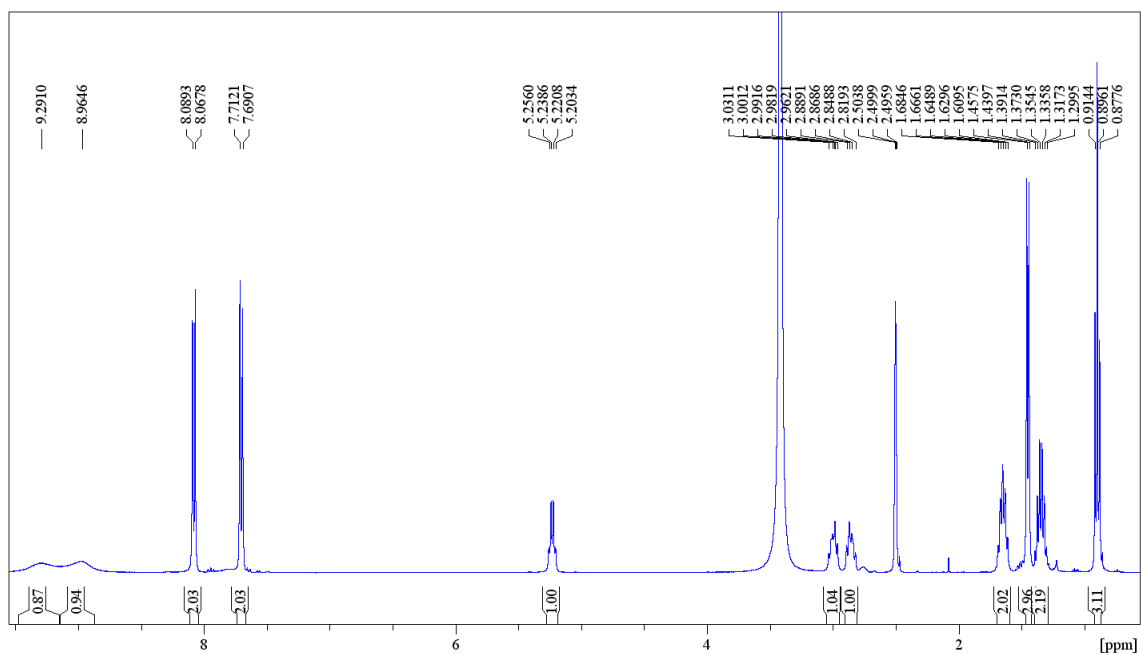


Figura A.49 - Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) da 4'-CBC (**9**).

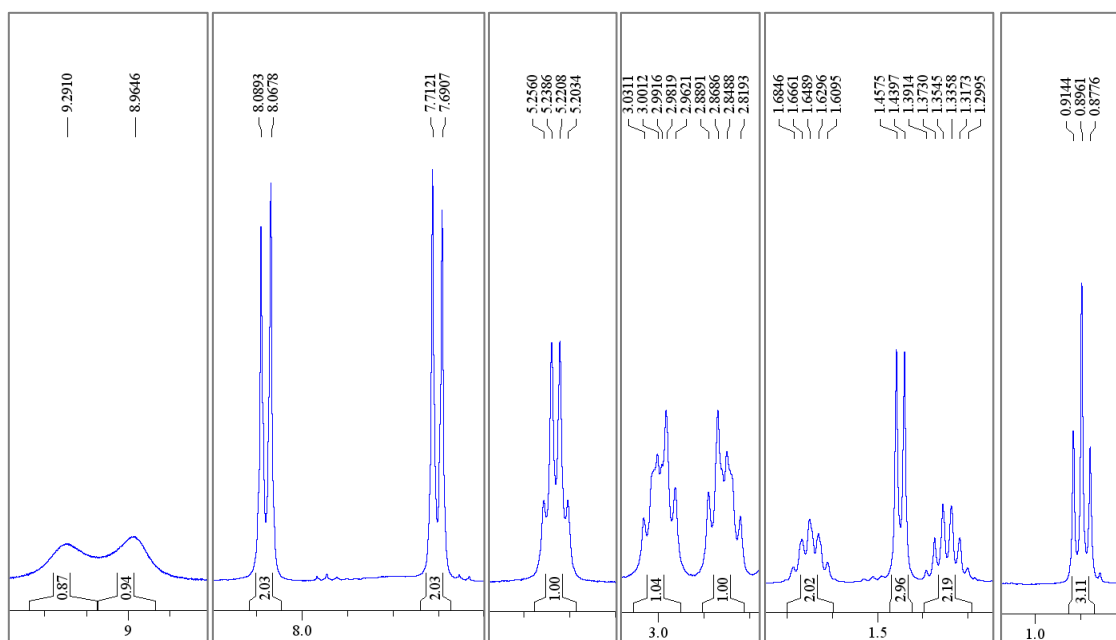


Figura A.50 - Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) da 4'-CBC (**9**) (ampliação).

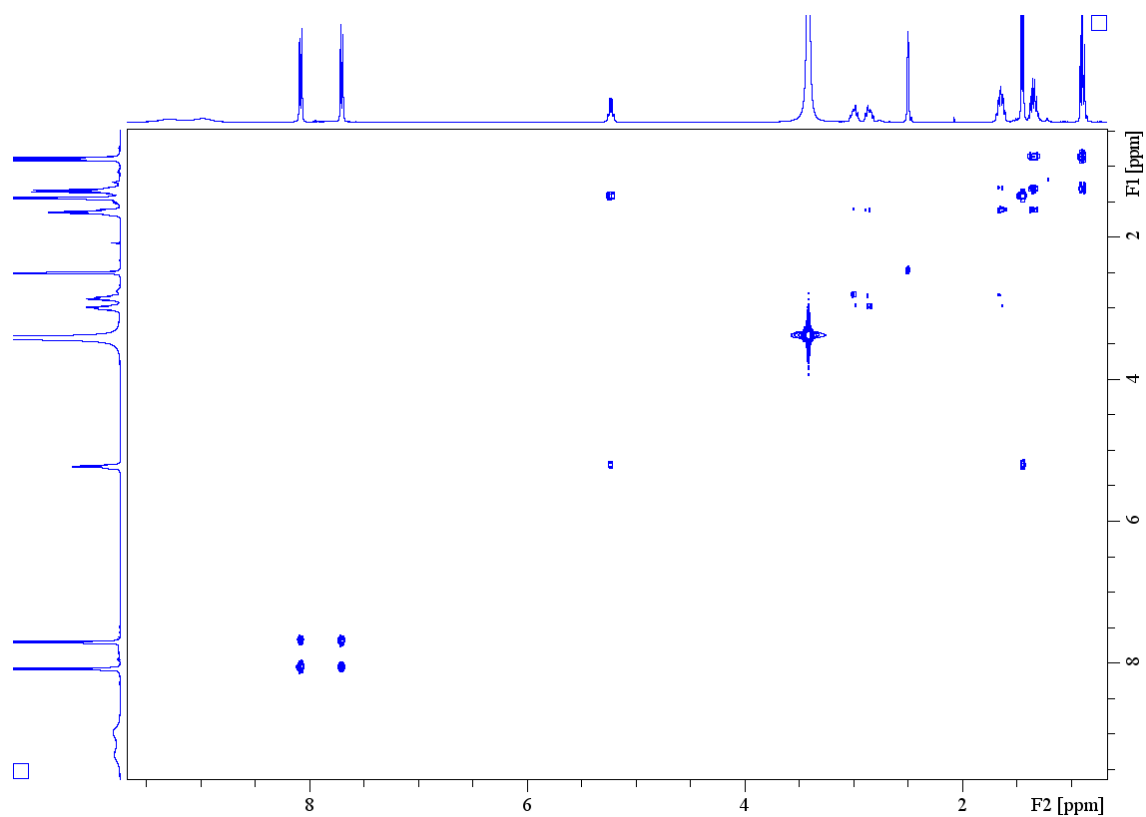


Figura A.51 - Espectro de COSY (DMSO- d_6) da 4'-CBC (9).

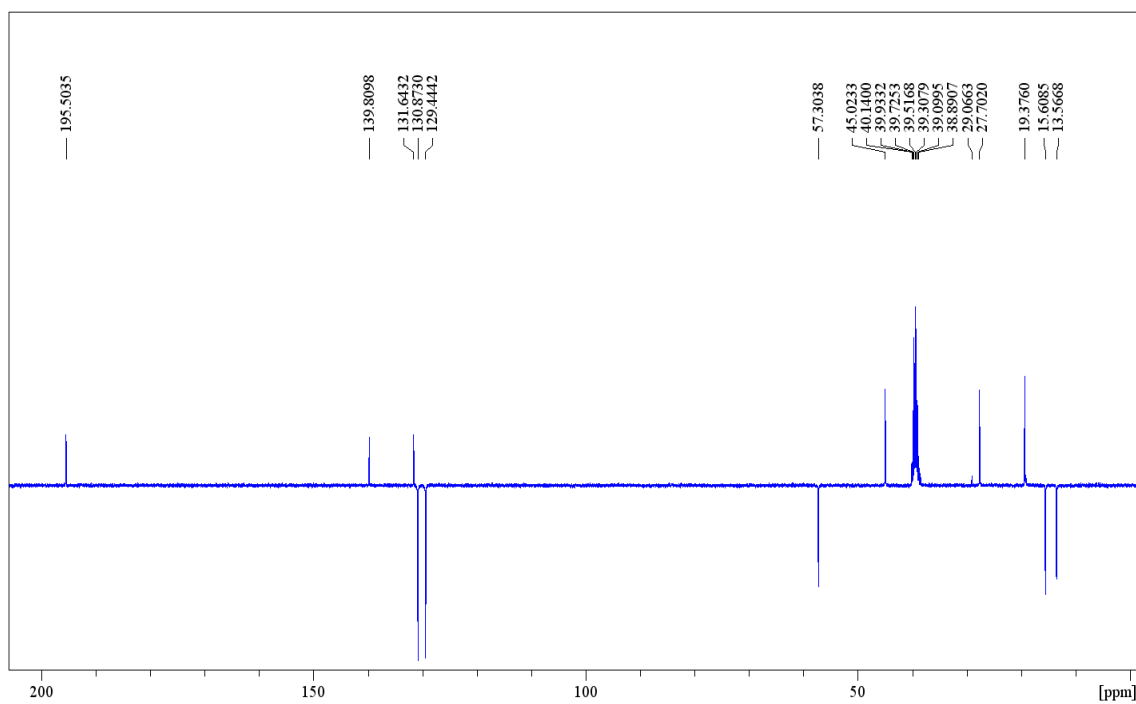


Figura A.52 - Espectro de RMN ^{13}C APT (DMSO- d_6) da 4'-CBC (9).

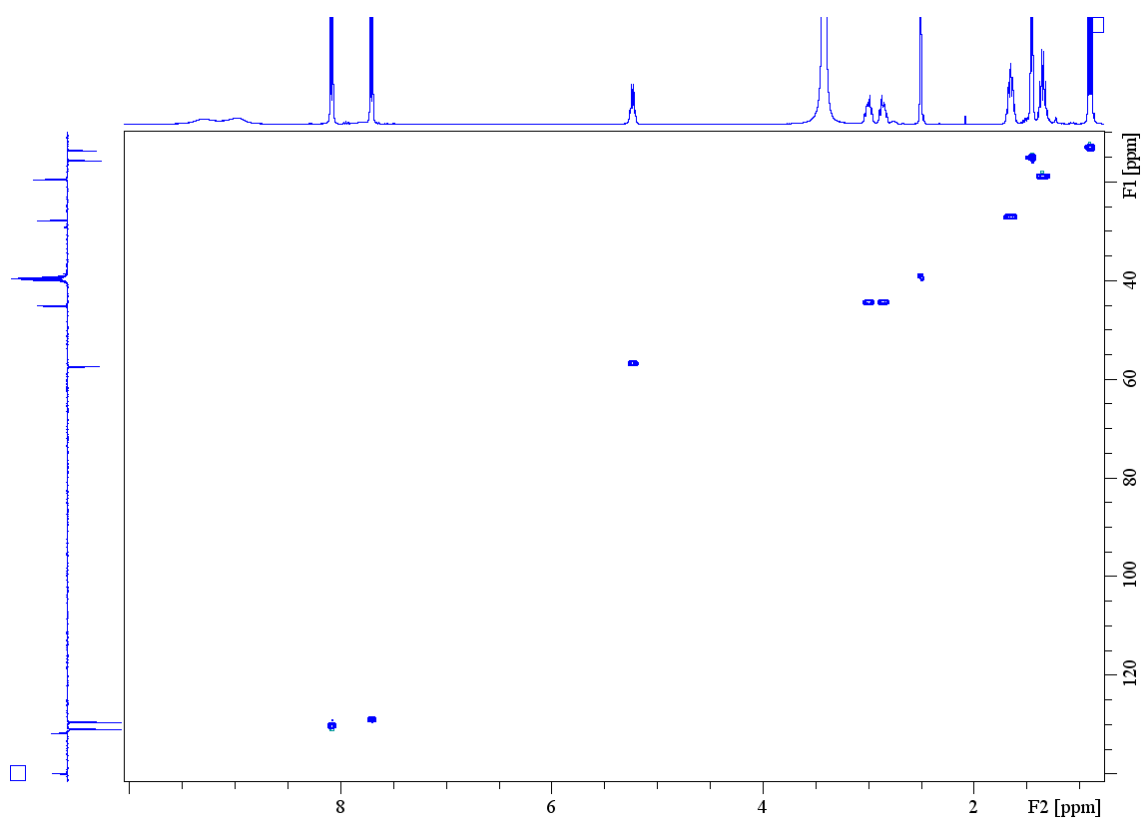


Figura A.53 - Espectro de HSQC (DMSO-*d*₆) da 4'-CBC (**9**).

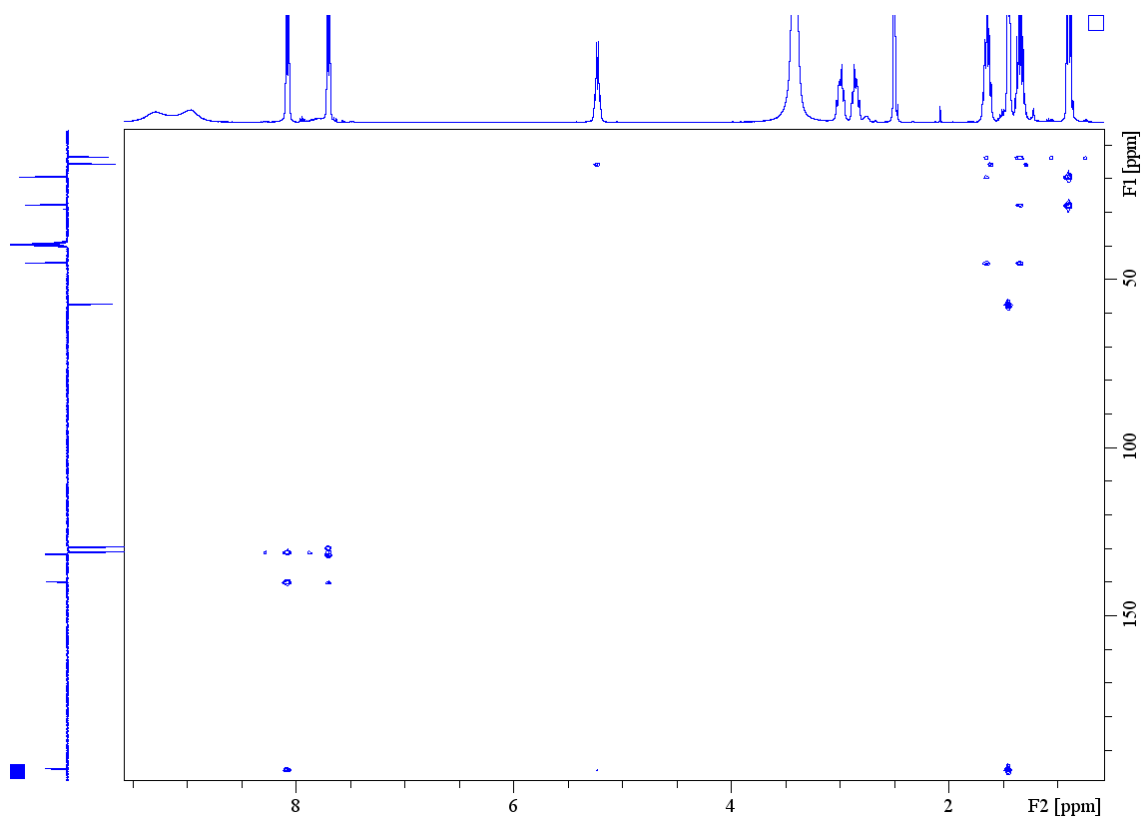


Figura A.54 - Espectro de HMBC (DMSO-*d*₆) da 4'-CBC (**9**).

Tabela A.1 - Resultados das previsões *in silico* obtidas no servidor pkCSM.

	SMILES	Molecular Weight	LogP	#Rotatable Bonds	#Acceptors	#Donors	Surface Area	Water solubility	Caco2 permeability	Intestinal absorption (human)	Skin Permeability	P-glycoprotein substrate	P-glycoprotein I inhibitor	P-glycoprotein II inhibitor	VDss (human)	Fraction unbound (human)	BBB permeability	CNS permeability
2'-CMC (1)	<chem>C[NH2+](C(C)C(=O)C1=CC=CC=C1)C.[Cl-]</chem>	234,126	-1,8916	3	1	1	95,059	-0,257	1,185	87,687	-3,057	No	No	No	0,365	0,586	0,016	-1,946
3'-CMC (2)	<chem>C[NH2+](C(C)C(=O)C1=CC=CC=C1)C.[Cl-]</chem>	234,126	-1,8916	3	1	1	95,059	-0,257	1,185	87,687	-3,057	No	No	No	0,365	0,586	0,016	-1,946
4'-CMC (3)	<chem>CC(C(=O)C1=CC=CC=C1)C.[Cl-]</chem>	234,126	-1,8916	3	1	1	95,059	-0,852	1,171	92,981	-2,884	No	No	No	0,498	0,801	-0,018	-2,383
2'-CEC (4)	<chem>CC[NH2+](C(C)C(=O)C1=CC=CC=C1)C.[Cl-]</chem>	248,153	-1,5015	4	1	1	101,424	-0,489	1,181	87,752	-3,057	No	No	No	0,428	0,566	0,044	-2,045
3'-CEC (5)	<chem>CC[NH2+](C(C)C(=O)C1=CC=CC=C1)C.[Cl-]</chem>	248,153	-1,5015	4	1	1	101,424	-0,489	1,181	87,752	-3,057	No	No	No	0,428	0,566	0,044	-2,045
4'-CEC (6)	<chem>CC[NH2+](C(C)C(=O)C1=CC=CC=C1)C.[Cl-]</chem>	248,153	-1,5015	4	1	1	101,424	-0,489	1,181	87,752	-3,057	No	No	No	0,428	0,566	0,044	-2,045
3'-CBC (8)	<chem>CCCC[NH2+](C(C)C(=O)C1=CC=CC=C1)C.[Cl-]</chem>	276,207	-0,7213	6	1	1	114,154	-1,128	1,185	84,504	-2,999	No	No	No	0,658	0,532	0,11	-1,905
4'-CBC (9)	<chem>CCCC[NH2+](C(C)C(=O)C1=CC=CC=C1)C.[Cl-]</chem>	276,207	-0,7213	6	1	1	114,154	-1,128	1,185	84,504	-2,999	No	No	No	0,658	0,532	0,11	-1,905
2'-Cl-PPP (10)	<chem>O=C(C1=CC=CC=C1)C([NH+])C1=CC=CC=C1.[Cl-]</chem>	274,191	-1,4061	3	1	1	113,358	-0,733	1,637	100	-2,738	No	No	No	0,771	0,796	-0,036	-2,589
3'-Cl-PPP (11)	<chem>ClC1=CC=CC=C1C(=O)C([NH+])C1=CC=CC=C1.[Cl-]</chem>	274,191	-1,4061	3	1	1	113,358	-0,706	1,627	100	-2,842	No	No	No	0,711	0,695	-0,028	-2,589
4'-Cl-PPP (12)	<chem>CC(C(=O)C1=CC=CC=C1)C([NH+])C1=CC=CC=C1.[Cl-]</chem>	274,191	-1,4061	3	1	1	113,358	-1,102	1,185	97,719	-2,887	No	No	No	0,677	0,758	-0,03	-2,622
2'-CDC (13)	<chem>C[NH+](C(C)C(=O)C1=CC=CC=C1)C.[Cl-]</chem>	248,153	-1,9403	3	1	1	101,634	-0,382	1,207	92,235	-3,021	No	No	No	0,422	0,58	0,229	-1,975
3'-CDC (14)	<chem>C[NH+](C(C)C(=O)C1=CC=CC=C1)C.[Cl-]</chem>	248,153	-1,9403	3	1	1	101,634	-0,382	1,207	92,235	-3,021	No	No	No	0,422	0,58	0,229	-1,975
4'-CDC (15)	<chem>CC(C(=O)C1=CC=CC=C1)C([NH+])C1=CC=CC=C1.[Cl-]</chem>	248,153	-1,9403	3	1	1	101,634	-0,94	1,194	97,53	-2,836	No	No	No	0,544	0,794	-0,037	-2,413
3'-Cl-DEC (16)	<chem>CC[NH+](C(C)C(=O)C1=CC=CC=C1)C.[Cl-]</chem>	276,207	-1,1601	5	1	1	114,364	-0,874	1,199	92,366	-3,021	No	No	No	0,55	0,539	0,335	-2,173
4'-Cl-DEC (17)	<chem>CC[NH+](C(C)C(=O)C1=CC=CC=C1)C.[Cl-]</chem>	276,207	-1,1601	5	1	1	114,364	-0,874	1,199	92,366	-3,021	No	No	No	0,55	0,539	0,335	-2,173
3'-CIC (18)	<chem>ClC1=CC=CC=C1C(=O)C([NH2+])C1=CC=CC=C1.[Cl-]</chem>	262,18	-1,113	4	1	1	107,789	-0,848	1,491	92,747	-2,69	No	No	No	0,609	0,623	0,048	-1,856
4'-CIC (19)	<chem>CC(C(=O)C1=CC=CC=C1)C([NH2+])C1=CC=CC=C1.[Cl-]</chem>	262,18	-1,113	4	1	1	107,789	-1,342	1,049	88,197	-2,772	No	No	No	0,62	0,646	0,061	-1,987
3'-Cl-TBC (20)	<chem>ClC1=CC=CC=C1C(=O)C([NH2+])C1=CC=CC=C1.[Cl-]</chem>	276,207	-0,7229	3	1	1	114,154	-1,218	1,563	91,006	-2,69	No	No	No	0,575	0,555	0,068	-1,603
4'-Cl-TBC (21)	<chem>CC(C(=O)C1=CC=CC=C1)C([NH2+])C1=CC=CC=C1.[Cl-]</chem>	276,207	-0,7229	3	1	1	114,154	-1,589	1,122	86,447	-2,751	No	No	No	0,592	0,579	0,087	-1,82
Mefedrona (22)	<chem>C[NH2+](C(C)C(=O)C1=CC=CC=C1)C.[Cl-]</chem>	213,708	-2,23658	3	1	1	91,121	0,154	1,178	83,913	-3,062	No	No	No	0,421	0,601	0,041	-1,946
								(log mol/L)	(log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)	(% Absorbed)	(log Kp)				(log L/kg)	(Fu)	(log BB)	(log PS)

Catinonas	CYP2D6 substrate	CYP3A4 substrate	CYP1A2 inhibitor	CYP2C19 inhibitor	CYP2C9 inhibitor	CYP2D6 inhibitor	CYP3A4 inhibitor	Total Clearance	Renal OCT2 substrate	AMES toxicity	Max. tolerated dose (human)	hERG I inhibitor	hERG II inhibitor	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	Hepatotoxicity	Skin Sensitisation	T.Pyiformis toxicity	Minnow toxicity
2'-CMC (1)	No	No	Yes	No	No	No	No	1,598	No	No	0,54	No	No	1,977	0,334	Yes	Yes	0,228	2,228
3'-CMC (2)	No	No	Yes	No	No	No	No	1,549	No	No	0,54	No	No	1,977	0,334	Yes	Yes	0,228	2,228
4'-CMC (3)	No	No	No	No	No	No	No	1,599	No	No	0,279	No	No	2,377	0,334	No	No	0,092	2,22
2'-CEC (4)	No	No	Yes	No	No	No	No	1,589	No	No	0,49	No	No	2,014	0,258	Yes	No	0,389	2,062
3'-CEC (5)	No	No	Yes	No	No	No	No	1,54	No	No	0,49	No	No	2,014	0,258	Yes	Yes	0,389	2,062
4'-CEC (6)	No	No	Yes	No	No	No	No	1,629	No	No	0,49	No	No	2,014	0,258	Yes	Yes	0,389	2,062
3'-CBC (8)	No	No	Yes	No	No	Yes	No	1,649	No	No	0,459	No	No	2,157	0,193	Yes	Yes	0,839	1,474
4'-CBC (9)	No	No	Yes	No	No	Yes	No	1,738	No	No	0,459	No	No	2,157	0,193	Yes	Yes	0,839	1,474
2'-Cl-PPP (10)	No	Yes	No	No	No	Yes	No	1,606	No	No	-0,132	No	No	2,285	0,128	No	Yes	0,302	1,961
3'-Cl-PPP (11)	No	No	No	No	No	No	No	1,557	No	No	0,213	No	No	2,555	0,128	No	No	0,297	1,961
4'-Cl-PPP (12)	No	No	No	No	No	No	No	1,649	No	No	-0,118	No	No	2,497	0,137	Yes	No	0,219	2,067
2'-CDC (13)	No	No	No	No	No	No	No	1,588	No	No	0,473	No	No	1,956	0,236	Yes	No	0,533	2,213
3'-CDC (14)	No	No	No	No	No	No	No	1,539	No	No	0,473	No	No	1,956	0,236	Yes	Yes	0,533	2,213
4'-CDC (15)	No	No	No	No	No	No	No	1,589	No	No	0,214	No	No	2,376	0,236	No	No	0,146	2,206
3'-Cl-DEC (16)	No	No	Yes	No	No	No	No	1,59	No	No	0,381	No	No	2,031	0,084	No	Yes	0,845	1,883
4'-Cl-DEC (17)	No	No	Yes	No	No	No	No	1,679	No	No	0,381	No	No	2,031	0,084	No	Yes	0,845	1,883
3'-CIC (18)	No	No	No	No	No	No	No	1,439	No	No	0,328	No	No	2,387	0,854	No	Yes	0,29	1,044
4'-CIC (19)	No	No	Yes	No	No	No	No	1,499	No	No	0,572	No	No	2,403	0,297	Yes	Yes	0,264	1,841
3'-Cl-TBC (20)	No	No	No	No	No	No	No	1,288	No	No	0,236	No	No	2,35	1,043	No	Yes	0,33	0,811
4'-Cl-TBC (21)	No	No	Yes	No	No	No	No	1,332	No	No	0,578	No	No	2,437	0,301	No	Yes	0,338	1,879
Mefedrona (22)	No	No	Yes	No	No	No	No	1,602	No	No	0,563	No	No	1,738	0,384	Yes	Yes	-0,093	2,445
								(log ml/min/kg)			(log mg/kg/day)			(mol/kg)	(log mg/kg_bw/day)				(log mM)

Tabela A.2- Resultados das previsões *in silico* obtidas no servidor SwissADME.

Catinona	SMILES	MW	Fraction Csp3	#Rotatable bonds	#H-bond acceptors	#H-bond donors	MR	TPSA	iLOGP	XLOGP3	WLOGP	MLOGP	Silicos-IT Log P	Consensus Log P	ESOL Log S	ESOL Solubility (mg/ml)	ESOL Solubility (mol/l)	ESOL Class	AliLog S	Ali Solubility (mg/ml)	Ali Solubility (mol/l)
2'-CMC (1)	<chem>C[NH2+]C(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	234,12	0,3	3	1	1	61,17	33,68	0	2,89	-1,89	-1,37	2,54	0,43	-3,23	1,37E-01	5,87E-04	Soluble	-3,26	1,29E-01	5,53E-04
3'-CMC (2)	<chem>C[NH2+]C(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	234,12	0,3	3	1	1	61,17	33,68	0	3,04	-1,89	-1,37	2,54	0,46	-3,33	1,11E-01	4,72E-04	Soluble	-3,41	9,04E-02	3,86E-04
4'-CMC (3)	<chem>CC(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	234,12	0,3	3	1	1	61,17	33,68	0	3,04	-1,89	-1,37	2,54	0,46	-3,33	1,11E-01	4,72E-04	Soluble	-3,41	9,04E-02	3,86E-04
2'-CEC (4)	<chem>CC[NH2+]C(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	248,15	0,36	4	1	1	65,98	33,68	0	3,4	-1,5	-1,1	2,91	0,74	-3,55	6,95E-02	2,80E-04	Soluble	-3,79	4,06E-02	1,63E-04
3'-CEC (5)	<chem>CC[NH2+]C(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	248,15	0,36	4	1	1	65,98	33,68	0	3,4	-1,5	-1,1	2,91	0,74	-3,55	6,95E-02	2,80E-04	Soluble	-3,79	4,06E-02	1,63E-04
4'-CEC (6)	<chem>CC[NH2+]C(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	248,15	0,36	4	1	1	65,98	33,68	0	3,4	-1,5	-1,1	2,91	0,74	-3,55	6,95E-02	2,80E-04	Soluble	-3,79	4,06E-02	1,63E-04
3'-CBC (8)	<chem>CCCC[NH2+]C(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	276,2	0,46	6	1	1	75,59	33,68	0	4,29	-0,72	-0,58	3,68	1,33	-4,12	2,09E-02	7,58E-05	Moderately soluble	-4,71	5,38E-03	1,95E-05
4'-CBC (9)	<chem>CCCC[NH2+]C(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	276,2	0,46	6	1	1	75,59	33,68	0	4,29	-0,72	-0,58	3,68	1,33	-4,12	2,09E-02	7,58E-05	Moderately soluble	-4,71	5,38E-03	1,95E-05
2'-Cl-PPP (10)	<chem>O=C1C=CC=C(C1)C(NH+)CCCC1Cl</chem>	274,19	0,46	3	1	1	77,19	21,51	0	3,99	-1,79	-0,97	3,32	0,91	-4,12	2,10E-02	7,64E-05	Moderately soluble	-4,14	1,97E-02	7,19E-05
3'-Cl-PPP (11)	<chem>ClC1=CC=CC=C1C(O)C(NH+)CCCC1Cl</chem>	274,19	0,46	3	1	1	77,19	21,51	0	3,99	-1,79	-0,97	3,32	0,91	-4,12	2,10E-02	7,64E-05	Moderately soluble	-4,14	1,97E-02	7,19E-05
4'-Cl-PPP (12)	<chem>CC(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	274,19	0,46	3	1	1	77,19	21,51	0	3,99	-1,79	-0,97	3,32	0,91	-4,12	2,10E-02	7,64E-05	Moderately soluble	-4,14	1,97E-02	7,19E-05
2'-CDC (13)	<chem>C[NH+]C(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	248,15	0,36	3	1	1	66,07	21,51	0	3,36	-1,94	-1,1	2,46	0,56	-3,59	6,33E-02	2,55E-04	Soluble	-3,49	8,04E-02	3,24E-04
3'-CDC (14)	<chem>C[NH+]C(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	248,15	0,36	3	1	1	66,07	21,51	0	3,5	-1,94	-1,1	2,46	0,58	-3,68	5,17E-02	2,08E-04	Soluble	-3,63	5,75E-02	2,32E-04
4'-CDC (15)	<chem>CC(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	248,15	0,36	3	1	1	66,07	21,51	0	3,5	-1,94	-1,1	2,46	0,58	-3,68	5,17E-02	2,08E-04	Soluble	-3,63	5,75E-02	2,32E-04
3'-Cl-DEC (16)	<chem>CC[NH+]C(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	276,2	0,46	5	1	1	75,69	21,51	0	4,24	-1,16	-0,58	3,23	1,15	-4,15	1,93E-02	7,00E-05	Moderately soluble	-4,4	1,09E-02	3,96E-05
4'-Cl-DEC (17)	<chem>CC[NH+]C(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	276,2	0,46	5	1	1	75,69	21,51	0	4,24	-1,16	-0,58	3,23	1,15	-4,15	1,93E-02	7,00E-05	Moderately soluble	-4,4	1,09E-02	3,96E-05
3'-CIC (18)	<chem>ClC1=CC=CC=C1C(O)C(NH+)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	262,18	0,42	4	1	1	70,79	33,68	0	3,84	-1,11	-0,83	3,12	1	-3,9	3,31E-02	1,26E-04	Soluble	-4,24	1,50E-02	5,71E-05
4'-CIC (19)	<chem>CC(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	262,18	0,42	4	1	1	70,79	33,68	0	3,84	-1,11	-0,83	3,12	1	-3,9	3,31E-02	1,26E-04	Soluble	-4,24	1,50E-02	5,71E-05
3'-Cl-TBC (20)	<chem>ClC1=CC=CC=C1C(O)C(NH+)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	276,2	0,46	4	1	1	75,63	33,68	0	4,02	-0,72	-0,58	3,35	1,21	-4,08	2,29E-02	8,28E-05	Moderately soluble	-4,43	1,03E-02	3,72E-05
4'-Cl-TBC (21)	<chem>CC(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	276,2	0,46	4	1	1	75,63	33,68	0	4,02	-0,72	-0,58	3,35	1,21	-4,08	2,29E-02	8,28E-05	Moderately soluble	-4,43	1,03E-02	3,72E-05
Mefedrona (22)	<chem>C[NH2+]C(C(=O)O)C1=CC=CC=C1Cl</chem>	213,7	0,36	3	1	1	61,13	33,68	0	2,77	-2,24	-1,64	2,39	0,26	-3,03	2,00E-01	9,35E-04	Soluble	-3,13	1,57E-01	7,36E-04

Catinonas	Ali Class	Silicos-IT LogSw	Silicos-IT Solubility (mg/ml)	Silicos-IT Solubility (mol/l)	Silicos-IT class	BGI	BHE	Pgp substrate	CYP1A2 inhibitor	CYP2C19 inhibitor	CYP2C9 inhibitor	CYP2D6 inhibitor	CYP3A4 inhibitor	log Kp (cm/s)	Lipins ki	Ghose	Veber	Egan	Muegge	Bioavailability Score	PAINS #alerts	Brenk #alerts	Leadlikeness #violations	Synthetic Accessibility
2'-CMC (1)	Soluble	-3,84	3,38E-02	1,44E-04	Soluble	Low	No	No	No	No	No	No	No	-5,68	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	2,02
3'-CMC (2)	Soluble	-3,84	3,38E-02	1,44E-04	Soluble	Low	No	No	Yes	No	No	No	No	-5,57	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	1,87
4'-CMC (3)	Soluble	-3,84	3,38E-02	1,44E-04	Soluble	Low	No	No	Yes	No	No	No	No	-5,57	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	1,74
2'-CEC (4)	Soluble	-4,25	1,40E-02	5,65E-05	Moderately soluble	Low	No	No	Yes	No	No	No	No	-5,4	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	2,11
3'-CEC (5)	Soluble	-4,25	1,40E-02	5,65E-05	Moderately soluble	Low	No	No	Yes	No	No	No	No	-5,4	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	1,98
4'-CEC (6)	Soluble	-4,25	1,40E-02	5,65E-05	Moderately soluble	Low	No	No	Yes	No	No	No	No	-5,4	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	1,86
3'-CBC (8)	Moderately soluble	-5,06	2,42E-03	8,75E-06	Moderately soluble	High	No	No	Yes	No	No	No	No	-4,94	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	2,19
4'-CBC (9)	Moderately soluble	-5,06	2,42E-03	8,75E-06	Moderately soluble	High	No	No	Yes	No	No	No	No	-4,94	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	2,1
2'-Cl-PPP (10)	Moderately soluble	-3,85	3,87E-02	1,41E-04	Soluble	Low	No	No	Yes	No	No	No	No	-5,14	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	2,27
3'-Cl-PPP (11)	Moderately soluble	-3,85	3,87E-02	1,41E-04	Soluble	Low	No	No	Yes	No	No	No	No	-5,14	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	2,14
4'-Cl-PPP (12)	Moderately soluble	-3,85	3,87E-02	1,41E-04	Soluble	Low	No	No	Yes	No	No	No	No	-5,14	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	2,05
2'-CDC (13)	Soluble	-3,52	7,58E-02	3,05E-04	Soluble	Low	No	No	No	No	No	No	No	-5,43	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	2,12
3'-CDC (14)	Soluble	-3,52	7,58E-02	3,05E-04	Soluble	Low	No	No	No	No	No	No	No	-5,33	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	1,97
4'-CDC (15)	Soluble	-3,52	7,58E-02	3,05E-04	Soluble	Low	No	No	No	No	No	No	No	-5,33	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	1,84
3'-Cl-DEC (16)	Moderately soluble	-4,33	1,31E-02	4,73E-05	Moderately soluble	Low	No	No	No	No	No	No	No	-4,97	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	2,18
4'-Cl-DEC (17)	Moderately soluble	-4,33	1,31E-02	4,73E-05	Moderately soluble	Low	No	No	No	No	No	No	No	-4,97	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	2,06
3'-CIC (18)	Moderately soluble	-4,28	1,38E-02	5,25E-05	Moderately soluble	Low	No	No	No	No	No	No	No	-5,17	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	2,08
4'-CIC (19)	Moderately soluble	-4,28	1,38E-02	5,25E-05	Moderately soluble	Low	No	No	No	No	No	No	No	-5,17	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	1,96
3'-Cl-TBC (20)	Moderately soluble	-4,67	5,96E-03	2,16E-05	Moderately soluble	High	No	No	No	No	No	No	No	-5,13	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	2,18
4'-Cl-TBC (21)	Moderately soluble	-4,67	5,96E-03	2,16E-05	Moderately soluble	High	No	No	No	No	No	No	No	-5,13	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	2,06
Mefedrona (22)	Soluble	-3,6	5,31E-02	2,48E-04	Soluble	Low	No	No	No	No	No	No	No	-5,64	0	1	0	0	0	0,55	0	0	1	1,68