

Tiago Rolando Silva Carvalho

Avaliação *in vitro* da nefrotoxicidade de cationas sintéticas

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2017

Tiago Rolando Silva Carvalho

Avaliação *in vitro* da nefrotoxicidade de cationas sintéticas

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2017

Tiago Rolando Silva Carvalho

Avaliação *in vitro* da nefrotoxicidade de cationas sintéticas

Trabalho original realizado por:

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como partes dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Doutora Márcia Cláudia Dias de Carvalho

Este trabalho foi financiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto UID/Multi/04546/2013.

This work was supported by national funds through FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, in the scope of FCT Project UID/Multi/04546/2013.

Sumário

O mundo das drogas recreativas alterou-se nas últimas décadas com o aparecimento contínuo de novas substâncias psicoativas (NSP), sendo a população jovem a mais afetada por estas substâncias. Entre estas NSP destacam-se as catinonas sintéticas que são química e estruturalmente semelhantes às anfetaminas, sendo também denominadas de “ β -ceto anfetaminas”, apresentando propriedades psicostimulantes. Embora atualmente muitas destas novas drogas já sejam ilegais em muitos países, estas drogas apareceram inicialmente no mercado como alternativas legais (“drogas legais”) a drogas ilícitas bem conhecidas, tais como as anfetaminas e a cocaína. Nos últimos anos foram descritos vários casos de intoxicações e mortes associadas ao consumo destas drogas. Desta forma, é de grande importância a realização de estudos que avaliem o seu potencial tóxico e o risco para a saúde dos seus consumidores. Neste trabalho pretendeu-se avaliar os potenciais efeitos nefrotóxicos de cinco derivados sintéticos da catinona comumente consumidos, nomeadamente a 3,4-metilenodioxipirovalerona (MDPV), metilona, pentedrona, 3,4-dimetilmetcatinona (3,4-DMMC) e 4-metilecatinona (4-MEC), usando a linha celular HK-2 como modelo *in vitro*. As células HK-2 foram expostas a uma ampla gama de concentrações, de 0,01 a 3 mM para a 3,4-DMMC e de 0,1 a 10 mM para as restantes catinonas sintéticas estudadas, durante 24 e 48 horas. A toxicidade foi avaliada usando o ensaio de redução do MTT que permite estimar a viabilidade celular. Os resultados obtidos nesta dissertação mostraram pela primeira vez que as β -ceto-anfetaminas estudadas induziram nefrotoxicidade, pelo menos no modelo *in vitro* usado, de modo dependente da concentração e do tempo de exposição. A 3,4-DMMC foi o derivado da catinona que exibiu maior toxicidade para as células HK-2, seguida da MDPV, pentedrona, metilona, e, por último, a 4-MEC. Contudo, são necessários estudos adicionais para a compreensão dos mecanismos subjacentes aos efeitos nefrotóxicos das β -ceto-anfetaminas.

Palavras-chave: Catinonas sintéticas, “drogas legais”, “sais de banho”, nefrotoxicidade, células HK-2, viabilidade celular.

Abstract

The world of recreational drugs has changed in the last decades with the continuous appearance of new psychoactive substances (NPS), being the young population the most affected by these substances. Among these NPS are synthetic cathinones that are chemically and structurally similar to amphetamines, being also called “ β -keto amphetamines”, possessing psychostimulant properties. Although many of these new drugs are now illegal in many countries, these drugs have initially appeared on the market as legal alternatives ("legal drugs") to well-known illicit drugs such as amphetamines and cocaine. Some cases of intoxication and death related to these drugs consumption have been reported in the last few years. Thus, it is really important to carry out studies that assess their toxic potential and health risks to consumers. The purpose of this study was to evaluate the potential nephrotoxic effects of five commonly used cathinone synthetic derivatives, namely 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV), methylone, pentedrone, 3,4-dimethylmetcatinone (3,4-DMMC) and 4-methylethcatinone (4-MEC) using the HK-2 cell line as an *in vitro* model. The HK-2 cells were exposed to a wide range of concentrations, specifically 0.01-3 mM for 3,4-DMMC and 0.1-10 mM for all the others synthetic cathinones, for 24 and 48 hours. The toxicity assessment was performed using the MTT reduction assay for evaluating cell viability. The results obtained in the present study showed for the first time that the tested β -keto amphetamines induced nephrotoxicity, at least in this *in vitro* model, in a concentration- and time-dependent manner. 3,4-DMMC was found to be the cathinone derivative that exhibited the highest toxicity for HK-2 cells, followed by MDPV, pentedrone, methylone, and 4-MEC. However, further studies are needed to understand the mechanisms underlying the nephrotoxic effects of β -keto-amphetamines.

Keywords: Synthetic cathinones, legal highs, bath salts, nephrotoxicity, HK-2 cells, cell viability

Agradecimentos

À minha orientadora, a Professora Doutora Márcia Carvalho, pela disponibilidade, dedicação, acompanhamento, paciência e orientação científica desta dissertação. Todo o acompanhamento e disponibilidade quer na parte prática quer na escrita da parte teórica foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Ana Margarida Araújo pela disponibilidade no início deste projeto e ensinamentos relacionados com o tratamento dos resultados.

Aos técnicos do CERLAB pela simpatia e acessibilidade na utilização de material e espaço, sempre que necessário.

Aos responsáveis pelo CEBIMED, que permitiram a realização experimental deste projeto, com todas as condições e material necessário para uma boa prática laboratorial.

Agradeço aos meus pais e à minha irmã, por todo o acompanhamento e apoio incansável durante todo o meu período académico, mas também em todas as outras fases da minha vida. Agradeço pela paciência, força e motivação que sempre me deram. Obrigado por todos os conselhos e valores transmitidos.

Queria deixar um agradecimento especial para a Isa Vaz, embora eu sinta que estas palavras nunca serão suficientes para compensar todo o apoio e dedicação. Obrigado pela ajuda incondicional, por todas as horas despendidas em meu auxílio, não só para esta dissertação, mas também ao longo destes anos. Agradeço ainda, pela força que me deste e por sempre acreditares que eu iria concretizar esta etapa especial com sucesso!

Ainda gostaria de agradecer aos meus amigos, em particular ao Álvaro Serrado e Beatriz Ramos por estarem sempre ao meu lado e por terem tornado este longo percurso muito mais agradável. Obrigado pela vossa amizade, pela confiança e por marcarem de uma forma tão positiva a minha vida.

Índice

| | |
|---|------|
| Sumário..... | vi |
| Abstract..... | vii |
| Índice de figuras | xi |
| Índice de tabelas | xiii |
| Lista de abreviaturas | xiv |
| Enquadramento e estrutura da dissertação..... | 1 |
| I. PARTE TEÓRICA: AS CATINONAS SINTÉTICAS..... | 3 |
| 1.1. Perspetiva histórica..... | 3 |
| 1.2. Prevalência do consumo e enquadramento legal | 8 |
| 1.3. Estrutura química..... | 9 |
| 1.4. Perfil de consumo | 15 |
| 1.4.1. Propriedades organoléticas e comerciais | 15 |
| 1.4.2 Vias de administração | 16 |
| 1.4.3 Dosagem | 16 |
| 1.5. Farmacocinética..... | 18 |
| 1.6. Farmacodinâmica..... | 23 |
| 1.7. Efeitos tóxicos | 26 |
| 1.8. Tolerância, dependência e síndrome de abstinência..... | 29 |
| 1.9. Tratamento de intoxicações agudas | 30 |
| II. PARTE EXPERIMENTAL | 31 |
| 2.1. Enquadramento e objetivos..... | 31 |
| 2.2 Materiais e Métodos..... | 33 |
| 2.2.1 Reagentes | 33 |
| 2.2.2. Linha celular HK-2..... | 34 |
| 2.2.3. Preparação do meio de cultura | 34 |
| 2.2.4. Descongelamento de alíquota celular | 35 |

| | |
|---|----|
| 2.2.5. Cultura e subcultura das células HK-2..... | 36 |
| 2.2.6. Preparação de alíquotas para congelação..... | 36 |
| 2.2.7. Incubação com as cationonas sintéticas..... | 37 |
| 2.2.8. Determinação da viabilidade celular com MTT tetrazólio..... | 40 |
| 2.2.9. Tratamento estatístico..... | 42 |
| 2.3. Resultados..... | 42 |
| 2.3.1. Avaliação do efeito citotóxico induzido pelas cationonas estudadas em células HK-2..... | 42 |
| 2.3.2. Análise comparativa da toxicidade das cationonas sintéticas estudadas na linha celular HK-2..... | 46 |
| 2.4. Discussão..... | 47 |
| III. CONCLUSÕES..... | 51 |
| IV. BIBLIOGRAFIA..... | 52 |
| V. ANEXOS..... | 58 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Friso cronológico associado às catinonas | 7 |
| Figura 2. Estruturas químicas da catina e da catinona presentes na planta <i>khat</i> (adaptado de (De Felice <i>et al.</i> , 2014))..... | 10 |
| Figura 3. Estrutura química base das catinonas sintéticas assinalando as regiões de inserção dos vários substituintes..... | 10 |
| Figura 4. Estruturas químicas da catinona e da anfetamina..... | 11 |
| Figura 5. Estrutura química dos derivados da catinona <i>N</i> -alquilados..... | 12 |
| Figura 6. Estruturas químicas das catinonas 3,4-metilenodioxo- <i>N</i> -alquiladas (1) e respectivas anfetaminas relacionadas (2) as 3,4-metilenodioxianfetaminas (MDMA, 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDEA, 3,4-metilenodioxietanfetamina; MBDB, <i>N</i> -metil-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamina; MBDP, <i>N</i> -metil-1,3-benzodioxolilpentanamina | 13 |
| Figura 7. Estruturas químicas das catinonas pirrolidinofenonas..... | 14 |
| Figura 8. Estrutura química das catinonas 3,4-metilenodioxo- <i>N</i> -pirrolidina. MDPPP, 3,4-metilenodioxo- α -pirrolidinopropiofenona; MDPBP, 3,4-metilenodioxo- α -pirrolidinobutiropfenona, MDPV, (1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-pirrolidinil-pentan-1-ona) | 15 |
| Figura 9. Estrutura química da α e β -nafirona..... | 15 |
| Figura 10. Fase I do metabolismo da catinona, formando a catina e norefedrina através de uma reação de redução [R] (adaptado de (Brenneisen <i>et al.</i> , 1986))..... | 20 |
| Figura 11. Vias de metabolização de fase I possíveis para a família das catinonas 3,4-metilenodioxo- <i>N</i> -alquiladas. [R] redução; [DA] <i>N</i> -desalquilação; [M] <i>O</i> -metilação (retirado de (Valente <i>et al.</i> , 2014))..... | 22 |

| | |
|---|----|
| Figura 12. Vias de metabolização de fase I possíveis para as catinonas do grupo 3,4-metilenodioxo- <i>N</i> -pirrolidina. [R] redução; [OH] hidroxilação; [DH] desidrogenação; [Ox] oxidação (retirado de (Valente <i>et al.</i> , 2014)). | 23 |
| Figura 13. Morfologia das células HK-2 (1) após a descongelação da alíquota celular e (2) após atingirem alta confluência. Observação em microscópio óptico invertido (ampliação de 100x) | 34 |
| Figura 14. Esquema da placa de 96 poços, onde os poços representados a branco contêm 200 µL de água estéril e os poços representados a cinzento contêm 200 µL da suspensão celular em meio completo (10.000 células/poço) | 39 |
| Figura 15. Esquema representativo da placa de 96 poços, onde os poços representados a verde correspondem aos poços controlo negativo de morte (células expostas somente ao meio RPMI) e os poços representados a azul correspondem aos poços das 14 concentrações de catinonas sintéticas testadas | 40 |
| Figura 16. Curvas de concentração-resposta da (A) pentedrona, (B) 3,4-DMMC, (C) metilona, (D) 4-MEC e (E) MDPV em células HK-2. Os dados foram obtidos com, pelo menos, cinco experiências independentes e as concentrações testadas em três replicados, através do ensaio de redução do MTT, após 24 e 48 horas de incubação. * vs tempo 24h (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) | 44 |
| Figura 17. Nefrotoxicidade da (A) pentedrona, (B) 3,4-DMMC, (C) metilona, (D) 4-MEC e (E) MDPV avaliada pelo teste de viabilidade celular MTT. As células HK-2 foram expostas por um período de 48 h a diferentes concentrações. Os dados foram obtidos com, pelo menos, cinco experiências independentes e as concentrações testadas em três replicados, e são apresentados como percentagem de controlo. As comparações entre grupos foram efetuadas utilizando o modelo One-Way Anova [($*p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) concentração <i>versus</i> controlo] | 45 |
| Figura 18. Curvas de concentração-resposta das catinonas estudadas em células renais HK-2, obtidas através do ensaio de redução do MTT, após (A) 24 e (B) 48 horas de incubação. As curvas foram traçadas pela função assimétrica logit (linhas contínuas) e as linhas a tracejado representam os intervalos de confiança de 95%. | 46 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Resumo dos efeitos adversos provocados pelas catinonas sintéticas..... | 28 |
| Tabela 2. Reagentes utilizados no estudo e respectivos fornecedores..... | 33 |
| Tabela 3. Folha de cálculo utilizada para a preparação das diferentes concentrações testadas para a metilona, pentedrona, MDPV e 4-MEC..... | 37 |
| Tabela 4. Folha de cálculo utilizada para a preparação das diferentes concentrações testadas para a 3,4-DMMC..... | 38 |
| Tabela 5. Parâmetros derivados de ajustes não-lineares de dados de concentração-resposta das drogas testadas para a função logit assimétrica, no teste de redução MTT..... | 47 |
| Tabela 6. Valores de EC ₅₀ obtidos para as catinonas estudadas às 24 e 48h..... | 47 |

Lista de abreviaturas

ATP- Adenosina Trifosfato

BHE- Barreira Hemato-Encefálica

Bupropiona- *m*-Cloro-*N*-*terc*-butil-catinona

Butilona- β -Ceto-metilbenzodioxolilbutanamina

CEBIMED- Centro de Investigação em Biomedicina

COMT- Catecol *O*-Metiltransferase

CYP- Citocromo P450

DAT- Transportador da Dopamina

DEA- *Drug Enforcement Administration*

DMSO- Dimetilsufóxido

EDTA- Ácido Etilenodiamina Tetracético

EMCDDA- *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*

Etcatinona- *N*-Etilcatinona ou Etilpropiona

EU- União Europeia

FBS- Soro Bovino Fetal

Flefedrona- *p*-Fluorometcatinona

FP-ENAS- Unidade de Investigação Fernando Pessoa em Energia, Ambiente e Saúde

GSH- Glutationa Reduzida

HBSS- *Hanks' Balanced Salt Solution*

HK-2- Human Kidney-2

HPV-16- Papiloma Vírus Humano-16

LC3- *Light Chain 3*

LSD- Dietilamida do Ácido Lisérgico

MAO A- Monoamina Oxidase A

MAO B- Monoamina Oxidase B

MBDP- N-metil-1,3-benzodioxolilpentanamina

MDBP- N-metil-1,3-benzodioxolilpentanamina

MDEA- 3,4-Metilenodioxietanfetamina

MDMA- 3,4-Metilenodioximetanfetamina ou *Ecstasy*

MDPBP- 3,4-Metilenodioxi- α -pirrolidinobutirofenona

MDPPP- 3,4-Metilenodioxi- α -pirrolidinopropiofenona

MDPV- Metilenodioxipirovalerona

MEPH- Mefedrona

METH- Metanfetamina

Metilona- 3,4-Metilenodioximetcatinona

MOPPP- 4-Metoxi- α -pirrolidinopropiofenona

MPBP- 4-Metil- α -pirrolidino-butirofenona

MPHP- 4-Metil- α -pirrolidinohexanofenona

MPPP- 4-Metil- α -pirrolidinopropiofenona

MTS 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, sal interno

MTT- Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NET- Transportador da Noradrenalina

NSP- Novas Substâncias Psicoativas

RNS- Espécies Reativas de Azoto

ROS- Espécies Reativas de Oxigénio

Pirovalerona- (RS)-1-(4-metilfenil-2-(1-pirrolidinil)pent-1-ona

SERT- Transportador da serotonina

SNC- Sistema Nervoso Central

VMAT-2- Transportador Vesicular de Monoaminas 2

XTT- 2,3-Bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-carboxinilida-2H-tetrazólio

WST-1- 2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazólio

α -PPP- α -Pirrolidinopropiofenona

α -PVP- α -Pirrolidinovalerofenona

α -MeDA- α -Metildopamina

3,4-DMMC- 3,4-Dimetilmetcatinona

4-MEC- 4-Metiletcatinona

5-HT- Serotonina

Enquadramento e estrutura da dissertação

O mercado das drogas cresceu em complexidade nas últimas décadas com o aparecimento num ritmo sem precedentes de novas substâncias psicoativas (NSP), criando um importante desafio para as autoridades de saúde pública. Novos produtos conhecidos como “drogas legais” foram surgindo, apresentando na sua composição substâncias psicotrópicas na sua forma natural ou obtidas por síntese. Embora atualmente muitas destas novas drogas sejam ilegais em muitos países, estas NPS eram inicialmente adquiridas livremente em lojas especializadas designadas de *smartshops* e continuam facilmente acessíveis em websites da Internet. O principal objetivo ao adquirir estas alternativas “legais” é o de mimetizar os efeitos produzidos por drogas ilícitas clássicas, como a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA ou *ecstasy*) e a cocaína (Arunotayanun e Gibbons, 2012; Coppola e Mondola, 2012; Prosser e Nelson, 2012).

As catinonas sintéticas representam atualmente o segundo maior grupo de NSP monitorizadas pelo *European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction* (EMCDDA) (Emcdda, 2017). São vendidas sob a designação de “sais de banho” ou “fertilizantes para plantas” e rotuladas como não sendo próprias para o consumo humano. Os primeiros derivados da catinona apresentavam finalidades terapêuticas, contudo, nas últimas décadas, estas drogas ganharam notoriedade no contexto recreacional, devido aos seus efeitos estimulantes semelhantes ao de anfetaminas clássicas. De facto, as catinonas sintéticas possuem uma estrutura química semelhante à das anfetaminas, a diferença residindo na presença de um grupo cetona na posição β da cadeia lateral. Por esse facto, as catinonas sintéticas são muitas vezes designadas de “ β -ceto anfetaminas” (Coppola e Mondola, 2012; Kelly, 2011; Valente *et al.*, 2014).

As primeiras catinonas sintéticas lançadas no mercado foram a metcatinona (efedrona) e a 4-metilmetcatinona (mefedrona, 4-MMC). Juntamente com a mefedrona, a 3,4-metilenodioxipirovalerona (MDPV) e a 3,4-metilenodioximetcatinona (metilona) emergiram muito rapidamente no mercado das drogas recreativas como sendo um dos principais constituintes dos “sais de banho” (Kelly, 2011; Valente *et al.*, 2014).

Apesar de estudos recentes terem já demonstrado a toxicidade induzida pelas catinonas sintéticas a nível hepático (Luethi *et al.*, 2017; Valente *et al.*, 2016a; Valente *et al.*, 2016b) e neuronal (Valente *et al.*, 2017a; Valente *et al.*, 2017b), não existem até ao momento estudos que avaliem o potencial tóxico destas substâncias a nível renal.

O objetivo deste trabalho passou pela avaliação *in vitro* do potencial nefrotóxico de cinco catinonas existentes no mercado, nomeadamente a 3,4-dimetilmetcatinona (3,4-DMMC), a metilona, a MDPV, a pentedrona e a 4-metilecatinona (4-MEC). Foi selecionado como modelo de estudo, a linha celular imortalizada HK-2 (Human Kidney-2 cells) de células tubulares proximais provenientes de rim humano.

Na primeira parte desta dissertação foi efetuada uma revisão bibliográfica que visou apresentar o estado da arte referente às catinonas sintéticas. Para alcançar este objetivo, procedeu-se à pesquisa e análise de artigos científicos publicados no PubMed, Science Direct, B-on e Google académico, utilizando as seguintes palavras-chave: “synthetic cathinones”, “Legal highs”, “Bath salts”, “renal cells”, “toxicity” e “cell viability”. Aliado a esta pesquisa efetuou-se ainda a recolha de informação em livros didáticos e websites governamentais através do monitor de busca “Google”. A pesquisa foi contínua ao longo do desenvolvimento deste trabalho, tendo-se realizado desde outubro de 2016 a setembro de 2017.

Na segunda parte do trabalho apresentam-se os objetivos do trabalho experimental, os protocolos experimentais e o tratamento estatístico utilizado, bem como os resultados obtidos e respetiva discussão.

Por último, apresentam-se as conclusões finais do trabalho bem como todas as referências bibliográficas utilizadas ao longo desta dissertação.

I. PARTE TEÓRICA: AS CATINONAS SINTÉTICAS

1.1. Perspetiva histórica

Proveniente do Noroeste Africano e do Sudoeste da Península Arábica surge uma planta designada de *khat* (*Catha edulis*). Durante séculos a mastigação de folhas frescas desta planta foi utilizada devido às propriedades estimulantes proporcionadas. Tratava-se de uma prática comum em determinadas comunidades locais destas regiões durante as suas cerimónias religiosas e culturais. Em alguns locais, nomeadamente no Iémen, esta prática é vista como um fenómeno social e cultural efetuado regularmente pelos homens da região, após o término do seu trabalho, realizando-se assim as “khat sessions” (Karila *et al.*, 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015; Valente *et al.*, 2014).

Com o passar dos anos, os meios de transporte e distribuição de mercadorias foram melhorando e evoluindo, permitindo a expansão do uso desta planta para os países ocidentais. No entanto, existia a limitação da necessidade de as folhas da planta estarem no seu estado fresco para que os seus consumidores conseguissem obter os efeitos psicotrópicos pretendidos. Com o envelhecimento das folhas advém a degradação enzimática da catinona, composto com atividade estimulante, formando-se os metabolitos com menor atividade estimulante, a catina e a norepinefrina. A exposição das folhas frescas ao calor e radiações solares acelerava o seu processo de degradação, pelo que os cultivadores envolviam-nas em cascas de banana para garantir a frescura e humidade adequada das folhas da *khat* (Feyissa e Kelly, 2008; Katz *et al.*, 2014; Valente *et al.*, 2014).

Esta planta foi descoberta pelo botânico sueco Peter Forskal, entre os anos de 1761 e 1763, durante uma expedição ao Egipto e Iémen. Forskal identificou *Catha edulis* como membro da família Celastraceae. Mais tarde, Karstem Niebuhr, o único sobrevivente da expedição liderada por Peter Forskal, intitula a planta *khat* de *Catha edulis* Forsk (Karila *et al.*, 2015; Valente *et al.*, 2014). Assim, apenas no século XVIII, é que o povo europeu ficou a conhecer esta planta através da expedição onde esta foi descoberta e devidamente catalogada (Kersten e Mclaughlin, 2015).

Em 1887, Fluckiger e Gerock descobrem um composto psicostimulante denominado de *Katin*, assumindo que este seria o principal composto ativo da planta *khat*. Mais tarde, em 1930, Wolfes identifica esse composto como sendo a (+)-norpseudoefedrina ou catina. Existiam, no entanto, algumas evidências que demonstravam que as propriedades estimulantes deste composto seriam insuficientes para conseguir, por si só, produzir todos os efeitos farmacológicos desencadeados. Ao longo do tempo foram surgindo mais evidências de que a catina isoladamente não possui potência suficiente para produzir os efeitos farmacológicos induzidos pela *khat* (Kersten e Mclaughlin, 2015; Valente *et al.*, 2014).

Mais tarde, nos anos de 1928 e 1929, foram descritos os processos de síntese para a efedrona e mefedrona, respetivamente (Kelly, 2011; Kersten e Mclaughlin, 2015). A descoberta de que estes derivados da catinona apresentavam uma estrutura semelhante à das anfetaminas e seus análogos, levou a um interesse cada vez maior no desenvolvimento destes compostos com finalidades terapêuticas (Karila *et al.*, 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015). Na antiga União Soviética (URSS), entre 1930-1940, a efedrona foi comercializada como antidepressivo, sendo mais tarde produzida como um estimulante do sistema nervoso central (SNC).

Em 1975, a *United Nations Narcotics Laboratory* isolou um análogo β -ceto e precursor da catina. Este novo composto trava-se da catinona ou (-)- α -aminopropiofenona. A catinona é atualmente considerada como sendo o principal alcaloide presente nas folhas da planta *khat* com propriedades estimulantes semelhantes às das anfetaminas, porém com uma potência inferior. Estudos recentes demonstraram que a potência da catinona em relação à catina pode ser cerca de 7-10 vezes superior, apresentando uma degradação mais rápida, daí a necessidade de se usar as folhas frescas (Karila *et al.*, 2015; Valente *et al.*, 2014).

Alguns derivados sintéticos da catinona, nomeadamente a *m*-cloro-*N*-*terc*-butil-catinona (bupropiona), as *N,N*-dietilcatinonas (dietilpropiona, anfepramona) e as *N,N*-dimetilcatinonas (dimetilpropiona, metanfepramona), foram inicialmente desenvolvidos com o intuito de serem utilizados como fármacos antidepressivos e anorexígenos, devido às suas propriedades estimulantes do SNC, mas também por apresentarem um menor potencial de abuso. A bupropiona foi introduzida no mercado em 1985, inicialmente

como antidepressivo, sendo mais tarde usada na terapêutica de cessação tabágica. É o único derivado sintético utilizado atualmente para fins clínicos quer nos Estados Unidos da América (EUA) quer na Europa (Wilkes, 2008). Por outro lado, a efedrona era vendida com a mesma finalidade terapêutica, contudo, apresentava um elevado potencial de adição e causava efeitos semelhantes aos produzidos pela cocaína, com a agravante de apresentar uma potência superior à da própria cocaína e catinona isoladamente (Young e Glennon, 1993; Valente *et al.*, 2014). Devido a esta propriedade, na URSS, em 1970, começou a existir um uso generalizado de efedrona, surgindo nas ruas com o nome de “Jeff” ou “Cat”, chegando aos EUA por volta da década de 1990 e desde então foram muitas as intoxicações graves associadas a este derivado. Em 1994, a efedrona foi adicionada ao anexo I da Convenção das Nações Unidas sobre substâncias psicotrópicas.

Até ao início dos anos 90, as únicas substâncias relacionadas com a catinona que se encontravam restritas eram a catina, a própria catinona e a metcatinona. Devido ao potencial terapêutico que determinados derivados da catinona possuíam, em 1996, é sintetizada e patenteada a metilona como um agente antidepressivo e antiparkinsoniano. Este composto acabou por ser retirado do mercado após se constatar que exibia uma potência psicostimulante muito próxima daquela que é proporcionada pela MDMA. Isto pode ser explicado pelo facto da metilona ser um composto análogo à MDMA. Durante a década de 1990, o interesse pelos derivados da catinona apenas se verifica em certos locais do mundo, existindo também um número restrito de compostos deste género (Kelly, 2011; Valente *et al.*, 2014).

O cenário que envolvia os derivados sintéticos da catinona foi alterado quando começaram a surgir como “drogas legais” em determinados países. Na primeira geração de catinonas sintéticas vendidas no mercado encontrava-se incluída a metilona sob a designação de “Explosion”. Esta começou a emergir em meados do ano 2000, inicialmente na Holanda e Japão, seguindo-se mais tarde a Austrália. Eram facilmente adquiridas através da Internet e das *smartshops*, sendo comercializadas como “sais de banho” nos Estados Unidos e como “fertilizantes para plantas” na Europa e sempre rotuladas como “não indicado para consumo humano” (Coppola e Mondola, 2012; Gregg e Rawls, 2014; Kersten e Mclaughlin, 2015; Valente *et al.*, 2014).

As catinonas pirrolidina *N*-substituídas, derivadas da α -pirrolidino propiofenona (α -PPP), surgem na Alemanha nos anos 2000 durante apreensões realizadas ao mercado das drogas tornando-se mais famosas mais tarde (Kersten e McLaughlin, 2015). Foram sintetizadas diversas substâncias pertencentes à família das pirrolidinofenonas com o propósito de serem usadas clinicamente. Assim, no início da década de 1970, apareceu a pirovalerona ((RS)-1-(4-metilfenil-2-(1-pirrolidinil)pent-1-ona), tendo sido utilizada durante muitos anos no tratamento de situações de fadiga crónica, letargia e obesidade. Contudo esta também caiu em desuso, pelos problemas de dependência que provocava. Entretanto, entre 2007-2008, aparece em Israel a mefedrona (MEPH), mais conhecida como “M-Cat”, “Miaow Miaow”, “Meph”, “Subcoca” e “TopCat”. Esta surgiu como sendo uma alternativa legal a drogas clássicas como a *ecstasy* e cocaína. A sua produção foi rapidamente cessada (ainda em 2008) pelo governo israelita devido ao número de hospitalizações associadas ao consumo da droga. Em 2008, pouco tempo após ter sido banida em Israel, a MEPH tornou-se popular também na Europa, em países como a Irlanda, Escandinávia, Austrália e Reino Unido.

Surgem depois a flefedrona (p-fluorometcatinona) e os seus isómeros estruturais 2- e 3-fluorometcatinona (Kelly, 2011; Valente *et al.*, 2014). Apareceram também a etcatinona (*N*-etilcatinona ou etilpropiona) e a butilona (β -ceto-metilbenzodioxolilbutanamina; β k-MBDB). A MDPV foi detetada inicialmente no Japão (em 2006), na Alemanha (em 2007) e na Finlândia, surgindo ainda na Polónia e Reino Unido, em 2010, após a mefedrona ter sido retirada do mercado.

Em abril de 2010, as catinonas sintéticas foram classificados na classe B na lista de substâncias onde são feitas penalizações em caso de posse e tráfico das mesmas. Para contrariar esta situação surgiram no mercado das drogas análogos naftil da catinona, sob a forma de NGR-1, NGR-2 e NGR-3, que não se encontravam abrangidos na proibição original referida anteriormente. Em julho de 2010, o governo do Reino Unido colocou estes compostos na classe B da legislação sobre o uso indevido de drogas.

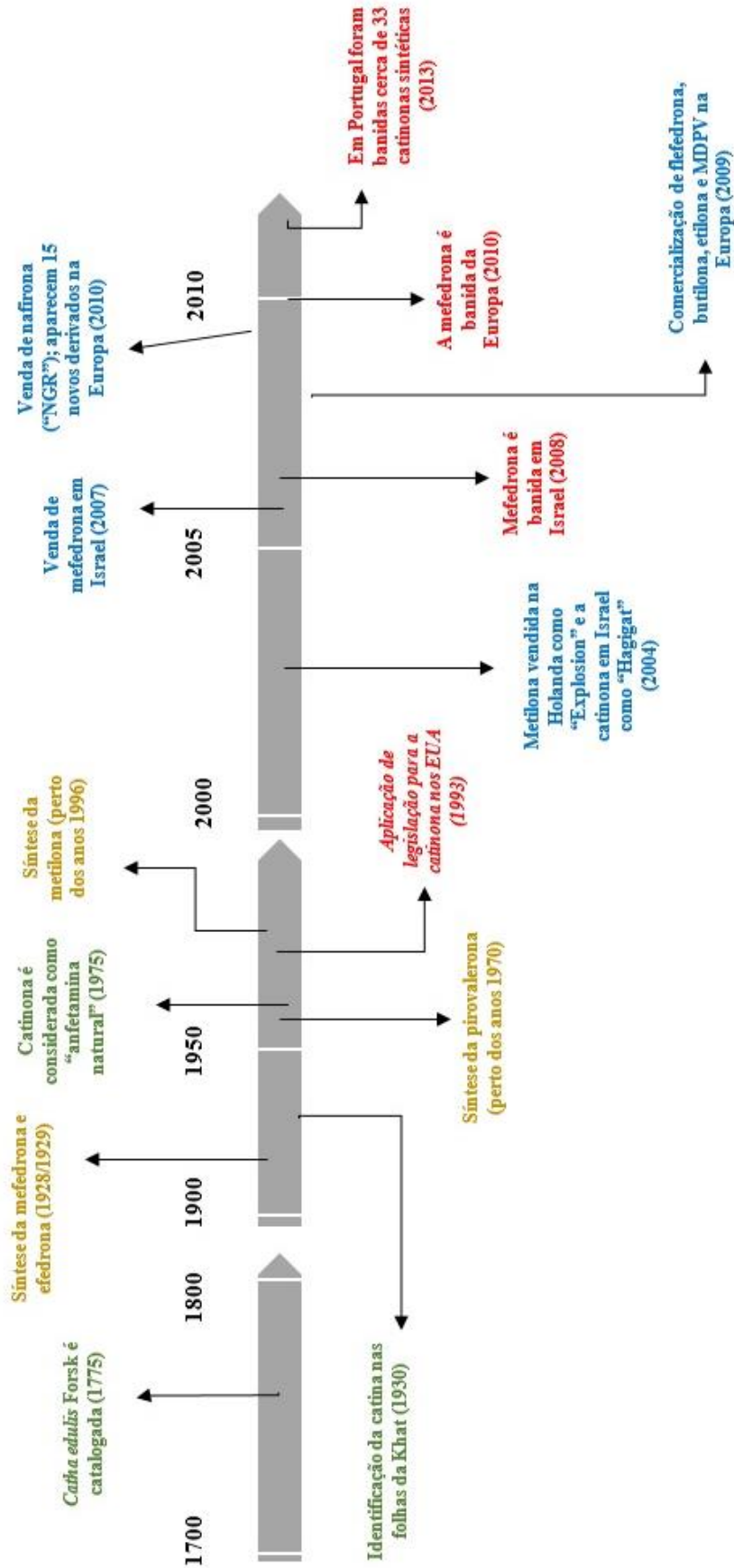


Figura 1. Friso cronológico associado às catinonas.

1.2. Prevalência do consumo e enquadramento legal

O consumo de *khat* encontrava-se inicialmente confinado ao local onde esta crescia. No entanto, com a emigração da população dos países de origem (para locais como a Europa e os EUA) e a melhoria das formas de distribuição, ocorreu a sua globalização (Manghi *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2014). O seu enquadramento a nível legal permanece ambíguo, isto porque, a catinona é colocada na Classe I da Lista de Substâncias Controladas da *Drug Enforcement Administration* (DEA), enquanto que a catina, no ano de 1988, é incluída na Classe IV dessa lista. Atualmente a planta *khat* é ilegal em certos países da Europa (Alemanha, Dinamarca, França, Holanda, Irlanda, Noruega e Suécia), nos EUA e no Canadá. Já em Portugal, Reino Unido, Austrália, e na maior parte dos países da África Oriental, esta encontra-se dentro do âmbito legal (Arunotayanun e Gibbons, 2012; Valente *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas assistiu-se por todo o mundo a um aumento da produção de novas substâncias psicoativas, sendo que a EMCDDA revelou no seu relatório anual que as catinonas sintéticas representam o segundo maior grupo de novas drogas monitorizadas, com 118 detetadas no total, incluindo 14 detetadas pela primeira vez em 2016 (Emcdda, 2017).

Surgiram no mercado com diversos nomes tais como “Bloom”, “Blue Silk”, “Ivory Wave”, “Purple Wave” e “Vanilla Sky”. Estas são vendidas em determinados países através das *smartshops* e/ou fornecedores via Internet, existindo um acesso rápido, fácil e sem qualquer tipo de ilegalidade na aquisição destes produtos. A legislação normalmente não consegue banir por completo estes produtos, uma vez que estão sempre a surgir novos tipos de catinonas sintéticas no mercado das drogas recreativas (Coppola e Mondola, 2012; Karila *et al.*, 2015; Spiller *et al.*, 2011).

É difícil estimar a prevalência do uso de catinonas sintéticas. Atualmente todas as pesquisas efetuadas neste campo recorrem exclusivamente a relatos dos seus consumidores. Além disto, a maior parte destas pesquisas correspondem a relatos de grupos de indivíduos muito específicos e, por consequência, estes não são representativos da população em geral (Valente *et al.*, 2014).

A mefedrona foi reportada como sendo a oitava droga mais notificada a nível Europeu, seguida de drogas como a heroína, anfetaminas, canábis, *ecstasy*, entre outras (Emcdda, 2017). A MDPV, outra droga pertencente a esta classe, apresenta maior prevalência na Finlândia, onde atingiu percentagens superiores às do consumo de bebidas alcoólicas, como revelaram os resultados da fiscalização da condução sob influência de álcool e drogas neste país (Kriikku *et al.*, 2011).

As catinonas sintéticas rapidamente se tornaram populares a nível mundial. Tal facto torna mais complicada a aplicação de legislação para estas drogas, isto porque, quando uma substância se torna controlada legalmente, surgem no mercado novos análogos estruturalmente modificados contornando estas lacunas legislativas. Desta forma, os fabricantes e consumidores destas drogas acabam por ficar um passo à frente da lei, continuando com este “jogo do gato e do rato” (Katz *et al.*, 2014).

O regime jurídico aplicado a estas drogas varia muito entre os diferentes países (Valente *et al.*, 2014). Em Portugal, no ano de 2013, foram implementadas novas medidas para controlo deste género de drogas, existindo penalizações em situações de comércio e consumo. O Decreto-Lei n.º 54/2013, de 17 de abril (em anexo), que veio definir o atual regime jurídico da prevenção e proteção contra a publicidade e o comércio das novas substâncias psicoativas, proíbe a produção, importação, exportação, publicidade, distribuição, venda, detenção, ou disponibilização de novas substâncias psicoativas. A este Decreto-Lei, acrescenta-se a Portaria n.º 154/2013, de 17 de abril, que aprova a lista das novas substâncias psicoativas (em anexo). A lista engloba 159 substâncias, sendo 33 delas derivados da catinona. Estas medidas desencadearam o encerramento de diversas *smartshops* distribuídas por todo o país. Nesta lei está também previsto que deve ser efetuada uma nova atualização da lista a cada 18 meses.

1.3. Estrutura química

Na composição química da *Catha edulis* estão presentes a catinona e a catina (derivado semelhante com uma potência estimulante inferior). A diferença entre estes compostos encontra-se no grupo β -ceto presente na catinona e que na catina encontra-se substituído por um grupo hidroxilo (Figura 2).

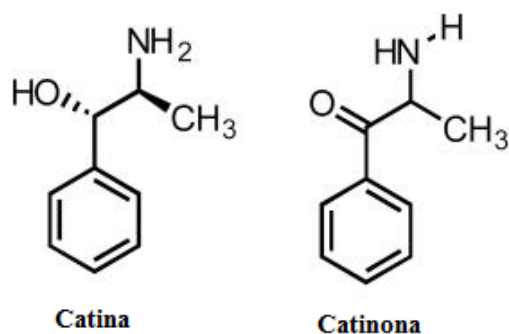


Figura 2. Estruturas químicas da catina e da catinona presentes na planta *khat* (adaptado de (De Felice *et al.*, 2014)).

Em meados dos anos 2000, surgiu no mercado das drogas recreativas a maior parte das catinonas sintéticas, sendo sintetizadas através da adição de diferentes substituintes em diferentes partes da molécula da catinona (Figura 3).

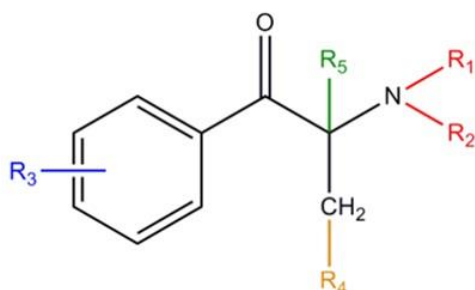


Figura 3. Estrutura química base das catinonas sintéticas assinalando as regiões de inserção dos vários substituintes.

As catinonas sintéticas são classificadas como derivados fenilalquilamina possuindo uma estrutura química semelhante à das anfetaminas (Figura 4). A diferença entre elas situa-se no grupo cetona introduzido na posição β da cadeia alquilamina ligada ao anel de benzeno. Por esse facto, as catinonas sintéticas são muitas vezes designadas de “ β -ceto anfetaminas” (Coppola e Mondola, 2012; Kelly, 2011; Valente *et al.*, 2014).

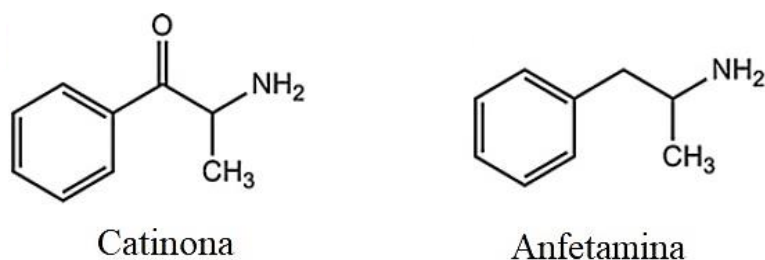


Figura 4. Estruturas químicas da catinona e da anfetamina.

Os derivados da catinona, na sua estrutura química, possuem um centro quiral, podendo existir sob duas formas estereoisoméricas (enantiómeros S e R), característica que determina a sua potência. Na sua forma natural, ou seja, na planta *khat*, são encontrados os S-enantiómeros da catinona; já os derivados presentes no mercado clandestino são constituídos normalmente por misturas racêmicas, contendo igual quantidade destes enantiómeros (R e S) (Katz *et al.*, 2014).

A extensão dos efeitos simpaticomiméticos produzidos pelas catinonas sintéticas, bem como a duração dos mesmos, variam consoante a estrutura do grupo funcional de cada catinona. Estes análogos sintéticos (exceto os derivados pirrolidina) são considerados menos potentes quando comparados com as anfetaminas, uma vez que a sua polaridade se encontra aumentada pela presença do grupo β -ceto e, conseqüentemente, a capacidade para atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) encontra-se diminuída (Coppola e Mondola, 2012; Prosser e Nelson, 2012).

Os derivados sintéticos da catinona possuem uma estrutura central semelhante entre eles, podendo ser divididos em quatro famílias distintas (Valente *et al.*, 2014). Inicialmente foram conhecidos os análogos sintéticos onde na catinona pode ocorrer *N*-alquilação nas posições R₁, R₂, R₃ e R₄. Neste grupo de **catinonas *N*-alquiladas** (figura 5) estão incluídos os derivados inicialmente sintetizados com propósitos terapêuticos, mas também outros derivados que foram produzidos e posteriormente introduzidos no mercado das drogas recreativas. Neste grupo insere-se a dietilpropiona e a dimetilpropiona usadas pelas suas propriedades anorexígenas e a bupropiona com propriedades antidepressivas. Estas apresentam uma substituição em R₁ e R₂ por grupos etilo no caso da dietilpropiona e grupos metilo no caso da dimetilpropiona. Quando se realiza uma *N*-metilação forma-se a metcatinona e com uma metilação adicional na

posição 4 do anel surge a MEPH (Kelly, 2011). Outros derivados pertencentes a esta família que surgiram no mercado ilícito foram a etcatinona, efedrona, flefedrona e o respetivo isômero (3-fluorometcations), 4-MEC, metedrona, pentedrona, bufedrona e a 3,4-DMMC.

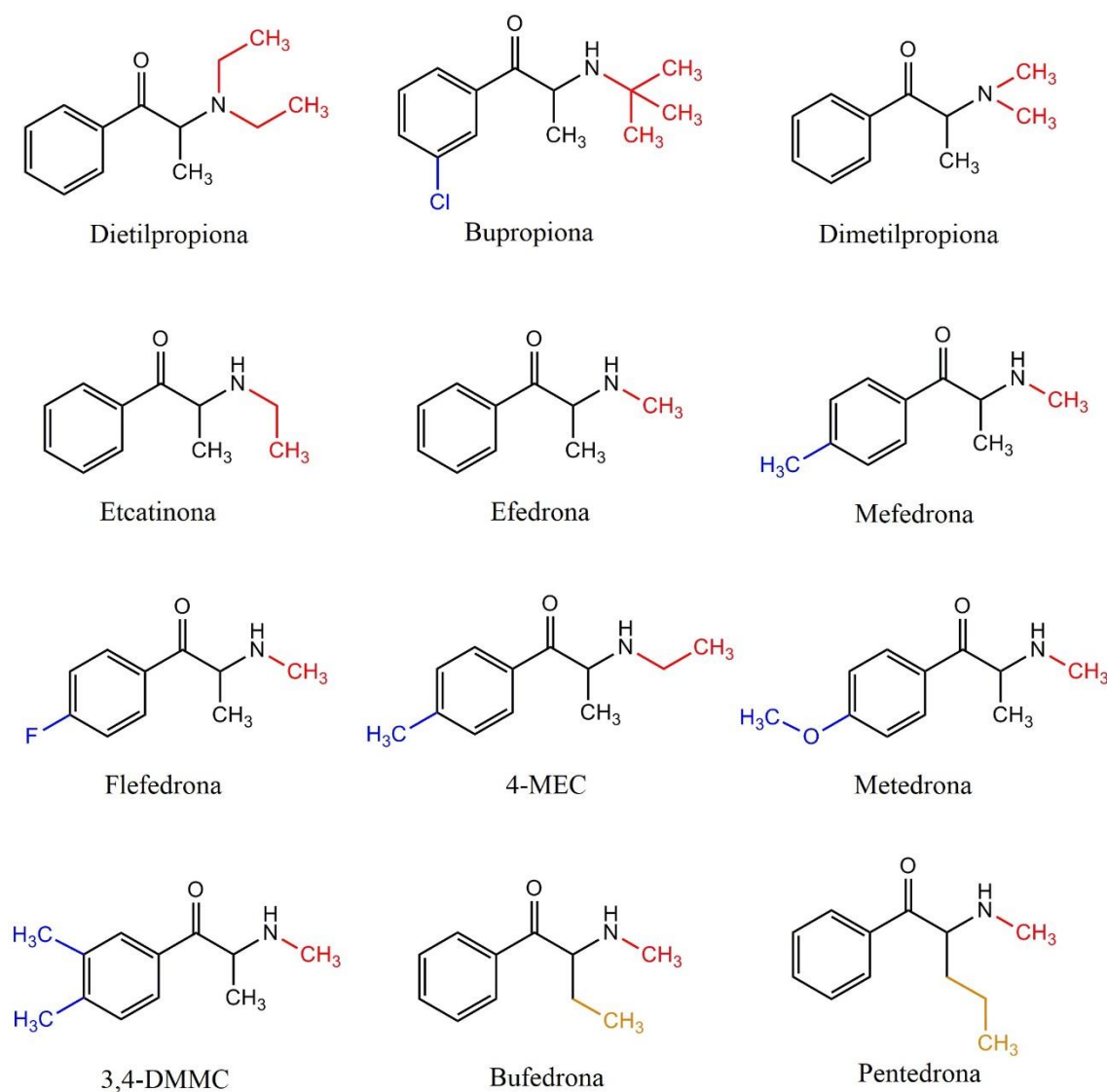


Figura 5. Estrutura química dos derivados da catinona *N*-alquilados.

No anel benzénico (na posição R_3) pode ser adicionado um grupo 3,4-metilenodioxi, surgindo uma família diferente de catinonas, as **catinonas 3,4-metilenodioxi-*N*-alquiladas** (figura 6), que englobam os derivados *N*-metilados e *N*-etilados (metilona e etilona). Neste grupo estão também inseridos os derivados que sofreram uma alquilação

em R₁ e R₄, sendo estes a pentilona e a butilona. No entanto, já existiam outras classes de drogas no mercado com estrutura similar a esta família de catinonas, sendo exemplos dessa semelhança a MDMA, a 3,4-metilenodioxietanfetamina (MDEA), a N-metil-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamina (MBDB) e a N-metil-1,3-benzodioxolipentanamina (MBDP), pertencendo todas elas ao grupo das 3,4-metilenodioxianfetaminas (Kelly, 2011; Valente *et al.*, 2014).

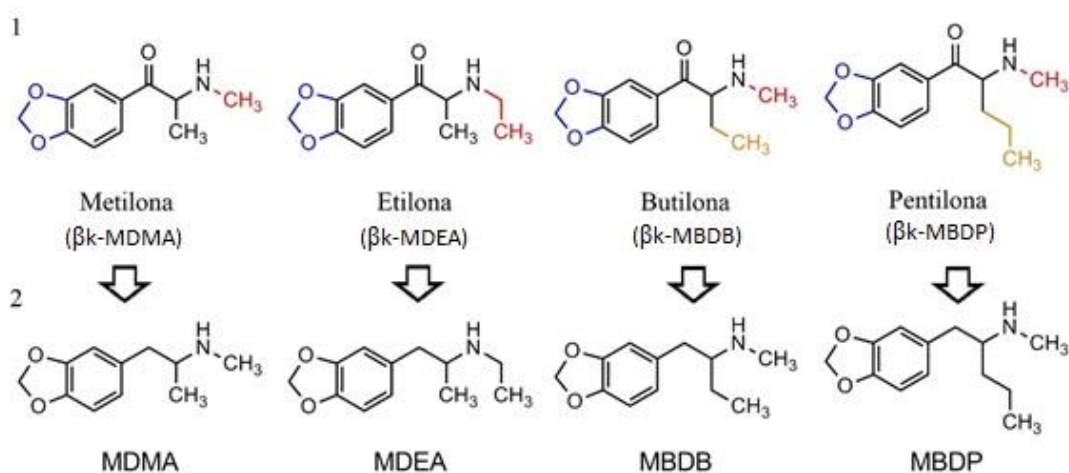


Figura 6. Estruturas químicas das catinonas 3,4-metilenodioxi-*N*-alquiladas (1) e respectivas anfetaminas relacionadas (2) as 3,4-metilenodioxianfetaminas (MDMA, 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDEA, 3,4-metilenodioxietanfetamina; MBDB, *N*-metil-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butanamina; MBDP, *N*-metil-1,3-benzodioxolipentanamina).

Com uma substituição pirrolidinil no átomo de azoto surge uma nova família, as **catinonas pirrolidinofenonas** (figura 7), sendo os compostos pertencentes a esta família os derivados da α -pirrolidinopropiofenona (α -PPP). Com uma metilação do anel da α -PPP surge a 4-metil- α -pirrolidinopropiofenona (MPPP). Com uma alquilação na posição R₄ desta molécula são produzidos a 4-metil- α -pirrolidino-butiropiofenona (MPBP), pirovalerona e 4-metil- α -pirrolidino-hexanopiofenona (MPHP). Quando na posição R₄ é inserido um grupo etilo forma-se a α -pirrolidinovalerofenona (α -PVP). Caso no anel da α -PPP ocorra uma substituição 4-metoxi produz-se a 4-metoxi- α -pirrolidinopropiofenona (MOPPP) (Kelly, 2011; Valente *et al.*, 2014). A 4-metil- α -pirrolidino-metilpropiofenona é o único derivado da catinona que apresenta uma alteração na posição R₅, sendo resultado da metilação da MPPP (Emcdda, 2011).

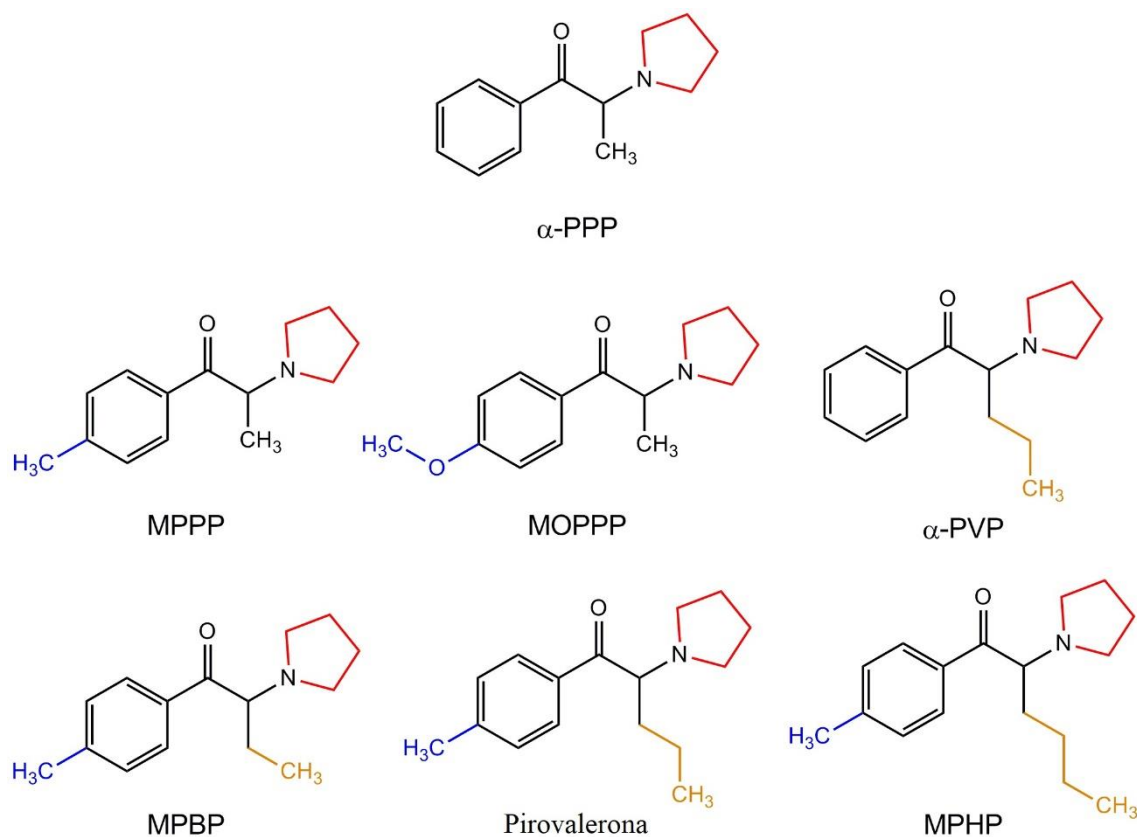


Figura 7. Estruturas químicas das catinonas pirrolidinofenonas.

Outra família pertencente às catinonas sintéticas aparece com a combinação das duas últimas famílias anteriormente referidas, as **catinonas 3,4-metilenedioxi-N-pirrolidina** (figura 8), que possuem um grupo *N*-pirrolidinilo e uma substituição 3,4-metilenedioxi no anel de benzeno da molécula (Valente *et al.*, 2014). Aqui são incluídas a 3,4-metilenedioxi- α -pirrolidinopropiofenona (MDPPP), 3,4-metilenedioxi- α -pirrolidinobutirofenona (MDPBP) e a MDPV. Se na molécula da MDPPP existir uma substituição no R₄ (introdução de um grupo metilo) é formada a MDPBP, caso seja um grupo etilo forma-se a MDPV (Valente *et al.*, 2014; Kelly, 2011).

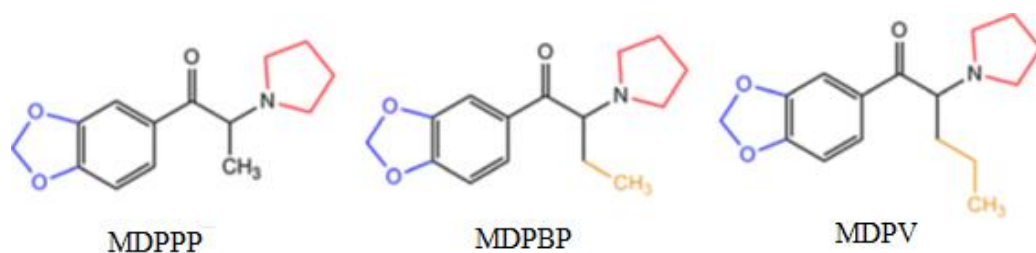


Figura 8. Estrutura química das catinonas 3,4-metilenodioxo-*N*-pirrolidina. MDPPP, 3,4-metilenodioxo- α -pirrolidinopropiofenona; MDPBP, 3,4-metilenodioxo- α -pirrolidinobutirofenona, MDPV, (1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-pirrolidinil-pentan-1-ona).

Mais tarde, surgiu uma segunda geração com um anel naftilo (Figura 9), sendo exemplo disso a nafirona. Apesar de normalmente aparecer a β -nafirona, também é mencionado a existência dos isômeros α e β -nafirona em produtos NRG-1 (Brandt *et al.*, 2010).

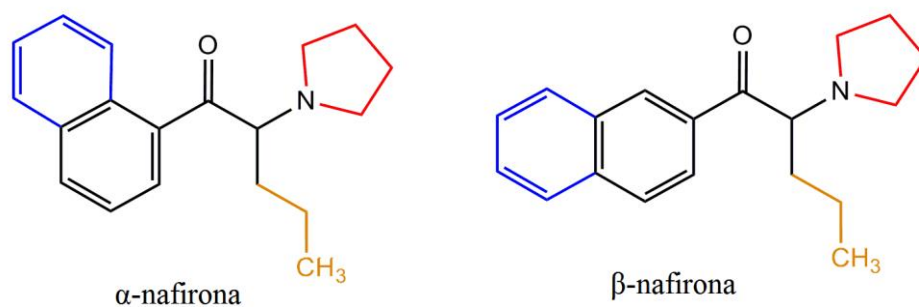


Figura 9. Estrutura química da α e β -nafirona.

1.4. Perfil de consumo

1.4.1. Propriedades organoléticas e comerciais

Os “sais de banho” aparecem muitas vezes no mercado das drogas sob a forma de pó amorfo ou cristalino, de coloração branca ou amarelada, podendo também surgir sob a forma de cápsulas. São vendidos normalmente em pacotes contendo uma quantidade que pode variar entre 200 mg a 10 g. Embora seja mais raro, as catinonas sintéticas podem também aparecer em forma de comprimidos.

Para além das propriedades mencionadas, o odor pode ser sentido em algumas das catinonas sintéticas. No caso da MDPV, os seus consumidores relataram que, sob a forma de pó branco, possui um odor característico quando exposta ao ar. Já a mefedrona na forma de sal cloridrato possui um odor desagradável, sendo uma mistura de odores como baunilha, cloreto e urina (Coppola e Mondola, 2012; Karila *et al.*, 2015; Prosser e Nelson, 2012; Valente *et al.*, 2014).

1.4.2 Vias de administração

A via de administração mais comum para esta classe de drogas é a oral. Pode ocorrer a deglutição das cápsulas contendo a droga ou um processo comumente designado de “bombing”. Neste processo o pó é ingerido após ser envolvido em papel de cigarro. Outra via muito comum é a insuflação nasal ou “snorting”, sendo normalmente realizada por “keying”, onde os consumidores colocam uma chave sob o pó e seguidamente o inalam.

Podem ainda ser utilizadas outras vias para a administração destas substâncias. Já foi relatado por consumidores destas drogas que a administração pode ser feita através das gengivas ou pela via sublingual, inalatória, intravenosa, intramuscular e ainda por via retal, sendo tidas como vias menos comuns (Coppola e Mondola, 2012; Katz *et al.*, 2014; Kersten e Mclaughlin, 2015; Prosser e Nelson, 2012; Valente *et al.*, 2014).

1.4.3 Dosagem

Os consumidores de derivados sintéticos das catinonas referem que as doses normalmente consumidas podem variar entre 1 mg a 1 g, mesmo não sabendo qual o grau de pureza dos compostos (Coppola e Mondola, 2012; Prosser e Nelson, 2012). Muitas vezes estes administram uma nova dose ainda na mesma sessão de consumo, uma vez que algumas das catinonas sintéticas apresentam um curto intervalo de ação (Coppola e Mondola, 2012).

Os efeitos psicostimulantes produzidos pela MEPH são obtidos com uma dosagem de cerca de 20-50 mg. Contudo, certos consumidores desta droga já descreveram que numa sessão normal pode ser consumido uma dose de 500 mg até 1 g de pó (Valente *et al.*, 2014). Para que os efeitos da MEPH possam surgir o mais rapidamente possível, os

indivíduos realizam a insuflação, usando uma quantidade entre 20-75mg, porém a duração dos efeitos torna-se reduzida, durando menos de 2 horas. Para uma duração de ação superior dos efeitos estimulantes produzidos pela MEPH, recorre-se à via oral sendo que a dosagem habitual varia entre 150 a 250 mg e os efeitos aparecem 15-45 minutos após a ingestão e podem durar desde 2 a 4 horas (Karila e Reynaud, 2011; Katz *et al.*, 2014; Valente *et al.*, 2014). Com a administração intravenosa torna-se possível obter um máximo de ação 10-15 minutos após a injeção, com a desvantagem de existir uma duração de ação inferior a 30 minutos. Por este motivo, é frequente que os consumidores recorram a diferentes vias de administração a fim de obter um início de ação rápido e uma duração de ação mais longa (Prosser e Nelson, 2012; Valente *et al.*, 2014).

No caso da MDPV, esta induz os efeitos psicostimulantes com doses inferiores a 5 mg, sendo que a dosagem habitual pode chegar até cerca de 20 mg ou mesmo ser superior a este valor devido à administração repetição da droga. Para uma dosagem superior a 15 mg, alguns dos utilizadores descrevem efeitos extremamente desagradáveis. A MDPV é geralmente consumida por via oral e intranasal, apresentando um início de ação e potência a nível dos efeitos proporcionados relativamente semelhantes, variando apenas a duração dos efeitos após o seu consumo. Na via intranasal, o tempo de ação pode variar entre 2-3,5 horas, começando os efeitos a evidenciarem-se 5-20 minutos após a inalação, enquanto que, por via oral, os efeitos surgem após 15-30 minutos e podem durar cerca de 2-7 horas (Karila e Reynaud, 2011; Valente *et al.*, 2014).

A metilona encontra-se vulgarmente disponível sob a forma de pó ou cápsulas, no entanto, numa fase inicial esta era vendida em tubos de 5 mL. Geralmente as doses usadas podem variar de 100 a 300 mg, sendo que uma dose superior a 250 mg já é considerada “pesada”, segundo os seus consumidores. Os efeitos da metilona surgem 15-30 minutos após a ingestão, tendo uma duração de ação próxima de 3 horas, embora alguns dos seus efeitos possam chegar a perdurar até 24 horas após o consumo (Karila e Reynaud, 2011; Lopez-Arnau *et al.*, 2013).

Pensa-se que as doses habituais de butilona sejam similares às utilizadas para a metilona, promovendo efeitos estimulantes que duram 4 a 6 horas. Como existe pouca informação na literatura, toda a informação descrita sobre esta droga é baseada nos relatos dos consumidores disponíveis na Internet (Karila e Reynaud, 2011; Warrick *et al.*, 2012).

Os consumidores referem que pode existir ainda a combinação entre diferentes catinonas ou a associação entre estas e outros tipos de substâncias psicoativas. Este processo é normalmente realizado quando se pretende obter determinados efeitos, mas também pode ser usado para reduzir alguns dos efeitos mais preocupantes. Se o objetivo for potenciar os efeitos estimulantes, é geralmente feita a combinação com anfetaminas, metanfetaminas, cafeína, cocaína, alucinogénios e outras catinonas sintéticas. Para combater ou neutralizar efeitos como a taquicardia causada por estes derivados sintéticos, pode haver co-consumo de álcool ou uso de beta-bloqueadores. As benzodiazepinas e a canábis são substâncias que os consumidores referem usar apenas para combater sintomas (como a ansiedade) causados pelo consumo das catinonas (Coppola e Mondola, 2012; Katz *et al.*, 2014).

1.5. Farmacocinética

A catinona, como já referido anteriormente, é o principal alcaloide ativo da planta *khat*. Em cada 100-500 g das suas folhas frescas pode estar presente uma quantidade de catinona próxima de 78-343 mg (Arunotayanun e Gibbons, 2012). A forma mais comum de utilizar a *khat* é através da mastigação das suas folhas frescas, surgindo os efeitos psicostimulantes cerca de meia hora depois e duram cerca de 3 horas (Kalix, 1996).

A absorção destes alcaloides presentes na planta *khat* ocorre em duas fases distintas. Através da mucosa oral, principal via da absorção da catinona, cerca de 60% deste composto é eficazmente absorvido, sendo superior para a catina (80%). Numa segunda fase, existe uma absorção da catinona através do suco deglutido, proveniente da mastigação da planta, ocorrendo assim a absorção a nível estomacal e no intestino delgado (Arunotayanun e Gibbons, 2012; Feyissa e Kelly, 2008; Toennes *et al.*, 2003).

A concentração plasmática de catinona é dependente da dose consumida, contudo, o tempo necessário para ser atingido o pico de concentração máxima não apresenta esta relação direta com a quantidade consumida de catinona (Valente *et al.*, 2014).

A catinona é eliminada maioritariamente sob a forma dos seus metabolitos, ou seja, na forma de catina e norepinefrina, sendo que apenas uma quantidade inferior a 7 % da dose

de catinona que foi consumida aparece sob forma inalterada na urina (Toennes e Kauert, 2002).

A quantidade consumida nunca é linear e varia de acordo com o derivado que está a ser utilizado, sendo que a via de administração e a potência dos efeitos produzidos por cada derivado são fatores fulcrais para escolher a quantidade necessária para obter os efeitos desejados (Kelly, 2011; Valente *et al.*, 2014). Tanto a farmacocinética como a farmacodinâmica, após uma exposição recente a um destes compostos, torna-se imprevisível devido às variações da natureza e pureza dos compostos presentes nos “sais de banho” (Valente *et al.*, 2014).

Num estudo realizado *in vitro* por Cozzi *et al.* (1999) demonstrou-se que a metilona e a efedrona apresentam uma potência menor que a MDMA e a metanfetamina (METH), respetivamente, para inibir a captação de neurotransmissores. Como na composição das catinonas sintéticas encontra-se presente um grupo β -ceto, a sua polaridade é aumentada e como consequência ocorre uma diminuição da sua capacidade para atravessar a barreira hemato-encefálica, quando comparadas com as anfetaminas que não possuem o grupo β -ceto como as catinonas sintéticas. Como consequência são necessárias doses mais elevadas de catinonas sintéticas para alcançar os mesmos efeitos causados pelas anfetaminas (Coppola e Mondola, 2012; Hill e Thomas, 2011; Prosser e Nelson, 2012).

No entanto, a família das catinonas pirrolidina não apresenta a dificuldade em atravessar a BHE comparativamente às outras catinonas sintéticas, uma vez que na sua estrutura química está presente o anel pirrolidina que confere menor polaridade à molécula (Coppola e Mondola, 2012).

Verificou-se que a MDPV, a metilona, a efedrona e a MEPH possuem uma elevada permeabilidade nas células endoteliais dos capilares de cérebro humano expressando transportadores “blood-to-brain” e “brain-to-blood”. Existem ainda evidências que sugerem a presença de um transporte ativo para o cérebro, via transportadores de influxo específicos para a MDPV, e daí a BHE apresentar maior permeabilidade tanto para este composto como para a MEPH (Simmler *et al.*, 2013).

Após a absorção da catinona ou de qualquer um dos seus derivados sintéticos ocorrem as reações de metabolização de fase I, nomeadamente a redução do grupo β -ceto a álcool

(reação catalisada pelas enzimas microsossomais hepáticas) produzindo-se nesta fase a catina e a norefedrina (figura 10) (Guantai e Maitai, 1983).

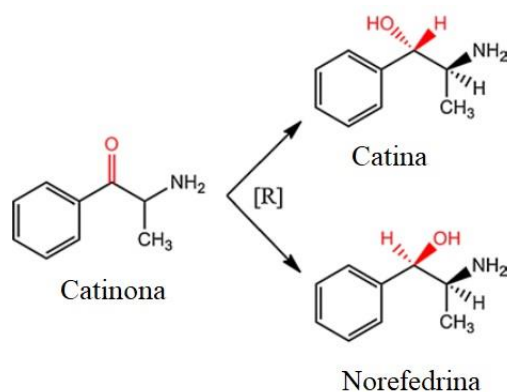


Figura 10. Fase I do metabolismo da catinona, formando a catina e norefedrina através de uma reação de redução [R] (adaptado de (Brenneisen *et al.*, 1986)).

A catinona possui um metabolismo estereoseletivo, onde o estereoisômero R-(+)-catinona é metabolizado a catina e o estereoisômero S-(+)-catinona é metabolizado, principalmente, a norefedrina (Mathys e Brenneisen, 1992).

Através de uma combinação entre a norefedrina absorvida (também presente nas folhas da *khat*) e o produto de metabolização da catinona, a quantidade de norefedrina excretada, presente na urina, é sempre superior à quantidade que foi ingerida (Toennes e Kauert, 2002).

A efedrona é reduzida a efedrina e posteriormente metabolizada a norefedrina através de uma *N*-desmetilação. Este metabolismo estereoseletivo ocorre também com a dimetilpropiona onde, após a sua redução em metilefedrina, esta sofre uma *N*-desmetilação originando a efedrina (Valente *et al.*, 2014).

Nas reações de metabolização de fase I dos **derivados N-alkilados** da catinona, onde se inclui a MEPH, podem ocorrer três vias distintas. A MEPH pode sofrer uma oxidação do grupo metilo presente no anel aromático com formação de um álcool que pode ser seguidamente oxidado originando um ácido carboxílico, o qual sofre então redução no grupo β -ceto. Por outro lado, pode ocorrer a *N*-desmetilação da amina primária, sendo

que o primeiro metabolito resultante tanto pode ser oxidado como reduzido. Quando ocorre redução, a função cetona é reduzida a álcool e os compostos resultantes são conjugados com o ácido glucurônico e/ou sulfatos, permitindo a sua excreção através da urina (Coppola e Mondola, 2012; Meyer *et al.*, 2010). As principais isoenzimas do sistema citocromo P450 (CYP) envolvidas nas reações de metabolização de fase I da MEPH são as CYP2D6 (Pedersen *et al.*, 2013).

No caso dos **derivados 3,4-metilenodioxi-N-alkilados** da catinona, o seu processo de metabolização já foi previamente caracterizado. Como observado na figura 11, são conhecidas três vias distintas da metabolização deste grupo de catinonas: a redução do grupo β -ceto, a desmetilenação do seu anel metilenodioxi seguida de *O*-metilação através da enzima catecol *O*-metiltransferase (COMT) e, como via menos comum, a *N*-desalquilação (Kamata *et al.*, 2006; Valente *et al.*, 2014). A partir das duas primeiras vias são formados três metabolitos hidroxilados que entram na fase II de metabolização, onde o seu grupo álcool sofre glucuronidação e sulfonação. Os compostos conjugados são excretados na urina juntamente com a fração inalterada (não metabolizada) da catinona (Coppola e Mondola, 2012; Zaitso *et al.*, 2009).

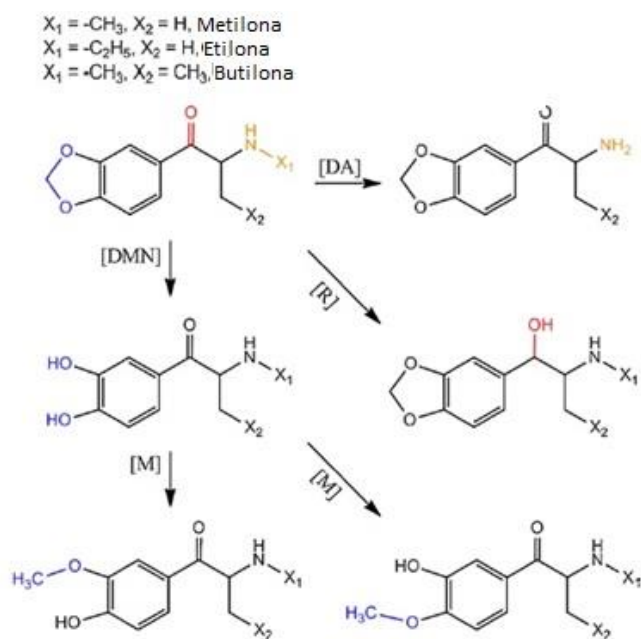


Figura 11. Vias de metabolização de fase I possíveis para a família das catinonas 3,4-metilenodioxiladas. [R] redução; [DA] *N*-desalquilação; [M] *O*-metilação (retirado de (Valente *et al.*, 2014)).

O grupo cetona presente na cadeia lateral amina dos **derivados 3,4-metilenodioxil-N-pirrolidina** da catinona, como no caso da α -PVP e da MDPV, é convertida num álcool. No que respeita ao anel 3,4-metilenodioxil da MDPV, este é metabolizado do mesmo modo que as β -ceto-metilenodioxilamfetaminas, produzindo-se um catecol e um metoxi catecol pirovalerona. Estes representam os metabolitos principais da MDPV que são posteriormente sulfonados e/ou glucuronados e excretados na urina (Valente *et al.*, 2014). Além disto, especificamente para a MDPV e α -PVP, o anel pirrolidina pode ser degradado e dar origem a amins primárias ou, por outro lado, a cadeia lateral e a posição 2' deste anel podem ser hidroxiladas e sofrer uma desidrogenação originando uma cetona e um anel lactamo, respetivamente. Por último, o anel pode abrir com formação do aldeído alifático correspondente e sofrer ainda uma oxidação adicional produzindo-se um ácido carboxílico (figura 12). Quando se trata da α -PVP o anel fenilo pode ser hidroxilado apenas na posição 4' e posteriormente estes metabolitos, e todos os outros que contenham grupos hidroxilo, sofrem parcialmente as reações metabólicas de fase II (Sauer *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2014).

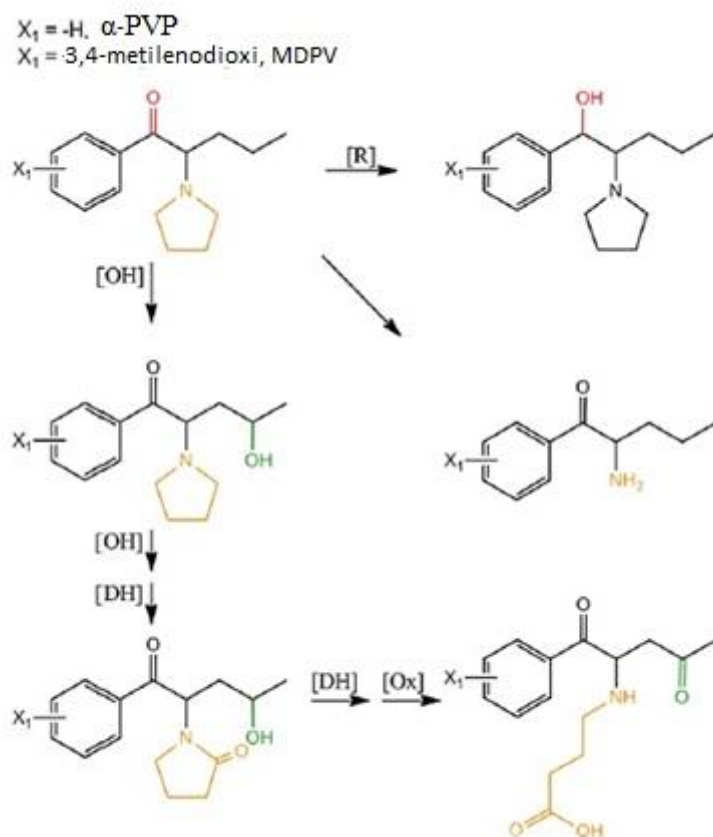


Figura 12. Vias de metabolização de fase I possíveis para as catinonas do grupo 3,4-metilenodioxil-N-pirrolidina. [R] redução; [OH] hidroxilação; [DH] desidrogenação; [Ox] oxidação (retirado de (Valente *et al.*, 2014)).

1.6. Farmacodinâmica

Sendo a catinona um análogo β -ceto da anfetamina e os seus metabolitos (catina e norefedrina) estruturalmente semelhantes à noradrenalina, durante o período da mastigação das folhas da planta *khat* ocorre a libertação destes compostos, levando ao aparecimento de efeitos estimulantes e simpaticomiméticos semelhantes aos apresentados pelas anfetaminas, os designados “amphetamine-like effects”. Diversos estudos elaborados recentemente demonstraram que, destes alcaloides, a catinona é o composto que apresenta maior potência para induzir a libertação no SNC de dopamina, da mesma maneira que ocorre com as anfetaminas (Valente *et al.*, 2014).

A presença do grupo metilo na posição α da cadeia lateral previne a inativação da catinona, catina e norefedrina pela monoamina oxidase (MAO), tal como acontece no

caso das anfetaminas. Para além desta propriedade, já foi comprovado que a catinona é capaz de inibir a MAO, nomeadamente a MAO-B, de modo mais potente que a anfetamina. Esta inibição promove a diminuição da degradação da dopamina, proporcionando uma acumulação de catecolaminas na fenda sináptica (Nencini *et al.*, 1984; Valente *et al.*, 2014). Como a catinona apresenta maior lipofilia que os seus metabolitos, atinge mais facilmente o SNC, favorecendo o aparecimento dos seus efeitos estimulantes e simpaticomiméticos.

Com um mecanismo de ação semelhante ao observado nas anfetaminas, as catinonas sintéticas promovem a libertação de catecolaminas nas terminações nervosas. Assim, ao nível das ações periféricas proporcionadas, quer seja por consumo de catinonas sintéticas, quer seja por mastigação da *khat*, é gerado uma síndrome simpaticomimética (Valente *et al.*, 2014). Esta é geralmente caracterizada por um aumento do ritmo cardíaco e pressão arterial, midríase, hipertermia, entre outros efeitos descritos mais pormenorizadamente na secção dos efeitos toxicológicos.

As catinonas sintéticas parecem exercer os seus efeitos após uma interação com os transportadores das monoaminas da membrana plasmática nomeadamente os transportadores da dopamina (DAT), da noradrenalina (NET) e da serotonina (SERT). Esta interação resulta num aumento da concentração destas aminas biogénicas na fenda sináptica (Cozzi *et al.*, 1999; Simmler *et al.*, 2013; Cameron *et al.*, 2013; Lopez-Arnau *et al.*, 2013; Sogawa *et al.*, 2011), do mesmo modo como já foi demonstrado com o consumo de anfetaminas (Carvalho *et al.*, 2012). Quando ocorre interação entre estes derivados sintéticos da catinona e os transportadores membranares de monoaminas, as catinonas são transportadas para o interior das células, levando à rutura das vesículas, estimulando a libertação dos neurotransmissores de uma forma não-exocitótica, revertendo assim o fluxo normal de transporte. As catinonas sintéticas podem ser classificadas como substratos (tal como as anfetaminas), ou então podem funcionar como bloqueadores (tal como a cocaína) levando a diferentes repercussões nos efeitos a longo prazo (Baumann *et al.*, 2013a).

De acordo com Simmler *et al.* (2013), existem três grupos diferentes de catinonas sintéticas dependendo em primeiro lugar da sua potência como inibidores da DAT, NET e SERT e em segundo lugar da sua acção como libertadores de substrato. As catinonas

do tipo “cocaine-MDMA-mixed”, onde estão incluídas a etilona, a butilona, metilona, mefedrona e nafirona, inibem a captação não seletiva de monoaminas, do mesmo modo que a cocaína. Este grupo promove também a libertação da serotonina (5-HT), da mesma forma que ocorre com o uso da MDMA, com a exceção da nafirona. (Valente *et al.*, 2014; Simmler *et al.*, 2013).

Estudos realizados em sinaptossomas de cérebro de rato demonstraram que a MDPV se comporta como um bloqueador do transportador seletivo de monoaminas, com elevada potência no caso das DAT e NET. Em comparação à cocaína, a MDPV apresenta uma potência cerca de cinquenta vezes superior para o DAT e de dez vezes para o NET. No entanto, para o SERT, a cocaína é cerca de dez vezes mais potente que a MDPV (Baumann *et al.*, 2013b; Cameron *et al.*, 2013; Valente *et al.*, 2014). A pirovalerona, como apresenta uma estrutura semelhante à MDPV, possui também um mecanismo semelhante. Ambos são inibidores muito potentes e seletivos para os transportadores da dopamina e noradrenalina, no entanto, não provocam a sua libertação como se observa para as anfetaminas (Valente *et al.*, 2014; Simmler *et al.*, 2013).

A catinona, metcatinona e flefedrona fazem parte do grupo das catinonas “methamphetamine-like”. A catinona e a metcatinona, tal como a anfetamina e a metanfetamina, atuam inibindo o transportador das monoaminas, sendo que apresentam uma maior potência para a DAT e baixa potência para a SERT. Para além disso, estes dois compostos promovem a libertação DAT, o que não ocorre com a 5-HT (tal como os seus análogos não β -ceto). Da mesma maneira que o seu análogo 4-fluoroanfetamina, a flefedrona tende a comportar-se de forma semelhante à catinona e metcatinona (Simmler *et al.*, 2013).

Cozzi *et al.* (1999) classificam ainda a metcatinona e a metilona como potentes inibidores dos transportadores de catecolaminas na membrana plasmática, com efeito muito limitado no que toca à inibição do transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2) em comparação com a MDMA e METH (Cozzi *et al.*, 1999).

Nestes estudos foi ainda observado que todas as catinonas apresentam boa permeabilidade no modelo *in vitro* da BHE, sendo que a MDPV apresentava uma permeabilidade transmembranar bastante elevada (Simmler *et al.*, 2013).

A afinidade com o NET relaciona-se com os efeitos simpaticomiméticos experienciados após consumir os derivados da catinona, tal como ocorre no caso da cocaína, da MDMA e da METH. À capacidade de inibir o DAT associam-se os efeitos psicostimulantes e o desenvolvimento de adição. Sintomas como paranoia e alucinações entre outros tipos de sintomas semelhantes, surgem devido a uma elevada afinidade para o SERT, tal como acontece com outras drogas alucinogénias mais clássicas como a mescalina, psilocibina e a LSD. Com a depleção de serotonina e dopamina induzida por estes compostos podem surgir sintomas como depressão e anedonia (Cameron *et al.*, 2013; Lopez-Arnau *et al.*, 2012; Schifano *et al.*, 2011; Simmler *et al.*, 2013).

1.7. Efeitos tóxicos

Tal como acontece com a *khat*, os efeitos provocados pelo consumo de catinonas sintéticas incluem normalmente os efeitos neurológicos, cardíacos e gastrointestinais (Karila *et al.*, 2015; Prosser e Nelson, 2012).

Estes efeitos podem variar entre as diferentes catinonas sintéticas, sendo dependentes da dose, via de administração e características individuais de cada consumidor (Karila *et al.*, 2015). Os efeitos desejados após o consumo geralmente incluem a euforia, aumento da empatia e do estado de alerta, intensificação das sensações, diminuição do apetite, estimulação mental, aumento da sociabilização e libido (Chavant *et al.*, 2015; Coppola e Mondola, 2012; Prosser e Nelson, 2012). No entanto, os seus consumidores também experienciam determinados efeitos adversos, nomeadamente agitação, náuseas e vômitos, tonturas, dores de cabeça, zumbidos, perda de apetite, perda de memória a curto prazo, espasmos musculares, taquicardia, aumento da pressão arterial, palpitações, hipertermia, bruxismo, sinais de parkinsonismo e midríase (Coppola e Mondola, 2012; Chavant *et al.*, 2015; Karila *et al.*, 2015; Valente *et al.*, 2014). Em casos de *overdose* podem aparecer situações de hiponatremia (provavelmente por aumento da vasopressina, levando a hiperhidratação como na *ecstasy*), rabdomiólise, acidose, psicose e convulsões. Em certas ocasiões podem surgir quadros mais graves como enfarte do miocárdio, colapso respiratório, edema cerebral, falência multiorgânica e culminar em morte.

É comum que com o consumo de catinonas apareçam alguns efeitos comportamentais, tais como insónias, confusão, ataques de pânico, alucinações, pensamentos suicidas,

automutilação, comportamentos violentos e anedonia (Chavant *et al.*, 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015; Karila *et al.*, 2015; Coppola e Mondola, 2012; Valente *et al.*, 2014).

Os derivados sintéticos da catinona, quando administrados por via intravenosa, podem causar uma sensação de queimadura, levar ao aparecimento de vesículas, trombose venosa, cicatrizes, formação de abscessos e, em casos mais problemáticos, o aparecimento de gangrena (Kersten e Mclaughlin, 2015). Para além das reações adversas anteriormente referidas, pode ainda ocorrer falência hepática aguda, lesão renal aguda, entre outros sintomas tais como síndrome serotoninérgica que resulta em hipertensão, tremores e hiperreflexia (Coppola e Mondola, 2012; Prosser e Nelson, 2012).

Os derivados sintéticos podem afetar múltiplos sistemas no organismo. Na tabela 1 são enumerados os diversos efeitos descritos pelos consumidores e profissionais de saúde nos diferentes sistemas.

Com o uso prolongado dos designados “sais de banho”, ocorre uma diminuição do transporte dopaminérgico, podendo desencadear efeitos semelhantes aos observados na doença de Parkinson (com maior prevalência na administração intravenosa), desordens neuropsiquiátricas e outros efeitos no sistema simpaticomimético. Ocorre também uma diminuição da serotonina e dopamina, bem como das enzimas triptofano hidroxilase e tirosina hidroxilase, responsáveis pela produção de serotonina e catecolaminas, respetivamente. Anorexia, aumento da incidência de isquemia miocárdica aguda e do vasoespasma coronário são outros dos problemas que podem surgir (Kelly, 2011; Kersten e Mclaughlin, 2015).

Tabela 1. Resumo dos efeitos adversos provocados pelas catinonas sintéticas.

| Sistemas | Efeitos adversos | Referências |
|------------------------------------|---|---|
| Cardiovascular | Angina; palpitações; hipertensão; dores no peito; miocardite; taquicardia; arritmia e alterações no segmento ST. | (Chavant <i>et al.</i> , 2015; Coppola e Mondola, 2012; Karila <i>et al.</i> , 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015; Prosser e Nelson, 2012; Schifano <i>et al.</i> , 2011; Valente <i>et al.</i> , 2014) |
| Hematológico | Coagulação intravascular disseminada e trombocitopenia. | (Karila <i>et al.</i> , 2015; Schifano <i>et al.</i> , 2011) |
| Nariz-Ouvidos-Garganta | Boca seca; irritação; epistaxis; problemas na língua e dor orofaríngea. | (Chavant <i>et al.</i> , 2015; Karila <i>et al.</i> , 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015; Prosser e Nelson, 2012; Schifano <i>et al.</i> , 2011; Valente <i>et al.</i> , 2014) |
| Gastrointestinal e hepático | Náuseas; vômitos; dor abdominal; perda de apetite; falha hepática e valores de função hepática anormais. | (Chavant <i>et al.</i> , 2015; Coppola e Mondola, 2012; Karila <i>et al.</i> , 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015; Prosser e Nelson, 2012; Schifano <i>et al.</i> , 2011) |
| Músculo esquelético | Artralgias; alterações das extremidades (descoloração, sensação de formiguelo, tensão muscular, espasmos musculares); aumento da creatina cinase; vasoconstrição periférica e rabdomiólise. | (Chavant <i>et al.</i> , 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015; Karila <i>et al.</i> , 2015; Prosser e Nelson, 2012; Schifano <i>et al.</i> , 2011) |
| Neurológico | Alteração do estado mental; desorientação; confusão; colapso; tonturas; dores de cabeça; perdas de memória; tremores; convulsões; distonia; hiperreflexia, <i>myoclonus</i> e parestesia. | (Chavant <i>et al.</i> , 2015; Karila <i>et al.</i> , 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015; Prosser e Nelson, 2012; Schifano <i>et al.</i> , 2011; Valente <i>et al.</i> , 2014) |
| Oftalmológico | Visão turva; midríase; dilatação das pupilas e nistagmo. | (Karila <i>et al.</i> , 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015; Prosser e Nelson, 2012; Schifano <i>et al.</i> , 2011; Valente <i>et al.</i> , 2014) |
| Respiratório | Falta de ar; taquipneia e distúrbios respiratórios. | (Karila <i>et al.</i> , 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015; Prosser e Nelson, 2012; Schifano <i>et al.</i> , 2011; Valente <i>et al.</i> , 2014) |
| Psicológico | Sensações de raiva; irritabilidade; agressividade; ansiedade; alucinações (visuais e auditivas); depressão; euforia; fadiga; aumento ou diminuição da concentração; discurso pouco coerente; ataques de pânico; paranóia; distorção nas capacidades perceptivas; delírio; agitação; psicoses; desordens cognitivas anedonia; tendências suicidas e automutilação. | (Chavant <i>et al.</i> , 2015; Coppola e Mondola, 2012; Karila <i>et al.</i> , 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015; Prosser e Nelson, 2012; Schifano <i>et al.</i> , 2011; Valente <i>et al.</i> , 2014) |
| Genito-urinário | Anorgasmia; disfunção erétil e aumento da libido. | (Karila <i>et al.</i> , 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015; Prosser e Nelson, 2012; Schifano <i>et al.</i> , 2011; Valente <i>et al.</i> , 2014) |
| Renal | Insuficiência renal, falha renal aguda. | (Karila <i>et al.</i> , 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015; Prosser e Nelson, 2012; Schifano <i>et al.</i> , 2011; Valente <i>et al.</i> , 2014) |
| Outros | Odor corporal; desidratação; insónias; suores; febre; pesadelos; rash cutâneo, toxicidade imunológica (vasculite, infecções e ulcerações); hiponatremia e hipertermia. | (Chavant <i>et al.</i> , 2015; Coppola e Mondola, 2012; Karila <i>et al.</i> , 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015; Prosser e Nelson, 2012; Schifano <i>et al.</i> , 2011; Valente <i>et al.</i> , 2014) |

Ao longo dos últimos anos foram reportados vários casos de intoxicações e mortes associados ao consumo de β -ceto anfetaminas (Borek e Holstege, 2012; Dargan *et al.*, 2011), principalmente nas faixas etárias mais jovens. No entanto, nem sempre é fácil a detecção da causa da morte nestes casos, uma vez que os laboratórios de análise revelam a existência de consumo simultâneo de diversas substâncias psicoativas (Coppola e Mondola, 2012; Dargan *et al.*, 2011).

Sendo a mefedrona uma droga muito conhecida no grupo das catinonas sintéticas, a preocupação com o uso da mesma tem vindo a aumentar, uma vez que foram descritos vários casos fatais associados ao seu consumo (Kelly, 2011). A primeira morte envolvendo a mefedrona ocorreu na Suécia no ano de 2008 (James *et al.*, 2011; Kelly, 2011). Normalmente, os consumidores desta droga apresentam dificuldade em concentrar-se, alcançar foco visual, problemas de memória, irritação, epistaxis, aumento da temperatura corporal (causando “suor mefedrona”), náuseas e vômitos, descoloração das extremidades e articulações, batimento cardíaco elevado, tremores e convulsões, dores de cabeça, ansiedade, agitação, insónias e/ou pesadelos noturnos e alucinações. Outros sintomas descritos para a mefedrona incluem vasoconstrição das extremidades, erupção (rash) cutânea, descoloração da pele e bruxismo (Coppola e Mondola, 2012; Dargan *et al.*, 2011; Kelly, 2011). Os efeitos adversos mais graves surgem em doses elevadas e/ou com o uso prolongado de mefedrona (Dargan *et al.*, 2011).

1.8. Tolerância, dependência e síndrome de abstinência

O consumo frequente de doses elevadas de catinonas sintéticas pode levar ao desenvolvimento de tolerância, dependência e ainda causar síndrome de abstinência após suspensão do consumo da droga.

No caso concreto da MDPV, existem relatos de consumidores que alegam o desenvolvimento de tolerância logo na primeira sessão de consumo para doses superiores a 200 mg, apesar das doses mais comuns variarem entre 5 e 30 mg (Coppola e Mondola, 2012). Também para a MEPH, os seus consumidores descreveram sentir um desejo intenso de consumir novamente e de aumentar as doses (Prosser e Nelson, 2012).

A síndrome de abstinência é relatada muitas vezes por consumidores que cessaram o consumo habitual da droga de uma maneira abrupta, nomeadamente no caso da MEPH, metcatinona e MDPV. Esta síndrome envolve situações de anergia, depressão, anedonia, ansiedade, paranoia, fadiga, distúrbios no sono e desejo de consumo. Alguns destes sintomas podem durar algumas semanas, nomeadamente a anergia, anedonia e o desejo intenso de consumo (Coppola e Mondola, 2012; Prosser e Nelson, 2012; Valente *et al.*, 2014).

1.9. Tratamento de intoxicações agudas

O tratamento adotado em situações de intoxicação por catinonas consiste normalmente em medidas de suporte (Prosser e Nelson, 2012). Não existe um antídoto específico para esta classe de drogas, nem qualquer tratamento aprovado pelas autoridades competentes no âmbito da saúde (Paillet-Loilier *et al.*, 2014).

Dado que não existem guias de tratamento para este género de intoxicações, opta-se normalmente por seguir um plano de tratamento semelhante ao utilizado no caso de intoxicações com anfetaminas e cocaína, devido à semelhança entre as drogas (Schifano *et al.*, 2011). Aos pacientes que apresentam sintomas como agitação, psicose, taquicardia, convulsões, hipertensão são administradas benzodiazepinas, devido ao seu efeito sedativo (Abbott e Smith, 2015; Karila *et al.*, 2015; Kersten e Mclaughlin, 2015; Prosser e Nelson, 2012). Em situações mais raras pode acontecer que os pacientes não possam ser tratados com benzodiazepinas e, portanto, outros sedativos devem ser usados, como por exemplo o propofol, barbitúricos e também antipsicóticos (Kersten e Mclaughlin, 2015).

Em casos de hipertermia deve ser realizado um arrefecimento drástico dos indivíduos intoxicados (banho em gelo, por exemplo), juntamente com a administração de fluidos por via intravenosa (Paillet-Loilier *et al.*, 2014; Prosser e Nelson, 2012; Kersten e Mclaughlin, 2015). Casos de hiponatremia após uma exposição às catinonas sintéticas foram já descritos, contudo, não é garantido que estas alterem a regulação de água e sódio do organismo, tal como acontece com a *ecstasy*. Para resolver esta situação efetua-se o mesmo tratamento usado para a MDMA, com uma restrição da ingestão de água ou administra-se uma solução salina hipertónica (Prosser e Nelson, 2012; Karila *et al.*, 2012).

Algumas das vezes são utilizados antipsicóticos, como, por exemplo, a risperidona por via oral ou o haloperidol por via intramuscular, como alternativas terapêuticas para estados de psicose, comportamentos agressivos e euforia. No entanto, é necessário ter prudência na administração de agentes antipsicóticos que bloqueiam a libertação de dopamina a pacientes intoxicados com catinonas, pois estes podem levar a distúrbios a nível do sistema termorregulador. Existindo situações de hipertermia e disritmias que ocorreram após a administração de haloperidol (Paillet-Loilier *et al.*, 2014).

Outras medidas podem ser necessárias no tratamento de intoxicações com estas drogas, tais como, ventilação mecânica para proteção das vias respiratórias e em casos de falha respiratória, infusão de catecolaminas e fluidos para tratamento do choque e ainda diálise, quando se pretende resolver casos de falha renal aguda ou distúrbios severos a nível metabólico (Karila *et al.*, 2015).

II. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Enquadramento e objetivos

As catinonas sintéticas foram desenhadas com o intuito de serem usadas com propósitos terapêuticos, mas rapidamente começaram a surgir casos de uso abusivo destas substâncias, sobretudo devido aos efeitos eufóricos que estas provocam (Kelly, 2011; Valente *et al.*, 2014). Em meados do ano de 2000 verificou-se um aumento marcado do número de catinonas sintéticas no mercado das drogas recreativas, surgindo como alternativas legais (“legal highs”) a algumas drogas ilícitas bem conhecidas, tais como a *ecstasy*, sendo facilmente adquiridas na Internet (Karila *et al.*, 2015; Valente *et al.*, 2014). Estas drogas representam atualmente um problema de saúde pública, sendo perentória a realização de estudos que avaliem a sua toxicidade.

Nesse sentido, estudos recentes demonstraram o potencial neurotóxico e hepatotóxico das catinonas sintéticas (Hill e Thomas, 2011; Luethi *et al.*, 2017; Valente *et al.*, 2016a; Valente *et al.*, 2016b; Valente *et al.*, 2017b; Watterson e Olive, 2014). Até à data, tanto quanto se sabe, não existem estudos que avaliem aos efeitos nefrotóxicos da exposição a estas drogas, razão pela qual se pretendeu efetuar o presente estudo. Dada a semelhança estrutural das catinonas sintéticas com a MDMA, é expectável que estas novas

substâncias psicotrópicas apresentem toxicidade semelhante, nomeadamente a nível renal.

O rim é um dos principais órgãos envolvidos na excreção de xenobióticos, podendo por vezes estar envolvido na metabolização dos mesmos. Para além desta função, o rim desempenha um papel a nível endócrino, da homeostase, controlando parâmetros como o pH e a pressão sanguínea. Por tais motivos, é de grande importância o estudo da toxicidade renal (Tarloff e Lash, 2005).

As células epiteliais do túbulo proximal renal humano caracterizam-se por serem as mais abundantes no interstício tubular cortical e o principal alvo de diversos xenobióticos, nomeadamente de determinadas drogas de abuso, podendo resultar em falência renal. O modelo *in vitro* que utiliza este género de células encontra-se aprovado para investigação da função celular a nível renal, processos de transporte e mecanismos envolvidos nas lesões provocadas por xenobióticos (Qi *et al.*, 2007; Valente *et al.*, 2011). Diferentes modelos *in vitro* podem ser utilizados para estes estudos de toxicidade renal, nomeadamente as culturas primárias (células isoladas a partir de um rim fresco e colocadas em cultura) e as linhas celulares imortalizadas, consideradas como “subculturas” das células usadas nas culturas primárias, uma vez que estas são transferidas para outros frascos de cultura dando continuidade ao processo de cultura. Apesar das culturas primárias serem muito próximas do tecido intacto apresentam certas desvantagens em relação às linhas celulares. Contrariamente ao que ocorre com as culturas primárias, as linhas celulares podem ser mantidas durante várias gerações o que facilita em muito os estudos devido à facilidade com que possui material para estudar e a enorme reprodutibilidade que proporcionam. Nas culturas celulares obtidas de tecido renal humano é necessário que seja constantemente preparadas culturas de um tecido fresco. Outra desvantagem destas culturas é a variabilidade existente no material de estudo, uma vez que os rins usados podem ser obtidos de indivíduos diferindo em idade, estilo de vida, sexo e características individuais (Tarloff e Lash, 2005).

Esta segunda parte da dissertação teve como objetivo principal o estudo da nefrotoxicidade das catinonas sintéticas, usando como modelo *in vitro* a linha celular imortalizada HK-2, sendo este modelo frequentemente utilizado quando se pretende realizar estudos de avaliação da toxicidade renal (Huang *et al.*, 2015; Sung *et al.*, 2008;

Zager e Iwata, 1997). As células HK-2 foram expostas a diferentes concentrações de cinco catinonas sintéticas selecionadas por serem comumente consumidas como drogas recreativas, nomeadamente a pentedrona, a MDPV, a 4-MEC, a 3,4-DMMC e a metilona, durante 24 e 48 horas. A avaliação da toxicidade foi feita com recurso ao ensaio do MTT que permite estimar a viabilidade celular.

O trabalho foi realizado no Centro de Investigação em Biomedicina (CEBIMED) pertencente à Unidade de Investigação Fernando Pessoa em Energia Ambiente e Saúde (FP-ENAS).

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados no decorrer do ensaio possuíam elevado grau de pureza.

Tabela 2. Reagentes utilizados no estudo e respetivos fornecedores.

| Reagentes | Fornecedores |
|--|------------------------------------|
| RPMI-1640 | |
| Hidrogenocarbonato de sódio | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) |
| Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) | |
| Pen Strep® 10.000 U/mL / 10.000 µg/mL | |
| Soro bovino fetal (FBS) | Gibco, Invitrogen™ |
| Tripsina (0,25%) | |
| Dimetilsufóxido (DMSO) | Merck (Darmstadt, Alemanha) |

Todas as catinonas usadas neste estudo foram amavelmente cedidas pelo Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e apresentavam uma pureza superior a 98%.

2.2.2. Linha celular HK-2

Neste estudo utilizou-se a linha celular HK-2, obtida a partir de células adultas e imortalizadas de tecido epitelial do túbulo proximal renal humano. Ao utilizar esta linha celular é possível obter resultados semelhantes aos que seriam obtidos a partir de células recentemente isoladas. Através da exposição de uma cultura primária destas células ao vírus do papiloma humano (HPV-16) recombinante é possível originar a linha celular imortalizada HK-2. Com a tradução dos genes E6/E7 deste vírus é possível imortalizar as células epiteliais sem provocar alterações significativas ao fenótipo e propriedades funcionais das células originárias (Ryan *et al.*, 1994).

Para evitar contaminações, os procedimentos foram realizados em condições assépticas, na câmara de fluxo laminar.

A figura 13 ilustra o aspeto da cultura HK-2 numa fase inicial de crescimento e após atingirem a confluência.

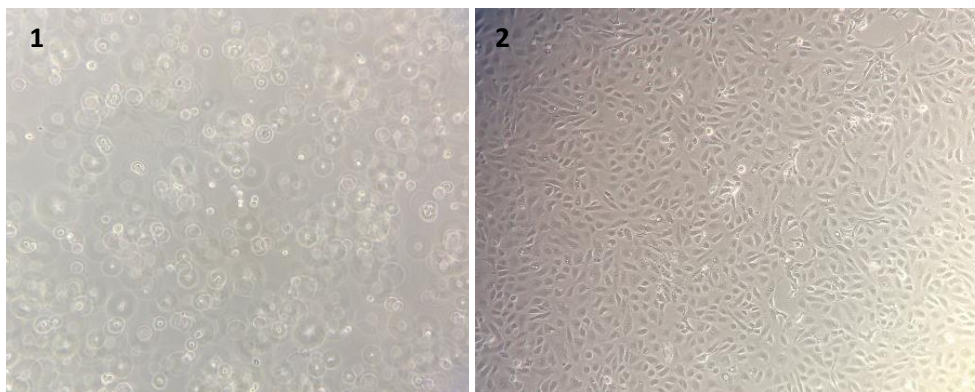


Figura 13. Morfologia das células HK-2 (1) após a descongelação da alíquota celular e (2) após atingirem alta confluência. Observação em microscópio ótico invertido (ampliação de 100x).

2.2.3. Preparação do meio de cultura

Para a cultura da linha celular HK-2 foi utilizado o meio RPMI-1640. O meio de cultura encontra-se sob a forma de pó, o que implica a necessidade de preparação prévia. Este é preparado através da dissolução do pó num litro de água desionizada, onde é adicionado

hidrogenocarbonato de sódio (2 g/L), que funciona como um regulador de pH pois as células metabolizam o dióxido de carbono (CO₂) presente na estufa, levando à diminuição do valor de pH. Através de um eletrodo previamente calibrado, o pH é ajustado com uma solução diluída de HCl até ser atingido o valor de 7,2-7,3. Devem ser mantidos estes valores uma vez que durante a posterior filtração esterilizante do meio, o pH sobe para o valor ideal de 7,4.

O meio de cultura é posteriormente é suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) que promove a adesão das células ao frasco/placa de cultura e 1% de solução de antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL) de forma a impedir a proliferação bacteriana. Fornecendo ao meio todos os nutrientes essenciais à sobrevivência das células e mantendo os valores de pH, pressão osmótica e temperatura adequados, é possível obter a adequada manutenção da cultura celular bem como o crescimento apropriado da mesma, quando em contacto com o meio.

2.2.4. Descongelação de alíquota celular

As células HK-2 encontravam-se inicialmente no criotubo em meio de congelação (meio de cultura completo com 7,5% de DMSO) a uma temperatura de -80 °C. Para realizar o seu descongelamento, recorreu-se ao meio RPMI previamente aquecido a 37°C.

Colocaram-se 9 mL de meio RPMI num tubo Falcon de 15 mL, descongelando o conteúdo do criotubo com parte do meio, sendo que todas as células foram transferidas para o tubo Falcon. Em seguida procedeu-se à centrifugação da suspensão celular a uma velocidade de 400 rpm, durante 5 minutos, e posterior ressuspensão do pellet com 10 mL de novo meio de cultura. Com este passo pretende-se que sejam retirados os vestígios de DMSO provenientes do meio de congelação, uma vez que este composto apresenta toxicidade para as células.

Transferiu-se 5 mL desta suspensão celular para um frasco de cultura celular de 25 cm², o qual é colocado na estufa a uma temperatura otimizada de 37 °C com 5% de CO₂, até ser atingido 70-80% de confluência celular. Tratando-se de um processo que demora alguns dias para ocorrer, o meio de cada frasco deve ser trocado a cada 2-3 dias, de modo a garantir o devido crescimento e sobrevivência celular.

2.2.5. Cultura e subcultura das células HK-2

Para tornar possível uma utilização contínua das células, várias subculturas devem ser realizadas, e para tal são executadas várias passagens celulares. Estas são feitas com o intuito de garantir a continuidade do crescimento celular e assim serem utilizadas em qualquer altura do estudo. Assim, após verificação do crescimento das células em monocamada por observação ao microscópio invertido, com confluência entre 70 e 80%, procedeu-se à desagregação enzimática das células aderidas no fundo do frasco de cultura celular, através de uma solução de tripsina/EDTA (0,05% e 0,02%, respetivamente). Para isso procedeu-se à remoção do meio contido no frasco e posterior lavagem (cerca de 10 segundos) da monocamada celular com 1 mL da solução de tripsina de forma a garantir uma melhor remoção do FBS, uma vez que este composto inativa a ação da tripsina. Seguidamente, são adicionados ao frasco 2 mL da solução de tripsina/EDTA permitindo que as células se destaquem do frasco e se desagreguem entre si. Este processo dura cerca de 3 minutos (período no qual o frasco deve ser colocado na estufa), e a verificação da sua eficácia é feita através da observação das células em microscópio invertido. Por cada mililitro de tripsina adicionam-se 4 mL de meio com FBS, de forma a cessar a ação da tripsina sob as células. Contudo, ao efetuar uma passagem, este volume pode ser ajustado por excesso em função do número de frascos pelos quais a suspensão celular vai ser dividida (“split”). Assim, após tripsinização, pode ser preparada a sementeira da linha celular na placa adequada ao ensaio, ou a passagem para outros frascos de cultura.

De salientar que todas as soluções adicionadas aos frascos onde se encontram as células devem ser previamente aquecidas a uma temperatura de 37 °C para evitar o stress das mesmas.

2.2.6. Preparação de alíquotas para congelação

Para a preparação de alíquotas com uma suspensão de células a $3,8 \times 10^4$ células/mL recorreu-se à tripsinização de um frasco de cultura 75 cm² com confluência de 70-80%, seguida de uma centrifugação (400 rpm; 5 min) e aspiração do sobrenadante. Posteriormente, o pellet é ressuspendido com 2 mL meio de congelação (meio de cultura completo com 7,5% de DMSO) que são divididos em dois criotubos com volumes iguais,

armazenados com a maior celeridade possível a uma temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de forma a evitar que o meio de congelação danifique as células.

2.2.7. Incubação com as catinonas sintéticas

A gama de concentrações testada para as diferentes catinonas foi selecionada de forma a se obter curvas concentração-resposta que vão desde a toxicidade nula até uma toxicidade absoluta (100%). Para as catinonas metilona, 4-MEC, pentedrona e MDPV, o intervalo de concentrações testado foi entre 0,1-10 mM, enquanto que para a 3,4-DMMC foi utilizado um intervalo entre 0,01 e 3 mM. Esta diferença deve-se ao facto da 3,4-DMMC ser mais tóxica que as restantes drogas, o que implica a necessidade de concentrações mais baixas para obter uma curva concentração-resposta adequada.

Para a preparação das soluções de catinonas, partiu-se do pó correspondente a cada uma das drogas selecionadas, dissolvendo-o em meio RPMI sem FBS de forma a obter uma solução mãe a 50 mM. Partindo dessa solução fizeram-se diluições sucessivas em meio de cultura sem FBS, como indicado nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Folha de cálculo utilizada para a preparação das diferentes concentrações testadas de metilona, pentedrona, MDPV e 4-MEC.

| 2 placas (24/48h) | | | |
|--------------------------|--------------------|---|---|
| Conc. final no poço (mM) | Conc. inicial (mM) | Volume (μl) a pipetar da solução a 50 mM | Volume (μl) de meio de cultura |
| 10 | 20 | 1440 | 2160 |
| | | Volume (μl) a pipetar da solução a 20 mM | |
| 8 | 16 | 520 | 130 |
| 7 | 14 | 455 | 195 |
| 6 | 12 | 390 | 260 |
| 5 | 10 | 1600 | 1600 |
| | | Volume (μl) a pipetar da solução a 10 mM | |
| 4 | 8 | 560 | 140 |
| 3,5 | 7 | 490 | 210 |
| 3 | 6 | 420 | 280 |
| 2,5 | 5 | 350 | 350 |
| 2 | 4 | 280 | 420 |
| 1,5 | 3 | 210 | 490 |
| 1 | 2 | 140 | 560 |
| 0,5 | 1 | 70 | 630 |
| | | Volume (μl) a pipetar da solução a 2 mM | |
| 0,1 | 0,2 | 70 | 630 |

Tabela 4. Folha de cálculo utilizada para a preparação das diferentes concentrações testadas de 3,4-DMMC.

| 2 placas (24/48h) | | | |
|--------------------------|--------------------|---|--------------------------------------|
| Conc. final no poço (mM) | Conc. inicial (mM) | Volume (μ l) a pipetar da solução 50 mM | Volume (μ l) de meio de cultura |
| 3 | 6 | 360 | 2640 |
| | | Volume (μl) a pipetar da solução 6 mM | |
| 2 | 4 | 500 | 250 |
| 1,6 | 3,2 | 400 | 350 |
| 1,2 | 2,4 | 300 | 450 |
| 1 | 2 | 250 | 500 |
| 0,8 | 1,6 | 200 | 550 |
| 0,65 | 1,3 | 162,5 | 587,5 |
| 0,5 | 1 | 125 | 625 |
| 0,3 | 0,6 | 200 | 1800 |
| | | Volume (μl) a pipetar da solução 0,6 mM | |
| 0,2 | 0,4 | 500 | 250 |
| 0,1 | 0,2 | 250 | 500 |
| 0,05 | 0,1 | 200 | 1000 |
| | | Volume (μl) a pipetar da solução 0,1 mM | |
| 0,02 | 0,04 | 300 | 450 |
| 0,01 | 0,02 | 150 | 600 |

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços. Recorreu-se a um frasco de cultura confluenta a 70-80% e, após tripsinização para destacamento das células, realizou-se a contagem das células da suspensão celular obtida em câmara de Neubauer. Estabeleceu-se que deveriam de existir 10.000 células/poço, sendo a suspensão celular diluída em meio de cultura completo de forma a se obter a densidade celular adequada. A suspensão de células HK-2 foi pipetada para os 60 poços centrais das placas (figura 14), com a concentração referida anteriormente, sendo que em cada poço são colocados 200 μ L de suspensão celular. Esta foi preparada com meio de cultura completo (contendo FBS) de forma a permitir a adesão das células ao fundo dos poços. Nos poços da periferia colocou-se 200 μ L de água esterilizada (em alternativa poderá ser usado HBSS ou meio de cultura estéril) de modo a evitar fenómenos de evaporação e concentração das soluções que estão a ser testadas.

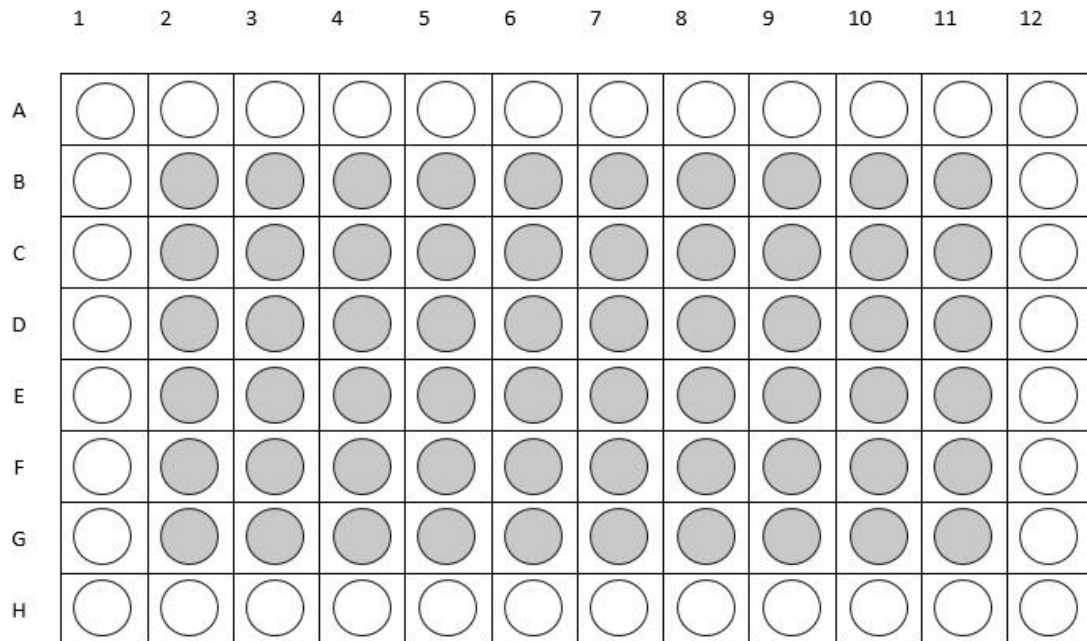


Figura 14. Esquema da placa de 96 poços, onde os poços representados a branco contêm 200 μ L de água estéril e os poços representados a cinzento contêm 200 μ L da suspensão celular em meio completo (10.000 células/poço).

Após um período de incubação de 24 horas na estufa a 37 °C com 5% de CO₂, no final do qual as células devem cobrir devidamente o fundo dos poços como confirmado por observação ao microscópio invertido, o meio foi rejeitado por aspiração suave. Em seguida, pipetou-se para cada poço um volume de 100 μ L de meio de cultura suplementado com solução de antibióticos mas sem FBS (pois a albumina presente no soro pode ligar-se à catinona e desta forma interferir com efeito observado), juntando-se ainda um volume de 100 μ L de cada concentração da droga em estudo. Para cada concentração testada da droga foram preparados triplicados como ilustra a figura 15.

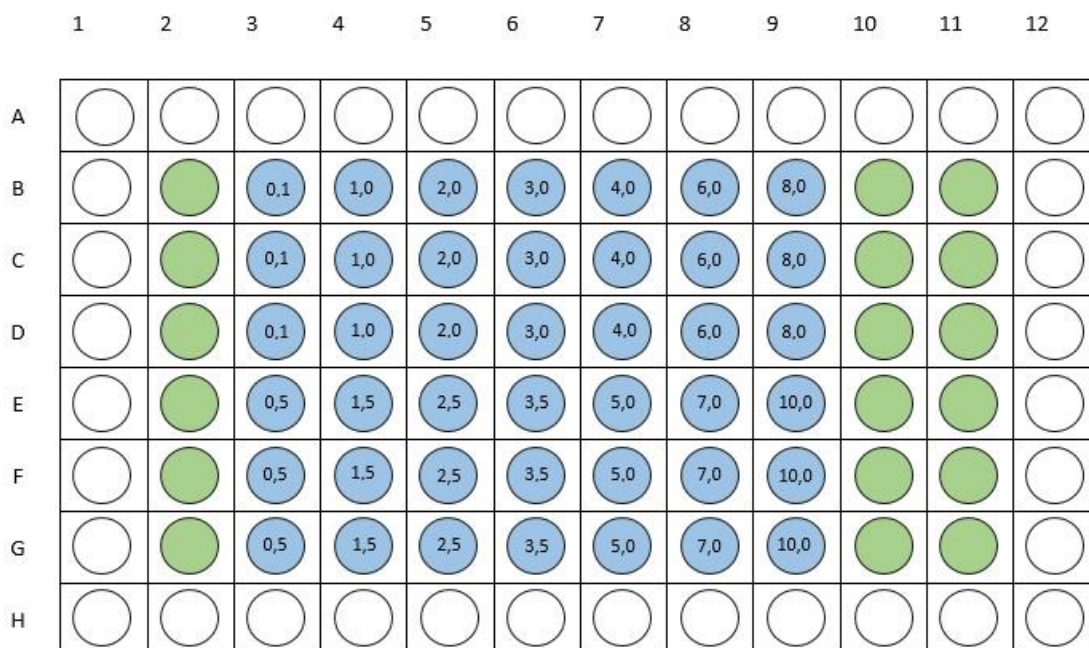


Figura 15. Esquema representativo da placa de 96 poços, onde os poços representados a verde correspondem aos poços controlo negativo de morte (células expostas somente ao meio RPMI) e os poços representados a azul correspondem aos poços contendo as 14 concentrações de catinonas sintéticas testadas.

Em todos os ensaios incluiu-se também um controlo negativo de morte, sendo uma coluna preenchida com 200 µL de meio RPMI e um controlo positivo de morte correspondendo a uma coluna com 200 µL de Triton X-100 a 1% (concentração final no poço). Para evitar a evaporação do mesmo e conseqüente alteração nos resultados das outras colunas, o controlo positivo de morte foi sempre preparado numa placa de 96 poços em separado das utilizadas para as drogas.

Para este estudo seleccionaram-se dois tempos de exposição das células às catinonas em estudo, que foram 24 e 48 horas.

2.2.8. Determinação da viabilidade celular com MTT tetrazólio

Os compostos podem ter efeitos nas células que vão desde alterações ao nível da proliferação celular até à sua morte. Qualquer que seja o tipo de ensaio utilizado, no final de cada experiência é importante saber o número de células que se encontram viáveis.

A viabilidade celular é assim o parâmetro mais frequentemente investigado nos ensaios de avaliação toxicológica. Este parâmetro pode ser determinado monitorizando vários processos celulares, através de diferentes medições baseadas em reações químicas do

metabolismo celular (Mosmann, 1983; Stone et al., 2009), incluindo-se o ensaio de redução metabólica de sais de tetrazólio.

São vários os compostos tetrazólio utilizados neste tipo de ensaios, sendo os mais comuns o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), o XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-carboxinilida-2H-tetrazólio, na forma de sal monossódico), o MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, sal interno) e o WST-1 (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazólio, na forma de sal monossódico). Para o ensaio realizado neste projeto utilizou-se o MTT, adaptando-se para o uso em placas de 96 poços. O MTT é um composto tetrazólio carregado positivamente, característica que lhe confere a capacidade de entrar diretamente nas células eucarióticas (Riss *et al.*, 2013).

Após exposição das células aos compostos a testar durante um período de 24 e 48 horas, removeu-se o meio de cultura (por aspiração com vácuo) a cada um dos 60 poços centrais da placa e adicionou-se em cada um destes um volume de 200 µL de uma solução de MTT a 0,5 mg/mL, preparada em meio de cultura a partir de uma solução stock a 5 mg/mL. Seguidamente, as placas são incubadas na estufa a 37 °C com 5% de CO₂ durante 2 horas. Quando existem células viáveis com metabolismo ativo, a enzima succinato desidrogenase mitocondrial converte o MTT num composto formazano de coloração violeta. Caso as células se encontrem mortas perdem a capacidade de metabolizar o MTT a formazano, sendo a quantidade de formazano formado diretamente proporcional ao número de células vivas. Este ensaio colorimétrico permite avaliar a função mitocondrial e funciona desta forma como um ótimo marcador de viabilidade celular, uma vez que o composto é reduzido por células metabolicamente ativas.

Terminadas as duas horas, a solução de MTT é aspirada cuidadosamente dos poços e adicionou-se 100 µL de DMSO para solubilizar o formazano que se apresenta na forma de precipitado insolúvel formado intracelularmente (Riss *et al.*, 2013). Para promover a solubilização total dos cristais de formazano, as placas foram colocadas num agitador de placas durante 3 minutos. Posteriormente, fez-se a medição deste composto recorrendo-se a um leitor de placas no comprimento de onda de 545 nm e usando como valor de referência o comprimento de onda de 630 nm.

2.2.9. Tratamento estatístico

As curvas normalizadas relativamente ao controlo negativo e positivo de morte foram construídas com valores de mortalidade (efeito) e logaritmo da concentração (mM) (Scholze et al., 2001).

Neste estudo foi empregue a seguinte função logit: $Y = \theta_{\min} + (\theta_{\max} - \theta_{\min}) / (1 + \exp(-\theta_1 - \theta_2 \times \log(x)))$, onde θ_{\min} e θ_{\max} representam respetivamente os efeitos mínimos e máximos observados, x representa a concentração da droga que se encontra em estudo, θ_1 é o parâmetro de localização e θ_2 representa o declive da curva.

Para a construção de todos os modelos de regressão não linear utilizou-se o programa informático GraphPad Prism 6 (versão 6.0c). Este programa permitiu assim a projeção de curvas concentração-resposta com forma sigmóide e os resultados apresentados com um intervalo de confiança de 95% (linhas tracejadas) dos valores médios obtidos de pelo menos cinco ensaios independentes.

No tratamento estatístico usando o programa acima descrito, as curvas das 24 e 48 horas das diferentes drogas, foram comparadas (θ_1 ; θ_2 ; θ_{\max}) usando o modelo t-test. Para a comparação da concentração da droga *versus* controlo utilizou-se o modelo One-way Anova. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Para cada uma das drogas testadas foram determinados os valores de EC_{50} , permitindo desta forma realizar uma comparação entre as diferentes drogas em estudo.

2.3. Resultados

2.3.1. Avaliação do efeito citotóxico induzido pelas catinonas estudadas em células HK-2

Para este estudo foram construídas curvas concentração-resposta para cada uma das catinonas selecionadas. Para tal foi necessário testar uma ampla gama de concentrações que permitisse a obtenção de curvas de concentração-resposta completas, isto é, abrangendo desde o efeito nulo (0% de morte celular) até à resposta máxima (100% de

morte celular) no ensaio de redução do MTT. Para tal, foi testada uma gama de concentrações de 0,01-3 mM para a 3,4-DMMC e de 0,1-10 mM para as restantes catinonas sintéticas estudadas.

As curvas de concentração-resposta foram obtidas por incubação da linha celular Hk-2 com as catinonas em estudo, por um período de 24 e 48 horas (Figura 16). Ao comparar as curvas dos diferentes tempos podemos observar que a citotoxicidade foi dependente do tempo de incubação para todas as catinonas estudadas, com exceção da 3,4-DMMC (Figura 16B). Assim, à medida que o tempo de incubação é maior, o efeito tóxico torna-se mais acentuado.

Os gráficos de barras apresentados em seguida demonstram que a percentagem de dano mitocondrial aumenta com o aumento da concentração de catinona sintética, ou seja, ocorre uma diminuição da capacidade das oxiredutases mitocondriais de reduzirem o MTT. Isto significa que todas as catinonas estudadas induzem citotoxicidade de forma dependente da concentração, como mostra a figura 17 para as 48 horas. O mesmo foi observado para o período de incubação de 24 horas (dados não apresentados).

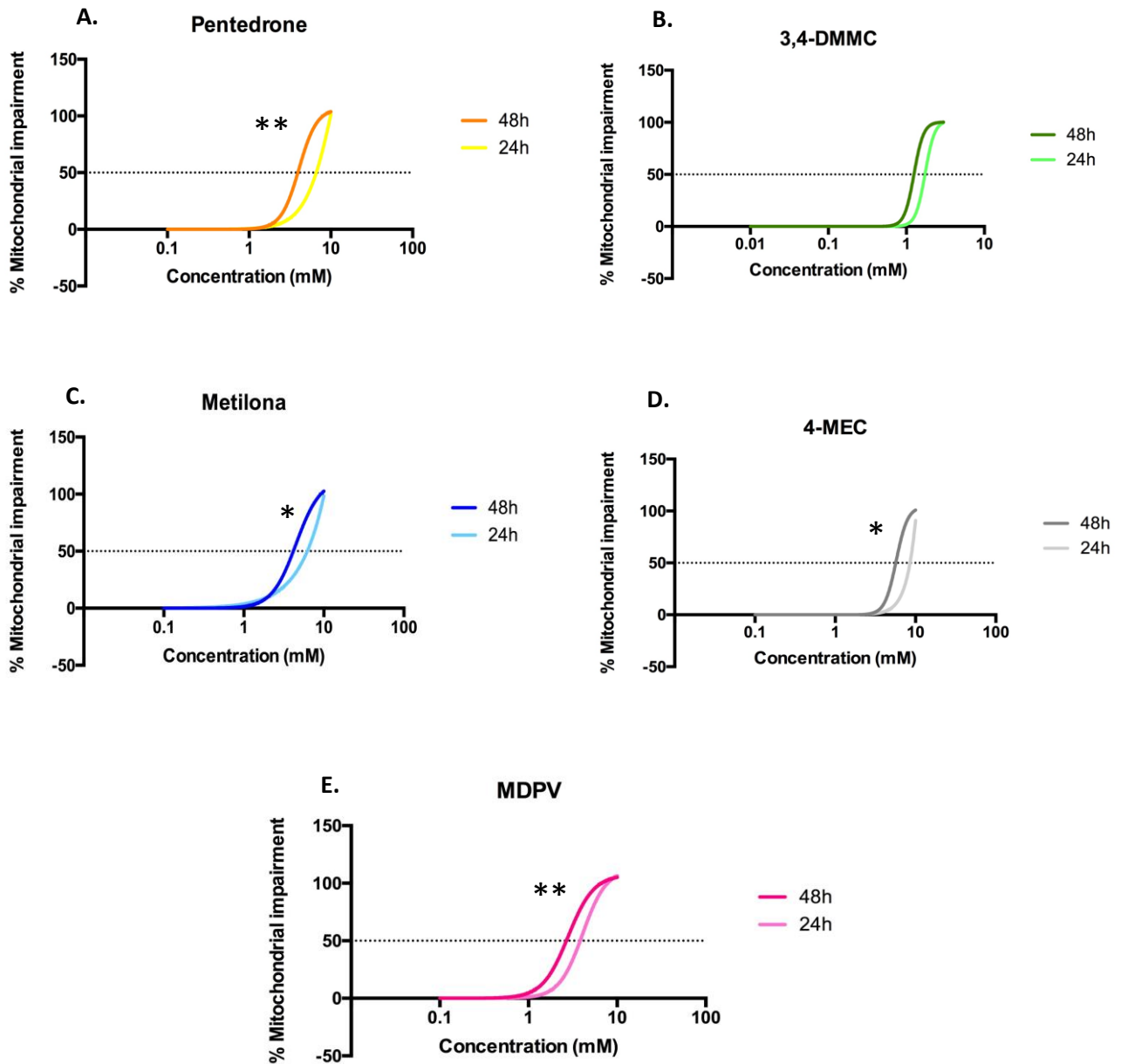


Figura 16. Curvas de concentração-resposta obtidas para a (A) pentedrona, (B) 3,4-DMMC, (C) metilona, (D) 4-MEC e (E) MDPV em células HK-2. Os dados foram obtidos com, pelo menos, cinco experiências independentes e as concentrações testadas em três replicados, através do ensaio de redução do MTT, após 24 e 48 horas de incubação. * vs tempo 24h (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

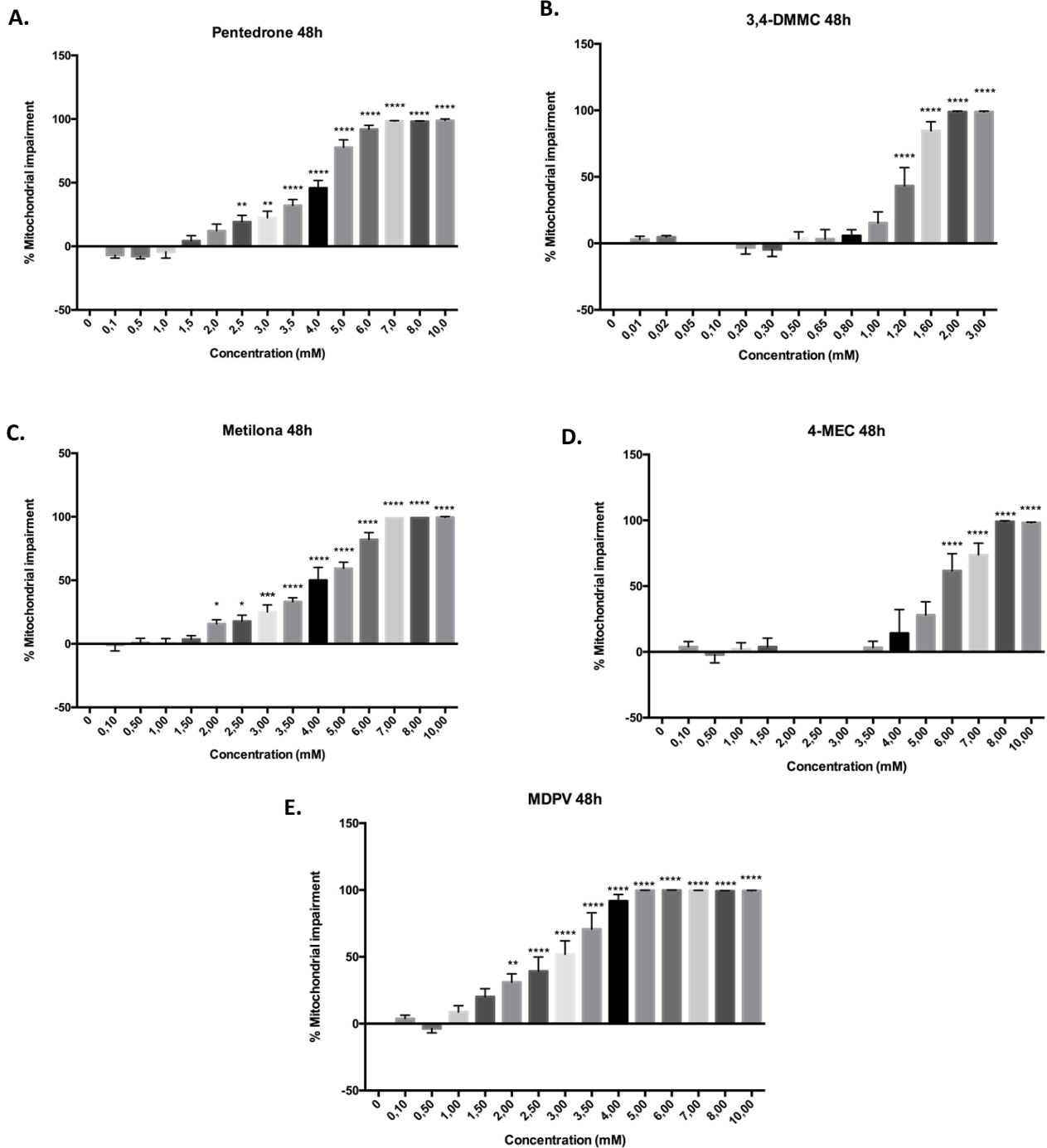


Figura 17. Nefrotoxicidade da (A) pentedrona, (B) 3,4-DMMC, (C) metilona, (D) 4-MEC e (E) MDPV avaliada pelo teste de viabilidade celular MTT. As células HK-2 foram expostas por um período de 48 h a diferentes concentrações das drogas selecionadas. Os dados foram obtidos com, pelo menos, cinco experiências independentes e as concentrações testadas em três replicados, e são apresentados como percentagem de controlo. As comparações entre grupos foram efetuadas utilizando o modelo One-Way Anova [($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$) concentração *versus* controlo)].

2.3.2. Análise comparativa da toxicidade das catinonas sintéticas estudadas na linha celular HK-2

Foi também objetivo deste trabalho avaliar e comparar a potência tóxica das catinonas estudadas neste modelo celular.

As curvas de citotoxicidade de cada uma das catinonas testadas em células HK-2 são apresentadas na figura 18, com o intervalo de confiança de 95% para o efeito médio de cada um dos compostos testados (a tracejado). As leituras de absorvância foram normalizadas relativamente ao controlo negativo (incubação com meio de cultura) e ao controlo positivo (incubação com 1% de Triton X-100), tal como descrito anteriormente.

Comparando as curvas de concentração-resposta obtidas, verifica-se que a curva correspondente à 3,4-DMMC se encontra deslocada para a esquerda comparativamente às restantes, o que se traduz numa maior toxicidade da 3,4-DMMC para estas células. De facto, para a 3,4-DMMC (Figura 17B) observa-se uma diminuição da viabilidade celular de forma significativa a partir da concentração 1,20 mM.

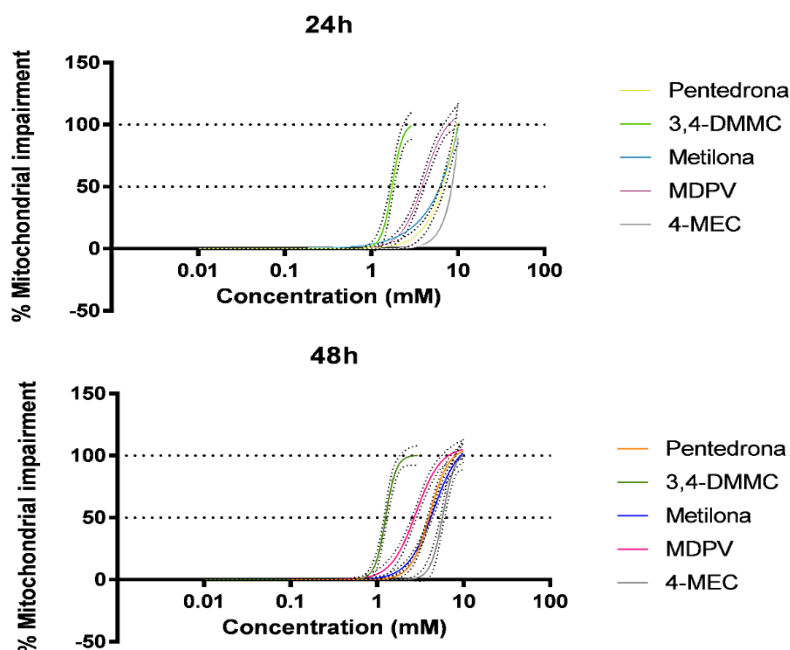


Figura 18. Curvas de concentração-resposta obtidas para as catinonas estudadas em células HK-2 através do ensaio de redução do MTT, após (A) 24 e (B) 48 horas de incubação. As curvas foram traçadas pela função assimétrica logit (linhas contínuas) e as linhas a tracejado representam os intervalos de confiança de 95%.

Na tabela 5 encontram-se resumidos os parâmetros de localização (θ_1), de declive (θ_2) e de efeito máximo (θ_{\max}) de cada uma das curvas concentração-resposta, de acordo com o modelo de regressão que melhor se adapta ao estudo das catinonas (Logit). Estes resultados mostram que as curvas obtidas para a 3,4-DMMC e a 4-MEC são semelhantes no que respeita ao declive, que é mais acentuado do que para as restantes catinonas.

Tabela 5. Parâmetros derivados de ajustes não-lineares de dados de concentração-resposta das drogas testadas para a função logit assimétrica, no teste de redução MTT.

| | Metilona | Pentredrona | 4-MEC | MDPV | 3,4-DMMC |
|-----------------|----------|-------------|--------|--------|----------|
| | 48h | 48h | 48h | 48h | 48h |
| θ_1 | -4,321 | -5,596 | -10,67 | -3,103 | -1,597 |
| θ_2 | 6,613 | 9,171 | 14,04 | 6,935 | 16,33 |
| θ_{\max} | 113 | 106,7 | 104,4 | 107,4 | 100,4 |

O valor de EC_{50} indica a concentração de composto capaz de induzir metade da resposta máxima, ou seja, a concentração de droga que origina a morte de 50% das células expostas. Na tabela 6 são apresentados os valores de EC_{50} obtidos para cada uma das drogas testadas onde se verifica que a 3,4-DMMC é a droga com maior toxicidade para as HK-2. Seguidamente, por ordem decrescente de toxicidade, surgem a MDPV, a pentredrona, a metilona e, por último, a 4-MEC.

Tabela 6. Valores de EC_{50} obtidos para as catinonas estudadas às 24 e 48h.

| | Pentredrona | 3,4-DMMC | Metilona | MDPV | 4-MEC |
|---------------------------------|-------------|----------|----------|----------|----------|
| EC_{50} 24h | 6,630 mM | 1,733 mM | 6,213 mM | 3,827 mM | 8,540 mM |
| EC_{50} 48h | 3,949 mM | 1,251 mM | 4,154 mM | 2,676 mM | 5,675 mM |

2.4. Discussão

O rim é um órgão alvo da toxicidade de muitos xenobióticos. Este recebe cerca de 25% do sangue bombeado pelo coração e é o principal órgão de excreção de xenobióticos, o que faz com que esteja exposto a uma grande quantidade dos compostos que entram em circulação (Wu *et al.*, 2009). No túbulo renal proximal acontece a concentração do filtrado glomerular através da reabsorção de algumas moléculas essenciais, fator que

confere uma suscetibilidade acrescida para sofrer lesões causadas por fármacos e drogas que sejam normalmente excretadas pelos rins. Assim, as células tubulares proximais são particularmente sensíveis aos efeitos destas moléculas nocivas, tornando importante o estudo da toxicidade dos mesmos.

Estudos anteriores demonstraram que as anfetaminas induzem nefrotoxicidade. Carvalho *et al.* (2002), num estudo realizado em culturas primárias de células renais, demonstrou que apesar da MDMA não apresentar toxicidade direta para as células renais, os seus metabolitos apresentam. Através da conjugação com a glutatona reduzida (GSH), ao invés de ocorrer destoxificação, ocorre um aumento da toxicidade dos metabolitos, como a α -metildopamina (α -MeDA), *in vitro*. Dada a semelhança estrutural entre as anfetaminas e as catinonas sintéticas (β -ceto anfetaminas) pode ser extrapolada a existência de toxicidade a nível renal para estas novas drogas (Carvalho *et al.*, 2002).

No estudo realizado no âmbito desta dissertação de mestrado foi traçado o perfil de citotoxicidade para cinco catinonas sintéticas comumente consumidas, nomeadamente a metilona, a MDPV, a 3,4-DMMC, a pentedrona e a 4-MEC. A 4-MEC foi umas das drogas selecionadas para o estudo pois apresenta uma estrutura similar à droga mais popular do grupo das catinonas sintéticas, a mefedrona (Gil *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que todas as β -ceto-anfetaminas testadas induziram morte celular no modelo *in vitro* de uma forma dependente da concentração e do tempo de exposição.

De todos os compostos testados, a 3,4-DMMC ($EC_{50(48h)} = 1,251$ mM) foi o derivado da catinona que exibiu maior toxicidade para as células HK-2, seguida da MDPV ($EC_{50(48h)} = 2,676$ mM), da pentedrona ($EC_{50(48h)} = 3,949$ mM) e da metilona ($EC_{50(48h)} = 4,154$ mM), sendo a 4-MEC a menos tóxica das substâncias testadas ($EC_{50(48h)} = 5,675$ mM).

O diferente potencial tóxico pode estar relacionado com as características estruturais das drogas. Por exemplo, a MDPV apresenta características mais lipofílicas do que a metilona dada a presença do anel pirrolidina e um grupo amina terciário, que pode justificar a sua maior toxicidade. O facto de ser um composto mais lipofílico permite-lhe atravessar mais facilmente a membrana celular e desta forma exercer a sua toxicidade no interior da célula (Coppola e Mondola, 2012). No que concerne a 3,4-DMMC, ainda não existe informação

suficiente que relacione as suas características estruturais e farmacocinéticas com a elevada toxicidade exibida por este derivado da catinona.

Embora não existam estudos publicados na literatura sobre a nefrotoxicidade dos derivados sintéticos da catinona, o seu potencial hepatotóxico e neurotóxico foi já demonstrado em alguns estudos (Hill e Thomas, 2011; Luethi *et al.*, 2017; Valente *et al.*, 2016a; Valente *et al.*, 2016b; Valente *et al.*, 2017b; Watterson e Olive, 2014). Foram realizados recentemente dois estudos onde se usaram culturas de células dopaminérgicas SH-SY5Y para avaliar o potencial neurotóxico *in vitro* promovido pela metilona e pela MDPV (Valente *et al.*, 2017b; Valente *et al.*, 2017a). Verificou-se que ambos os derivados induzem morte neuronal de forma dependente da concentração, com aumento da produção intracelular de espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS). Os autores avançaram com a hipótese de que após a metabolização da MDPV e da metilona podem ser formados catecóis que ao serem oxidados formam orto-quinonas reativas que entram no ciclo redox. Este mecanismo encontra-se implicado na formação de espécies reativas por parte das drogas referidas anteriormente.

Outros mecanismos neurotóxicos observados nesses estudos foram a depleção da GSH e a disfunção mitocondrial, caracterizada pela despolarização da membrana mitocondrial e depleção de adenosina trifosfato (ATP). A indução de morte celular por apoptose foi também um mecanismo comum a estas duas catinonas, observando-se a ativação de mecanismos intrínsecos (ativação da caspase-9) e extrínsecos (ativação da caspase-8), formação de núcleos picnóticos e condensação de cromatina (Valente *et al.*, 2017b).

Segundo Valente *et al.* (2017) tanto a metilona como a MDPV induzem alterações morfológicas concordantes com ativação autofágica em neurónios dopaminérgicos, com formação de autofagossomas e ativação de marcadores de autofagia, tais como a formação de organelos vesiculares acídicos e aumento da expressão da proteína LC3-II, de uma forma dependente da concentração e do tempo de exposição. A autofagia surge como um efeito primário da neurodegeneração induzida pelas β -ceto-anfetaminas, verificando-se a ativação dos marcadores autofágicos antes da indução de morte celular ou da ativação de caspase-3. Foi ainda demonstrado que o agente antioxidante *N*-acetil-L-cisteína detém efeitos neuroprotectores, levando a uma reversão completa da formação de espécies reativas de oxigénio e azoto e uma diminuição parcial de atividade autofágica e apoptótica

induzidas pela metilona e pela MDPV. Este resultado evidencia a importância do stress oxidativo na regulação dos mecanismos de morte celular programada incitados pelas drogas de abuso em estudo (Valente *et al.*, 2017a).

Os estudos mecanísticos realizados em culturas primárias de hepatócitos de rato suportam a capacidade dos derivados sintéticos da catinona para induzirem hepatotoxicidade *in vitro* através do aumento do stress oxidativo, da perturbação das funções mitocondriais, redução do ATP intracelular e da indução de morte celular por apoptose. A MDPV e a pentedrona foram os compostos com maior potencial hepatotóxico, enquanto a metilona exibiu um menor potencial hepatotóxico (Valente *et al.*, 2016a).

Um dos efeitos agudos inerentes ao abuso de β -ceto-anfetaminas é a hipertermia. Os resultados obtidos no estudo de (Valente *et al.*, 2016b) mostraram que o aumento da temperatura por si só interfere com o estado redox intracelular, observando-se também o agravamento de todos os efeitos hepatotóxicos da MDPV em condições hipertérmicas, caracterizado pelo aumento da produção de ROS/RNS, depleção de glutathiona e ATP, e aumento dos níveis de cálcio intracelular. A morte celular por apoptose foi precipitada pelo aumento da temperatura de incubação, com um aumento da prevalência de necrose celular a concentrações mais elevadas de MDPV (Valente *et al.*, 2016b).

Apesar dos resultados apresentados nestes artigos demonstrarem a indução de stress oxidativo e disfunção mitocondrial em ambos os órgãos-alvo (fígado e cérebro), os mecanismos subjacentes à citotoxicidade observada nas células HK-2 não foram ainda avaliados e serão certamente explorados em estudos futuros.

III. CONCLUSÕES

As catinonas sintéticas constituem uma das classes de drogas recreativas sintéticas mais vendidas, apesar do seu estatuto ilegal em vários países. Estas drogas foram inicialmente vendidas como sendo uma alternativa “legal” às drogas ilícitas clássicas, como por exemplo a ecstasy. As informações disponíveis acerca da segurança, propriedades farmacológicas e toxicológicas, interações e advertências de consumo destas drogas são atualmente ainda muito limitadas. Os efeitos adversos incluem agitação severa, hipertensão, taquicardia, hipertermia, paranóia e psicose aguda, bem como danos em vários órgãos, tais como cérebro, fígado, rins, coração e tecido muscular. No entanto, os mecanismos subjacentes à toxicidade nos órgãos-alvo ainda não foram totalmente compreendidos.

Neste estudo foi efetuada uma avaliação da citotoxicidade de cinco catinonas sintéticas que são frequentemente consumidas usando como modelo *in vitro* a linha celular HK-2. Assim, o trabalho experimental realizado para elaborar a presente dissertação permitiu concluir que:

- a exposição às catinonas sintéticas promove nefrotoxicidade nas células renais humanas HK-2, de uma forma dependente da concentração e do tempo de exposição;
- a 3,4-DMMC revelou ser o derivado da catinona com maior toxicidade para as células HK-2, seguida da MDPV, pentedrona, metilona e, por último, 4- MEC.

Embora este estudo tenha demonstrado pela primeira vez que as catinonas sintéticas induzem nefrotoxicidade, é necessário a realização de mais estudos para elucidar os possíveis mecanismos subjacentes à nefrotoxicidade destas novas drogas recreativas.

IV. BIBLIOGRAFIA

- Abbott, R. e Smith, D. E. (2015). The New Designer Drug Wave: A Clinical, Toxicological, and Legal Analysis. *J Psychoactive Drugs*, 47, pp. 368-71.
- Arunotayanun, W. e Gibbons, S. (2012). Natural product 'legal highs'. *The Royal Society of Chemistry*, 29, pp. 1304–1316.
- Baumann, M. H.; Partilla, J. S. e Lehner, K. R. (2013a). Psychoactive "bath salts": not so soothing. *Eur J Pharmacol*, 698, pp. 1-5.
- Baumann, M. H.; Partilla, J. S.; Lehner, K. R., *et al.* (2013b). Powerful cocaine-like actions of 3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV), a principal constituent of psychoactive 'bath salts' products. *Neuropsychopharmacology*, 38, pp. 552-62.
- Borek, H. A. e Holstege, C. P. (2012). Hyperthermia and multiorgan failure after abuse of "bath salts" containing 3,4-methylenedioxypropylvalerone. *Ann Emerg Med*, 60, pp. 103-5.
- Brandt, S. D.; Wootton, R. C.; De Paoli, G., *et al.* (2010). The naphyrone story: The alpha or beta-naphthyl isomer? *Drug Test Anal*, 2, pp. 496-502.
- Brenneisen, R.; Geissshusler, S. e Schorno, X. (1986). Metabolism of cathinone to (-)-norephedrine and (-)-norpseudoephedrine. *J Pharm Pharmacol*, 38, pp. 298-300.
- Cameron, K. N.; Kolanos, R.; Solis, E., Jr., *et al.* (2013). Bath salts components mephedrone and methylenedioxypropylvalerone (MDPV) act synergistically at the human dopamine transporter. *Br J Pharmacol*, 168, pp. 1750-7.
- Carvalho, M.; Carmo, H.; Costa, V. M., *et al.* (2012). Toxicity of amphetamines: an update. *Arch Toxicol*, 86, pp. 1167-231.
- Carvalho, M.; Hawksworth, G.; Milhazes, N., *et al.* (2002). Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an *in vitro* study using rat and human renal proximal tubular cells. *Arch Toxicol*, 76, pp. 581-8.
- Chavant, F.; Boucher, A.; Le Boisselier, R., *et al.* (2015). New synthetic drugs in addictovigilance. *Therapie*, 70, pp. 167-89.
- Coppola, M. e 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". *Toxicol Lett*, 211, pp. 144-9.

- Cozzi, N. V.; Sievert, M. K.; Shulgin, A. T., *et al.* (1999). Inhibition of plasma membrane monoamine transporters by beta-ketoamphetamines. *Eur J Pharmacol*, 381, pp. 63-9.
- Dargan, P. I.; Sedefov, R.; Gallegos, A., *et al.* (2011). The pharmacology and toxicology of the synthetic cathinone mephedrone (4-methylmethcathinone). *Drug Test Anal*, 3, pp. 454-63.
- De Felice, L. J.; Glennon, R. A. e Negus, S. S. (2014). Synthetic cathinones: chemical phylogeny, physiology, and neuropharmacology. *Life Sci*, 97, pp. 20-6.
- Emcdda (2011). *EMCDDA Annual Report 2011: the state of drugs problem in Europe*. Luxembourg, Publications Office of the European Union.
- Emcdda (2017). *Relatório Europeu sobre drogas: Tendências e Evoluções*. Luxemburgo, Serviço das Publicações da União Europeia,.
- Feyissa, A. M. e Kelly, J. P. (2008). A review of the neuropharmacological properties of khat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32, pp. 1147-66.
- Gil, D.; Adamowicz, P.; Skulska, A., *et al.* (2013). Analysis of 4-MEC in biological and non-biological material--three case reports. *Forensic Sci Int*, 228, pp. e11-5.
- Gregg, R. A. e Rawls, S. M. (2014). Behavioral pharmacology of designer cathinones: a review of the preclinical literature. *Life Sci*, 97, pp. 27-30.
- Guantai, A. N. e Maitai, C. K. (1983). Metabolism of cathinone to d-norpseudoephedrine in humans. *J Pharm Sci*, 72, pp. 1217-8.
- Hill, S. L. e Thomas, S. H. (2011). Clinical toxicology of newer recreational drugs. *Clin Toxicol (Phila)*, 49, pp. 705-19.
- Huang, J. X.; Kaeslin, G.; Ranall, M. V., *et al.* (2015). Evaluation of biomarkers for *in vitro* prediction of drug-induced nephrotoxicity: comparison of HK-2, immortalized human proximal tubule epithelial, and primary cultures of human proximal tubular cells. *Pharmacol Res Perspect*, 3, pp. e00148.
- James, D.; Adams, R. D.; Spears, R., *et al.* (2011). Clinical characteristics of mephedrone toxicity reported to the U.K. National Poisons Information Service. *Emerg Med J*, 28, pp. 686-9.
- Kalix, P. (1996). *Catha edulis*, a plant that has amphetamine effects. *Pharm World Sci*, 18, pp. 69-73.

- Kamata, H. T.; Shima, N.; Zaitso, K., *et al.* (2006). Metabolism of the recently encountered designer drug, methylone, in humans and rats. *Xenobiotica*, 36, pp. 709-23.
- Karila, L.; Megarbane, B.; Cottencin, O., *et al.* (2015). Synthetic cathinones: a new public health problem. *Curr Neuropharmacol*, 13, pp. 12-20.
- Karila, L.; Petit, A.; Cottencin, O., *et al.* (2012). [Synthetic drugs: the new low-cost landscape of drugs]. *Rev Prat*, 62, pp. 664-6.
- Karila, L. e Reynaud, M. (2011). GHB and synthetic cathinones: clinical effects and potential consequences. *Drug Test Anal*, 3, pp. 552-9.
- Katz, D. P.; Bhattacharya, D.; Bhattacharya, S., *et al.* (2014). Synthetic cathinones: "a khat and mouse game". *Toxicol Lett*, 229, pp. 349-56.
- Kelly, J. P. (2011). Cathinone derivatives: a review of their chemistry, pharmacology and toxicology. *Drug Test Anal*, 3, pp. 439-53.
- Kersten, B. P. e Mclaughlin, M. E. (2015). Toxicology and management of novel psychoactive drugs. *J Pharm Pract*, 28, pp. 50-65.
- Kriikku, P.; Wilhelm, L.; Schwarz, O., *et al.* (2011). New designer drug of abuse: 3,4-Methylenedioxypropylone (MDPV). Findings from apprehended drivers in Finland. *Forensic Sci Int*, 210, pp. 195-200.
- Lopez-Arnau, R.; Martinez-Clemente, J.; Carbo, M., *et al.* (2013). An integrated pharmacokinetic and pharmacodynamic study of a new drug of abuse, methylone, a synthetic cathinone sold as "bath salts". *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 45, pp. 64-72.
- Lopez-Arnau, R.; Martinez-Clemente, J.; Pubill, D., *et al.* (2012). Comparative neuropharmacology of three psychostimulant cathinone derivatives: butylone, mephedrone and methylone. *Br J Pharmacol*, 167, pp. 407-20.
- Luethi, D.; Liechti, M. E. e Krahenbuhl, S. (2017). Mechanisms of hepatocellular toxicity associated with new psychoactive synthetic cathinones. *Toxicology*, 387, pp. 57-66.
- Manghi, R. A.; Broers, B.; Khan, R., *et al.* (2009). Khat use: lifestyle or addiction? *J Psychoactive Drugs*, 41, pp. 1-10.
- Mathys, K. e Brenneisen, R. (1992). Determination of (S)-(-)-cathinone and its metabolites (R,S)-(-)-norephedrine and (R,R)-(-)-norpseudoephedrine in urine by

- high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Chromatogr*, 593, pp. 79-85.
- Meyer, M. R.; Wilhelm, J.; Peters, F. T., *et al.* (2010). Beta-keto amphetamines: studies on the metabolism of the designer drug mephedrone and toxicological detection of mephedrone, butylone, and methylone in urine using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 397, pp. 1225-33.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, pp. 55-63.
- Nencini, P.; Amiconi, G.; Befani, O., *et al.* (1984). Possible involvement of amine oxidase inhibition in the sympathetic activation induced by khat (*Catha edulis*) chewing in humans. *J Ethnopharmacol*, 11, pp. 79-86.
- Paillet-Loilier, M.; Cesbron, A.; Le Boisselier, R., *et al.* (2014). Emerging drugs of abuse: current perspectives on substituted cathinones. *Subst Abuse Rehabil*, 5, pp. 37-52.
- Pedersen, A. J.; Petersen, T. H. e Linnet, K. (2013). In vitro metabolism and pharmacokinetic studies on methylone. *Drug Metab Dispos*, 41, pp. 1247-55.
- Prosser, J. M. e Nelson, L. S. (2012). The toxicology of bath salts: a review of synthetic cathinones. *J Med Toxicol*, 8, pp. 33-42.
- Qi, W.; Johnson, D. W.; Vesey, D. A., *et al.* (2007). Isolation, propagation and characterization of primary tubule cell culture from human kidney. *Nephrology (Carlton)*, 12, pp. 155-9.
- Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L., *et al.* (2013). Assay Guidance Manual. In: Riss, T. L. e Minor, L. (eds.) *Cell Viability Assays*. pp. 2-5.
- Ryan, M. J.; Johnson, G.; Kirk, J., *et al.* (1994). HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int*, 45, pp. 48-57.
- Sauer, C.; Peters, F. T.; Haas, C., *et al.* (2009). New designer drug alpha-pyrrolidinovalerophenone (PVP): studies on its metabolism and toxicological detection in rat urine using gas chromatographic/mass spectrometric techniques. *J Mass Spectrom*, 44, pp. 952-64.
- Schifano, F.; Albanese, A.; Fergus, S., *et al.* (2011). Mephedrone (4-methylmethcathinone; 'meow meow'): chemical, pharmacological and clinical issues. *Psychopharmacology (Berl)*, 214, pp. 593-602.

- Scholze, M.; Boedeker, W.; Faust, M., *et al.* (2001). A general best-fit method for concentration-response curves and the estimation of low-effect concentrations. *Environ Toxicol Chem*, 20, pp. 448-57.
- Simmler, L. D.; Buser, T. A.; Donzelli, M., *et al.* (2013). Pharmacological characterization of designer cathinones *in vitro*. *Br J Pharmacol*, 168, pp. 458-70.
- Sogawa, C.; Sogawa, N.; Ohyama, K., *et al.* (2011). Methylone and monoamine transporters: correlation with toxicity. *Curr Neuropharmacol*, 9, pp. 58-62.
- Spiller, H. A.; Ryan, M. L.; Weston, R. G., *et al.* (2011). Clinical experience with and analytical confirmation of "bath salts" and "legal highs" (synthetic cathinones) in the United States. *Clin Toxicol (Phila)*, 49, pp. 499-505.
- Stone, V.; Johnston, H. e Schins, R. P. (2009). Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Crit Rev Toxicol*, 39, pp. 613-26.
- Sung, M. J.; Kim, D. H.; Jung, Y. J., *et al.* (2008). Genistein protects the kidney from cisplatin-induced injury. *Kidney Int*, 74, pp. 1538-47.
- Tarloff, J. B. e Lash, L. H. (2005). Toxicology of the kidney. *Target organ toxicology series*. 3rd ed. Boca Raton, Fla., CRC Press pp. 182-183; 191-194.
- Toennes, S. W.; Harder, S.; Schramm, M., *et al.* (2003). Pharmacokinetics of cathinone, cathine and norephedrine after the chewing of khat leaves. *Br J Clin Pharmacol*, 56, pp. 125-30.
- Toennes, S. W. e Kauert, G. F. (2002). Excretion and detection of cathinone, cathine, and phenylpropanolamine in urine after khat chewing. *Clin Chem*, 48, pp. 1715-9.
- Valente, M. J.; Amaral, C.; Correia-Da-Silva, G., *et al.* (2017a). Methylone and MDPV activate autophagy in human dopaminergic SH-SY5Y cells: a new insight into the context of beta-keto amphetamines-related neurotoxicity. *Arch Toxicol*, pp.
- Valente, M. J.; Araujo, A. M.; Bastos Mde, L., *et al.* (2016a). Editor's Highlight: Characterization of Hepatotoxicity Mechanisms Triggered by Designer Cathinone Drugs (beta-Keto Amphetamines). *Toxicol Sci*, 153, pp. 89-102.
- Valente, M. J.; Araujo, A. M.; Silva, R., *et al.* (2016b). 3,4-Methylenedioxypropylone (MDPV): *in vitro* mechanisms of hepatotoxicity under normothermic and hyperthermic conditions. *Arch Toxicol*, 90, pp. 1959-73.
- Valente, M. J.; Bastos, M. L.; Fernandes, E., *et al.* (2017b). Neurotoxicity of beta-Keto Amphetamines: Deathly Mechanisms Elicited by Methylone and MDPV in Human Dopaminergic SH-SY5Y Cells. *ACS Chem Neurosci*, 8, pp. 850-859.

- Valente, M. J.; Guedes De Pinho, P.; De Lourdes Bastos, M., *et al.* (2014). Khat and synthetic cathinones: a review. *Arch Toxicol*, 88, pp. 15-45.
- Valente, M. J.; Henrique, R.; Costa, V. L., *et al.* (2011). A rapid and simple procedure for the establishment of human normal and cancer renal primary cell cultures from surgical specimens. *PLoS One*, 6, pp. e19337.
- Warrick, B. J.; Wilson, J.; Hedge, M., *et al.* (2012). Lethal serotonin syndrome after methylone and butylone ingestion. *J Med Toxicol*, 8, pp. 65-8.
- Watterson, L. R. e Olive, M. F. (2014). Synthetic cathinones and their rewarding and reinforcing effects in rodents. *Adv Neurosci (Hindawi)*, 2014, pp. 209875.
- Wilkes, S. (2008). The use of bupropion SR in cigarette smoking cessation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 3, pp. 45-53.
- Wu, Y.; Connors, D.; Barber, L., *et al.* (2009). Multiplexed assay panel of cytotoxicity in HK-2 cells for detection of renal proximal tubule injury potential of compounds. *Toxicol In Vitro*, 23, pp. 1170-8.
- Young, R. e Glennon, R. A. (1993). Cocaine-stimulus generalization to two new designer drugs: methcathinone and 4-methylaminorex. *Pharmacol Biochem Behav*, 45, pp. 229-31.
- Zager, R. A. e Iwata, M. (1997). Inorganic fluoride. Divergent effects on human proximal tubular cell viability. *Am J Pathol*, 150, pp. 735-45.
- Zaitso, K.; Katagi, M.; Kamata, H. T., *et al.* (2009). Determination of the metabolites of the new designer drugs bk-MBDB and bk-MDEA in human urine. *Forensic Sci Int*, 188, pp. 131-9.

V. ANEXOS

- Decreto Lei nº 54/2013 de 17 de Abril.
- Portaria nº 154/2013 de 17 de Abril.