

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ANÁLISE QUÍMICA E TOXICOLÓGICA DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES E
COMPOSTOS EMAGRECEDORES CONTENDO *p*-SINEFRINA ASSOCIADA A
EFEDRINA, SALICINA E CAFEÍNA**

GABRIELA CRISTINA SCHMITT

Porto Alegre, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ANÁLISE QUÍMICA E TOXICOLÓGICA DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES E
COMPOSTOS EMAGRECEDORES CONTENDO *p*-SINEFRINA ASSOCIADA A
EFEDRINA, SALICINA E CAFEÍNA**

Tese apresentada por **Gabriela Cristina Schmitt**,
como requisito para obtenção do Título de
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr. Renata Pereira Limberger

Co-orientadora: Prof^a. Dr. Mirna Bainy Leal

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, avaliada pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Profa. Dr. Miriam Anders Apel
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dr. Rosane Gomez
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Sérgio Augusto de Loreto Bordignon
Centro Universitário La Salle (UNILASALLE)

CIP - Catalogação na Publicação

Schmitt, Gabriela Cristina
Análise química e toxicológica de suplementos alimentares e compostos emagrecedores contendo p-sinefrina associada a efedrina, salicina e cafeína / Gabriela Cristina Schmitt. -- 2012.
177 f.

Orientadora: Renata Pereira Limberger.
Coorientadora: Mirna Bainy Leal.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Compostos emagrecedores. 2. p-sinefrina. 3. efedrina. 4. salicina. 5. cafeína. I. Limberger, Renata Pereira, orient. II. Leal, Mirna Bainy, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof^a. Dr. Renata Pereira Limberger e co-orientação da Prof^a. Dr. Mirna Bainy Leal, nos laboratórios de Toxicologia da Faculdade de Farmácia e de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O trabalho também conta com a colaboração da Prof^a. Dr. Solange Cristina Garcia, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e da Dr. Eliane Dallegrave, do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. Gabriela Cristina Schmitt recebeu bolsa de doutorado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico este trabalho aos meus pais Amauri e Luci.

E também a Patrícia, Júnior, Eduarda, Valentina, Andréa e Durval.

Obrigada por serem essa família maravilhosa, por estarem sempre ao meu lado,

por todo amor, carinho, compreensão, incentivo, renúncias,

e, sobretudo, pelo apoio incondicional aos meus sonhos.

Sem vocês não teria chegado até aqui.

Amo muito vocês!

*"...Para achar água é preciso
descer terra adentro,
encharcar-se no lodo.
Mas há os que preferem
olhar os céus
e esperar pelas chuvas..."*

Oduvaldo Vianna Filho

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr. Renata Pereira Limberger pelo acolhimento, apoio, amizade, incentivo e dedicação. Agradeço principalmente pelas oportunidades de aprendizado e por sua contribuição a minha formação científica.

À Prof^ª. Dr. Mirna Bainy Leal pela co-orientação, amizade, apoio, dedicação e ensinamentos.

À Prof^ª. Dr. Eliane Dallegrave pela amizade, apoio, dedicação, incentivo, ensinamentos e por toda contribuição para realização de parte desse trabalho.

Aos queridos amigos e colegas de laboratório: Eloisa, Maíra, Ana Laura, Rose, Paulinha, Rachel, Fernando, Madinho, Carol, Guilherme, Kris, Priscila, Otávio, Vitória, Juliano, Adri W., Dani, Daiane, Ana Stela, Dona Bia, Lu Rossato, Vivi, Marcelo, Débi, Valeska, André, Gilcéia, Julinho, Charline, Adri Santos, Ângela, Natália, Mariele, Marília, Sabrina, Bruna, Rafael, Fernanda, Elisa, Gabi G. e Profa Solange: agradeço a todos pelo apoio, incentivo, colaboração e aprendizado que me proporcionaram. Obrigada pelos momentos de descontração, amizade, carinho, conselhos, sorrisos, abraços e compreensão, que foram fundamentais em tantos momentos.

A Luciane Andrea, minha grande amiga de tantas e todas as horas, obrigada pelo carinho, compreensão, pelo constante incentivo, apoio e paciência.

Aos grandes amigos do peito Marcelo, Rachel, Fran, Marguet, Fernando e Madson e turma do “Xurras” Mana, Lisa, Beti, Susi, Débi, Bina, Beta, Lê e Glau: obrigada pela amizade, carinho, apoio, incentivo, força, atenção, conselhos, paciência abraços, beijos, sorrisos, e compreensão das minhas ausências.

À Ana Laura, Rose, Andréia e a Érica pela dedicação, disponibilidade, esforço, apoio e responsabilidade em tantos momentos durante a execução do trabalho: vocês foram fundamentais.

À toda minha família: pais, irmãs, sobrinhas, cunhados, tios, tias, primos. Agradeço pelo apoio incondicional e pelo constante incentivo.

Ao Programa da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Este espaço também é dedicado àqueles que, mesmo não citados nominalmente, de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho. A todos, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
RESUMO	IXVII
ABSTRACT	XIX
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
3. REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1. Obesidade e perda de peso	11
3.2. Suplementos alimentares e compostos emagrecedores.....	12
3.3. Generalidades sobre <i>p</i> -sinefrina, efedrina, cafeína e salicina	14
3.3.1 <i>Citrus aurantium</i> e <i>p</i> -sinefrina	14
3.3.2 Efedrina	19
3.3.3 Cafeína	20
3.3.4 Salicina	22
3.4. Toxicidade de <i>p</i> -sinefrina, efedrina, cafeína e salicina e suas associações	23
4. MANUSCRITO I	29
5. MANUSCRITO II	53
6. MANUSCRITO III	79
7. MANUSCRITO IV	103
8. DISCUSSÃO GERAL.....	129
9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	135
10. REFERÊNCIAS.....	139
11. ANEXO	153

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estruturas químicas da *o*-sinefrina, *m*-sinefrina, *p*-sinefrina e efedrina **16**
- Figura 2.** Estruturas químicas de compostos com semelhança estrutural: adrenalina, noradrenalina, anfetamina, *p*-sinefrina, fenilpropanolamina e efedrina.. **17**
- Figura 3.** Biossíntese da sinefrina..... **18**
- Figura 4.**Estrutura química da cafeína..... **20**
- Figura 5.** Estrutura química da salicina..... **22**

LISTA DE ABREVIATURAS

AT	Amina traço
ATFA	Anidrido trifluoroacético
CG/DIC	Cromatografia a gás acoplada a detector de ionização em chama
CG/EM	Cromatografia a gás acoplada a detector de massas
DL ₅₀	Dose Letal para 50% da População
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
GSH	Glutathiona Reduzida
GPx	Glutathiona Peroxidase
MDA	Malonildialdeído

RESUMO

Os suplementos alimentares e compostos emagrecedores a base de extratos vegetais têm uso muito difundido e indiscriminado, principalmente pela diversidade de produtos disponíveis e facilidade de acesso aos mesmos, aliada à falsa crença popular de que “o que é natural não faz mal”. Produtos contendo a associação de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína são amplamente consumidos pela população. Entretanto, a efetividade e, sobretudo, a segurança da associação dessas substâncias ainda não é conhecida, visto que estudos sobre o sinergismo farmacológico e toxicológico dessa associação ainda são praticamente inexistentes. Logo, o objetivo deste trabalho foi elucidar o perfil toxicológico agudo e subcrônico, incluindo avaliação do estresse oxidativo e de alterações fisiológicas, bem como o desenvolvimento de metodologias que permitam analisar e quantificar o teor dessas substâncias nos produtos comerciais. Para avaliação da toxicidade aguda, doses de 300, 350 e 400 mg/kg da associação de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína (10:4:6:80) foram testadas via oral em camundongos machos e fêmeas. Foi possível observar redução da atividade locomotora, ptose (em todas as doses em ambos os sexos), convulsões (350 mg/kg em fêmeas e 400 mg/kg em machos e fêmeas), além de salivação, agitação, piloereção em fêmeas, bem como mortes em machos (350 e 400 mg/kg) oriunda de hemorragia cardiopulmonar. Redução na atividade locomotora foi confirmada através do teste de atividade locomotora espontânea em machos que mostrou diminuição significativa ($p < 0,01$) em todos os grupos tratados, sendo o mesmo resultado observado quando do teste de temperatura corporal, havendo decréscimo da mesma em todas as doses testadas. O teste de rota-rod mostrou ocorrência de neurotoxicidade em machos tratados com 400 mg/kg. A DL_{50} da mistura foi estimada entre 350 e 400 mg/kg. No teste de avaliação da toxicidade subcrônica, ratos machos e fêmeas foram tratados por via oral com a mesma mistura por 28 dias consecutivos nas doses de 50, 75, 100 e 150 mg/kg. Avaliações hematológicas, bioquímicas e de marcadores de estresse oxidativo foram realizadas, observando-se ocorrência de peroxidação lipídica e de dano hepático e renal em ratos machos (100 e 150 mg/kg), além de diminuição da GSH em todos os machos tratados. Nas fêmeas não houve indicação de estresse oxidativo, mas sim, ocorrência de alterações hepáticas não conclusivas. O diferente perfil de toxicidade apresentado por machos e fêmeas sugere influência hormonal sobre os efeitos

fármaco-toxicológicos da mistura. Os resultados obtidos mostraram que a associação de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína, nas doses testadas, apresenta considerável perfil de toxicidade, tanto agudo quanto subcrônico, indicando a necessidade de testes toxicológicos mais detalhados para total elucidação dos efeitos, incluindo avaliações relacionadas à influência da presença de estrogênio, avaliações que permitam períodos mais longos de exposição e avaliação de outros marcadores de estresse oxidativo, visto o grande número de acidentes toxicológicos relatados após utilização de suplementos alimentares e compostos emagrecedores cujas formulações frequentemente contém essa associação de substâncias. Com base no desenvolvimento da metodologia de análise, a extração em fase sólida com cartuchos de troca iônica SCX, seguida de extração líquido-líquido com clorofórmio, subsequente reação de derivatização com anidrido trifluoroacético e posterior análise em CG/DIC (e GC/EM para confirmação) pode ser considerada uma alternativa promissora para analisar simultaneamente sinefrina, efedrina e cafeína em suplementos alimentares e compostos emagrecedores. O método por CG/DIC foi validado pela definição da faixa de linearidade para as substâncias (50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 ug/mL para octopamina efedrina e *p*-sinefrina e 250, 500, 1000, 2500, 5000 e 10000 ug/mL para cafeína), limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, seletividade, especificidade e robustez. O método de análise desenvolvida pode ser utilizado no controle de qualidade de produtos, para identificar e quantificar estas substâncias em uma ampla variedade de matrizes.

Palavras-chave: *p*-sinefrina, efedrina, salicina, cafeína, compostos emagrecedores, avaliação toxicológica.

ABSTRACT

Dietary supplements and weight loss compounds plant-based are indiscriminate and widespread use, mainly for the diversity of products available and easy access to them, coupled with the false popular belief that “what is natural does not hurt”. Products containing *p*-synephrine associated to ephedrine, salicin and caffeine are largely consumed. However, the effectiveness and safety of this mixture is still unknown, since studies about pharmacological and toxicological synergism are still nonexistent. Therefore, the aim of this study was evaluate the acute and subchronic toxicological profile, including assessment of oxidative stress physiological alterations, as well as the development of methodologies to analyze and quantify these substances in commercial products. To acute toxicological evaluation, 300, 350 and 400 mg/kg doses of association of *p*-synephrine, ephedrine, salicin and caffeine (10:4:6:80 w/w) were tested by oral gavage in male and female mice and was possible to observed a reduction in locomotor activity and ptose (in all treated groups for both male and female mice), seizures (350 mg/kg in female and 400 mg/kg in male and female), besides salivation, agitation and piloerection in female. Deaths occurred in male (350 and 400 mg/kg) and necropsy showed cardiopulmonary hemorrhage. The decrease in locomotor activity was confirmed throught the spontaneous locomotor activity, in which the number of crossings significantly decreased ($p < 0.01$) in all treated groups, being the similar result obtained in body temperature evaluation, reducing in the all same doses. The rotarod test showed neurotoxicity in male treated with 400 mg/kg. The LD₅₀ of the mixture was estimated between 350 and 400 mg/kg. In subchronic toxicity evaluation, male and female rats were treated by oral gavage with the mixture for 28 consecutive days at doses of 50, 75, 100 and 150 mg/kg. Hematological, biochemical and oxidative stress biomarkers were performed and showed lipid peroxidation, and hepatic and renal damages in male rats (100 and 150 mg/kg) and reduction in GSH levels and all treated male groups. In females, there were no indications of oxidative stress, but were observed not conclusive hepatic enzyme changes. The different toxicity profile displayed by male and female rats suggests hormonal influence in mixture effects. All the results obtained showed that the association of *p*-synephrine, ephedrine, salicin and caffeine in tested doses has considerable toxicity both acute and subchronic profiles, indicating the need of more detailed investigations for elucidate all the

effects, including assessments related to protector role of estrogen, and more long-term studies of exposure, besides evaluations of more oxidative biomarkers, since the large number of toxicological report cases related to these products whose formulations usually contain these substances' combination. On the basis of analytical methodology development, the SPE with SCX stationary phases followed by liquid-liquid extraction with chloroform and subsequent derivatization with anhydride trifluoroacetic and GC/FID (and GC/MS confirmation) analysis can be considered a promising alternative to analyze simultaneously synephrine, ephedrine and caffeine in supplements and weight loss products. The GC/FID method was validated by defining the linearity (50, 100, 200, 500, 1000 and 2000 µg/mL to ephedrine, octopamine and *p*-synephrine and 250, 500, 1000, 2500, 5000 and 10000 µg/mL to caffeine), limit of detection, limit of quantification, precision, accuracy, selectivity, specificity and robustness. The analysis method developed can be used in quality control to identify and quantificate these substances in a wide range of matrices.

Keywords: *p*-synephrine, ephedrine, salicin, caffeine, weight loss products, toxicological evaluation.

1. INTRODUÇÃO

O uso exponencial e indiscriminado de suplementos alimentares e compostos emagrecedores a base de *p*-sinefrina associada à efedrina, salicina e cafeína representa uma grande problemática à população e aos órgãos regulatórios nacionais e internacionais, uma vez que o incremento e disseminação de produtos no mercado são mais céleres do que o desenvolvimento de estudos científicos que comprovem e garantam sua eficácia e segurança de uso (SCHMITT *et al.*, 2012).

A obesidade, que se constitui em um grave problema de saúde pública, aliada ao culto social à magreza, gera uma busca desenfreada por formulações que contenham substâncias ditas emagrecedoras. Com isso, a população passa a fazer uso de produtos contendo substâncias e/ou associação de substâncias que não possuem nenhum respaldo científico no que tange a segurança e eficácia. E nesse contexto, destacam-se os suplementos alimentares e compostos emagrecedores a base de extratos vegetais, cuja utilização é sustentada na falsa premissa popular de que “o que é natural não faz mal”.

Dentre os produtos à base de plantas empregados para emagrecimento e tratamento da obesidade, destacaram-se aqueles contendo efedrina (Ma Huang, *Ephedra* sp.). Entretanto, em abril de 2004, o *Food and Drug Administration* (FDA) proibiu a venda de suplementos alimentares contendo alcaloides da efedra nos Estados Unidos (BENT *et al.*, 2004), devido à associação do seu uso com problemas cardíacos, psiquiátricos, derrames cerebrais e hipertensão (HALLER e BENOWITZ, 2000; SAMENUK *et al.*, 2002; FUGH-BERMAN e MYERS, 2004; BOUCHARD *et al.*, 2005).

A efedrina é uma amina simpatomimética de uso muito difundido em suplementos dietéticos e compostos emagrecedores. Após ser associada a diversos episódios de reações adversas, foi sendo progressivamente substituída por substâncias como a *p*-sinefrina (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004, BOUCHARD *et al.*, 2005), cuja principal fonte são os frutos imaturos de *Citrus aurantium* L. utilizado na forma de extrato seco padronizado. Apesar de fabricantes de produtos emagrecedores afirmarem que esta substância é livre de efeitos adversos como os observados para efedrina, vários relatos na literatura associaram a utilização de *p*-sinefrina e/ou extratos enriquecidos de *C. aurantium* com a ocorrência de alterações cardíacas, convulsões, hipertensão, tonturas, insônia, dentre outros. Entretanto,

estudos realizados por Arbo e colaboradores (2008, 2009a, 2009b) mostraram que a *p*-sinefrina e extratos de *C. aurantium* apresentaram baixa toxicidade, mesmo quando testados em altas doses. Não foram observadas a ocorrência de mortes, danos cardíacos, hepáticos ou renais nos animais submetidos a testes de toxicidade aguda e subcrônica, levando a crer que os relatos de toxicidade que se tinham até então poderiam estar relacionados ao uso simultâneo de *C. aurantium/p*-sinefrina com outras substâncias de caráter estimulante que, quando utilizadas concomitantemente, podem potencializar suas ações, tanto em termos de estimulação quanto de efeitos adversos. Dentre elas, destacam-se a salicina, a cafeína e a própria efedrina, principalmente na forma de extrato seco padronizado de suas fontes naturais, que são encontrados em uma vasta gama de produtos disponibilizados no mercado (BREUM *et al.*, 1994; HALLER *et al.*, 2002). Em estudo recente realizado nos Estados Unidos, aproximadamente 75% dos consumidores de suplementos alimentares admitiu usar produtos contendo *C. aurantium/p*-sinefrina associada a outros estimulantes como cafeína, guaraná, noz-de-cola, chá-verde, teofilina e teobromina (BLANCK *et al.*, 2007).

Nesse contexto, considerando-se a facilidade de acesso e a diversidade de suplementos alimentares e compostos vegetais emagrecedores disponíveis, aliada a escassez de dados conclusivos na literatura a respeito de sua eficácia e segurança torna justificável o estudo do perfil toxicológico agudo e subcrônico da associação de *p*-sinefrina com efedrina, salicina e cafeína, bem como a validação de metodologia que permita análise e quantificação simultânea do teor destas substâncias nos produtos. O tema proposto é de suma importância pelo seu valor contributivo ao meio científico e a saúde da população, fornecendo maior embasamento e subsídios que ajudem a promover o uso racional e mais seguro desses produtos de uso tão difundido, comercializados em farmácias de manipulação, drogarias, sites de venda livre na internet e até mesmo em supermercados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar a avaliação toxicológica *in vivo* da mistura de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína, além de estabelecer e validar metodologia analítica para determinação e quantificação simultânea dessas substâncias em suplementos alimentares e compostos emagrecedores por cromatografia a gás com detector de ionização de chamas (CG/DIC) e confirmação com detector de massas (CG/EM).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade aguda da associação de padrões de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína em camundongos
- Determinar os efeitos dos padrões de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína associados sobre a atividade locomotora de camundongos através do teste de neurotoxicidade por desempenho no rota-rod e avaliação da atividade locomotora espontânea.
- Avaliar a toxicidade subcrônica de padrões de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína associados em ratos, incluindo a avaliação hepática, renal e cardíaca, através da determinação sérica de transaminases (aspartato e alanina aminotransferases), creatinina e creatina quinase (CK), respectivamente, avaliação hematológica através da determinação de hemoglobina e hematócrito e avaliação dos efeitos sobre marcadores do estresse oxidativo como malonildialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH), sobre enzimas antioxidantes como glutathiona peroxidase (GPx).
- Estabelecer e validar metodologia para quantificação simultânea de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína em extratos vegetais, suplementos alimentares e compostos emagrecedores por CG/DIC e confirmação por CG/EM, incluindo a padronização de etapas de preparo das amostras como extração em fase sólida e derivatização.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Obesidade e perda de peso

A obesidade é um grave e impactante problema de saúde pública (KALMAN *et al.*, 2000). Segundo a Organização Mundial de Saúde, é uma doença crônica prevalente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, com maior ocorrência nos Estados Unidos (EUA) e Europa (WHO, 1995, 2007). Estima-se que, somente nos EUA, os custos diretos com a obesidade cheguem a US\$ 70 bilhões ou 6,8% do gasto total anual em saúde (WHO 2007). Sua prevalência vem aumentando em quase todos os países, a ponto de ser considerada, atualmente, uma epidemia mundial de grandes proporções (MOKDAD *et al.*, 1999; WHO 2009).

Este aumento, particularmente nas últimas décadas, ocorreu claramente no Brasil. Segundo o IBGE, em 2007, 8,9% dos homens e 13,1% das mulheres eram obesas e cerca de 38,8 milhões de indivíduos estavam acima do peso, correspondendo a 40,6% da população adulta do país (IBGE, 2007). Dados recentes indicam aumento no índice de adultos obesos, chegando a 13,9% da população. Um levantamento do Ministério da Saúde aponta que, entre 2006 e 2009, a proporção de pessoas com excesso de peso subiu de 42,7% para 46,6%. O percentual de obesos cresceu de 11,4% para 13,9% no mesmo período. A pesquisa mostra que 51% dos homens e 42,3% das mulheres têm excesso de peso. A ocorrência do problema está relacionada a fatores genéticos, mas há uma influência significativa do sedentarismo e de padrões alimentares inadequados. Entre os homens, a situação é mais comum a partir dos 35 anos, mas chega a 59,6% de 55-64 anos. Na população feminina, o índice mais que dobra na faixa etária dos 45 aos 54 anos (52,9%) em relação a 18-24 anos (24,9%). Já a prevalência da obesidade entre homens quase triplica do grupo etário de 18 a 24 anos (7,7%) para 55 a 64 anos (19,9%). Quando se leva em consideração somente mulheres, o índice aumenta mais de três vezes na comparação das duas faixas etárias: de 6,2% para 21,3% (BRASIL, 2006, 2009, 2010).

Estes índices, associados aos conceitos muitas vezes equivocados de culto a magreza e saúde, desencadeiam uma busca crescente por terapias alternativas que auxiliem ou promovam a perda de peso. Neste contexto, os produtos ditos naturais destacam-se na preferência da população, uma vez que podem ser facilmente adquiridos e carregam um mitológico estigma de segurança, de que substâncias

naturais podem ajudar a queimar calorias sem causar alterações e danos no organismo. Dentre as formulações comerciais de produtos para emagrecer, encontram-se os suplementos alimentares e compostos emagrecedores a base de extratos vegetais (MORO e BASILE, 2000; LINK *et al.*, 2006).

3.2 Suplementos alimentares e compostos emagrecedores

Conceitualmente os suplementos alimentares são produtos com vitaminas, minerais, plantas e substâncias derivadas de plantas, aminoácidos e concentrados metabólitos, bem como constituintes e extratos dessas substâncias, consumidos com o objetivo de melhorar a saúde e prevenir doenças (FDA, 1998). Estes produtos eram utilizados inicialmente por pessoas com atividade física intensa que não conseguiam suprir suas necessidades nutricionais somente com a alimentação e/ou como coadjuvantes para incrementar o desempenho de atletas profissionais (GARCÍA e NAVARRO, 1991).

Atualmente, seu uso está tão difundido entre a população em geral que os suplementos alimentares vêm sendo utilizados indiscriminadamente para perda de peso e ganho de massa muscular, sendo comercializados na forma de tabletes, cápsulas, pós, géis, gel cápsulas e líquidos. De acordo com a legislação vigente, não são considerados medicamentos e, por isso, podem ser adquiridos ou dispensados livremente em vários locais como academias, supermercados, farmácias, lojas especializadas no ramo e até mesmo por meio da internet (KURTZWEIL, 1998; LINCK *et al.*, 2006).

Preocupada com o crescente consumo destes produtos, o FDA divulgou, em 1998, alguns suplementos a base de plantas, associados com risco a saúde humana, destacando-se aqueles a base de efedra (Ma Huang, *Ephedra* sp.) ou efedrina, seu principal ingrediente ativo, devido à associação clínica de seu uso com severos efeitos adversos, incluindo episódios de hipertensão, dores de cabeça, problemas cardiovasculares, isquemia, danos no sistema nervoso central, problemas psiquiátricos e até morte (HALLER e BENOWITZ, 2000; SAMENUK *et al.*, 2002; FUGH-BERMAN e MYERS, 2004; BOUCHARD, 2005). Em 2004, a venda de suplementos alimentares contendo efedrina foi banida em alguns países (BENT *et*

al., 2004 GROLLMAN, 2005; HAAZ, 2006). Estima-se que nesta época, 2 milhões de adultos utilizavam diariamente produtos contendo efedra/efedrina nos EUA (BENT *et al.*, 2004).

No Brasil, o mercado de suplementos alimentares movimentou valores em torno de 500 milhões de dólares no ano de 2000 e estima-se que os números atuais sejam bem mais expressivos. As formulações a base de efedra/efedrina não são proibidas, mas tem sua venda regulamentada pela Portaria 344/1998 – Lista D1 de substâncias precursoras (BRASIL, 1998). A legislação brasileira considera a efedrina, assim como seus sais isômeros, substâncias sujeitas a controle especial. De acordo com a Portaria nº 169 de 2003 do Ministério da Justiça, as atividades de compra, venda, fabricação, transporte e armazenamento de efedrina, pura ou em misturas, a partir de qualquer quantidade ou concentração, estão sujeitas a controle pela Polícia Federal, que concede autorização para comercialização. Contudo, o comércio ilegal destes produtos é frequente devido à ausência de fiscalização. Para a legislação brasileira, somente é permitida a venda de suplementos vitamínicos e minerais com o objetivo de nutrir, como uma complementação da dieta alimentar, o que não se aplica a utilização atual destas substâncias.

A indústria de suplementos alimentares e compostos emagrecedores, que se constitui como um empreendimento multimilionário em todo mundo, desenvolveu estratégias comerciais para manutenção de sua lucratividade. Prospectou no mercado produtos reformulados e comercializados como “efedra *free*”, substituindo a efedrina por um análogo estrutural, a *p*-sinefrina ou por extratos de *Citrus aurantium*, uma de suas principais fontes naturais, prometendo a manutenção dos efeitos emagrecedores e supressores de apetite, mas sem os efeitos prejudiciais da efedrina (GROLLMAN, 2005). Seu uso em formulações emagrecedoras foi baseado em uma suposta estimulação específica de receptores β_3 adrenérgicos encontrados principalmente em adipócitos e no fígado, que quando estimulados, causam aumento na taxa metabólica e temperatura corporal a nível central, levando à aceleração do gasto calórico e queima de gordura (BRAY e RYAN, 1997). Contudo, sua efetividade na perda de peso ainda é controversa (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004; BENT *et al.*, 2004; ARBO *et al.*, 2008).

Vários suplementos alimentares e compostos emagrecedores encontrados contêm a associação de *p*-sinefrina (*C. aurantium*) com os mais diversos tipos de

substâncias. Dentre as mais frequentes estão a cafeína (*Paullinia cupana*, *Cola nitida*, *Cola acuminata*, *Camelia sinensis*), salicina (*Salix* sp.) e até mesmo a efedrina (Ma Huang, *Ephedra sinica*, *Sida cordifolia*). Mesmo que a efedrina tenha sido proibida ou restringida em vários países (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004), continua sendo encontrada em alguns produtos através de acréscimo não declarado e adulterações, para melhorar a eficiência dos produtos.

A composição das formulações de suplementos alimentares e compostos emagrecedores disponíveis para comercialização é bem variável e complexa. Diversas substâncias são associadas a fim de tornar os produtos mais eficazes e com melhor desempenho. É comum encontrarmos formulações que incluem também fármacos e outros produtos com finalidades terapêuticas diversas, tais como diuréticos, laxantes, digitálicos, antidepressivos, calmantes, estimulantes do hormônio da tireóide e redutores de apetite. A possibilidade de variação nas associações permite que a indústria disponibilize uma maior diversidade de produtos no mercado, na tentativa de melhor se adequar as diferentes necessidades dos consumidores, bem como possibilita o aumento de lucratividade.

3.3 Aspectos relevantes sobre *p*-sinefrina, efedrina, cafeína e salicina

3.3.1 *Citrus aurantium* e *p*-sinefrina

Citrus aurantium L. (Rutaceae) é conhecida popularmente como laranja-amarga, laranja-azedada, laranja-cavalo e laranja-de-Sevilha, e na medicina tradicional chinesa, seus frutos imaturos são conhecidos como “zhi shi” e utilizados como estimulante da função gastrointestinal e tônico geral (BOUCHARD *et al.*, 2005). Na região do mediterrâneo, os frutos de *C. aurantium* são utilizados desde os tempos medievais como estimulante cardíaco e vascular, digestivo, estomáquico, sedativo, tranquilizante, colagogo, estimulante do apetite, tônico em geral, além de antídoto contra venenos (ARIAS e RAMÓN-LACA, 2005). O óleo essencial obtido das cascas de frutos de *C. aurantium* já teve suas propriedades ansiolíticas demonstradas anteriormente por Carvalho-Freitas e Costa (2002) e Pultrini e

colaboradores (2006), sendo empregada para curar ou aliviar insônia, tratar nervosismo, ansiedade e histeria.

Atualmente, o interesse pelos frutos verdes de *C. aurantium* tem crescido devido ao seu uso em produtos emagrecedores de origem vegetal. Seu fruto seco imaturo contém aproximadamente 10% de flavonóides e inúmeras feniletilaminas, que incluem metiltiramina, octopamina e, sobretudo, *p*-sinefrina (HAAZ *et al.*, 2006).

A sinefrina é uma amina quiral presente na natureza apenas na forma (*R*)-(-)-*p*-sinefrina (ou *l*-sinefrina) (ARAI *et al.*, 1997). Os seus enantiômeros possuem atividades farmacológicas distintas nos receptores adrenérgicos. A forma isomérica *R*-(-)- apresenta uma atividade cerca de duas vezes maior do que o isômero *S*-(+)- (PELLATI *et al.*, 2005). Devido ao seu interesse farmacológico, também é comercializada na forma racêmica como fármaco sintético, sob o nome de oxedrina (HAAZ *et al.*, 2006), com atividades vasoconstritora e relaxante da musculatura brônquica (KUSU *et al.*, 1996; MATTOLI *et al.*, 2005). Tem sido usada como descongestionante nasal e na forma de colírio (REYNOLDS, 1993). Há relatos da atividade antidepressiva da *p*-sinefrina em modelos animais (SONG *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 2001).

Do ponto de vista estrutural, dependendo da posição do substituinte –OH, são possíveis três isômeros de posição para sinefrina: *orto*, *meta* e *para* (Figura 1) (PENZAK *et al.*, 2001; PELLATI *et al.*, 2005). Quimicamente, *p*-sinefrina é muito similar a outras aminas simpatomiméticas como a efedrina. Apenas duas características químicas as distinguem: um dos carbonos do anel é hidroxilado (OH substitui H) e um dos grupos metila (CH₃) da cadeia lateral é substituído por hidrogênio (H) (Figura 1).

A literatura é divergente em relação aos isômeros posicionais presentes no *C. aurantium*. Alguns autores afirmam que nos frutos apenas a *p*-sinefrina está presente (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004; ARBO *et al.*, 2008); enquanto outros atestam a concomitante ou exclusiva presença de *m*-sinefrina (PENZAK *et al.*, 2001; GREENWAY *et al.*, 2006). Quanto a *o*-sinefrina, sua existência na natureza ainda não foi relatada, resultando apenas de síntese química e não é utilizada na perda de peso (SANTANA *et al.*, 2008).

Embora a literatura científica atual não apresente um consenso sobre a ocorrência da *m*-sinefrina nos frutos de *C. aurantium*, alguns suplementos alimentares contém este isômero (PENZAK *et al.*, 2001; BENT *et al.*, 2004; ALLISON *et al.*, 2005; HAAZ *et al.*, 2006; GREENWAY *et al.*, 2006), advindo de fonte natural ou sintética. Considerando que a *m*-sinefrina é mais potente do que a *p*-sinefrina na estimulação adrenérgica, não se descarta a possibilidade de adulteração dos produtos ditos naturais com este isômero visando efeitos mais significativos (ALLISON *et al.*, 2005; SANTANA *et al.*, 2008).

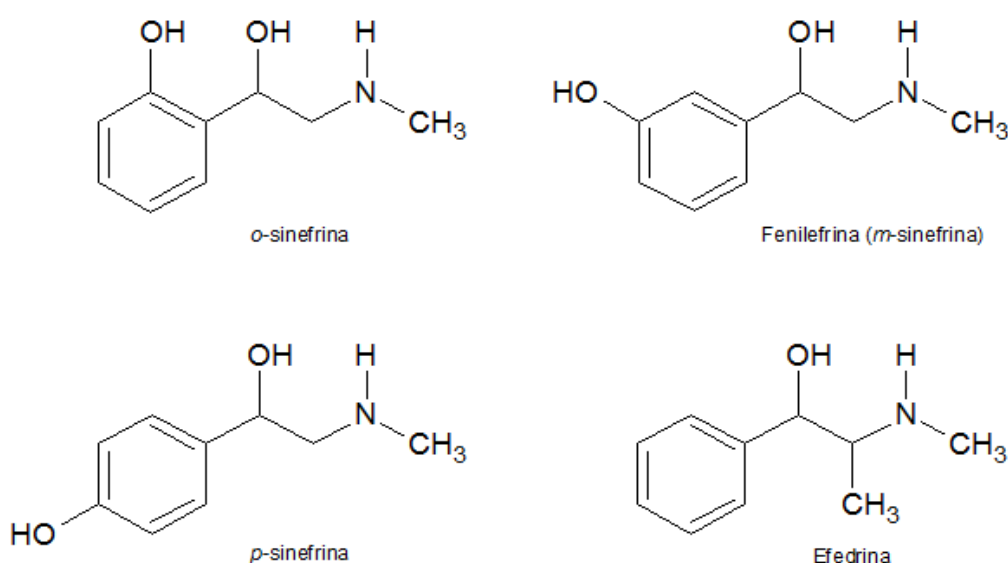


Figura 1. Estruturas químicas dos isômeros posicionais da sinefrina (orto, meta e para) e da efedrina.

A sinefrina é uma amina de estrutura química similar a outros agonistas adrenérgicos como adrenalina, noradrenalina, anfetamina, fenilpropanolamina e efedrina (Figura 1 e 2). Estes compostos têm em comum um anel aromático com uma cadeia lateral etilamina substituída. A hidroxilação do anel, somente em uma posição, sugere que não sejam degradadas pela catecol-o-metiltransferase, o que permitiria uma maior duração de ação (BOUCHARD *et al.*, 2005). As substituições no anel aromático, no carbono β e no grupo amínico da cadeia lateral permitem que a sinefrina seja um potente agonista α e β adrenérgico. Ao mesmo tempo, a introdução de grupos hidroxila no carbono β e no anel aromático diminui a sua capacidade de penetração no SNC, uma vez que aumentam a polaridade da

molécula. A hidroxilação na posição 4 do anel aromático determina uma menor atividade adrenérgica da *p*-sinefrina se comparada ao isômero *meta* substituído (BROWN *et al.*, 1988; STRADER *et al.*, 1989).

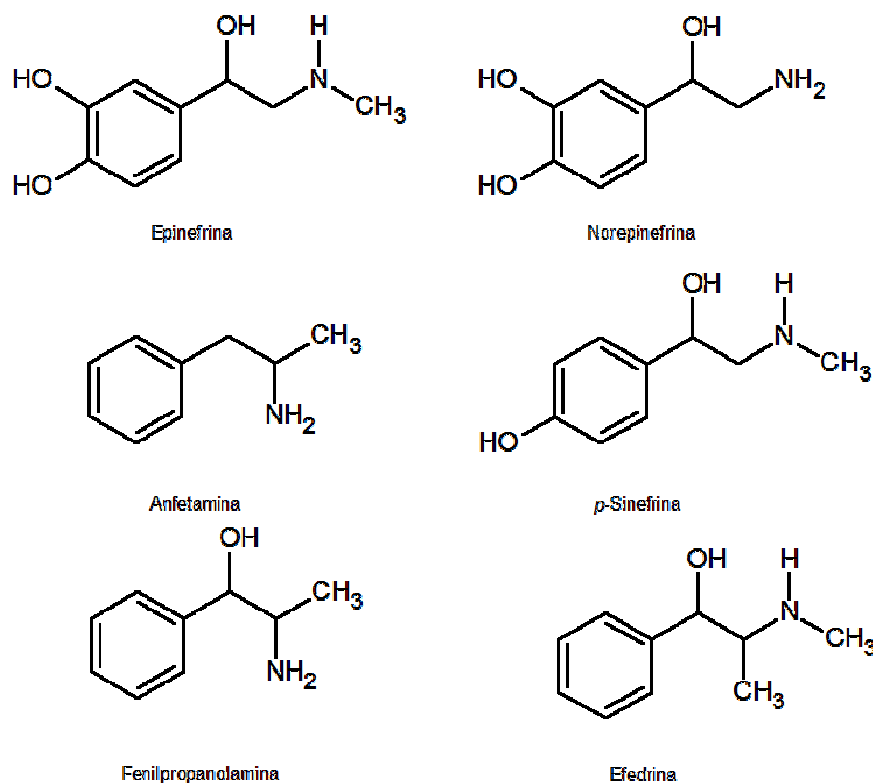


Figura 2. Estruturas químicas de compostos com semelhança estrutural: adrenalina, noradrenalina, anfetamina, *p*-sinefrina, fenilpropanolamina e efedrina.

Em relação à síntese da sinefrina (Figura 3), endogenamente ocorre após a descarboxilação da tirosina em tiramina, que, por sua vez, é convertida em N-metiltiramina e posteriormente em sinefrina (PELLATI e BENVENUTI, 2007). Nos animais, a biossíntese envolve a conversão da tiramina, formada a partir da descarboxilação da tirosina, em octopamina, catalisada pela dopamina β -hidroxilase (D β H). O produto desta reação é posteriormente transformado em sinefrina pela feniletanolamina N-metil transferase (PNMT) (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004).

Assim como a octopamina, sua precursora biológica, a sinefrina, é considerada uma amina traço (AT) ou elusiva devido ao fato de ser uma substância

que ocorre fisiologicamente em humanos, encontrada em pequenas concentrações no sistema nervoso central (0,1-10 nM) (ZUCCHI *et al.*, 2006). Por muito tempo, o papel fisiológico dessas aminas permaneceu desconhecido, sobretudo pela falta de métodos analíticos para sua detecção em amostras biológicas e pela incapacidade em demonstrar a existência de receptores específicos para as mesmas (D'ANDREA *et al.*, 2004), mas sabe-se que as AT são neuromoduladores fisiológicos, com efeitos simpatomiméticos indiretos (GRANDY *et al.*, 2007). Mais recentemente, elas vêm recebendo grande atenção da comunidade científica devido aos efeitos semelhantes aos de anfetaminas (BAUD *et al.*, 1985; LINDEMANN e HORNER, 2005).

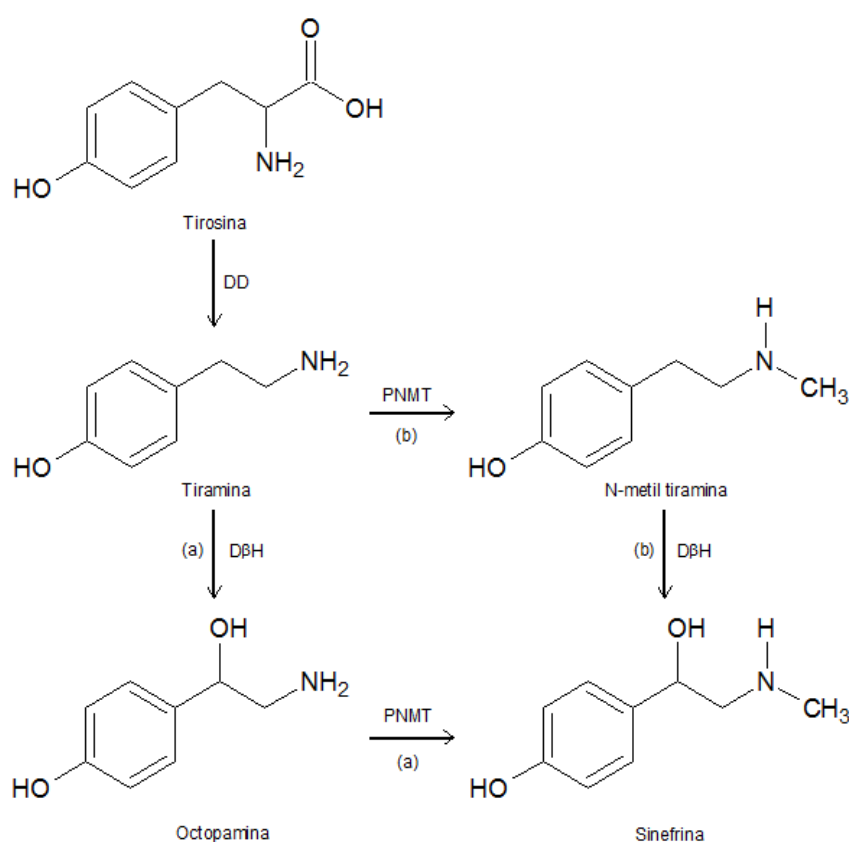


Figura 3. Biossíntese da Sinefrina. As vias sinalizadas por (a) ocorrem apenas nos animais, enquanto que as sinalizadas por (b) são as vias preferenciais de síntese nos vegetais. (DD= dopa descarboxilase; DβH= dopamina β-hidroxilase; PNMT= feniletanolamina-N-metiltransferase). Adaptado de PELLATI e BENVENUTI, 2007.

Análises enantioseletivas confirmaram que os frutos de *C. aurantium* contêm apenas o isômero R(-). Porém, observa-se que a (-)-sinefrina pode sofrer isomerização óptica a (+)-sinefrina quando submetida a procedimentos extrativos

com temperaturas elevadas ou períodos de aquecimento prolongado, bem como longos períodos de refluxo (PELLATI e BENVENUTI, 2007). Kusu e colaboradores (1996), ao analisarem a urina de voluntários após a ingestão de suco de *Citrus unshiu* observaram que 20 a 50% da (-)-sinefrina ingerida foi excretada na sua forma conjugada e cerca de 10% na forma de (+)-sinefrina conjugada. Com isso, levantou-se a hipótese ainda não comprovada de que, *in vivo*, a sinefrina pode sofrer interconversão do isômero (-) à forma (+).

3.3.2 Efedrina

A efedrina (Figuras 1 e 2) é uma amina simpatomimética, agonista de receptores α e β adrenérgicos, com efeitos sobre o sistema cardiovascular e SNC (ROTHMAN *et al.*, 2003; SCHANEBERG *et al.*, 2003), além de levar ao aumento dos níveis séricos de noradrenalina através de sua liberação das terminações nervosas periféricas para o líquido extracelular (ROTHMAN *et al.*, 2003). Quimicamente, é uma feniletilamina, sendo denominada (1R,2S)-2-metilamino-1-fenilpropan-1-ol, e faz parte de um grupo de aminas de ação estimulante central e periférica, assim como o êxtase (3,4 metilenodioximetanfetamina – MDMA), metanfetamina e outras anfetaminas (FREY *et al.*, 2006).

A efedrina é o principal alcaloide encontrado em plantas do gênero *Ephedra* (Ephedraceae), também conhecidas por Ma Huang, as quais podem ser localizadas em zonas subtropicais da Ásia, Europa e Américas (WHO, 1999; SONI *et al.*, 2004). Estas plantas caracterizam-se pela presença de alcaloides derivados da fenilalanina, sendo principalmente encontrados (+)-pseudoefedrina (+)-metilpseudoefedrina, (+)-norpseudoefedrina, (-)-norefedrina, (-)-metilefedrina e (-)-efedrina, sendo este último presente em maiores quantidades (SCHANEBERG *et al.*, 2003; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006). Estão presentes em diversas especialidades farmacêuticas utilizadas no tratamento de doenças respiratórias como asma, resfriado e congestão nasal, devido a sua ação descongestionante e broncodilatadora e também hipertensora (MARTINDALE, 2005). São componentes de várias formulações utilizadas para perda de peso e ganho de massa muscular (TSENG *et al.*, 2006), normalmente na forma de extrato de efedra padronizado em efedrina.

Sua vasta utilização nos suplementos está ligada ao mecanismo pelo qual a efedrina exerce ação termogênica que, por sua vez, está relacionado à estimulação dos receptores β -adrenérgicos nos adipócitos e também no músculo esquelético (GREENWAY, 2001). Ela também estimula a liberação de noradrenalina, que ativa a enzima adenilato ciclase, aumentando os níveis de AMP_c. Sendo assim, há ativação da lipase hormônio-sensível e liberação de ácidos graxos a partir do tecido adiposo. (GOODMAN *et al.*, 2001).

3.3.3 Cafeína

A cafeína (Figura 4) é um derivado metilado de bases purínicas pertencente ao grupo das metilxantinas, onde se incluem também a teobromina e a teofilina. Este pseudoalcaloide é estruturalmente identificado como 3,7-diidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona, mas também pode ser denominado 1,3,7-trimetilxantina (MARTINDALE, 2005). Essa substância está presente na natureza em mais de 60 espécies vegetais em todo o mundo e pode ser encontrada nas sementes de café (*Coffea* sp.), nas folhas de chá-verde (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), no cacau (*Theobroma cacao* L.), no guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), na erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.- Hilaire) e na cola (*Cola nitida* (Vent) Schott & Endl., *Cola acuminata* (P. Beauv.) Schott & Endl.) (SILVA NETO e SOARES, 2006).

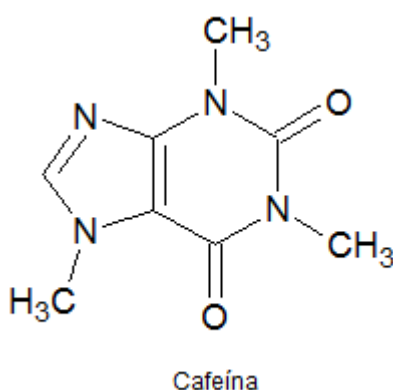


Figura 4: Estrutura química da cafeína

A cafeína possui como mecanismos de ação bem estabelecidos a nível celular: a mobilização de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, a inibição da enzima fosfodiesterase, a ação na bomba de sódio e potássio e o antagonismo aos receptores de adenosina, sendo esse último o mais importante, uma vez que é responsável por diversas respostas no organismo (NEHLIG *et al.*, 1992; BRAGA e ALVES, 2000).

No SNC a adenosina age como redutor da frequência cardíaca, da pressão arterial e da temperatura corporal. Esses efeitos depressores ocorrem porque a adenosina promove a inibição da liberação de noradrenalina (GOODMAN *et al.*, 2001). Antagonizando esses efeitos, a cafeína promove estimulação dos sistemas envolvidos, aumentando tanto a liberação de noradrenalina como a taxa de ativação espontânea dos neurônios noradrenérgicos (NEHLIG *et al.*, 1992; SILVA NETO e SOARES, 2006). Além disso, observa-se a estimulação cardíaca, aumento da pressão arterial por vasoconstrição cerebral e redução da mobilidade intestinal, produzindo um clássico estado de estimulação simpática (NEHLIG *et al.*, 1992; SILVA NETO e SOARES, 2006). Também provoca à inibição pré-sináptica da liberação de dopamina, levando ao aumento de seus níveis quando do consumo crônico (SILVA NETO e SOARES, 2006).

A cafeína age também no aumento da secreção da enzima lipase, uma lipoproteína que mobiliza os depósitos de gordura para utilizá-los como fonte de energia em substituição ao glicogênio muscular, tornando o corpo mais resistente à fadiga (GREENWAY, 2001). Ainda, estimula lipólise induzida por noradrenalina e mostrou inibir a lipase pancreática em ratos (GREENWAY, 2001). Outro mecanismo de ação é inibição da enzima fosfodiesterase, que é responsável pela degradação do mediador químico intracelular, denominado adenosina monofosfato cíclico (AMP_c), convertendo-o em adenosina (GOODMAN *et al.*, 2001). Dessa forma ela aumenta o tempo de meia-vida do AMP_c (aumento nos níveis de AMP_c intracelular) levando a um aumento da lipólise (TARNOPOLSKY *et al.*, 1989; BRAGA e ALVES, 2000).

Estudos experimentais e epidemiológicos sugerem que a cafeína pode facilitar a perda e a manutenção do peso corpóreo pelo aumento da termogênese, oxidação de gordura e lipólise (COFFEY *et al.*, 2004; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2006). Porém, os mecanismos pelo qual ela induz esses efeitos ainda não estão bem

esclarecidos. Achenson e colaboradores (2004) sugerem que ela pode estimular a termogênese pelo aumento do *turnover* lipídico. Esse efeito na mobilização lipídica poderia ser interpretado de dois modos:

- Cafeína estimula a atividade do SNS, aumentando a liberação de catecolaminas e conseqüentemente a oxidação lipídica;
- Cafeína age pela inibição do AMP_c, que em altas concentrações nos tecidos ativa a lipase hormônio sensível, promovendo lipólise.

Logo, ela tem sido utilizada em várias formulações destinadas ao emagrecimento, sobretudo por acreditar-se que a mesma melhora os efeitos de outras substâncias simpatomiméticas, como a efedrina (HALLER *et al.*, 2004).

3.3.4 Salicina

A salicina (Figura 5) é um glicosídeo fenólico com propriedades analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias. É extraído da casca do salgueiro branco (White willow bark), casca seca, inteira ou fragmentada, de ramificações jovens de *Salix alba* L. e outras espécies do gênero *Salix* (Salicaceae) incluindo *S. purpurea* L. e *S. fragilis* L. A droga vegetal contém no mínimo 1,5% do total de derivados salicílicos, expresso como salicina (C₁₃H₁₈O₇; MM 286,3) (PARFITT, 1999). A salicina é usualmente obtida fazendo-se um extrato aquoso da casca de espécies de *Salix* (MERCK, 1996).

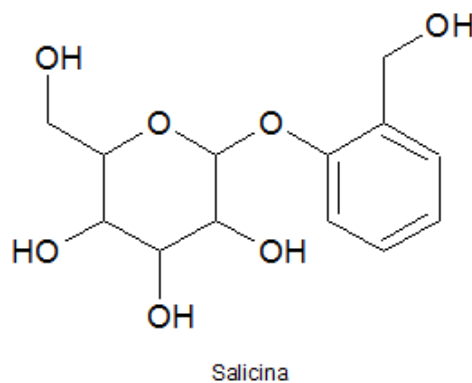


Figura 5. Estrutura química da salicina

Depois da ingestão oral, a salicina é hidrolisada no fígado a álcool salicílico, o qual é oxidado a ácido salicílico, principal produto de biotransformação (SCHMID *et al.*, 2001). Em reações de fase II, o ácido salicílico é convertido a ácido salicilúrico e ácido gentísico, os quais são excretados na urina, na forma de glicuronídeos. Estima-se que 71% da salicina absorvida é eliminada na forma de ácido salicilúrico, seguido de ácido salicílico (15%) e ácido gentísico (14%) (SCHMID *et al.*, 2001).

Apesar de ser amplamente difundido o uso de salicilatos em formulações emagrecedoras e termogênicas, praticamente não há respaldo científico que justifique seu emprego em tais formulações. Acredita-se que a salicina ajude a potencializar o efeito das outras substâncias de forma sinérgica, prolongando o tempo de ação da efedrina, sinefrina e cafeína, para reforçar a sua eficácia como agentes de perda de peso. Literaturas não científicas apresentam a salicina como sendo um ingrediente de “reforço” para a termogênese, ajudando a impulsionar o efeito de outros ingredientes de modo sinérgico e que promoveria aumento do calor corporal, levando a um prolongamento do tempo de ação da efedrina ou de outras substâncias termogênicas presentes nas associações. Apenas os trabalhos de Dulloo e Miller (1987) e Horton e Geissler (1991) foram encontrados relacionando a especialidade farmacêutica Aspirina[®], que pertence a mesma família de salicilatos que a salicina, ao aumento da indução de termogênese de substâncias como a efedrina, mas sem relacionar nenhum mecanismo de ação específico.

3.4. Toxicidade de *p*-sinefrina, efedrina, cafeína e salicina e suas associações

Os compostos anfetamínicos promovem a indução da liberação de serotonina e de noradrenalina, adrenalina e dopamina, bem como inibição da recaptção dos mesmos (RANG *et al.*, 2001, SULZER *et al.*, 2005). Estes neurotransmissores ativam os respectivos receptores, resultando, dentre outros efeitos, numa exacerbação da estimulação simpática. Além disso, as anfetaminas promovem alterações nos centros de saciedade por um mecanismo mediado pelo hipotálamo lateral, promovendo um efeito anoréxico, além de estarem associadas ao desenvolvimento de tolerância e dependência (GOODMAN *et al.* É sabido que, em altos níveis ou em administrações repetidas, são capazes de produzir efeitos

neurotóxicos como depleção de dopamina endógena de seus depósitos neuronais e aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais parecem contribuir com o dano nos terminais de dopamina (FREY *et al.*, 2006). Com isto, tem sido admitido que as anfetaminas podem aumentar a formação de ERO por estimularem as funções basais da mitocôndria, fonte primária de ATP celular, através da cadeia de transporte de elétrons (BROWN e YAMAMOTO, 2003).

A sinefrina possui estrutura química e comportamento farmacológico semelhante à efedrina e anfetaminas (ROSSATO *et al.*, 2011). Portanto, é possível que também leve ao aumento de ERO e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo, condição na qual a produção de substâncias oxidantes excede a capacidade antioxidante do organismo, ocupando papel de destaque na patogênese de várias doenças (HALLIWEL, 1993; LEICHTWEIS e JI, 2001). De fato, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a sinefrina induz ao aumento da atividade mitocondrial, podendo levar a um aumento na produção de ERO (AZAMBUJA, 2007; LARENTIS, 2007).

Os suplementos alimentares e compostos emagrecedores contendo efedrina foram associados a ocorrência de infarto agudo do miocárdio, arritmia cardíaca, hipertensão grave, hepatite, convulsões e acidente vascular cerebral (JOSEFSON, 1996; AULT, 1997; HALLER e BENEWITZ, 2000; SAMENUK *et al.*, 2002; MORGENSTERN *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2008).

A toxicidade da efedrina é manifestada por superestimulação do sistema adrenérgico e efeitos no sistema cardiovascular e incluem cefaleia, ansiedade, insônia, agitação, tonturas, náuseas, vômitos, sudorese, sede, palpitações, fraqueza muscular e tremores, psicose, e crises convulsivas, além de risco aumentado de rabdomiólise (PENTEL, 1984; REYNOLDS, 1993; ZAHN *et al.*, 1999). A administração tópica como descongestionante nasal pode causar efeito rebote e taquifilaxia em poucos dias de uso, e a administração parenteral pode resultar em alucinações, delírios e euforia (REYNOLDS, 1996). Também pode predispor acidente vascular cerebral tanto hemorrágico quanto isquêmico (SONG *et al.*, 2008).

A exemplo do que ocorre com a efedrina, os efeitos adversos mais frequentemente associados ao uso de produtos a base de sinefrina/*Citrus aurantium* são os que afetam o sistema cardiovascular, devido aos efeitos adrenérgicos. Geralmente pessoas que estão acima do peso são mais propensas ao consumo

desses produtos do que a população com índice de massa corpórea considerado como normal, e é também mais vulnerável aos efeitos adversos, principalmente devido à ocorrência de comorbidades associadas à obesidade. Além disso, vários usuários são consumidores crônicos destes produtos (BLANCK *et al.*, 2007) e o fazem sem nenhum acompanhamento médico e/ou em doses exageradas e muito variáveis.

O efeito da ingestão de cafeína sobre o sistema cardiovascular ainda é motivo de grande controvérsia. Seu consumo regular parece elevar a pressão arterial de forma persistente (JAMES, 2004; DE MARIA e MOREIRA, 2007). A utilização excessiva pode resultar em sérios problemas e, em casos raros, morte (BRODERICK e BENJAMIN, 2004; KERRIGAN e LINDSEY, 2005). Em humanos, a ingestão de doses entre 200 e 300 mg produz melhora da concentração e aumento de energia (GARRETT e GRIFFITHS, 1997). Alguns autores afirmaram que um consumo superior a 400 mg por dia pode levar ao chamado “cafeinismo”, cujos sintomas mais comuns são ansiedade, inquietação, irritabilidade, tremores, perda de apetite, tensão muscular e palpitações no coração (FINNEGAN, 2003). Contudo, essa dose não é consensual. Segundo Silva Neto e Soares (2006), a mesma seria de 500 mg e incluiria sintomas como insônia, rubor facial, contração muscular, dor abdominal, tensão, pensamento e fala acelerados e desorganizados e, algumas vezes, exacerbação de uma ansiedade preexistente ou de estados de pânico, depressão ou esquizofrenia. Portanto, sendo um estimulante do SNC, é necessário ter cautela na associação da cafeína com outros estimulantes centrais, como os anfetamínicos, para não induzir efeito excessivo (RABELLO *et al.*, 2000).

Estudos e relatos de caso têm demonstrado que preparações comerciais contendo extratos enriquecidos de *Citrus aurantium* e/ou sinefrina provocam ou estão associadas a aumento de pressão arterial (HALLER *et al.*, 2005; BUI *et al.*, 2006), angina variante (GANGE *et al.*, 2006), infarto do miocárdio em paciente sem histórico de doença cardíaca (NYKAMP *et al.*, 2004), assim como há relato da ocorrência de isquemia cerebral após uso diário (por curto período de tempo) de produto livre de efedrina e contendo sienfrina (BOUCHARD *et al.*, 2005). Em ratos, foi observada uma redução no consumo de alimento e aumento da mortalidade nos grupos tratados com extrato de *C. aurantium*, além de alterações no eletrocardiograma, incluindo arritmias ventriculares (CALAPAI *et al.*, 1999).

Entretanto, em estudos conduzidos por Arbo e colaboradores (2008; 2009a; 2009b) tanto extratos de *C. aurantium* quanto a *p*-sinefrina apresentaram baixa toxicidade, mesmo quando testados em altas doses. Os efeitos observados evidenciaram uma toxicidade aguda transitória, pois persistiram apenas por 3 a 4 h e foram atribuídos à estimulação adrenérgica (ARBO *et al.*, 2008). Ensaio de toxicidade sub-crônica (28 dias) avaliaram vários biomarcadores e, de uma forma geral, não evidenciaram toxicidade. Não foram observadas mortes, danos cardíacos, hepáticos ou renais nem alterações uterinas nos animais submetidos a testes de toxicidade aguda (ARBO *et al.*, 2008), sub-crônica (ARBO *et al.*, 2009b) ou de atividade (anti)estrogênica (ARBO *et al.*, 2009a).

Além disso, Rossato e colaboradores (2010) investigaram a captação de *p*-sinefrina e *m*-sinefrina por cardiomiócitos isolados de ratos e observaram que os cardiomiócitos foram capazes de distinguir os dois isômeros e que somente a *m*-sinefrina produziu efeitos tóxicos potenciais, enquanto que o isômero *para* mostrou pouca ou nenhuma cardiotoxicidade *in vitro*. Esses resultados levam a crer que relatos de toxicidade que se tinham até então poderiam estar relacionados ao uso simultâneo de sinefrina/*C.aurantium* com outras substâncias de caráter estimulante, dentre as quais a cafeína, salicina e até mesmo a efedrina, substâncias essas que comumente se encontram associadas nos produtos disponibilizados no mercado.

Efeitos cardiovasculares graves levaram a *Health Canada Agency* a decretar a proibição do uso de sinefrina com intuito de perda de peso (JORDAN *et al.*, 2004). Entretanto, dos 16 casos considerados na época, apenas 1 se referia a um produto contendo apenas o extrato de *C. aurantium*. Em 7 casos, a sinefrina estava associada à cafeína e em 8 casos estava combinada com cafeína e efedrina. Dois indivíduos que ingeriram os suplementos com sinefrina, cafeína e efedrina foram a óbito após complicações cardíacas, demonstrando que essas associações podem potencializar significativamente os efeitos adversos (JORDAN *et al.*, 2004).

Essa hipótese pode ser corroborada pelos resultados de um estudo randomizado, duplo cego contra placebo em que indivíduos receberam dois tipos de suplementos para emagrecimento: um contendo apenas sinefrina e outro contendo sinefrina associada à cafeína. Enquanto que com a associação foi observado um aumento na pressão sistólica e diastólica, o mesmo não aconteceu com a sinefrina isolada. O ritmo cardíaco, porém, aumentou significativamente nos dois tratamentos

quando comparados com o grupo placebo, possivelmente devido à atividade inespecífica β -adrenérgica da sinefrina (HALLER *et al.*, 2005). Este e outros casos clínicos relatados sugerem uma potencial toxicidade cardíaca da sinefrina, em especial quando usada em associação com outros estimulantes cardíacos.

4. MANUSCRITO I:

**“Toxicological Effects of a Mixture Used in Weight Loss Products:
p-Synephrine Associated With Ephedrine, Salicin, and Caffeine”**

Aceito para publicação no International Journal of Toxicology

O presente artigo descreve a avaliação da toxicidade aguda em camundongos machos e fêmeas de *p*-sinefrina associada à efedrina, salicina e cafeína, uma mistura comumente utilizada nos produtos emagrecedores disponibilizados no mercado. A avaliação incluiu o teste de toxicidade aguda, avaliação da atividade locomotora espontânea, teste da neurotoxicidade por desempenho no rota-rod e avaliação da temperatura corporal.

Foram encontrados vários sinais característicos de toxicidade aguda, incluindo alterações na atividade motora, agitação, episódios de *jumping*, ptose, piloereção, salivação, dificuldade respiratória, lacrimejamento, espasmos musculares, convulsões e morte. Outro achado importante foi diferença de toxicidade entre gêneros, sendo os machos mais suscetíveis a ação da mistura do que as fêmeas, fato esse atribuído ao estrogênio. Também foi possível observar significativa diminuição na atividade locomotora espontânea, redução da latência de permanência no rota-rod, demonstrando perda de equilíbrio, e diminuição significativa da temperatura corporal dos animais tratados com a mistura.

Toxicological Effects of a Mixture Used in Weight Loss Products: *p*-Synephrine Associated With Ephedrine, Salicin, and Caffeine

Gabriela Cristina Schmitt¹, Marcelo Dutra Arbo¹, Andréia Louise Lorensi², Érica Santos Maciel², Carolina Lopes Krahn¹, Kristiane de Cássia Mariotti¹, Eliane Dallegrave³, Mirna Bainy Leal², and Renata Pereira Limberger¹

¹ Department of Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

² Department of Pharmacology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

³ Toxicological Information Center of Rio Grande do Sul, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Brazil

Corresponding Author:

Renata Pereira Limberger, Department of Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752/605, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil
Email address: rlrenata@yahoo.com

ABSTRACT

p-Synephrine is an adrenergic amine found in *Citrus aurantium* L. fruits and has been used for weight loss in dietary supplements. There are commercial products containing this substance associated to caffeine, salicin and ephedrine. The aim of this study was to evaluate the acute toxicity of this mixture in mice of both sexes. The significative results observed after acute oral administration to male and female mice of 300, 350 and 400 mg/kg total of *p*-synephrine, ephedrine, salicin plus caffeine in a 10:4:6:80 w/w ratio were a reduction in locomotor activity and ptosis in all treated groups for both sexes. Seizures were also observed in male (400mg/kg) and female groups (350 and 400 mg/kg). Gasping and tearing were observed in males. Salivation (400 mg/kg), agitation (350 and 400 mg/kg) and piloerection (all treated groups) were significantly observed only in females. Deaths occurred in males at 350 and 400 mg/kg treated groups and the necropsy showed cardiopulmonary hemorrhage. A reduction in locomotor activity was confirmed through the

spontaneous locomotor activity test, in which the number of crossings considerably decreased ($p < 0.01$) in all treated groups. The rota-rod test showed a decrease in motor coordination at 400 mg/kg. Body temperature decreased significantly ($p < 0.01$) in all treated groups compared to controls. The results suggested clear signs of toxicity of *p*-synephrine, ephedrine, salicin and caffeine association this toxicity augments the attentiveness on commercial products containing this mixture, given the expressive number of adverse events related to its utilization.

Keywords: *p*-synephrine, ephedrine, salicin, caffeine, weight-loss, acute toxicity

5. MANUSCRITO II:

“Biochemical and oxidative differences between male and female rats after subchronic toxicity test of a mixture used in weight loss products”

Em fase final de redação para submissão

O presente trabalho descreve a avaliação toxicológica subcrônica por 28 dias consecutivos em ratos Wistar machos e fêmeas da mistura de padrões de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína, na proporção de 10:4:6:80, mimetizando apresentações comerciais de suplementos alimentares e compostos emagrecedores.

Os resultados obtidos demonstraram que a mistura das substâncias promove, em determinadas doses, alterações hepáticas e renais e ocorrência de estresse oxidativo em machos. Contudo, as fêmeas apresentaram diferente perfil de toxicidade, não havendo indícios de dano hepático, renal nem tampouco de estresse oxidativo, sugerindo que a diferença hormonal entre os gêneros pode influenciar a ação e/ou toxicidade da mistura.

**BIOCHEMICAL AND OXIDATIVE DIFFERENCES BETWEEN MALE AND FEMALE
RATS AFTER SUBCHRONIC TOXICITY TEST OF A MIXTURE USED FOR
WEIGHT LOSS**

Gabriela Cristina Schmitt¹, Andréia Louise Lorensi², Marcelo Dutra Arbo¹, Érica Santos Maciel², Ana Laura Bemvenuti Jacques¹, Sabrina Nunes Nascimento¹, Eliane Dallegrove³, Solange Cristina Garcia¹, Mirna Bainy Leal², Renata Pereira Limberger^{1*}

¹Laboratório de Análises e Pesquisas Toxicológicas, Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752/605, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil

²Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500/202, Porto Alegre 90050-170, RS, Brazil

³Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Rua Domingos Crescêncio, 8º andar, Porto Alegre 90650-090, RS, Brazil

* Corresponding author:

E-mail address: rlnata@yahoo.com (Prof. Dr. Renata Pereira Limberger)

Tel.: +55 51 3308-5297; fax: +55 51 3308-5437.

ABSTRACT

The safety of products being marketed for weight loss containing associations of multiple ingredients, including *p*-synephrine, ephedrine, salicin, and caffeine are controversy and there is no study about their toxicity on the scientific literature. This association in dietary supplements and weight loss products is very frequently and common used worldwide, although ephedrine has been prohibited in many countries. Previous toxicological studies found acute toxicity of this mixture in male and female mice indicating the need of more studies regarding this subject. The aim of this study was to evaluate the subchronic toxicity profile of *p*-synephrine, ephedrine, salicin and caffeine association. Male and female Wistar rats (n=8 per group per sex) were treated for 28 consecutive days by oral gavage with water (control) or 50, 75, 100 and 150 mg/kg of the association of *p*-synephrine, ephedrine, salicin and caffeine (proportion of 10:4:6:80, m respectively). Daily, body weight was measured and animals were observed for signs of toxicity, morbidity and mortality. At the end of the period, animals were sacrificed and necropsied. Blood were collected for hematological, biochemical and oxidative stress evaluation, including hematocrit, hemoglobin, ALT, AST, creatinine, MDA, GSH, GPx. The results were analyzed by ANOVA/Bonferroni. Repeated-dose oral subchronic toxicity study showed no clinical signs of toxicity, neither weight alterations nor deaths occurred as well as any significative alterations in hematological parameters both in male and female rats. Biochemical and oxidative stress biomarkers performed showed lipid peroxidation, and hepatic and renal damages ($p<0.05$) in male rats (100 and 150 mg/kg) and reduction ($p<0.05$) in GSH levels and all treated male groups. In females, there were no indications of oxidative stress, neither biochemical alteration. The different toxicity profile displayed by male and female rats suggests hormonal influence in mixture effects. Results demonstrated that the association of *p*-synephrine with ephedrine, salicin and caffeine can alter the oxidative status and promote renal and hepatic damages. More long-term studies should be made to elucidate the role of hormones on toxicological effects presented by the weight-loss association. The use of products containing the questioned association should be used with caution until the total understanding of the toxicological profile.

Keywords: *p*-synephrine, ephedrine, salicin, caffeine, subchronic toxicity, oxidative stress

6. MANUSCRITO III:

“GC/FID simultaneously analysis of ephedrine, octopamine, *p*-synephrine and caffeine in weight loss products”

Em fase final de redação para submissão

O presente trabalho descreve a otimização e validação de um método analítico por CG/DIC para determinação e quantificação simultânea de *p*-sinefrina, efedrina, octopamina e cafeína e confirmação por CG/EM.

O método proposto foi desenvolvido e validado com sucesso e se mostrou simples, seletivo, exato e robusto. O método foi aplicado a compostos emagrecedores e suplementos alimentares comercializados e se mostrou adequado para tal finalidade, podendo ser usado no controle de qualidade para identificar e quantificar essas substâncias em uma ampla variedade de matrizes.

Não foi possível incluir a quantificação da salicina no método proposto, uma vez que a mesma não obedeceu aos parâmetros de validação preconizados pela guia adodata, sendo possível apenas sua identificação. Contudo, incluímos a determinação e quantificação de octopamina, que é uma amina precursora da *p*-sinefrina em sua biossíntese e pode ser de grande valia quando da avaliação da qualidade de produtos ditos naturais, isso é, de produtos que declaram conter extratos de *Citrus aurantium*.

**GC/FID SIMULTANEOUSLY ANALYSIS OF EPHEDRINE, OCTOPAMINE,
p-SYNEPHRINE AND CAFFEINE IN WEIGHT LOSS PRODUCTS**

**Gabriela Cristina Schmitt, Ana Laura Bemvenuti Jacques, Roselena Silvestri
Schuh, Charline Fernanda Backes, Renata Pereira Limberger***

Laboratory of Toxicology, Department of Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author:

Department of Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752/605, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil

Tel.: +55 51 3308-5297; fax: +55 51 3308-5437.

E-mail address: rlrenata@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and validate a method for identification and quantification of ephedrine, octopamine, *p*-synephrine and caffeine simultaneously in dietary supplements and weight loss products, based on GC/FID analysis, followed by confirmation with GC/MS. The use of products containing these substances associated is very frequent and there is a lack of analysis methods to guarantee the quality of products. The samples were submitted to cleanup by solid phase extraction with strong cation exchange and liquid-liquid extraction with chloroform, and then derivatized with trifluoroacetic anhydride. The extraction procedure proposed was considered appropriate and the method was validated. The separation of the analytes was adequate in a total running of 12 minutes and the GC/FID method was validated by defining the linearity (50, 100, 200, 500, 1000 and 2000 µg/mL to ephedrine, octopamine and *p*-synephrine and 250, 500, 1000, 2500, 5000 and 10000 µg/mL to caffeine), limit of detection, limit of quantification, precision, accuracy, selectivity, specificity and robustness. The selectivity of the method was further improved by confirmation of the analytes by GC/MS. Mean recovery from weight loss products was 86.5 to ephedrine, 85.6 to octopamine, 86.4 to *p*-synephrine and 90.1 to caffeine. None significant changes were observed in the chromatographic behavior when the experimental conditions were changed slightly demonstrating that the method is rugged. The analysis method developed can be used in quality control to identify and quantificate these substances in a wide range of matrices.

Keywords: Ephedrine, *p*-synephrine, octopamine, caffeine, weight loss products, methods validation

7. MANUSCRITO IV:

“*Citrus aurantium* L. (bitter orange): chemical composition, pharmacological properties and toxicological aspects”

Capítulo publicado no livro “*Citrus Fruits: Properties, Consumption and Nutrition*”
(ISBN: 978-1-61761-189-6)

O presente capítulo traz uma ampla revisão bibliográfica sobre *Citrus aurantium*. Nele, serão abordados aspectos botânicos, composição química, usos populares, propriedades farmacológicas, aspectos toxicológicos e analíticos de *C. aurantium* e seus extratos.

C. aurantium, também conhecida por laranjeira-amarga, laranjeira-azedada, laranjeira-cavalo e laranjeira de Sevilha, possui utilização milenar na medicina popular para diversos fins. Entretanto, passou a receber destaque a partir do momento em que extratos de seus frutos verdes começaram a ser utilizados em formulações para emagrecimento, devido à presença da amina *p*-sinefrina.

Chapter 4

**CITRUS AURANTIUM L. (BITTER ORANGE):
CHEMICAL COMPOSITION, PHARMACOLOGICAL
PROPERTIES AND TOXICOLOGICAL ASPECTS**

*¹Gabriela Cristina Schmitt, ¹Marcelo Dutra Arbo,
²Luciana Grazziotin Rossato, ³Eliane Dallegrave,
⁴Mirna Bainy Leal and ¹Renata Pereira Limberger**

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga,
2752/605, Porto Alegre, 90610-000, RS, Brasil

²REQUIMTE, Toxicology Department, Faculty of Pharmacy, University of Porto,
Rua Aníbal Cunha 164, 4099-030, Porto, Portugal

³Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul, Fundação Estadual de
Produção e Pesquisa em Saúde, Rua Domingos Crescêncio,
132/8º andar, Porto Alegre, 90650-090, RS, Brasil

⁴Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Departamento de
Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500/202, Porto Alegre 90050-170, RS, Brasil

1. SUMMARY

The evergreen *Citrus aurantium* is a tree probably native from Southern Vietnam and widely cultivated throughout the world (Putzbach et al., 2007). The terms bitter orange, sour orange, Seville orange and green orange are commonly used to describe *C. aurantium* L. (Rutaceae) fruits. Its active principles comprise essential oils (Rogers, 1981; Pultrini et al., 2006), flavonoids (Bisset and Wichtl, 1994), and adrenergic amines as *p*-synephrine (Haller et al., 2005).

Recently, *C. aurantium* aroused great interest because of the extracts of unripe fruits, containing *p*-synephrine, have been used for weight loss (Schaneberg and Khan, 2004) as a component of dietary supplements, replacing ephedrine,

banned in some countries. However, *p*-synephrine has structural and pharmacological similarity with other adrenergic amines such as epinephrine, norepinephrine, amphetamine and ephedrine. For this reason, believes that it may cause similar adverse effects, especially on the cardiovascular system (Fugh-Berman and Myers, 2004).

Based on these considerations, herein we present a literature review focusing botanical aspects, chemical composition, general uses, pharmacological properties, toxicity and analytical aspects of *Citrus aurantium* extracts.

8. DISCUSSÃO GERAL

Os resultados dos testes agudos com a associação de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína demonstraram claramente que essa mistura apresenta sinais de toxicidade. Arbo e col. (2008) realizaram testes de toxicidade aguda em camundongos utilizando apenas extratos de *C. aurantium* e *p*-sinefrina e os resultados demonstraram apenas efeitos transitórios, mesmo quando testados em altas dosagens. Entretanto, a associação de *p*-sinefrina com efedrina, salicina e cafeína evidenciou toxicidade em camundongos, incluindo a ocorrência de sinais como ptose, piloereção e alterações na atividade locomotora, tanto em machos quanto em fêmeas, em todas as doses testadas.

Inicialmente houve redução na atividade locomotora, com posterior aumento e ocorrência de episódios de agitação e de *jumping*, demonstrando num primeiro momento efeitos tóxicos provocados pelo excesso de estimulação adrenérgica e em um segundo estágio os efeitos farmacológicos característicos mais pronunciados para esse tipo de substâncias. Os efeitos da mistura na atividade locomotora foram evidenciados também através do teste de atividade locomotora espontânea, sendo que os animais apresentaram significativo decréscimo na atividade ($p < 0,01$), inclusive em relação ao grupo tratado apenas com *p*-sinefrina (em dose equivalente àquela encontrada na mistura). Redução da atividade locomotora pôde ser observada quando da administração de altas doses de cafeína (Okuro *et al.*, 2010) e extratos contendo alcaloides da efedra. O efeito redutor pode decorrer de estimulação adrenérgica, uma vez que altas doses de agonistas α_1 e β_2 produziram esse tipo de efeito (Consoli *et al.*, 2007; Stone *et al.*, 2007).

Salivação e piloereção são efeitos tóxicos não específicos, mas indicativos de efeitos mediados por agonistas α_1 (Cordioli, 2005), assim como aumento da frequência respiratória é indicativo de ação no sistema adrenérgico e já havia sido observada anteriormente para *p*-sinefrina e para extratos contendo alcaloides da efedra (Arbo *et al.*, 2008). A ptose geralmente é um efeito apresentado por drogas depressoras (Almeida *et al.*, 1999). Também foi possível observar decréscimo significativo na coordenação motora ou excessivo relaxamento da musculatura em animais tratados com a mistura, através de efeitos neurológicos não específicos (Dallmeier and Carlini, 1981).

Efeitos na temperatura corporal também foram observados, ocorrendo uma significativa diminuição ($p < 0,01$) da mesma em todos os grupos tratados com a mistura, apesar de essas substâncias serem utilizadas como termogênicas (Preuss *et al.*, 2002) e deveriam aumentar a temperatura corporal. Contudo, por haver hiperestimulação α e β adrenérgica, pode haver efeitos de toxicidade que promovam alterações do centro regulador de temperatura e levem a hipotermia. Watanabe e col. (2008) demonstraram hipotermia por estimulação α adrenérgica, assim como há relatos de hipotermia provocada por altas doses de cafeína (Okuro *et al.*, 2010; Pechlivanova *et al.*, 2010).

Os efeitos observados nos estudos indicam que o mecanismo de ação e de toxicidade de misturas pode envolver mais do que uma simples soma de ações farmacológicas de cada um dos componentes. A farmacocinética e farmacodinâmica das substâncias podem ser modificadas quando da administração concomitante das mesmas, podendo haver interações que alterem o efeito farmacológico de cada uma (Linck *et al.*, 2009) e promovam efeitos inesperados, incluindo efeitos tóxicos.

A necropsia dos animais mortos em decorrência da exposição aguda a mistura evidenciou hemorragia cardiopulmonar, e corroborando com vários relatos da literatura de casos onde há utilização de suplementos alimentares ou produtos destinados a perda de peso contendo *p*-sinefrina associada à efedrina ou cafeína e que resultam em episódios de arritmias, hipertensão, taquicardia e outras alterações cardíacas, infarto do miocárdio, derrame cerebral e até mortes devido a complicações cardiovasculares (Haller *et al.*, 2008; Bui *et al.*, 2006; Hoffman *et al.*, 2006; Bouchard *et al.*, 2005; Jordan, 2004; Nasir *et al.*, 2004; Marcus e Grollman, 2003).

Os testes de toxicidade subcrônica demonstraram que a administração por 28 dias da mistura de substâncias nas doses testadas modifica o *status* oxidativo e promove alterações hepáticas e renais nos ratos machos. O fígado é um órgão alvo de toxicidade de drogas anfetamínicas e sabe-se que tanto a *p*-sinefrina e a efedrina são estruturalmente e farmacologicamente relacionadas a essa classe de substâncias (Firenzuoli *et al.*, 2005). Além disso, anfetaminas e análogos aumentam a produção de ERO (Yamamoto e Zhu, 1998; Colado *et al.*, 1997; Fleckenstein *et al.*, 1997; Giovanni *et al.*, 1995), assim como a cafeína (Jewett *et al.*, 1989), fatos esses

que podem levar a ocorrência de peroxidação lipídica e, conseqüentemente, estresse oxidativo.

Contudo, nas fêmeas não foram visualizadas alterações oxidativas, hepáticas ou renais. Vários relatos apontam que o gênero é um fator envolvido na injúria hepática induzida por drogas (Hemieda, 2007; McConnachie *et al.*, 2007, Dever and Elfarra, 2008) e demonstram que os machos são mais suscetíveis a esse tipo de efeito, sendo que as concentrações de estrogênio podem ser responsáveis por essa discrepância (McConnachie *et al.*, 2007; Dever e Elfarra, 2008; Liang *et al.*, 2011). Alguns estudos reportam diferenças na capacidade antioxidante entre os gêneros masculino e feminino (Yamamoto *et al.*, 2002; Ilhan *et al.*, 2004) sugerindo que o hormônio estrogênio possui capacidade antioxidante, enquanto que a testosterona não possui nenhuma atividade antioxidante (Yagi e Komura, 1986).

No que tange a análise química de suplementos alimentares e compostos emagrecedores, há uma necessidade emergente de métodos que possam determinar várias substâncias simultaneamente, de forma rápida e inequívoca, para maior controle de qualidade das formulações encontradas no mercado. Logo, a análise simultânea de efedrina, *p*-sinefrina, salicina e cafeína em produtos para perda de peso vêm ao encontro desse propósito, sobretudo ao considerarmos que não há métodos descritos na literatura para análise simultânea das substâncias propostas.

Foi possível validar um método por CG/DIC para analisar efedrina, *p*-sinefrina, cafeína e octopamina em suplementos alimentares e compostos emagrecedores. Contudo, não foi possível incluir a salicina, uma vez que a mesma pode ser detectada, mas não apresentou reprodutibilidade e esse fato impossibilitou sua validação no método proposto através dos parâmetros exigidos pelas guias que regulamentam validações. Já a octopamina foi incluída pelo fato de ser precursor da *p*-sinefrina em sua biossíntese e pode ser de grande valia no controle de qualidade de produtos ditos naturais que contenham extratos de *Citrus aurantium*.

A análise por CG/FID foi validada com sucesso através da definição de sua linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, robustez e seletividade. O método de extração, adaptado de Andrade *et al.* (2009), por SPE utilizando

cartuchos SCX, seguido de extração líquido-líquido com clorofórmio foi considerado apropriado, sendo capaz de minimizar os interferentes. A etapa de preparação da amostra é crucial, sobretudo em se tratando de matrizes tão complexas como são os suplementos alimentares e compostos emagrecedores. A posterior derivatização das amostras através de reação de acetilação com anidrido trifluoroacético foi satisfatória, permitindo a análise das aminas efedrina, *p*-sinefrina e octopamina sem interferir na análise da cafeína. O emprego do método proposto e validado em amostras adquiridas no mercado local evidenciou sua satisfatória aplicabilidade em diferentes matrizes, sendo possível detectar e quantificar as substâncias em questão.

A otimização por CG/EM foi fundamental para nortear processo de validação por CG/DIC, além de auxiliar na diferenciação de algumas substâncias que podem coeluir (caso da *m*-sinefrina e octopamina, que possuem o mesmo tempo de retenção no método por CG/FID), permitindo, assim, a inequívoca identificação através dos espectros de massas. Além disso, essa diferenciação auxilia o controle de qualidade das amostras, permitindo a inferência de adulterações nas mesmas.

9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho realizamos a avaliação toxicológica da associação de *p*-sinefrina, efedrina, salcina e cafeína, uma mistura amplamente utilizada em diversos produtos emagrecedores consumidos em todo mundo. As avaliações toxicológicas aguda e subcrônica da mistura demonstraram um alto potencial de toxicidade, sendo possível observar várias alterações fisiológicas nos animais submetidos aos testes.

O teste de toxicidade aguda demonstrou redução da atividade locomotora, ptose (em todas as doses em ambos os sexos), convulsões (350 mg/kg em fêmeas e 400 mg/kg em machos e fêmeas), além de salivação, agitação, piloereção em fêmeas, bem como mortes em machos (350 e 400 mg/kg) oriunda de hemorragia cardiopulmonar. Redução na atividade locomotora foi confirmada através do teste de atividade locomotora espontânea em machos que mostrou diminuição significativa ($p < 0,01$) em todos os grupos tratados, sendo o mesmo resultado observado quando do teste de temperatura corporal, havendo decréscimo da mesma em todas as doses testadas. O teste de rota-rod mostrou ocorrência de neurotoxicidade em machos tratados com 400 mg/kg. A DL_{50} da mistura em machos foi estimada entre 350 e 400 mg/kg.

A avaliação da toxicidade subcrônica demonstrou alterações significativas ($p < 0,05$) em marcadores do estresse oxidativo, indicando a ocorrência de peroxidação lipídica (pelo aumento de MDA), além de danos hepáticos e renais em ratos machos (100 e 150 mg/kg) e diminuição da GSH em todos os machos tratados. Nas fêmeas não houve indicação de estresse oxidativo, mas sim ocorrência de alterações hepáticas que não foram conclusivas.

De modo geral os resultados obtidos justificam a continuidade dos estudos toxicológicos, com a realização de novas avaliações, incluindo estudos de mais longa duração, haja vista a utilização destes produtos por períodos mais longos de tempo pelos consumidores. Além disso, a avaliação de outros marcadores de estresse oxidativo se fazem pertinentes para um melhor entendimento do perfil oxidativo exercido pela mistura. Ainda, o fato de que os resultados encontrados mostraram perfis diferenciados entre machos e fêmeas justifica a realização de estudos que verifiquem a influência hormonal sobre a ação e sobre a toxicidade desta mistura, sobretudo da ação do estrogênio, incluindo ensaios de atividade (anti)estrogênica, uma vez que mulheres jovens, em idade reprodutiva, e que

compostos químicos podem interferir em rotas hormonais e alterar o ciclo menstrual, a fertilidade e o desenvolvimento embrionário.

O método proposto por CG/DIC foi desenvolvido e validado com sucesso para a determinação e quantificação simultânea de efedrina, octopamina, *p*-sinefrina e cafeína em suplementos alimentares e compostos emagrecedores. Os resultados obtidos demonstram que o método pode ser considerado linear, específico, preciso e robusto, em uma análise rápida e eficaz, além de ter uma boa recuperação, haja vista a complexidade da matriz e a necessidade de *clean-up* e derivatização dos analitos. A aplicação do método nos produtos adquiridos mostrou resultados satisfatórios, podendo ser implementada em rotinas laboratoriais onde a análise seja requerida para controle de qualidade de produtos, sobretudo naqueles laboratórios que não possuam cromatografia líquida ou CG/EM.

10. REFERÊNCIAS

ACHENSON, K. J.; GREMAUD, G.; MEIRIM, I.; MONTIGON, F.; KREBS, Y.; FAY, L. B.; GAY, L.-J.; SCHNEITER, P.; SCHINDLER, C.; TAPPY, L. Metabolic effects of caffeine in humans: lipid oxidation or futile cycling? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 79-40, 2004.

ALLISON, D. B.; CUTTER, G.; MOORE, D.; BARNES, S. Exactly which synephrine alkaloid does *Citrus aurantium* (bitter orange) contain? **International Journal of Obesity**, v. 29, p. 443-446, 2005.

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ANDRADE, A.S.; SCHMITT, G.C.; ROSSATO, L.G.; RUSSOWSKY, D.; LIMBERGER, R.P. Gas Chromatographic method for analysis of *p*-Synephrine in *Citrus aurantium* L. products. **Chromatographia**, v. 69, p. S225-S229, 2009.

ARAI, K.; JIN, D.; KUSU, F.; TAKAMURA, K. Determination of *p*-hydroxymandelic acid enantiomers in urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.15, p.1509-1514, 1997.

ARBO, M.D.; LARENTIS, E.R.; LINCK, V.M.; ABOY, A.L.; PIMENTEL, A.L.; HENRIQUES, A.T.; DALLEGRAVE, E.; GARCIA, S.C.; LEAL, M.B.; LIMBERGER, R.P. Concentrations of *p*-synephrine in fruits and leaves of *Citrus* species (Rutaceae) and acute toxicity testing of *Citrus aurantium* extract and *p*-synephrine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2770-2775, 2008.

ARBO, M.D.; FRANCO, M.T.; LARENTIS, E.L.; GARCIA, S.C.; SEBEN, V.C.; LEAL, M.B.; DALLEGRAVE, E.; LIMBERGER, R.P. Screening for in vivo (anti)estrogenic activity of ephedrine and *p*-synephrine and their natural sources *Ephedra sinica* Stapf.(Ephedraceae) and *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) in rats. **Archives of Toxicology**, v. 83, p. 95-99, 2009a.

ARBO, M.D.; SCHMITT, G.C.; LIMBERGER, M.F.; CHARÃO, M.F.; MORO, A.M.; RIBEIRO, G.L.; DALLEGRAVE, E.; GARCIA, S.C.; LEAL, M.B.; LIMBERGER, R.P. Subchronic toxicity of *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) extract and *p*-synephrine in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 114-117, 2009b.

ARBO, M.D.; BRAUN, P.; LEAL, M.B.; LARENTIS, E.R.; ABOY, A.L.; BULCÃO, R.P.; GARCIA, S.C.; LIMBERGER, R.P. Presence of *p*-synephrine in teas commercialized in Porto Alegre (RS/Brazil). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 273-278, 2009c.

ARIAS, B.A.; RAMÓN-LACA, L. Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p. 89-95, 2005.

AULT, A. FDA proposes limits on ephedrine supplements. **Lancet**, v.349, p.1753, 1997.

AZAMBUJA, I. E. **Influência da p-sinefrina e efedrina na viabilidade celular e no dano ao DNA**. Monografia (Trabalho de conclusão de curso de Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BARBOSA - FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M.R.; MOURA, M. D.; SILVA, M. S.; LIMA, K.V.B.; CUNHA, E. V. L.; FECHINE, I. M.; TAKEMURA, O. S. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twentycentury review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.109-139, 2006.

BAUD, B., ARBILLA, S.; CANTRILL, R.C; SCATTON, B.; LANGER, S.Z. Trace amines inhibit the electrically evoked release of [³H]acetylcholine from slices of rat striatum in the presence of pargyline: similarities between β -phenylethylamine and amphetamine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 235, n. 1, p. 220-229, 1985.

BENT, S.; PADULA, A.; NEUHAUS, J. Safety and efficacy of *Citrus aurantium* for weight loss. **The American Journal of Cardiology**, v.94, p.1359-1361, 2004.

BLANCK, H.M.; SERDULA, M.K.; GILLESPIE, C.; GALUSKA, D.A.; SHARPE, P.A.; CONWAY, J.M.; KHAN, L.K.; AINSWORTH, B.E. Use of nonprescription dietary supplements for weight loss is common among Americans. **Journal of the American Dietetic Association**, v.107, p.441-447, 2007.

BOUCHARD, N.C.; HOWLAND, M.A.; GRELLER, H.A.; HOFFMAN, R.S.; NELSON, L.S. Ischemic stroke associated with use of an ephedra-free dietary supplement containing synephrine. **Mayo Clinic Proceedings**, v.80, p.541-545, 2005.

BRAGA, L. C.; ALVES, M. P. A cafeína como recurso ergogênico nos exercícios de endurance. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 8, n. 3, p. 33-37, 2000.

BRASIL, 1998. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 344 Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. D.O.U. - Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 de maio de 1998.

BRASIL, 2006. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Obesidade. Brasília, DF, 2006. 108 p. il. - (Cadernos de Atenção Básica, n. 12) (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2006.

BRASIL, 2009. Ministério da Saúde, Portal da Saúde. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/reportagensespeciais/default.cfm?pg=dspdetalhes&id_area=124&co_noticia=10078 e http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/excesso_peso_obesidade_16_8_10.pdf Acesso em 18.08.2010.

BRASIL, 2010. Ministério da Saúde, Portal da Saúde. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11458. Acesso em 18.08.2010.

BRAY, G.A. e RYAN, D. Drugs used in the treatment of obesity. **Diabetes Reviews**, v.8, p.83-100, 1997.

BREUM, L.; PEDERSEN, J. K.; AHLSTROM, F.; FRIMODT-MOLLER, J. Comparison of an ephedrine/caffeine combination and dexfenfluramine in the treatment of obesity. A double-blind multi-centre trial in general practice. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v.2, n.18, p.99-103, 1994.

BRODERICK, P.; BENJAMIN, A.B. Caffeine and psychiatric symptoms: a review. **Journal of the Oklahoma State Medical Association**, v.97, p.538-542, 2004.

BROWN, C.M., McGRATH, J.C., MIDGLEY, J.M., MUIR, A.G., O'BRIEN, J.W., THONOOR, C.M., 715 WILLIAMS, C.M., WILSON, V.G. Activities of octopamine and synephrine stereoisomers on alpha-adrenoceptors. **British Journal of Pharmacology**, v.93, p.417-429, 1988.

BROWN, J.M. e YAMAMOTO, B. K. Effects of amphetamines on mitochondrial function: role of free radicals and oxidative stress. **Pharmacology & Therapeutics**, v.99, p.45-53, 2003.

BUI, L.T.; NGUYEN, D.T.; AMBROSE, P.J. Blood pressure and heart rate effects following a single dose of bitter orange. **The Annals of Pharmacotherapy**, v.40, p.53-57, 2006.

CALAPAI, G.; FIRENZUOLI, F.; SAITTA, A.; SQUADRITO, F.; ARLOTTA, M.R.; CONSTANTINO, G.; INFERRERA, G. Antiobesity and cardiovascular toxic effects of *Citrus aurantium* extracts in the rat: a preliminary report. **Fitoterapia**, v.70, p.586-592, 1999.

CARVALHO-FREITAS, M.I.R.; COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.25, p.1629-1633, 2002.

COFFEY C. S.; STEINER, D.; BAKER, B. A.; ALLISON, D. B. A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial of a product containing ephedrine, caffeine, and other ingredients from herbal sources for treatment of overweight and obesity in the absence of lifestyle treatment. **International Journal of Obesity**, v.28, p.1411-1419, 2004.

COLADO, M. I.; O'SHEA, E.; GRANADOS, R.; MURRAY, T. K.; GREEN, A. R. In vivo evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ("ecstasy") and p-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 889- 900, 1997.

CONSOLI, D.; LEGGIO, G.M.; MAZZOLA, C.; MICALE, V.; DRAGO, F. Behavioral effects of the b3 adrenoceptor agonist SR58611A: is it the putative prototype of a new class of antidepressant/anxiolytic drugs? **European Journal of Pharmacology**, v. 573(1-3), p. 139-147, 2007.

CORDIOLI, A.V. **Psicofármacos. Consulta rápida**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2005.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E.A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. **Pharmacology**, v. 22, p. 113–127, 1981.

D'ANDREA, G., TERRAZZINO, S., LEON, A., FORTIN, D., PERINI, F., GRANELLA, F., BUSSONE, G. Elevated levels of circulating trace amines in primary headaches. **Neurology**, v.62, p.1701–1705, 2004.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise **Química Nova**, v.30, n.1, 2007.

DEVER, J.T.; ELFARRA, A.A. L-Methionine toxicity in freshly isolated mouse hepatocytes is gender-dependent and mediated in part by transamination. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 326, p. 809–817, 2008.

DULLOO, A. G.; MILLER, D. S. Reversal of obesity in the genetically obese Zucker rat with an ephedrine/methylxanthines thermogenic mixture. **Journal of Nutrition**, v.117, p.383-389, 1987.

FDA - Food and Drug Administration. Supplements associated with illnesses and injuries. U.S. Food and Drug Administration, Washington, 1998. Disponível em: <<http://www.fda.gov/fdac/features/1998/dietchrt.html>>. Acessado em 21.04.2008.

FINNEGAN, D. The health effects of stimulant drinks. **Nutrition Bulletin**, v.28, n.2, p.147-55, 2003.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; CALAPAI, C. Adverse reaction to an adrenergic herbal extract (*Citrus aurantium*). **Phytomedicine**, v. 12, p. 247–248, 2005.

FLECKENSTEIN, A. E.; WILKINS, D. G.; GIBB, J. W.; HANSON, G. R. Interaction between hyperthermia and oxygen radical formation in the 5-hydroxytryptaminergic response to a single methamphetamine administration. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, p. 281–285, 1997.

FREY, B.N.; VALVASSORI, S.S.; GOMES, K.M.; MARTINS, M.R.; DAL-PIZZOL, F.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Increased oxidative stress in submitochondrial particles after chronic amphetamine exposure. **Brain Research**, v.1097, p.224-229, 2006.

FUGH-BERMAN, A.; MYERS, A. *Citrus aurantium*, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research. **Experimental Biology and Medicine**, v.229, p.698-704, 2004.

GANGE, C.A.; MADIAS, C.; FELIX-GETZIK, E.M.; WEINTRAUB, A.R.; MARK ESTES III, N.A. Variant angina associated with bitter orange in a dietary supplement. **Mayo Clinic Proceedings**, v.84, p.545-548, 2006.

GARCÍA, J.A.V.; NAVARRO, S.Z. Necesidades nutricionales en deportistas. **Archivos Medicos del Deporte**, v.8, n.30, p.169-179, 1991.

GARRETT, B. E. e GRIFFITHS, R. R. The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v.57, p.533-541, 1997.

GIOVANNI, A.; LIANG, L. P.; HASTINGS, T. G.; ZIGMOND, M. J. Estimating hydroxyl radical content in rat brain using systemic and intraventricular salicylate: impact of methamphetamine. **Journal of Neurochemistry**, v. 641, p. 819– 825, 1995.

GOODMAN, R.R.; GILMAN, A.G; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Eds.). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10th ed, New York: McGraw-Hill, 2001. 2045 p.

GRANDY, D.K. Trace amine-associated receptor 1 – family archetype or 778 iconoclast? **Pharmacology & Therapeutics**, v.116, p.335–390, 2007.

GREENWAY, F. L. The safety and efficacy of pharmaceutical and herbal caffeine and ephedrine use as a weight loss agent. **Obesity Reviews**, v.2, p. 99 - 211, 2001.

GREENWAY, F.; JONGE-LEVITAN, L.; MARTIN, C.; ROBERTS, A.; GRUNDY, I.; PARKER, C. Dietary Herbal Supplements with phenylephrine for weight loss. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 4, p. 572-578, 2006.

GROLLMAN, A. P. Academic perspectives on dietary supplements use: the need for new guidelines. **Thrombosis Research**, v. 117, p. 185-192, 2005.

HAAZ, S.; FONTAINE, K.R.; CUTTER, G.; LIMDI, N.; PERUMEAN-CHANEY, S.; ALLISON, D.B. *Citrus aurantium* and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update. **Obesity Reviews**, v.7, p.79-88, 2006.

HALLER, C.A.; BENOWITZ, N.L. Adverse cardiovascular and central nervous system events associated with dietary supplements containing ephedra alkaloids. **The New England Journal of Medicine**, v.343, p.1833-1838, 2000.

HALLER, C. A.; JACOB III, P.; BENOWITZ, N. L. Pharmacology of ephedra alkaloids and caffeine after single-dose dietary supplement use. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.71, n. 6, p.421-432, 2002.

HALLER, C.A.; JACOB, P.; BENOWITZ, N.L. Enhanced stimulant and metabolic effects of combined ephedrine and caffeine. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 75, p. 259-273, 2004.

HALLER, C.A.; BENOWITZ, N.L.; JACOB, P. Hemodynamic effects of ephedra-free weight-loss supplements in humans. **American Journal of Medicine**, v.118, p.998-1003, 2005.

HALLER, C.A.; DUAN, M.; JACOB, P.; BENOWITZ, N.L. Human pharmacology of a performance-enhancing dietary supplement under resting and exercise conditions. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 65(6), p. 833-840, 2008.

HALLIWELL, B. Free radicals and vascular disease: how much do we know? **British Medical Journal**, v.307, p.885, 1993.

HEMIEDA, F.A. Influence of gender on tamoxifen-induced biochemical changes in serum of rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 301, p; 137–142, 2007.

HOFFMAN, J.R.; KANG, J.; RATAMESS, N.A., JENNINGS, P.F.; MANGINE, G.; FAIGENBAUM, A.D. Thermogenic effect from nutritionally enriched coffee consumption. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 3, p. 35-41, 2006.

HORTON, T.; GEISSLER; C.A. Aspirin potentiates the effect of ephedrine on the thermogenic response to a meal in obese but not lean women. **International Journal of Obesity**, v.15, n.5, p.359-366, 1991.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Obesidade atinge mais de 40% da população brasileira. Disponível em <[http://www.ibge.gov.br/ibgeteen /noticias/obesidade](http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/noticias/obesidade) > Acesso em 16.12.2007.

ILHAN, N.; KAMANLI, A.; OZMERDIVENLI, R.; ILHAN, N. Variable effects of exercise intensity on reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive substance levels, and glucose concentration. **Archives of Medical Research**, v. 35, p. 294–300, 2004.

JAMES, J. E. Dietary caffeine, performance and mood: enhancing and restorative effects after controlling for withdrawal relief. **Neuropsychobiology**, v.52, p.1–10, 2004.

JEWETT, S.; EDDY, L.; HOCHSTEINE, P. Is the autoxidation of catecholamines involved in ischemia-reperfusion injury? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 6, p. 185-188, 1989.

JORDAN, S.; MURTY, M.; PILON, K. Products containing bitter orange or synephrine: suspected cardiovascular adverse reactions. **Canadian Medical Association Journal (CMAJ)**, v.171, n.8, p.993-994, 2004.

JOSEFSON, D. Herbal stimulant causes U.S deaths. **BMJ**, v.312; p.1378-1379, 1996.

KALMAN, D.S.; COLKER, C.M.; SHI, Q.; SWAIN, M.A. Effects of a weight-loss aid in healthy overweight adults: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Current Therapeutic Research**, v.61, p.199-205, 2000.

KERRIGAN, S., LINDSEY, T. Fatal caffeine overdose: two case reports. **Forensic Science International**, v.153, p.67-69, 2005.

KIM, K.W.; KIM, H.D.; JUNG, J.S.; WOO, R.S.; KIM, H.S.; SUH, H.W.; KIM, Y.H.; SONG, D.K. Characterization of antidepressant-like effects of *p*-synephrine stereoisomers. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives in Pharmacology**, v.364, p.21-26, 2001.

KURTZWEIL, P. An FDA Guide to Dietary Supplements. U.S. Food and Drug Administration, Washington, 1998. Disponível em: <<http://www.cFDA.gov/dms/fdsuppch.html>>. Acessado em 08.05.2008.

KUSU, F.; MATSUMOTO, K.; ARAI, K.; TAKAMURA, K. Determination of synephrine enantiomers in food and conjugated synephrine in urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Analytical Biochemistry**, v.235, p.191-194, 1996.

LARENTIS, E.R. **Avaliação da influência da *p*-sinefrina na proliferação e morte celular**. Monografia (Trabalho de conclusão de curso de Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

LEICHTWEIS, S.; JI, L.L. Glutathione deficiency intensifies ischemic-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.172, p.1-10, 2001.

LIANG, Q.; SHENG, Y.; JIANG, P.; JI, L.; XIA, Y.; MIN, Y.; WANG, Z. The gender-dependent difference of liver GSH antioxidant system in mice and its influence on isoniazid-induced liver injury. **Toxicology**, v. 280, p. 61-69, 2011.

LINDEMANN, L., HOENER, M.C. A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family. **Trends in Pharmacology Sciences**, v.26, p. 274–281, 2005.

LINCK, V. M.; THIESEN, F.V.; LEAL, M.B. *Citrus aurantium*: comercialização em farmácias e drogarias e riscos à saúde. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.19, n.2, p.89-94, 2006.

LINCK, V.M.; DA SILVA, A.L.; FIGUEIRÓ, M.; PIATO, A.L.; HERRMANN, A.P.; DUPONT BIRCK, F.; CAMARÃO, E.B.; NUNES, D.S.; MORENO, P.R.; ELISABETSKY, E. Inhaled linalool-induced sedation in mice. **Phytomedicine**, v. 16(4), p. 303-307, 2009.

LOPEZ-GARCIA, E. Changes in caffeine intake and long-term weight change in men and women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 674-680, 2006.

MARCUS, D.M.; GROLLMAN, A. Ephedra-free is not Danger-free. **Science**, v. 301, p. 1669-1671, 2003.

MARTINDALE, W. Martindale: The Complete Drug Reference. London: The Pharmaceutical Press, 34th ed., 2005. 2756 p.

MATTOLI, L.; CANGI, F.; MAIDECCHI, A.; GHIARA, C.; TUBARO, M.; TRALDI, P. A rapid liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry method for

evaluation of synephrine in *Citrus aurantium* L. samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.9860-9866, 2005.

McCONNACHIE, L.A.; MOHAR, I.; HUDSON, F.N.; WARE, C.B.; LADIGES, W.C.; FERNANDEZ, C.; CHATTERTON-KIRCHMEIER, S.; WHITE, C.C.; PIERCE, R.H.; KAVANAGH, T.J. Glutamate cysteine ligase modifier subunit deficiency and gender as determinants of acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Toxicology Science**, v. 99, p. 628–636, 2007.

MERCK, N.J.: **THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 12th ed. Whitehouse Station, 1996.

MOKDAD, A.H.; SERDULA, M.K.; DIETZ, W.H.; BOWMAN, B.A.; MARKS, J.S.; KOPLAN, J.P. The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991–1998. **JAMA**, v, 282, p.1519 –1522, 1999.

MORGENSTERN, L.B.; VISCOLI, C.M.; KERNAN, W.N.; BRASS, L.M.; BRODERICK, J.P.; FELDMANN, E.; WILTERDINK, J.B.; BROTT, T.; HORWITZ, R.I. Use of ephedra-containing products and risk for hemorrhagic stroke. **Neurology**, v. 60, n. 1, p. 132-135, 2003.

MORO, C.O.;BASILE, G. Obesity and medicinal plants. **Fitoterapia**, v.71, p.S73-S82, 2000.

NASIR, J.M.; DURNING, S.; FERGUSON, M.; BAROLD, H.S.; HAIGNEY, M.C. Exercise-induced syncope associated with qt-prolongation and ephedra-free xenadrine. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 78(8), p. 1059-1062, 2004.

NYKAMP, D.L.; FACKIH, M.N.; COMPTON, A.L. Possible association of acute lateral-wall myocardial infarction and bitter orange supplement. **Annals of Pharmacotherapy**, v.38, n.5, p.812-816, 2004.

OKURO, M.; FUJIKI, N.; KOTORII, N.; ISHIMARU, Y.; SOKOLOFF, P.; NISHINO, S. Effects of paraxanthine and caffeine on sleep, locomotor activity, and body temperature in orexin/ataxin-3 transgenic narcoleptic mice. **Sleep**, v. 33(7), p. 930-942, 2010.

PARFITT, K. **MARTINDALE: The complete drug reference**. 32th ed. London: Pharmaceutical Press, 1999.

PECHLIVANOVA, D.; TCHEKALAROVA, J.; NIKOLOV, R.; YAKIMOVA, K. Dose-dependent effects of caffeine on behavior and thermoregulation in a chronic unpredictable stress model of depression in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 209(2), p. 205-211, 2010.

PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; MELEGARI, M. Enantioselective LC analysis of synephrine in natural products on a protein-based chiral stationary phase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, p.839-849, 2005.

PELLATI, F.; BENVENUTI, S. Chromatographic and eletrophoretic methods for the analysis of phenethylamine alkaloids in *Citrus aurantium*. **Journal of Chromatography A**, v.1161, p. 71-88, 2007.

PENTEL, P. Toxicity of over-the-counter stimulants. **Journal of American Medical Association**, v. 252, p. 1898-1903, 1984.

PENZAK, S.R.; JANN, M.W.; COLD, J.A.; HON, Y.Y.; DESAI, H.D.; GURLEY, B.J. Seville (sour) orange juice: synephrine content and cardiovascular effects in normotensive adults. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.41, n.10, p.1059-1063, 2001.

PREUSS, H.G.; DiFERDINANDO, D.; BAGCHI, M.; BAGCHI, D. *Citrus aurantium* as a thermogenic, weight-reduction replacement for ephedra: an overview. **Journal of Medicine**, v. 33, p. 1-4, 2002.

PULTRINI, A.M.; GALINDO, L.A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models of mice. **Life Sciences**, v.78, n.15, p.1720-1725, 2006.

RABELLO, G. D.; FORTE, L. V.; GALVÃO, A. C. Clinical evaluation of the efficacy of the paracetamol and caffeine combination in the treatment of tension headache. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 58, n. 1, p. 90-98, 2000.

RAWSON, E.S.; CLARKSON, P.A. **Ephedrine as an ergogenic aid. Performance-enhancing Substances in Sport and Exercise**. Ed Bahrke, M.S.; Yesalis, C.E. Human Kinetics. 2002.

REYNOLDS, J.E.F. (Ed.) **Martindale the Extra Pharmacopoeia**. 31th ed. London: The Pharmaceutical Press, 1993.

ROSSATO, L.G.; COSTA, V.M.; PINHO, P.G.; CARVALHO, F.; BASTOS, M.L.; REMIÃO, F. Structural isomerization of synephrine influences its uptake and ensuing glutathione depletion in rat isolated cardiomyocytes. **Archives of Toxicology**, v. 85, n.8, p. 929-939, 2011.

ROTHMAN, R.B.; VU, N.; PARTILLA, J.S.; ROTH, B.L.; HUFEISEN, S.J.; COMPTON-TOTH, R.B.; BIRKES, J.; YOUNG, R.; GLENNON, R.A. In vitro characterization of ephedrine-related stereoisomers at biogenic amine transporters and the receptorome reveals selective action as norepinephrine transporter substrates. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 307, p. 138–145, 2003.

SAMENUK, D.; LINK, M.S.; HOMOUD, M.K.; CONTRERAS, R.; THEOHARIDES, T.C.; WANG, P.J.; ESTES, N.A. Adverse cardiovascular events temporally associated with ma huang, an herbal source of ephedrine. **Mayo Clinic Proceedings**, v.77, p.12-16, 2002.

SANTANA, J.; SHARPLESS, K.E.; NELSON, B.C. Determination of *p*-synephrine and *m*-synephrine positional isomers in bitter orange-containing supplements by LC/879 UV and LC/MS/MS. **Food Chemistry**, v.109, p.675–682, 2008.

SCHANEBERG, B.T.; CROCKETT, S.; BEDIR, E.; KHAN, I.A. The role of chemical fingerprinting: application to Ephedra. *Phytochemistry* 62, 911–8. al. The role of chemical Wngerprinting: application to Ephedra. **Phytochemistry**, v. 62, p. 911–918, 2003.

SCHMID, B.; KÖTTER, I.; HEIDE, L. Pharmacokinetics of salicin after oral administration of a standardized willow bark extract. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, p. 387-391, 2001.

SILVA NETO, R. P.; SOARES, A. A. O papel da cafeína nas cefaleias: fator agravante ou atenuante? **Migrâneas & Cefaleias**, v. 9, n. 3, p. 72-77, 2006.

SONG, D.K.; SUH, H.W.; JUNG, J.S.; WIE, M.B.; SON, K.H.; KIM, Y.H. Antidepressant-like effects of *p*-synephrine in mouse models of immobility tests. **Neuroscience Letters**, v.214, p.107-110, 1996.

SONG, H. J.; SHIM, K-N.; RYU, K.H.; KIM, T.H.; JUNG, S-A.; YOO, K. A Case of Ischemic Colitis Associated with the Herbal Food Supplement Ma Huang. **Yonsei Medical Journal**, v. 49, n. 3, p. 496-499, 2008.

SONI, M. G.; CARABINB, I.G.; GRIFFITHS, J. C.; BURDOCK, G.A. Safety of Ephedra: lessons learned. **Toxicology Letters**, v. 150, p. 97-111, 2004.

STONE, E.A.; QUARTEMAIN, D.; LIN, Y.; LEHMANN, M.L. Central α 1-adrenergic system in behavioral activity and depression. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 1063-1075, 2007.

STRADER, C.D., CANDELORE, M.R., HILL, W.S., SIGAL, I.S., DIXON, R.A. Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.264, p.13572–13578, 1989.

TARNOPOLSKY, M.A.; ATKINSON, S.A.; MACDOUGALL, J.D.; SALE, D.G.; SUTTON, J.R. Physiological responses to caffeine during endurance running in habitual caffeine users. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 21, n. 4, p. 418-424, 1989.

TSENG, Y. L.; SHIEH, M. H.; KUO, F. H. Metabolites of ephedrine in human urine after administration of a single therapeutic dose. **Forensic Science International**, v. 157, n. 2-3, p.149-55, 2006.

WATANABE, M.; TOMIYAMA-MIYAJI, C.; KAINUMA, E.; INOUE, M.; KUWANO, Y.; REN, H.; SHEN, J.; ABO, T. Role of α -adrenergic stimulus in stress-induced modulation of body temperature, blood glucose and innate immunity. **Immunology Letters**, v. 115, p. 43-49, 2008.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva: WHO; 1995.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regional Office for the Western Pacific. Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines. Manila: 1999.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The challenge of obesity in the WHO European Region and the strategies for response. Geneva: WHO, 2007. Disponível em: < <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/disease-prevention/physical-activity/publications/2007/challenge-of-obesity-in-the-who-european-region-and-the-strategies-for-response-the/>> Acesso em 22.04.09.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity. Geneva: WHO, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em 22.04.09.

YAGY, K.; KOMURA, S. Inhibitory effect of female hormones on lipid peroxidation. **Biochemistry International**, v. 13, p. 1051-1055, 1986.

YAMAMOTO, B.K.; ZHU, W. The effects of metamphetamine on the production of free radicals and oxidative stress. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.287, p.107-114, 1998.

YAMAMOTO, T.; OHKUWA, T.; ITOH, H. Effect of gender differences and voluntary exercise on antioxidant capacity in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology and Pharmacology**, v. 132, p. 437-444, 2002.

ZAHN, K. A.; LI, R. L.; PURSSEL, R. A. Cardiovascular toxicity after ingestion of "herbal ecstasy". **The Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 2, p. 289-291, 1999.

ZUCCHI, R., CHIELLINI, G., SCANLAN, T.S., GRANDY, D.K. Trace amine-associated 924 receptors and their ligands. **British Journal of Pharmacology**, v.146, p.967–978, 2006.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2007982

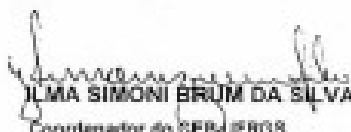
Título : Avaliação da toxicidade de suplementos alimentares e compostos emagrecedores contendo p-sinefrina e efedrina em camundongos e ratos

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
MIRNA BAINY LEAL	PESQ RESPONSÁVEL	mirnabm@gmail.com	33083589
ELIANE DALLEGRAVE	PESQUISADOR	ELIANED@UFRGS.BR	33083589
GABRIELA CRISTINA SCHMITT	PESQUISADOR	gabrielaschmitt@terra.com.br	33085235
RENATA PEREIRA LIMBERGER	PESQUISADOR	renata@farmacia.ufrgs.br	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 42 , ata nº 122 , de 18/12/2008 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quinta-feira, 18 de dezembro de 2008



ILMA SIMONI BRUM DA SILVA
Coordenador do CEP-UFRGS