

## INTRODUÇÃO

A obesidade vem crescendo em ritmo alarmante no Brasil, podendo ser classificada como uma epidemia (OMS, 2009). Esta realidade, associada à busca pelo bem estar físico, faz crescer desenfreadamente a administração de substâncias emagrecedoras. Dentro desse contexto, suplementos alimentares são frequentemente administrados, apesar da supervisão limitada pelas agências federais. O uso exponencial e indiscriminado de suplementos alimentares à base de *p*-sinefrina (precursora biológica da octopamina) associada à efedrina, salicina e cafeína representa uma grande problemática, uma vez que o incremento e disseminação de produtos no mercado são mais céleres do que o desenvolvimento de estudos científicos que promovam e garantam sua eficácia e segurança de uso. Acredita-se que a salicina (não avaliada neste estudo) ajude a potencializar o efeito das outras substâncias.

## OBJETIVO

Estabelecer e validar metodologia para identificação e quantificação simultânea de *p*-sinefrina, efedrina, octopamina e cafeína em suplementos alimentares, por CG/DIC, incluindo a padronização de etapas de preparo das amostras como extração em fase sólida e derivatização.

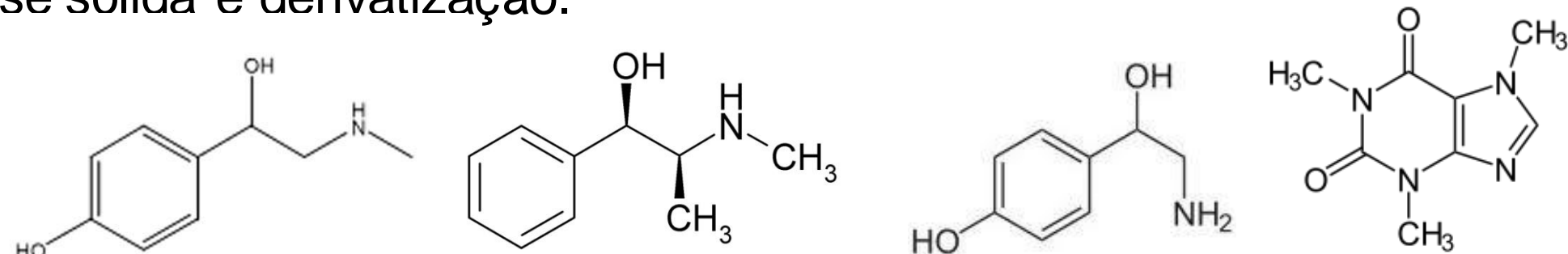


Fig. 1: estruturas de *p*-sinefrina, efedrina, octopamina e cafeína, respectivamente.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Aproximadamente 15,0 mg do montante de cápsulas foram submetidos à maceração dinâmica com 3 mL de água em vórtex, por 5 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos e limpo por extração em fase sólida (EFS), em um manifold a vácuo (Vertical, Bangkok, Tailândia), com colunas SCX (permuta catiônica forte, ácido benzenossulfônico) 100 mg (Adsorbex, Merck, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram aplicadas em cartuchos previamente condicionadas com 2 mL de metanol, seguido de 2 mL de água. As colunas foram lavadas com 2 mL de água:metanol (75:25 v/v). A extração da cafeína foi realizada com 2 mL de clorofórmio. Efedrina, octopamina e *p*-sinefrina foram eluídas a partir dos cartuchos, depois de lavados com 4 mL de metanol: isopropanol: hidróxido de amônio (78:20:2 v/v/v). Os eluentes foram secos com nitrogênio. O procedimento de derivatização foi adaptado de Rossato et. al, 2010. Os resíduos secos foram submetidos à derivatização com 40 uL de acetato de etila e 40 uL de anidrido trifluoroacético (TFAA). A incubação foi realizada a 80 °C durante 30 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a solução foi seca com nitrogênio. O resíduo obtido foi ressuspenso em 50 uL de acetato de etila e injetado no sistema CG/DIC.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A separação dos analitos foi adequada em tempo de corrida total de 12 minutos e o método foi validado em relação a linearidade (50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 µg/mL para efedrina, octopamina e *p*-sinefrina e 250, 500, 1000, 2500, 5000 e 10000 µg/mL para cafeína), limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão, seletividade, especificidade e robustez. As médias de recuperação foram 86,5 (efedrina), 85,6 (octopamina), 86,4 (*p*-sinefrina) e 90,1 (cafeína). Não foram observadas alterações significativas no comportamento cromatográfico, quando as condições experimentais foram ligeiramente modificadas, demonstrando que o método é robusto. O método de análise desenvolvido pode ser utilizado no controle de qualidade, a fim de identificar e quantificar tais substâncias numa vasta gama de matrizes.

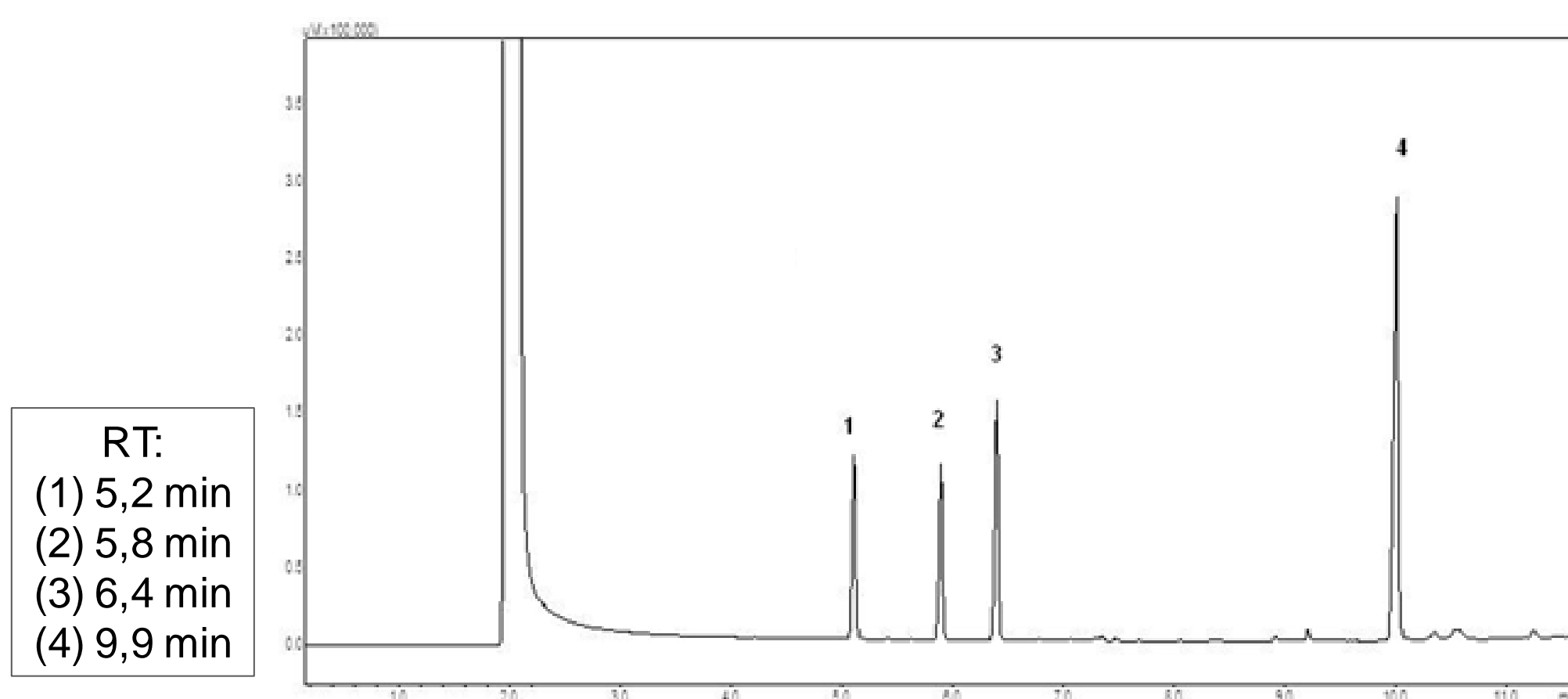


Fig. 2: Cromatograma de análise de efedrina (1), octopamina (2), sinefrina (3) e cafeína (4).

Substância	Equação da reta	Coefficiente de correlação
Efedrina	$y = 1126,3 x + 16,625$	0,9990
Octopamina	$y = 850,79 x + 52,409$	0,9973
<i>p</i> -Sinefrina	$y = 1533,6 x + 27,848$	0,9982
Cafeína	$y = 830,1 x + 10,192$	0,9984

Tab. 1: Resultados da linearidade para as quatro substâncias analisadas.

## CONCLUSÃO

A validação foi bem sucedida, na qual todos os parâmetros estabelecidos pela resolução N° 899 da ANVISA foram determinados e encontraram-se dentro dos valores preconizados por essa resolução. A extração e limpeza da matriz complexa por SPE reduz a quantidade de solventes orgânicos utilizados bem como remove interferências, melhorando o perfil cromatográfico da análise. O método pode ser instituído na rotina de laboratórios equipados com CG/DIC para análise simultânea de compostos emagrecedores que possuem as quatro substâncias associadas ou apenas uma delas. Trata-se de uma boa alternativa para laboratórios que não têm acesso a HPLC ou CG/EM para análise.

### Referências:

- Bent S, Padula A, Neuhaus J. Safety and efficacy of *Citrus aurantium* for weight loss. The American Journal of Cardiology, 94, 1359-1361, 2004.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº. 899 de 29 de maio de 2.003. Guia para validação de métodos analíticos. D.O.U. - Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.
- 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, 229, 698-704, 2004.
- Garcia PR, Yonamine, Moreau R L de M. Determinação de efedrinas em urina por cromatografia em fase gasosa (CG/DNP) para o controle da dopagem no esporte. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 41(3) 2005.
- Greenway FL. The safety and efficacy of pharmaceutical and herbal caffeine and ephedrine use as a weight loss agent. Obesity Reviews, 2, 99 - 211, 2001.
- Grollman AP. Academic perspectives on dietary supplements use: the need for new guidelines. Thrombosis Research, 117, 185-192, 2005.
- Jones G. Caffeine and other sympathomimetic stimulants: modes of action and effects on sports performance. Essays in Biochemistry, 44, 109-123, 2008.