

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

Análise toxicológica de suplementos alimentares e compostos emagrecedores
contendo salicina, efedrina, *p*-sinefrina e cafeína

ANA CLÁUDIA FAGUNDES

PORTO ALEGRE, 2016

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

Análise toxicológica de suplementos alimentares e compostos emagrecedores
contendo salicina, efedrina, *p*-sinefrina e cafeína

Dissertação apresentada por **Ana Cláudia Fagundes** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Prof. Dr. Renata Pereira Limberger

Co-orientador (a): Prof. Dr. Mirna Bainy Leal

Porto Alegre, 2016

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.05.2016, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Flávia Valladão Thiesen

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Miriam Anders Apel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Fagundes, Ana Cláudia
Análise toxicológica de suplementos alimentares e compostos emagrecedores contendo salicina, efedrina, p-sinefrina e cafeína / Ana Cláudia Fagundes. -- 2016. 71 f.

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

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

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

Este trabalho foi desenvolvido sob 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, na cidade de Porto Alegre, com financiamento de agências de fomento. O trabalho também conta com a colaboração da Prof^a Dr. Eliane Dallegrave do Departamento de Farmacociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. A autora recebeu bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr. Renata Pereira Limberger pela orientação, confiança e oportunidade de realizar este trabalho.

À Prof^ª. Dr. Mirna Bainy Leal, pela amizade, apoio, incentivo e, principalmente, pela sua dedicação para realização desta dissertação.

À Prof^ª. Dr. Eliane Dallegrave pela amizade, dedicação e aprendizado.

À equipe Labtoxico pela amizade, apoio e conhecimento. Em especial à Bruna, Rosana e Taís.

À equipe do laboratório de Toxicologia de Produtos Naturais do Instituto de Ciências Básicas da Saúde pela dedicação e conhecimento. Em especial à Janaína e Naiana pela amizade, apoio, dedicação, aconselhamentos e, principalmente, incentivos nos meus bons e maus momentos.

À minha família pelo apoio incondicional, compreensão, aconselhamentos, paciência e incentivo.

À CAPES pela bolsa de estudos.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

A busca por um padrão estético globalizado e o aumento da obesidade fazem crescer o uso de suplementos alimentares e compostos emagrecedores à base de extratos vegetais. Produtos contendo a associação de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína são amplamente consumidos e não apresentam efetividade e segurança bem esclarecidas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade subcrônica de *p*-sinefrina, efedrina, cafeína e salicina, isoladas e em associação, em ratos Wistar machos. Doses de salicina 6 mg/kg, efedrina 4 mg/kg, *p*-sinefrina 10 mg/kg, cafeína 80 mg/kg e a associação de salicina, efedrina, *p*-sinefrina e cafeína 100 mg/kg (6:4:10:80, respectivamente) foram testadas via oral por 28 dias consecutivos. A massa corporal foi verificada semanalmente e o teste da atividade locomotora foi realizado no 28º dia. O sangue foi coletado para análise bioquímica e órgãos vitais como fígado e rins foram utilizados para avaliação histológica. Os resultados mostraram uma redução significativa ($p < 0,05$) na massa corporal nos dias 21 e 28 do grupo tratado com cafeína comparado ao grupo controle. Nos dias 14, 21 e 28 ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) da massa corporal no grupo tratado com *p*-sinefrina comparado com os grupos efedrina, salicina, cafeína e associação. No teste da atividade locomotora houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo tratado com a associação comparado ao grupo controle. Não foram encontradas alterações nos marcadores bioquímicos de fígado, rim e coração, bem como nas avaliações macroscópicas dos órgãos vitais. Entretanto, na análise histológica do fígado, verificou-se em todos os grupos a presença de vacuolização e tumefação celular, congestão vascular e alargamento dos sinusóides, e apenas os grupos *p*-sinefrina, efedrina e salicina apresentaram degeneração hidrópica. Na histologia dos rins todos os grupos demonstraram vacuolização celular e aumento do espaço da cápsula de Bowman e o grupo *p*-sinefrina mostrou a presença de infiltrado inflamatório. Esses resultados sugerem que o uso dessas substâncias, tanto na forma isolada como em associação, apresenta um perfil toxicológico considerável. **Palavras-chave:** *p*-sinefrina, efedrina, salicina, cafeína, suplementos alimentares, compostos emagrecedores, avaliação toxicológica.

ABSTRACT

The search for a globalized aesthetic standard and the increasing obesity are enhancing the use of food supplements and weight loss compounds from plant base extracts. Products containing the combination of *p*-synephrine, ephedrine, caffeine and salicin are widely consumed and the effectiveness and safety are not well understood. Therefore, the aim of this study was to evaluate the subchronic toxicity of *p*-synephrine, ephedrine, caffeine and salicin, isolated and in combination, in male Wistar rats. Doses of salicin 6 mg/kg, ephedrine 4 mg/kg, *p*-synephrine 10 mg/kg, caffeine 80 mg/kg and the association of salicin, ephedrine, *p*-synephrine and caffeine (100 mg/kg; 6:4:10:80, respectively) were administered orally for 28 consecutive days. Body weight was recorded weekly and a locomotor activity test was performed on the 28th day. Blood was collected for biochemical analysis and vital organs such as liver and kidneys were used for histologic evaluation. The results showed a significant reduction ($p < 0.05$) in body mass on days 21 and 28 in the caffeine-treated group compared to control group. Besides that, on days 14, 21 and 28 a significant increase ($p < 0.05$) in body weight was observed in the group treated with *p*-synephrine compared to the ephedrine, salicin, caffeine and association-treated groups. In the test of locomotor activity, a significant increase ($p < 0.05$) was observed in the association-treated group treated compared to the control group. No changes were found in biochemical markers associated with liver, kidney and heart conditions or in macroscopic evaluations of vital organs. However, the histological analysis of the liver in all groups shown presence of cellular vacuolization and swelling, vascular congestion and enlargement of the sinusoids, whereas the *p*-synephrine, ephedrine and salicin groups exhibited hydropic degeneration. In the histology of kidneys, all groups showed cellular vacuolation and increased of the Bowman's capsule space and the *p*-synephrine group showed the presence of inflammatory infiltrate. These results suggest that the use of these substances either in isolation or in combination showed a considerable toxicological profile. **Keywords:** *p*-synephrine, ephedrine, salicin, caffeine, food supplements, slimming compounds, toxicological evaluation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas dos isômeros posicionais da sinefrina (<i>orto</i> , <i>meta</i> , <i>para</i>) e da efedrina	31
Figura 2 – Estrutura química da cafeína.....	32
Figura 3 – Estrutura química da salicina.....	33
Figura 4 – Gráfico do peso corporal relativo.....	43
Figura 5 – Gráfico da atividade locomotora.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros bioquímicos séricos.....	48
Tabela 2 –	Massa relativa dos órgãos.....	48
Tabela 3 –	Resultados da análise histológica do fígado	50
Tabela 4 –	Resultados da análise histológica dos rins.....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. REVISÃO.....	25
3.1 Obesidade.....	27
3.2 Suplementos alimentares e compostos emagrecedores.....	28
3.3 Aspectos relevantes sobre <i>p</i> -sinefrina, efedrina, cafeína e salicina.....	29
3.3.1 <i>Citrus aurantium</i> (Rutaceae) e <i>p</i> -sinefrina.....	29
3.3.2 Efedrina.....	31
3.3.3 Cafeína.....	32
3.3.4 Salicina.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Padrões e Reagentes.....	37
4.2 Aspectos éticos.....	37
4.3 Animais.....	37
4.4 Teste de toxicidade subcrônica.....	38
4.5 Avaliação da atividade locomotora espontânea.....	38
4.6 Preparo das amostras para medidas bioquímicas.....	38
4.7 Análise Bioquímica: avaliação da toxicidade hepática, cardíaca e renal.....	39
4.8 Avaliação histopatológica.....	39
4.9 Análise estatística.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PESPECTIVAS.....	57
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO A – Carta de aprovação do projeto no comitê de ética no uso de animais.....	69

1 INTRODUÇÃO

O aumento acelerado da prevalência da obesidade nas últimas décadas representou um sinal de alerta para Organização Mundial de Saúde (OMS) que, devido a esse fato, colocou a obesidade no patamar de epidemia mundial sendo considerada a mais importante desordem nutricional nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (PEDRONI et al., 2013).

Existem evidências claras de que estilos de vida modernos, crescentes demandas profissionais e o foco na tecnologia que facilita o sedentarismo estimulam a busca por alternativas rápidas e fáceis para perda de peso, ao invés da modificação do estilo de vida (MACHADO, SILVEIRA, SILVEIRA, 2012).

Diferentes abordagens nutricionais têm sido empregadas para facilitar e ajudar a perda de peso, entre elas encontram-se suplementos alimentares e compostos emagrecedores. Apesar do grande número de formulações disponíveis em uma variedade de apresentações comerciais, há poucas evidências científicas quanto a sua segurança e eficácia (HUNTINGTON, SHEWMARE, 2010).

Durante vários anos a substância efedrina foi utilizada em suplementos alimentares e compostos emagrecedores para o tratamento da obesidade e produção de energia, entretanto seu uso foi proibido nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) em abril de 2004, por apresentar efeitos adversos graves, como problemas cardíacos, psiquiátricos, derrames cerebrais e hipertensão (HANSEN et al., 2012; SCHMITT, 2012).

A partir dessas evidências, o uso da efedrina foi substituído pela substância *p*-sinefrina presente em extratos secos padronizados dos frutos da planta *Citrus aurantium* L. (Rutaceae), conhecida popularmente como laranja-amarga. Por ser análogo estrutural da efedrina, os efeitos farmacológicos da *p*-sinefrina são muito semelhantes aos da efedrina, sugerindo que os suplementos alimentares e compostos emagrecedores podem também possuir o mesmo potencial de desenvolver a toxicidade promovida pela efedrina (HANSEN et al., 2012; SCHMITT, 2012). Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (ARBO et al., 2009a; ARBO et al., 2009b) tanto a *p*-sinefrina, como extratos de *C. aurantium* apresentaram baixa toxicidade *in vivo*,

mesmo quando testados em doses elevadas. Rossato e colaboradores (2011a) investigaram o perfil cardiotoxico da *p*-sinefrina em um modelo *in vitro* e constataram uma baixa toxicidade. Entretanto, Schmitt (2012) encontrou sinais de neurotoxicidade, danos hepáticos, renais e ocorrência de estresse oxidativo ao realizar uma avaliação toxicológica em camundongos da mistura de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína. Esses resultados sugerem que os efeitos tóxicos da *p*-sinefrina estão possivelmente relacionados ao seu uso simultâneo com outras substâncias estimulantes.

No período de janeiro de 1998 a fevereiro de 2004 o órgão regulatório *Health Canada* registrou 16 casos de produtos contendo extratos de *C. aurantium* ou *p*-sinefrina suspeitos de causar sintomas cardiovasculares graves. Após esse relato, o *Health Canada* proibiu o uso de *p*-sinefrina em suplementos alimentares no Canadá e a Agência Mundial Anti-doping (*World Anti-doping Agency - WADA*) incluiu a *p*-sinefrina no programa de vigilância desde 2009 (ROSSATO et al., 2011b).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi aprofundar o estudo do perfil toxicológico subcrônico da associação de *p*-sinefrina com efedrina, salicina e cafeína, realizando análise comparativa entre a toxicidade observada com a administração da associação dessas substâncias e a toxicidade observada com a administração isolada de cada uma destas, bem como uma avaliação histopatológica em ratos machos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade subcrônica de padrões de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína, isolados e em associação, em ratos machos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade subcrônica da associação de salicina com cafeína, efedrina e *p*-sinefrina, bem como a toxicidade subcrônica dessas substâncias isoladamente em ratos machos.
- Analisar a toxicidade hepática, cardíaca e renal por determinação sérica de transaminases (aspartato e alanina aminotransferase), creatina quinase (CK), creatinina, proteínas totais e uréia em ratos machos, tratados com salicina, cafeína, efedrina e *p*-sinefrina, em associação e isoladamente.
- Avaliar os efeitos da salicina, cafeína, efedrina e *p*-sinefrina, em associação e isoladamente, sobre a atividade locomotora dos ratos através do teste da atividade locomotora espontânea.
- Analisar histopatologicamente os órgãos (fígado e rins) após tratamento subcrônico com salicina, cafeína, efedrina e *p*-sinefrina, em associação e isoladamente.

3. REVISÃO

3.1 OBESIDADE

A obesidade é um problema de saúde pública e é considerada uma epidemia mundial. Sua etiologia está relacionada com inúmeros fatores como idade, predisposição genética, características psicológicas, consumo de alimentos altamente calóricos e sedentarismo (MARQUES et al., 2015).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a obesidade é definida como o acúmulo em excesso de gordura corporal representando um grande risco para saúde. Ao longo do tempo, este excesso de peso contribui para o desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (HARBILAS et al., 2012).

Desde 1980, o número de indivíduos obesos tem dobrado em todo o mundo. Em 2014 mais de 1,9 bilhões de adultos com idade de 18 anos ou mais estavam acima do peso e destes 600 milhões eram obesos (WHO, 2016). Os Estados Unidos se destacam pela elevada e crescente prevalência da obesidade. Em 2010 o país apresentava um índice de adultos obesos de 31,2%. Segundo um estudo conduzido pela OMS, em 2014 esse índice aumentou para 33,7%. Com relação ao Brasil, em 2010 o número de adultos obesos era de 17,8% e, em 2014, passou para 20%. Em 2014, o índice de obesidade foi maior em mulheres do que em homens (22,7% comparado a 17,3%, respectivamente) (WHO, 2015).

O rápido crescimento dos índices de obesidade no mundo resultou em um aumento na procura e no uso de formulações a base de plantas medicinais classificadas como suplementos alimentares e compostos emagrecedores. Tais formulações são amplamente utilizadas por possuírem um mitológico estigma de segurança, pois sendo substâncias naturais ajudariam na perda de peso sem causar alterações e danos no organismo (SCHMITT, 2012; VERPEUT et al., 2013).

3.2 SUPLEMENTOS ALIMENTARES E COMPOSTOS EMAGRECEDORES

Os suplementos alimentares são produtos que apresentam em suas formulações ingredientes como vitaminas, minerais, ervas, aminoácidos, enzimas e são comercializados na forma de comprimidos, cápsulas, pós e líquidos (FDA, 2016). O consumo desses produtos aumentou em todo o mundo nas últimas décadas e no Brasil o uso de suplementos alimentares varia de 20 a 94%. A maioria dos estudos relacionados com o seu uso envolve atletas ou pessoas fisicamente ativas, sendo estes os principais consumidores. Atualmente, os produtos naturais representam uma opção cada vez mais popular para ajudar a tratar a obesidade. No Brasil, mais de 90% da população já fez uso de plantas medicinais e com isso a indústria de fitoterápicos fatura em torno de 1 bilhão de reais por ano (CERCATO et al., 2015; NEVES, CALDAS, 2015).

Com o crescimento exponencial do consumo destes produtos, o FDA em 1998 divulgou um material contendo informações sobre os riscos à saúde humana associados ao uso de suplementos a base de plantas. Foram destacados aqueles que continham efedrina, por apresentar vários efeitos adversos entre eles problemas cardíacos, hipertensão e até a morte (SCHMITT, 2012). Em abril de 2004 o FDA nos Estados Unidos proibiu a venda destes produtos, entretanto, no Brasil as formulações a base de efedra ou efedrina não foram proibidas, mas fazem parte da lista de substâncias precursoras de entorpecentes e/ou psicotrópicas e sua comercialização está sujeita a controle especial (BRASIL, 2015).

Após a proibição, extratos da planta *Citrus aurantium* L., que contém como principal componente ativo *p*-sinefrina, estavam sendo utilizados como um substituto da efedrina em muitos destes produtos denominados “*ephedra-free*” (HANSEN et al., 2012). Esta substituição em formulações emagrecedoras foi baseada na ação da *p*-sinefrina no metabolismo através de uma provável indução da lipólise por ativação dos receptores β 3-adrenérgicos. Por outro lado, a analogia estrutural da *p*-sinefrina com a efedrina sugere que os suplementos “*ephedra-free*” podem também apresentar o

mesmo potencial de desenvolver a toxicidade promovida pela efedrina, justificando estudo de segurança e eficácia (ARBO, 2008; ROSSATO et al., 2011b; SCHMITT, 2012; MEDANA et al., 2013).

A composição das formulações de suplementos alimentares e compostos emagrecedores é bem variável e, portanto, muitos contêm *p*-sinefrina associada com diversos tipos de substâncias, dentre as mais frequentes estão cafeína, salicina e efedrina com o objetivo de tornar os produtos mais eficazes e com melhor desempenho. Além disso, a literatura científica relata a existência de um problema potencial relacionado à adulteração em suas formulações. As substâncias mais utilizadas são os esteroides, estimulantes, anorexígenos e substâncias para disfunção erétil. Essa possibilidade de variações e adulterações permite uma diversidade de produtos no mercado e conseqüentemente o aumento no risco para a saúde dos consumidores (SCHMITT, 2012; NEVES, CALDAS, 2015).

3.3 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE *P*-SINEFRINA, EFEDRINA, CAFEÍNA E SALICINA

3.3.1 *Citrus aurantium* (RUTACEAE) E *P*-SINEFRINA

Citrus aurantium L. é o nome botânico de uma árvore comumente conhecida como laranja-amarga, laranja-azedo, laranjeira-de-Sevilha e na medicina tradicional chinesa, seus frutos imaturos são conhecidos como “zhishi”. (RODRIGUES et al., 2013). É uma planta pertencente à família Rutaceae, cujos extratos dos frutos têm sido utilizados para o tratamento da obesidade. Os componentes ativos mais importantes presentes em seus frutos são os alcaloides fenetilamina, incluindo octopamina, tiramina, n-metiltiramina, hordenina e, sobretudo, *p*-sinefrina (PELLATI et al., 2012).

A *p*-sinefrina atua como um agonista adrenérgico e possui três isômeros de posição: *orto*, *meta* e *para* (Figura 1). O isômero *o*-sinefrina não é utilizado como um

agente farmacológico e sua presença na natureza não tem sido documentada. Alguns estudos relatam a presença de *m*-sinefrina em *C. aurantium* enquanto outros afirmam que apenas a *p*-sinefrina pode ser encontrada na planta (ROSSATO et al., 2010a). A luz do conhecimento atual, entendemos que apenas a *p*-sinefrina esteja presente na planta, como produto do metabolismo vegetal.

A ação farmacológica dos isômeros *para* e *meta* está relacionada com a ativação dos diferentes receptores, alfa e beta-adrenérgicos. A ativação dos receptores α_1 promove o relaxamento da mucosa gastrintestinal, aumento da secreção salivar, glicogenólise hepática e principalmente a contração do músculo liso, produzindo um efeito vasoconstritor e aumentando a pressão arterial. Devido a esse efeito, a *p*-sinefrina é comercializada como um medicamento utilizado no tratamento da hipotensão. Já a *m*-sinefrina, também denominada fenilefrina, é considerada um agente α -adrenérgico mais potente que o isômero *para* e possivelmente pode ser considerado o responsável pelos efeitos adversos dos suplementos alimentares e compostos emagrecedores a base de sinefrina. Os receptores α_2 quando ativados causam agregação plaquetária, contração vascular e inibição da secreção de insulina. Como medicamento, a *m*-sinefrina tem sido utilizada principalmente como princípio ativo de descongestionante nasal (ROSSATO, 2010b).

Com relação à ativação dos receptores β -adrenérgicos, o receptor β_1 causa o aumento da taxa cardíaca e da força de contração, enquanto que o β_2 promove dilatação dos brônquios e dos vasos sanguíneos, além de glicogenólise hepática. Os receptores β_3 , por sua vez, estão presentes no tecido adiposo e a sua estimulação inicia a lipólise pelo aumento da termogênese, mecanismo pelo qual está associado a promoção do emagrecimento (ROSSATO, 2010b).

Quimicamente, apenas duas características distinguem a *p*-sinefrina da efedrina: um dos carbonos do anel é hidroxilado e um dos grupos metila da cadeia lateral é substituído por hidrogênio (Figura 1) (SCHMITT, 2012). Alguns autores afirmam que essa diferença estrutural proporciona uma possível mudança em suas relações

estrutura-atividade, ligação ao receptor e propriedades farmacológicas (HONG et al., 2012).

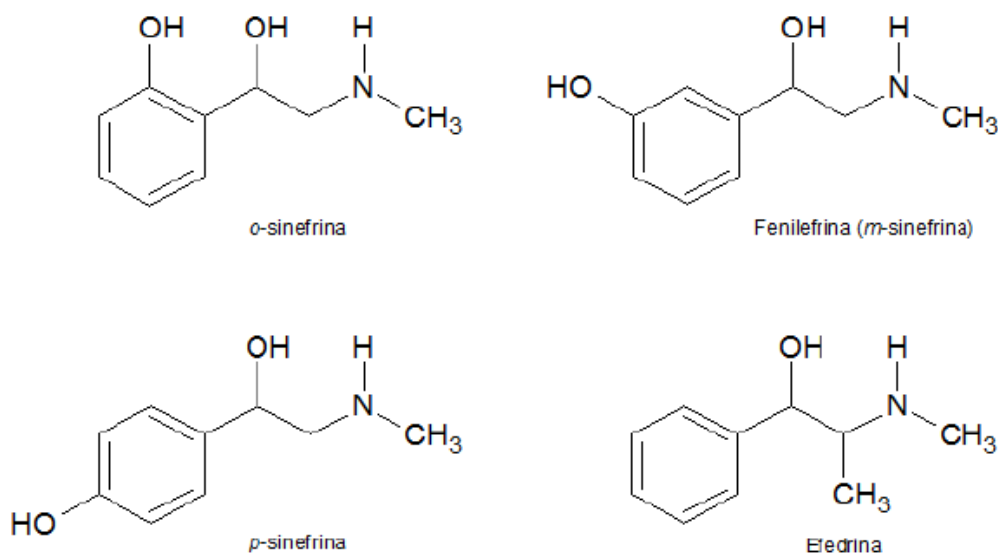


Figura 1: Estruturas químicas dos isômeros posicionais da sinefrina (*orto*, *meta* e *para*) e da efedrina.

3.3.2 EFEDRINA

A efedrina é o principal alcaloide extraído do caule e folhas da planta do gênero *Ephedra* também conhecida por Ma Huang. Ela foi isolada pela primeira vez no final do século 19 como um cloridrato e sintetizada pela primeira vez em 1920 no Japão e, em seguida, passou a ser produzida e comercializada pela empresa Merck (SCHMITT, 2012; LACCOURREYE et al., 2015).

Considerada uma amina simpatomimética, possui propriedades estimulantes no SNC atuando como agonista não seletivo dos receptores adrenérgicos. Quimicamente, é considerada uma feniletilamina, sendo denominada (1*R*,2*S*)-2-metilamino-1-fenilpropan-1-ol, pertencendo ao 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). Sua vasta utilização em

suplementos alimentares e compostos emagrecedores está associada a suposta ação termogênica (SCHMITT, 2012; JIA et al., 2013).

Devido a essas propriedades farmacológicas, a efedrina também é utilizada em produtos farmacêuticos como descongestionantes nasais e broncodilatadores para o tratamento de rinites, sinusites e asma (MARTINDALE, 2005). Porém, como a sua atividade simpatomimética é inespecífica, também exerce efeitos sobre o débito cardíaco e aumento da pressão arterial (SCHMITT, 2012).

3.3.3 CAFEÍNA

A cafeína é uma substância psicoativa mais consumida e sua popularidade tem sido atribuída a suas propriedades estimulantes. É estruturalmente conhecida como 1,3,7- trimetilxantina (Figura 2), naturalmente presente em mais de 60 espécies de plantas. As principais formas de consumo da cafeína são através do chá das folhas da planta *Thea sinenses* L. e das sementes do café (*Coffea* sp.). Além disso, a cafeína também pode ser encontrada em produtos contendo cacau, bem como em vários medicamentos e suplementos alimentares (SCHMITT, 2012; DIAS et al., 2015).

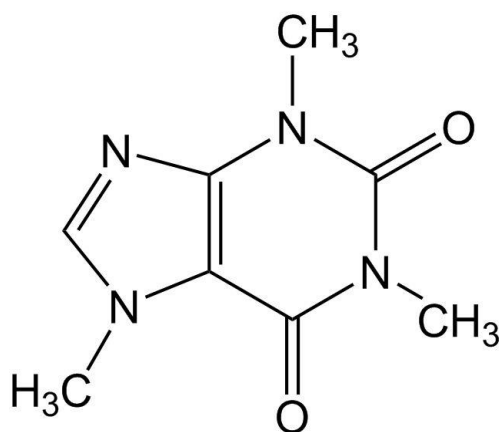


Figura 2: Estrutura química da cafeína.

Seu principal mecanismo de ação é o antagonismo dos receptores da adenosina. A adenosina age como redutora da frequência cardíaca, pressão arterial e da

temperatura corporal devido à inibição da liberação de noradrenalina. Antagonizando esses efeitos, a cafeína causa um aumento da liberação de noradrenalina, a ativação espontânea dos neurônios noradrenérgicos e conseqüentemente a lipólise (SCHMITT, 2012; DIAS et al., 2015).

A cafeína é facilmente absorvida por via oral em seres humanos, apresentando aproximadamente 100% de biodisponibilidade e atingindo uma concentração plasmática máxima no prazo de 15-45 min após a ingestão. Enquanto o consumo moderado de cafeína é geralmente visto como uma prática relativamente positiva para a saúde, existem vários estudos que indicam que quando ingerido em quantidades excessivas, pode causar vários efeitos deletérios à saúde como doença cardíaca coronariana, bem como distúrbios reprodutivos e psiquiátricos (DIAS et al., 2015).

3.3.4 SALICINA

A existência de glicosídeos fenólicos tem sido conhecida por muitos anos. O primeiro a ser extraído e isolado foi a salicina (Figura 3) em 1928 a partir da casca do salgueiro-branco (*Salix alba* L.). Essas substâncias são de grande interesse para uso medicinal devido as suas diversas atividades biológicas, entre elas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (STEPANOVA et al., 2014).

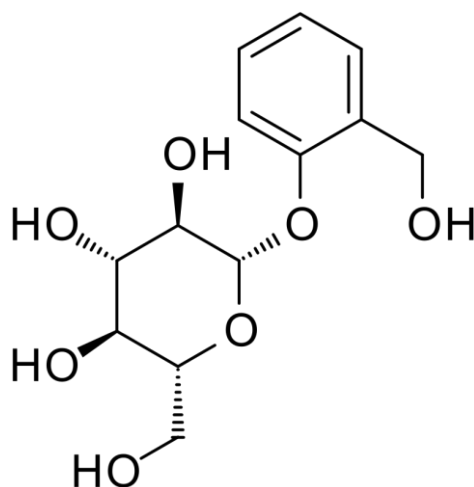


Figura 3: Estrutura química da salicina

A importância do uso da salicina na área farmacêutica é destacada principalmente por ser um composto precursor para a síntese de ácido acetilsalicílico utilizado para o tratamento de resfriados febris moderados e infecções (influenza), doenças reumáticas agudas e crônicas, cefaleias e dores causadas por inflamações (DIOGO et al., 2008).

Após a ingestão oral da salicina, a mesma sofre hidrólise no fígado a álcool salicílico o qual é oxidado a ácido salicílico. Em reação de fase II, o ácido salicílico é transformado em ácido salicílico e ácido gentísico, os quais são secretados na urina na forma de glicuronídeos (SCHMITT, 2012).

Acredita-se que o uso de salicilatos em formulações emagrecedoras e termogênicas seja devido à possibilidade de potencialização do efeito de outras substâncias, prolongando o efeito de ação da efedrina, *p*-sinefrina e cafeína (SCHMITT, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PADRÕES E REAGENTES

Foram utilizados padrões de (\pm)-*p*-sinefrina (99%) adquirido da MP Biomedicals® (California, USA), cloridrato de efedrina (99,5%) da Sigma Aldrich® (St Louis, USA), cafeína (99%) da Merck® (Darmstadt, Alemanha) e salicina (99%) da Fluka Biochemika (Suíça). Todos os padrões foram dissolvidos em água purificada através do sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). Para análise de parâmetros bioquímicos séricos foram utilizados Kits comerciais da Bioclin® (Minas Gerais, Brasil).

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), sob o número 27952.

Para a definição do tamanho da amostra foram usadas todas as estratégias que visam minimizar o número de animais usados em cada experimento. O ensaio de toxicidade subcrônica foi adaptado do protocolo 407 (Doses Repetidas – 28 dias) da *Organization for Economic Cooperation & Development* (OECD, 1995).

4.3 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos de 60 dias (ração e água "*ad libitum*"), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animal de Laboratório da UFRGS (CREAL-UFRGS). Antes de iniciar os experimentos, os animais foram adaptados por 15 dias no biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) – UFRGS, mantidos em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm) (4/por caixa) com livre acesso a água e alimento em ciclos de claro/escuro de 12h (7 – 19h), em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade monitorada. Os ratos foram alocados em seis grupos de 8 ratos.

4.4 TESTE DE TOXICIDADE SUBCRÔNICA

Os animais foram tratados por via oral (gavagem) diariamente durante 28 dias, sendo um grupo controle tratado com água, e os demais com salicina 6 mg/kg, cafeína 80 mg/kg, efedrina 4 mg/kg e *p*-sinefrina 10 mg/kg, isoladamente, e outro grupo com a associação das quatro substâncias em estudo *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína (10:4:6:80) na dose de 100 mg/kg mimetizando formulações comerciais de suplementos alimentares e compostos emagrecedores. O volume de administração foi de 10 ml/kg. Alterações comportamentais e variação de massa corporal foram verificadas diariamente.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA

A avaliação da atividade locomotora espontânea foi realizada no 28º dia antes da administração diária dos tratamentos. Os animais foram colocados em caixa de atividade locomotora (*Insight Equipamentos Ltda.*), a qual consiste em uma caixa de 50 x 48 x 50 cm, dotada de seis barras, cada uma com 16 sensores de luz infravermelha que detectam a posição relativa do animal na caixa. Os parâmetros monitorados foram a distância percorrida e a velocidade de movimentação dos animais, sendo os 5 min iniciais considerados atividade exploratória e os 10 min finais a atividade locomotora.

4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA MEDIDAS BIOQUÍMICAS

No 29º dia os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com a associação de tiopental (50 mg/kg) e lidocaína (10 mg/ml), eutanasiados e necropsiados. Sob anestesia os animais foram exsanguinados por punção da veia cava caudal e posteriormente, os órgãos foram removidos, limpos de tecidos adjacentes e avaliados quanto à massa relativa (em relação à massa corporal) e histopatologia (hepática e

renal). O sangue coletado foi transferido para um tubo contendo heparina, centrifugado, e o plasma foi transferido para um novo tubo para em seguida ser congelado, a fim de realizar análise bioquímica. Foram respeitadas as normas do CONCEA, garantindo que o procedimento foi realizado em ambiente propício, sem a presença de outros animais (vivos ou mortos), com a contensão usual, por profissional treinado, com a presença de Médico Veterinário e de forma rápida.

4.7 ANÁLISE BIOQUÍMICA: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE HEPÁTICA, CARDÍACA E RENAL

Na avaliação da toxicidade subcrônica, as funções hepática, cardíaca e renal foram, realizadas através da utilização de kits para determinação sérica de transaminases (aspartato e alanina aminotransferase), creatina quinase (CK), creatinina, proteínas totais e ureia em ratos machos, tratados com salicina, cafeína, efedrina e *p*-sinefrina, em associação e isoladamente.

4.8 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os órgãos fígado e rim, depois de fixados em formol, foram embebidos em parafina e seccionados a 3 μ m. Os fragmentos foram montados sobre lâminas, fixados com xilol, corados em hematoxilina/eosina e observados em microscópio óptico a 40, 100 e 400x.

Os parâmetros histopatológicos do fígado e rim foram avaliados quanto à presença de infiltrado inflamatório, vacuolização e tumefação celular, congestão vascular, degeneração hidrópica, aumento dos sinusóides e aumento do espaço da cápsula de Bowman.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados em média e erro padrão da média, proporções e as variáveis que apresentaram distribuição normal, foram analisadas pelos testes de ANOVA de uma via, ANOVA de medidas repetidas, seguidos pelo teste de Bonferroni, quando indicado. Os resultados da análise histopatológica foram expressos em porcentagem e analisados através do teste Qui-quadrado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi realizada a avaliação toxicológica das substâncias *p*-sinefrina, efedrina, cafeína e salicina na forma isolada, bem como em associação. Essas substâncias são amplamente utilizadas em diversos produtos emagrecedores consumidos em todo o mundo. A avaliação toxicológica subcrônica demonstrou um perfil toxicológico considerável, sendo possível observar várias alterações fisiológicas *in vivo*.

Durante os 28 dias de tratamento, não foram observados sinais clínicos de toxicidade nos animais dos diferentes tratamentos, bem como não ocorreram óbitos. A massa corporal apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) nos dias 21 e 28 do grupo tratado com cafeína quando comparados com o grupo controle. Já nos dias 14, 21 e 28 ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) da massa corporal no grupo tratado com *p*-sinefrina quando comparado com os grupos efedrina, salicina, cafeína e associação (Figura 4).

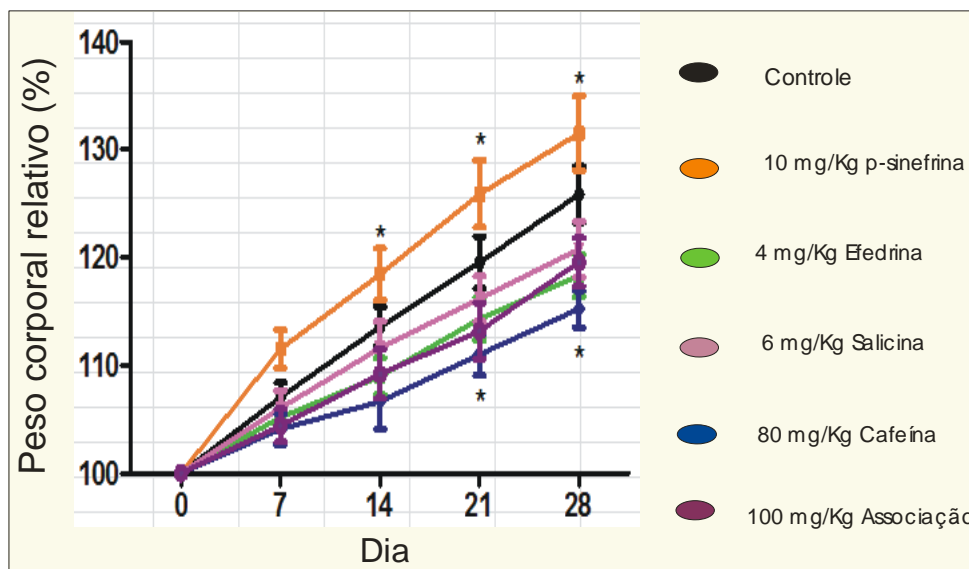


Figura 4: Ganho de peso corporal relativo em ratos machos após 28 dias de tratamento com 10 mg/kg de *p*-sinefrina, 4 mg/kg de efedrina, 6 mg/kg de salicina, 80 mg/kg de cafeína e 100 mg/kg da associação de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína (10:4:6:80 w/w). Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média ($n = 8$). * Significativamente diferente do grupo controle por medida repetida ANOVA / Bonferroni.

De uma forma geral, a popularidade do uso de *p*-sinefrina em suplementos alimentares e compostos emagrecedores está relacionada as suas possíveis ações

ergogênicas associada a uma provável ativação dos receptores β 3-adrenérgicos levando ao aumento da taxa metabólica, lipólise e redução da ingestão de alimentos (RATAMESS et al., 2015).

Em trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa, Arbo e colaboradores (2009b) avaliaram a toxicidade subcrônica de extrato seco de *C. aurantium* e *p*-sinefrina em camundongos. Os animais foram tratados por via oral nas doses de 400, 2000 e 4000 mg/kg de extrato de *Citrus aurantium* e 30 e 300 mg/kg de *p*-sinefrina isolada (sem associações). Os estudos do extrato e *p*-sinefrina isolada revelaram redução no ganho de massa corporal em todos os animais tratados sugerindo um resultado positivo no que diz respeito à perda de peso. Entretanto, Schmitt e colaboradores (2012) realizaram uma avaliação toxicológica subcrônica por 28 dias consecutivos em ratos Wistar machos e fêmeas tratadas com mistura de padrões de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína, de modo a mimetizar a composição de suplementos alimentares comercializados, na proporção de 10:4:6:80 (100 mg/kg) nas doses de 50, 75, 100 e 150 mg/kg por via oral. O estudo da mistura revelou a ausência de alterações significativas na massa corporal dos animais, bem como não evidenciou perda de peso. No entanto, as fêmeas apresentaram um ganho de massa corporal demonstrando serem menos suscetíveis ao efeito do emagrecimento da mistura e mais suscetíveis aos efeitos tóxicos. Esse fato pode estar supostamente relacionado à diferença hormonal entre machos e fêmeas.

Em um estudo conduzido por Verpeut e colaboradores (2013), a administração aguda de extrato de *C. aurantium* (6% sinefrina) nas doses de 1-10 mg/kg em ratos machos não provocou a diminuição da ingestão de alimentos. Rodrigues e colaboradores (2013) investigaram o efeito do extrato de *C. aurantium* na farmacocinética do fármaco antiarrítmico amiodarona em ratos Wistar machos. Os animais que receberam o tratamento com o extrato (10% de sinefrina) por 14 dias na dose de 164 mg/kg por via oral apresentaram um aumento significativo na massa corporal. Em adição, Hansen e colaboradores (2012), avaliaram os efeitos fisiológicos em ratos do gênero feminino de dois extratos de *C. aurantium*, um contendo 6% de *p*-sinefrina e outro contendo 95% da mesma. Foram administradas, por via oral, doses de

10 mg/kg e 50 mg/kg de *p*-sinefrina em 28 dias apresentando como resultado a ausência de alteração relacionada com perda de massa ou diminuição do consumo de alimento.

Nos achados apresentados neste trabalho, os animais que receberam o tratamento com *p*-sinefrina 10 mg/kg mostraram aumento significativo no ganho de massa corporal. Ao relacionarmos os resultados obtidos com os relatados, possivelmente doses mais altas de *p*-sinefrina sejam necessárias para promoção do emagrecimento, entretanto isto pode potencializar os efeitos tóxicos, sobretudo em associações. Por outro lado, os possíveis mecanismos de ação ergogênicos da substância *p*-sinefrina que envolve o aumento do gasto de energia e débito cardíaco através da estimulação do SNC, possivelmente explicam o resultado oposto do esperado, pois para compensar tal efeito, os animais podem ter aumentado sua ingestão de alimento.

No que diz respeito a presença de cafeína, os animais tratados com 80 mg/kg apresentaram uma perda de massa corporal significativa. Estudos experimentais e epidemiológicos sugerem que a cafeína pode ajudar na perda e na manutenção da massa corporal por vários mecanismos de ação sendo eles através do aumento da termogênese, oxidação lipídica e lipólise (SCHMITT, 2012). Entretanto, estudos *in vivo* com administração crônica de cafeína mostraram o desenvolvimento de hipertensão e doenças renais evidenciando uma possível relação sobre o aumento da secreção de renina através do antagonismo dos receptores de adenosina (FREDHOLM, 2011; OUEDRAOGO et al., 2012).

Kim e colaboradores (2016a) em um artigo de revisão, sugerem que através de um estudo *in vitro* é possível verificar uma ação inibitória da cafeína sobre a enzima fosfodiesterase, responsável pela degradação de AMPc convertendo-o em adenosina, com isso, os níveis de AMPc intracelular aumentam, resultando na promoção da lipólise. Observou-se também, que a ingestão de cafeína aumenta os níveis de circulação de adrenalina melhorando a biodisponibilidade de ácidos graxos para oxidação lipídica (JEUKENDRUP, RANDELL, 2011). Em um estudo *in vivo*, doses

de 10 mg e 50 mg/kg de cafeína, administradas por via oral, diminuíram significativamente o quociente de respiração (QR), possivelmente aumentando a oxidação lipídica (KIM et al., 2011).

Kim e colaboradores (2016a) mostraram que recentemente tem sido sugerido que a cafeína diminui o acúmulo intracelular de lipídios, inibe a captação de glicose induzida pela insulina em adipócitos de ratos e aumenta a lipólise. Estas suposições indicam que a cafeína pode desempenhar um papel importante na redução do acúmulo de lipídios, entretanto, seu envolvimento na adipogênese não foi claramente elucidado. Com base nessa hipótese, Kim e colaboradores (2016b) desenvolveram um estudo *in vitro* que possibilitou verificar o efeito da cafeína na inibição da adipogênese através da utilização de pré-adipócitos de linhagem celular 3T3-L1. As células foram incubadas em um meio de diferenciação adipogênica na presença de crescentes concentrações de cafeína (0, 0.1, 0.5, 1, 2 e 5 mM) por 8 dias resultando em uma inibição dose-dependente da diferenciação dos adipócitos, em que a supressão da diferenciação foi completa na dose de 5 mM. Além disso, a cafeína também inibiu a expressão da proteína ligante ao amplificador CCAAT (C/EBP α) e a ativação do receptor gama (PPAR γ) caracterizados como dois fatores de transcrição importantes na adipogênese. Com base nesses resultados podemos concluir que a cafeína supostamente reduz o tecido adiposo tanto por estimulação da lipólise quanto por inibição da adipogênese.

Por outro lado, a perda da massa corporal dos animais tratados com cafeína, pode também estar relacionada com seus efeitos tóxicos. Uma vez que a cafeína quando ingerida em quantidades excessivas manifesta efeitos tóxicos significativos como náuseas, taquicardia, hipertensão e arritmias (GURLEY et al., 2015).

No teste da atividade locomotora foi possível observar um aumento significativo ($p < 0,05$) desta no grupo tratado com a associação das substâncias *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína quando comparado com o grupo controle (Figura 5).

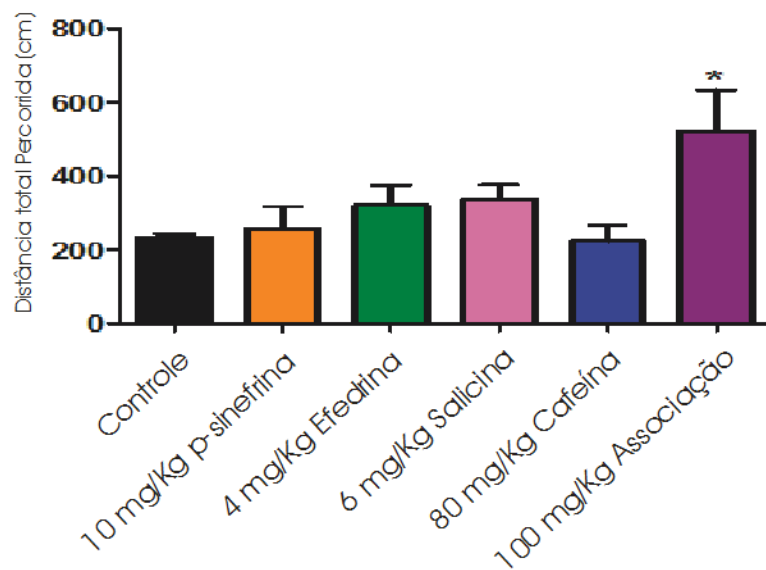


Figura 5: Distância total percorrida (cm) pelos ratos após 28 dias de tratamento com 10 mg/kg de *p*-sinefrina, 4 mg/kg de efedrina, 6 mg/kg de salicina, 80 mg/kg de cafeína e 100 mg/kg da associação de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína (10: 4: 6: 80 w/w). Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média (n = 8). * Significativamente diferente do grupo controle por ANOVA / Bonferroni.

Em resultados anteriores do grupo, Schmitt (2012) avaliou a toxicidade aguda em camundongos com a associação das mesmas substâncias estudadas e verificou que inicialmente houve uma redução na atividade locomotora, com posterior aumento e episódios de agitação, demonstrando em um primeiro momento efeitos tóxicos provocados pela estimulação adrenérgica e no segundo estágio os efeitos farmacológicos característicos para esse tipo de substâncias. Arbo (2008) avaliou a toxicidade aguda, por via oral, do extrato seco de *C.aurantium* (doses 300-5000 mg/kg) e *p*-sinefrina (doses 150-2000 mg/kg) e identificou uma diminuição na atividade locomotora tanto nos animais tratados com o extrato como com *p*-sinefrina. Recentemente, Acevedo e colaboradores (2016) demonstraram que devido à cafeína possuir uma ação bloqueadora não seletiva dos receptores de adenosina os roedores apresentam um aumento no comportamento locomotor. Esse efeito comportamental da cafeína mostra-se dose-dependente, ou seja, em doses baixas causa ativação comportamental e em doses elevadas causa supressão. Portanto, o conjunto dos resultados obtidos permite inferir que a associação de *p*-sinefrina com outras

substâncias estimulantes como a cafeína, salicina e efedrina pode supostamente ser responsável pelo efeito tóxico por estimulação adrenérgica excessiva.

No que tange à análise bioquímica, não foram encontradas alterações nos marcadores de função hepática, renal e cardíaca (Tabela 1), bem como nas avaliações macroscópicas dos órgãos vitais (Tabela 2).

Tabela 1: Parâmetros bioquímicos séricos dos ratos após 28 dias de tratamento com 10 mg/kg de *p*-sinefrina, 4 mg/kg de efedrina, 6 mg/kg de salicina, 80 mg/kg de cafeína e 100 mg/kg da associação de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína (10:4:6:80 w/w).

	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Proteínas totais (g/L)	TGO (U/mL)	TGP (U/mL)	CK-MB (U/mL)
Controle	52 ± 1.08	0.44 ± 0.017	5.87 ± 0.27	71.5 ± 4.34	51.0 ± 2.97	250.8 ± 23.2
10 mg/kg <i>p</i> -Sinefrina	49.5 ± 1.37	0.41 ± 0.008	5.95 ± 0.10	67.7 ± 1.94	44.3 ± 1.76	242.6 ± 21.5
4 mg/kg Efedrina	46.1 ± 5.42	0.39 ± 0.024	5.82 ± 0.17	78.6 ± 12.43	48.8 ± 5.24	343.1 ± 87.3
6 mg/kg Salicina	48.8 ± 2.54	0.42 ± 0.023	6.08 ± 0.13	70.3 ± 3.60	53.4 ± 3.96	206.6 ± 87.3
80 mg/kg Cafeína	35.8 ± 1.89	0.40 ± 0.012	5.64 ± 0.03	74.0 ± 2.65	48.1 ± 2.60	206.6 ± 13.9
100 mg/kg Associação	39.3 ± 2.63	0.56 ± 0.159	5.61 ± 0.17	71.5 ± 6.01	53.1 ± 3.78	214.1 ± 21.5

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n = 8).

Tabela 2: Parâmetros avaliados quanto à massa relativa de órgãos dos ratos após 28 dias de tratamento com 10 mg/kg de *p*-sinefrina, 4 mg/kg de efedrina, 6 mg/kg de salicina, 80 mg/kg de cafeína e 100 mg/kg da associação de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína (10: 4: 6: 80 w/w).

	Rim D	Rim E	Fígado	Adrenal D	Adrenal E	Pulmão	Coração	Baço
Controle	0,346 ± 0,014	0,338 ± 0,028	3,601 ± 0,172	0,005 ± 0,001	0,006 ± 0,0009	0,334 ± 0,0124	0,296 ± 0,015	0,237 ± 0,014
10 mg/kg <i>p</i> -sinefrina	0,361 ± 0,007	0,350 ± 0,008	3,537 ± 0,058	0,007 ± 0,0007	0,008 ± 0,0004	0,363 ± 0,013	0,293 ± 0,004	0,249 ± 0,007
4 mg/kg efedrina	0,358 ± 0,007	0,361 ± 0,014	3,411 ± 0,064	0,005 ± 0,0006	0,006 ± 0,0006	0,362 ± 0,018	0,293 ± 0,007	0,299 ± 0,023
6 mg/kg Salicina	0,346 ± 0,015	0,343 ± 0,010	3,471 ± 0,106	0,007 ± 0,0005	0,007 ± 0,0003	0,403 ± 0,028	0,296 ± 0,008	0,298 ± 0,032
80 mg/kg Cafeína	0,345 ± 0,006	0,341 ± 0,009	3,291 ± 0,058	0,007 ± 0,0005	0,007 ± 0,0002	0,382 ± 0,008	0,307 ± 0,007	0,257 ± 0,013
100 mg/kg Associação	0,366 ± 0,013	0,350 ± 0,014	3,595 ± 0,126	0,007 ± 0,0007	0,008 ± 0,0007	0,396 ± 0,0154	0,300 ± 0,003	0,261 ± 0,012

Não apresentou diferença significativa. Rim D p= 0,633; Rim E p= 0,860; Fígado p= 0,181; Adrenal D p= 0,153; Adrenal E p=0,64; Pulmão p= 0,178; Coração p= 0,737; Baço p= 0,181. ANOVA de uma via.

Esses achados convergem com resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, através da avaliação toxicológica subcrônica *in vivo* da associação de salicina, efedrina, *p*-sinefrina e cafeína realizada por Schmitt et al. (2012). Os resultados mostraram alterações oxidativas, renais e hepáticas em ratos machos, mas em ratos fêmeas não houve indicação de estresse oxidativo, e sim ocorrência de alterações hepáticas. Relatos da literatura indicam que o sexo é um fator supostamente envolvido

na injúria hepática induzida por drogas 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 (SCHMITT, 2012).

Com relação à análise histológica do fígado, os dados apresentados na Tabela 3 revelam que os animais do grupo controle (40%) apresentaram apenas uma leve tumefação celular. Enquanto no grupo tratado com *p*-sinefrina os animais manifestaram vacuolização celular (43%), tumefação celular (14%), congestão vascular (57%), degeneração hidrópica (71%) e alargamento dos sinusóides (14%). No grupo tratado com efedrina todos os animais apresentaram vacuolização celular e a maioria congestão vascular (71%), além de manifestarem tumefação celular (43%) e degeneração hidrópica (29%). Da mesma forma, nos animais do grupo salicina todos manifestaram a presença de vacuolização celular e a maioria congestão vascular (71%), além de tumefação celular (43%), degeneração hidrópica (29%) e alargamento dos sinusóides (29%). No grupo cafeína foi possível observar a presença de congestão vascular em todos os animais, além de vacuolização e de tumefação celular (86%), assim como alargamento dos sinusóides (14%). Todos os ratos tratados com a associação das substâncias manifestaram congestão vascular, além de vacuolização celular (67%), tumefação celular (17%) e de alargamento dos sinusóides (17%). Tanto a congestão vascular, quanto a vacuolização celular apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e o controle ($p < 0,05$ – Qui-quadrado), sendo que para tumefação celular a cafeína diferiu dos grupos tratados com *p*-sinefrina e com a mistura e para degeneração hidrópica, a *p*-sinefrina diferiu dos grupos controle, cafeína e mistura ($p < 0,05$ – Qui-quadrado).

Estes dados revelam uma possível hipertensão caracterizada pela congestão vascular, justificando o alargamento dos sinusóides, assim como alterações na dinâmica celular e conseqüentemente no seu equilíbrio.

Tabela 3: Análise histológica do fígado dos ratos após 28 dias de tratamento com 10 mg/kg de *p*-sinefrina, 4 mg/kg de efedrina, 6 mg/kg de salicina, 80 mg/kg de cafeína e 100 mg/kg da associação de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína (10: 4: 6: 80 w/w).

Grupo	N (6±1)	Vacuolização Celular *	Tumefação Celular *	Congestão Vascular *	Degeneração Hidrópica *	Alargamento Sinusóides
Controle	5	0% ^b	40% ^{a,b}	0% ^b	0% ^b	0%
<i>p</i> -sinefrina	7	43% ^a	14% ^b	57% ^a	71,4% ^a	14%
Efedrina	7	100% ^a	43% ^{a,b}	71% ^a	29% ^{a,b}	0%
Salicina	7	100% ^a	43% ^{a,b}	86% ^a	29% ^{a,b}	29%
Cafeína	7	86% ^a	86% ^a	100% ^a	0% ^b	14%
Mistura	6	67% ^a	17% ^b	100% ^a	0% ^b	17%

* Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$ – Qui-quadrado)

Na análise histológica dos rins (Tabela 4), o grupo controle apresentou vacuolização celular (40%) e aumento do espaço da cápsula de Bowman (20%). Nos animais tratados com *p*-sinefrina foi observada a manifestação de tumefação celular (43%) e aumento do espaço da cápsula de Bowman (29%), em níveis proporcionais ao grupo controle. Entretanto, no grupo efedrina ocorreu a presença de infiltrado inflamatório (43%), vacuolização celular (71%) e aumento do espaço da cápsula de Bowman (47%). No grupo salicina, os animais apresentaram infiltrado inflamatório (20%), vacuolização celular (71%) e aumento do espaço da cápsula de Bowman (71%). Já o grupo que recebeu tratamento com cafeína manifestou alterações na maioria dos animais, incluindo infiltrado inflamatório (47%), vacuolização celular (86%) e aumento do espaço da cápsula de Bowman (100%), além disso, os animais que receberam a associação apresentaram infiltrado inflamatório (16%), vacuolização celular (100%) e aumento do espaço da cápsula de Bowman (83%).

Todas as variáveis histológicas avaliadas nos rins manifestaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$ – Qui-quadrado), sendo o infiltrado inflamatório significativo nos grupos efedrina e cafeína em relação aos demais, a vacuolização celular significativamente diferente no grupo tratado com a mistura em relação aos dos grupos controle e *p*-sinefrina, além do aumento

significativo do espaço da cápsula de Bowman nos grupos tratados com a salicina, cafeína e com a mistura em relação ao grupo controle.

Estes dados também revelam uma possível vasoconstrição sustentada que gera redução dos capilares glomerulares e consequente aumento do espaço da cápsula de Bowman, assim como alterações na dinâmica celular e consequentemente no seu equilíbrio.

Tabela 4: Análise histológica dos rins dos ratos após 28 dias de tratamento com 10 mg/kg de *p*-sinefrina, 4 mg/kg de efedrina, 6 mg/kg de salicina, 80 mg/kg de cafeína e 100 mg/kg da associação de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína (10: 4: 6: 80 w/w).

Grupo	N (6±1)	Infiltrado Inflamatório *	Vacuolização Celular *	Aumento do Espaço da Cápsula de Bowman *
Controle	5	0% ^b	40% ^b	20% ^b
<i>p</i> -sinefrina	7	0% ^b	43% ^b	29% ^{a,b}
Efedrina	7	43% ^a	71% ^{a,b}	47% ^{a,b}
Salicina	7	20% ^{a,b}	71% ^{a,b}	71% ^a
Cafeína	7	47% ^a	86% ^{a,b}	100% ^a
Mistura	6	16% ^{a,b}	100% ^a	83% ^a

* Diferença significativa entre os grupos (p<0,05 – Qui-quadrado)

Tendo em vista o crescente consumo de suplementos alimentares à base de plantas destinadas para o tratamento da obesidade e redução de peso, muitas preocupações relacionadas aos seus aspectos de segurança têm sido questionadas, tais como os efeitos colaterais estão associados, sobretudo, ao sistema hepático, renal e cardiovascular (CHITTURI, FARREL, 2008). Estudos têm identificado produtos naturais como uma das principais causas de toxicidade hepática (LEE, et al., 2015). De acordo com Abdualmjid e Sergi (2013) existem relatos de casos de lesões no fígado como aumento das enzimas hepáticas, hepatite, necrose e cirrose associadas ao uso de produtos vegetais isolados ou em combinação com outras substâncias. Além disso, é igualmente conhecido que extratos de *C. aurantium* contendo *p*-sinefrina,

supostamente podem produzir efeitos sobre o sistema cardiovascular possivelmente através da estimulação adrenérgica (OLIVEIRA et al., 2014).

Considerando essa hipótese, os resultados das análises histológicas tanto no fígado como no rim mostraram a ocorrência de possível hipertensão caracterizado no fígado pela congestão vascular causando o alargamento dos sinusóides e nos rins pela redução dos capilares glomerulares aumentando o espaço na cápsula de Bowman. Tais alterações foram mais proeminentes principalmente nos grupos tratados com cafeína e mistura. Esses resultados podem estar relacionados com os principais mecanismos de ação da cafeína que ocorre através do antagonismo dos receptores de adenosina resultando no aumento da pressão arterial por vasoconstrição (SCHMITT, 2012). Gurley e colaboradores (2015) afirmam que a cafeína quando combinada com efedrina ou anfetaminas pode aumentar a probabilidade de reações adversas graves tais como arritmias cardíacas, infarto do miocárdio e crise hipertensiva.

A integridade funcional dos rins é vital para a homeostase do corpo em virtude do papel que desempenha na excreção de resíduos metabólicos, na síntese e na liberação dos hormônios renina e eritropoietina, bem como na regulação do volume dos fluidos extracelulares, na composição de eletrólitos e no equilíbrio acidobásico (KLAASSEN, WATKINS, 2012).

Hansen e colaboradores (2012) investigaram os efeitos cardiovasculares em ratos tratados por 28 dias com extratos de *C. aurantium*, *p*-sinefrina e cafeína, em associação. Como resultado a *p*-sinefrina mostrou efeitos mínimos sobre a frequência cardíaca e pressão arterial, enquanto que o extrato em associação revelou efeitos mais significativos sugerindo que outros componentes presentes no extrato tenham contribuído na alteração desses parâmetros fisiológicos. Entretanto, o aumento na frequência cardíaca e pressão arterial foram mais pronunciados nos grupos que receberam, concomitantemente, cafeína em seus tratamentos.

Segundo Rossato (2011b) a toxicidade cardíaca da *p*-sinefrina possivelmente pode ser agravada quando associada com outros estimulantes cardíacos. Dos casos de efeitos cardiovasculares graves que levaram a *Health Canada* a decretar a proibição do

uso de *p*-sinefrina para o tratamento da obesidade, apenas um se referia a um produto contendo o extrato de *C.aurantium* enquanto que em outros sete casos, a *p*-sinefrina estava associada à cafeína e em oito casos estava combinada com cafeína e efedrina. Dois indivíduos que ingeriram os suplementos com *p*-sinefrina, cafeína e efedrina foram a óbito por complicações cardíacas, demonstrando que essas associações podem potencializar significativamente os efeitos adversos.

Stohs e colaboradores (2012) realizaram uma revisão de estudos publicados e não publicados aplicados em seres humanos envolvendo o uso de extratos de *C.aurantium* e *p*-sinefrina, fornecendo informações relacionadas à segurança e à eficácia destes produtos amplamente utilizados. Foram analisados mais de 20 estudos envolvendo um total de 360 indivíduos que consumiram *p*-sinefrina isolada ou em combinação com outros ingredientes por 12 semanas. Mais de 50% dos indivíduos envolvidos estavam acima do peso ou eram obesos e aproximadamente dois terços desses consumiram cafeína (132-528 mg/dia) em conjunto com *p*-sinefrina (10-53 mg/dia). Aproximadamente 44% dos indivíduos consumiram um único produto contendo extrato de *C.aurantium* e *p*-sinefrina, enquanto que o restante utilizou um complexo com vários ingredientes além de *p*-sinefrina. Em geral os indivíduos que utilizaram apenas o extrato (*p*-sinefrina) isolado ou em combinação com outros ingredientes à base de plantas não manifestaram efeitos adversos significativos como aumento na frequência cardíaca, pressão arterial e alterações bioquímicas.

Oliveira e colaboradores (2014), sugerem que no fígado o extrato de *C.aurantium* pode comprometer a hemodinâmica, o metabolismo dos hidratos de carbono e o consumo de oxigênio. Para confirmar tal suposição, os autores realizaram um estudo em fígados de ratos em perfusão isolada para verificar os efeitos da *p*-sinefrina no metabolismo hepático. A infusão de *p*-sinefrina aumentou a pressão de perfusão bem como o consumo de oxigênio. Além disso, apresentou efeito catabólico (glicogenólise) e anabólico (gliconeogênese) que são mediados por ativação de receptores β ou α adrenérgicos com participação simultânea de íons cálcio (Ca^{2+}) e AMPc. Portanto, *p*-sinefrina pode ser considerada como um composto ativo sobre o metabolismo hepático e possivelmente ser responsável pelas alterações

hemodinâmicas que são desencadeadas através da estimulação dos receptores adrenérgicos presentes no fígado, corroborando com os resultados encontrados na análise histológica.

O estudo histológico também possibilitou verificar alterações na dinâmica e equilíbrio celular tanto nas células hepáticas como renais. Considerando que a *p*-sinefrina é uma amina de estrutura química similar a outros agonistas adrenérgicos como efedrina e anfetamina, Carvalho e colaboradores (2012) em um artigo de revisão citaram estudos *in vivo* evidenciando a presença de múltiplos focos de necrose celular no tecido hepático e numerosas microvesículas no citoplasma dos hepatócitos após a administração de MDMA (3,4 metilenodioximetanfetamina). De acordo com Pontes e colaboradores (2008), o consumo de MDMA pode levar a um aumento no teor de lipídios hepáticos provavelmente através da lipólise por ativação dos receptores β -adrenérgicos no tecido muscular esquelético e com isso, os níveis de circulação de ácidos graxos livres são aumentados e retomados pelo fígado, justificando possivelmente a formação dos vacúolos no citoplasma dos hepatócitos.

Outro relato importante afirmado por Carvalho e colaboradores (2012), está relacionado com a presença de necrose celular e infiltrado inflamatório no tecido hepático após a administração de doses repetidas de MDMA em um estudo realizado em ratos. Essa hepatotoxicidade pode estar associada com um aumento do índice de peroxidação lipídica e diminuição dos níveis de glutathiona. A suscetibilidade desses efeitos pode ser aumentada pela deficiência de antioxidantes, sugerindo assim que MDMA pode induzir estresse oxidativo no fígado (CARVALHO et al., 2012). Schmitt (2012) na avaliação toxicológica subcrônica *in vivo* da mistura de *p*-sinefrina, efedrina cafeína e salicina observou alterações nos marcadores bioquímicos e de estresse oxidativo, como por exemplo peroxidação lipídica, danos hepáticos e renais e redução dos níveis de GSH em ratos machos. Portanto, o fígado é um órgão alvo de toxicidade de drogas anfetamínicas e sabe-se que tanto *p*-sinefrina como efedrina são farmacologicamente relacionadas a esta classe de substâncias (FIRENZUOLI et al., 2005).

Em uma análise histopatológica realizada no rim de pacientes intoxicados com anfetamínicos em casos fatais foi demonstrada extensa degeneração tubular e necrose, edema intersticial e hemorragia, oclusão de pequenos vasos e infiltração de leucócitos da medula renal. Além disso, os anfetamínicos, por terem propriedades vasoconstritoras, predis põem a medula renal a isquemia e hipóxia. Embora não haja uma evidência clara dos efeitos nefrotóxicos dos anfetamínicos, o mecanismo responsável ainda precisa ser elucidado (CARVALHO et al., 2012).

De um modo geral, todas as informações registradas neste trabalho sugerem que os sinais de toxicidade causados através da ingestão de *p*-sinefrina, efedrina, salicina, cafeína e associação das mesmas estão possivelmente relacionados a diferentes mecanismos. Portanto, é crucial compreendermos todos os fatores envolvidos para assim estabelecermos estratégias preventivas e eficazes diminuindo os possíveis riscos à saúde dos consumidores.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PESPECTIVAS

Os animais que receberam o tratamento com *p*-sinefrina 10 mg/Kg mostraram um aumento significativo no ganho de massa corporal. No entanto, o tratamento com cafeína 80 mg/Kg produziu uma diminuição significativa da mesma. Esses resultados correlacionam com estudos experimentais e epidemiológicos que afirmam uma possibilidade da cafeína em facilitar a manutenção do peso corporal, bem como, a perda através do aumento da termogênese, oxidação de gordura e lipólise (COFFEY et al, 2004; LOPEZ-GARCIA, 2006).

Na análise histológica do fígado e rim foi possível verificar a presença de sinais de toxicidade nas células e alterações vasculares principalmente nos grupos tratados com cafeína 80 mg/kg e associação 100 mg/kg, indicando um possível efeito tóxico cardiovascular. Este resultado corrobora com os achados clínicos e relatos de acidentes toxicológicos ocorridos mundialmente, aumentando ainda mais a atenção sobre a utilização destes produtos.

De modo geral, os resultados obtidos justificam a continuidade dos estudos toxicológicos, com a realização de novas avaliações, incluindo estudos de duração mais longa, haja vista a utilização crônica destes produtos pelos consumidores, bem como realização de ensaios com fêmeas e estudos clínicos. O motivo dos resultados encontrados pelo grupo de pesquisa mostrarem perfis diferenciados entre machos e fêmeas justifica a realização de estudos que verifiquem a influência hormonal sobre a ação e sobre a toxicidade da mistura e das substâncias isoladas, sobretudo da ação do estrogênio, incluindo ensaios de atividade (anti) estrogênica, uma vez que estes compostos químicos podem interferir em rotas hormonais e alterar o ciclo menstrual, a fertilidade e o desenvolvimento embrionário. Além disso, avaliações histológicas são imprescindíveis para melhor entendimento dos órgãos afetados e consequentemente dos mecanismos envolvidos.

ABDUALMJID, R. J. & SERGI, C. Hepatotoxic Botanicals - An Evidence-based Systematic Review. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 3, pp. 376-404, 2013.

ACEVEDO, J. et al. Caffeine stimulates locomotor activity in the mammalian spinal cord via adenosine A1 receptor dopamine D1 receptor interaction and PKA dependent mechanisms. **Neuropharmacology**, v. 101, pp. 490-505, 2016.

ARBO, M. D. **Avaliação toxicológica de *p*-sinefrina e extrato de *Citrus aurantium* (Rutaceae)**. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

ARBO, M. D. et al. 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, n. 1, pp. 95-99, 2009a.

ARBO, M. D. et al. Subchronic toxicity of *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) extract and *p*-synephrine in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, n. 2, pp. 114-117, 2009b.

BRASIL. ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 8, de 13 de fevereiro de 2015**. Diário Oficial da União – Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil, 27 fev. 2015. Seção 39, pp. 112.

CARVALHO, M. et al. Toxicity of amphetamines: an update. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 8, pp. 1167-1231, 2012.

CERCATO, L. M. et al. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: is there potential for obesity treatment? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, pp. 286-296, 2015.

CHITTURI, S. & FARREL, G. C. Hepatotoxic slimming aids and other herbal hepatotoxins. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, n. 3, pp. 366-373, 2008.

DIAS, T. R. et al. Dose-dependent effects of caffeine in human Sertoli cells metabolism and oxidative profile: Relevance for male fertility. **Toxicology**, v. 328, n. 3, pp. 12-20, 2015.

DIOGO, H.P., PINTO, S. S., RAMOS, M. Relaxation behaviour of d(-)-salicin as studied by Thermally Stimulated Depolarisation Currents (TSDC) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, n. 1-2, pp. 192-197, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Dietary Supplements: What you Need to Know. US Food and Drug Administration, Washington**, 2016. Disponível em: <www.fda.gov/Food/DietarySupplements/UsingDietarySupplements/ucm109760.htm>. Acessado em 02/02/16.

FIRENZUOLI, F., GORI, L., CALAPAI, C. Adverse reaction to an adrenergic herbal extract (*Citrus aurantium*). **Phytomedicine**, v. 12, n. 3, pp. 247-248, 2005.

FREDHOLM, B. B. **Methylxanthines. Handbook of Experimental Pharmacology. Sweden**, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-13443-2>>. Acessado em 16/08/2016.

GURLEY, B. J., STEELMAN, S. C., THOMAS, S. L. Multi-ingredient, Caffeine-containing Dietary Supplements: History, Safety and Efficacy. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 2, pp. 275-301, 2015.

HANSEN, D. K. et al. Physiological effects following administration of *Citrus aurantium* for 28 days in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 261, n. 3, pp. 236-247, 2012.

HARBILAS, D. et al. *Populus balsamifera* L. (Salicaceae) mitigates the development of obesity and improves insulin sensitivity in a diet-induced obese mouse model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, pp. 1012-1020, 2012.

HONG, N. et al. *p*-Synephrine stimulates glucose consumption via AMPK in L6 skeletal muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 418, n. 4, pp. 720-724, 2012.

HUNTINGTON, M. K. & SHEWMARE, R. A. Weight-loss Supplements: What is the Evidence? **South Dakota Medicine**, v. 63, n. 6, pp. 205-207, 2010.

JEUKENDRUP, A. & RANDELL, R. Fat burners: nutrition supplements that increase fat metabolism. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 10, pp. 841-851, 2011.

JIA, J. J. et al. Ephedrine induced thioredoxin – 1 expression through β -adrenergic receptor/ cyclic AMP/ protein Kinase A/ dopamine – and cyclic AMP –regulated phosphoprotein signaling pathway. **Cellular Signaling**, v. 25, n. 5, pp. 1194-1201, 2013.

KIM, A. R. et al. Caffeine inhibits adipogenesis through modulation of mitotic clonal expansion and the AKT/GSK3 pathway in 3T3-L1 adipocytes. **BMB Reporter**, v. 49, n. 2, pp. 111-115, 2016b.

KIM, J. et al. Effects of oral caffeine and capsaicin administration on energy expenditure and energy substrates utilization in resting rats. **Journal of Exercise Nutrition**, v. 15, pp.183-189, 2011.

KIM, J., PARK, J., LIM, K. Nutrition Supplements to Stimulate Lipolysis: A Review in Relation to Endurance Exercise Capacity. **Nutritional Science and Vitaminology**, v. 62, n. 3, pp. 141-161, 2016a.

KLAASSEN, C. & WATKINS, B.J. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2ª ed., Porto Alegre: AMGH, pp. 460, 2012.

LACCOURREYE, O. et al. Benefits, limits and danger of ephedrine and pseudoephedrine as nasal decongestants. **European Annals of Otorhinolaryngology**, v. 132, pp. 31-34, 2015.

LEE, W. et al. Systematic review on herb-induced liver injury in Korea. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, pp. 47-54, 2015.

MACHADO, E. C., SILVEIRA, M. F., SILVEIRA, V. M. F. Prevalência de estratégias de emagrecimento e uso de substâncias para perder peso entre adultos: um estudo populacional. **Caderno de Saúde Pública**, v. 28, n. 8, pp. 1439-1449, 2012.

MARQUES, A. C. R. et al. Influência das Dietas Hipercalóricas sobre os Parâmetros de Obesidade, Dislipidemia e Hiperglicemia em Ratos. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 1, pp. 55-62, 2015.

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

MEDANA, C. et al. Study of the photocatalytic transformation of synephrine: a biogenic amine relevant in anti-doping analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, pp. 1105-1113, 2013.

NEVES, D. B. da J., CALDAS, E. D. Dietary supplements: international legal framework and adulteration profiles, and characteristics of products on the Brazilian clandestine Market. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, pp. 93-104, 2015.

OLIVEIRA, A. L. et al. The action of *p*-synephrine on hepatic carbohydrate metabolism and respiration occurs via both Ca²⁺ mobilization and camp production. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 388, pp. 135-147, 2014.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). **Guideline for the Testing of Chemicals, Revised Draft Test Guideline 407, Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. OECD, Paris, 1995.

OUEDRAOGO, M. et al. Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, pp. 492-512, 2012.

PEDRONI, J. L. et al. Prevalência de obesidade abdominal e excesso de gordura em escolares de uma cidade serrana no sul do Brasil. **Ciência&Saúde Coletiva**, v.18, n. 5, pp. 1417-1425, 2013.

PELLATI, F., CANNAZZA, G., BENVENUTI, S. Study on the racemization of synephrine by off-column chiral high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, pp. 3503-3510, 2012.

PONTES, H. et al. Chronic exposure to ethanol exacerbates MDMA-induced hyperthermia and exposes liver to severe MDMA-induced toxicity in CD1 mice. **Toxicology**, v. 252, pp. 64-71, 2008.

RATAMESS, N. A. et al. The effects of supplementation with *P-Synephrine* alone and in combination with caffeine on resistance exercise performance. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 12:35, pp. 1-11, 2015.

RODRIGUES, M., ALVES, G., FALCÃO, A. Investigation herb-drug interaction the effect of *Citrus aurantium* fruit extract on the pharmacokinetics of amiodarone in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, pp. 153-159, 2013.

ROSSATO, L. G. **A sinefrina e o seu potencial cardiotoxico. O uso no emagrecimento e metodologias para detectar a sinefrina** - Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Toxicologia Analítica Clínica e Forense, Universidade do Porto, Porto, 2010b.

ROSSATO, L. G et al. Synephrine: From trace concentrations to massive consumption in weight-loss. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, pp. 8-16, 2011b.

ROSSATO, L. G. et al. Structural isomerization of synephrine influences its uptake and ensuing glutathione depletion in rat-isolated cardiomyocytes. **Archives of Toxicology**, v. 85, pp. 929-939, 2011a.

ROSSATO, L. G. et al. Development and validation of a GC/IT-MS method for simultaneous quantitation of *para* and *meta*-synephrine in biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, pp. 721-726, 2010a.

SCHMITT, G. C. **Análise química e toxicológica de suplementos alimentares e compostos emagrecedores contendo *p*-sinefrina associada à efedrina, salicina e cafeína** - Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

SCHMITT, G. C. et al. Toxicological Effects of a Mixture Used in Weight Loss Products: *p*-Synephrine Associated with Ephedrine, Salicin, and Caffeine. **International Journal of Toxicology**, v. 31, n. 2, pp. 184-191, 2012.

STEPANOVA, E. V., BELYANIN, M. L., FILIMONOV, V. D. Synthesis of acyl derivatives of salicin, salirepin, and arbutin. **Carbohydrate Research**, v. 388, pp. 105-111, 2014.

STOHS, S. J., PREUSS, H. G., SHARA, M.A Review of the Human Clinical Studies Involving *Citrus aurantium* (Bitter Orange) Extract and its Primary Protoalkaloid *p*-Synephrine. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2011, pp. 1-9, 2012.

VERPEUT, J. L., WALTERS, A. L., BELLO, N. T. *Citrus aurantium* and *Rhodiolarosea* in combination reduce visceral white adipose tissue and increase hypothalamic norepinephrine in a rat model of diet-induced obesity. **Nutrition Research**, v. 33, pp. 503-512, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Health Observatory Data Repository**. Geneva. WHO, 2015. Disponível em: <<http://apps.who.int/gho/data/node.main.A900A?lang=en>>. Acessado em 02/02/16.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Media center: Obesity and overweight**. Geneva. WHO, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acessado em 01/02/16.

ANEXO A – Carta de aprovação do projeto no comitê de ética no uso de animais



U F R G S

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 27952

Título: ANALISE TOXICOLOGICA DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES E COMPOSTOS EMAGRECEDORES CONTENDO SALICINA, EFEDRINA, P-SINEFRINA E CAFEINA

Vigência: 03/09/2014 à 31/12/2016

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

RENATA PEREIRA LIMBERGER - coordenador desde 03/09/2014

MIRNA BAINY LEAL - coordenador desde 03/09/2014

MARCELO DUTRA ARBO - pesquisador desde 03/09/2014

Ana Cláudia Fagundes - Aluno de Mestrado desde 03/09/2014

Equipe Externa:

Eliane Dallegrave - pesquisador desde 03/09/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o projeto de pesquisa projeto de pesquisa 27952 intitulado “Análise toxicológica de suplementos alimentares e compostos emagrecedores contendo salicina, efedrina, p-sinefrina e cafeína”, em reunião realizada em 14/09/2015 - Sala 323 do Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 96 ratos Wistar, adultos (60 dias), sendo 48 machos e 48 femeas, Centro de Reprodução e Experimentação de Animal de Laboratório da UFRGS (CREAL-UFRGS), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 24 de Setembro de 2015

CRISTIANE MATTE
Coordenador da comissão de ética