

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ANÁLISE DE ESTIMULANTES EM SUPLEMENTOS
ALIMENTARES E PRODUTOS NATURAIS A BASE
DE PLANTAS COMERCIALIZADAS PARA FINS DE
EMAGRECIMENTO NO BRASIL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gabriela Mezzomo Zemolin

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**ANÁLISE DE ESTIMULANTES EM SUPLEMENTOS
ALIMENTARES E PRODUTOS NATURAIS A BASE DE
PLANTAS COMERCIALIZADOS PARA FINS DE
EMAGRECIMENTO NO BRASIL**

Gabriela Mezzomo Zemolin

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós -
graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em
Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Carine Viana Silva

Santa Maria, RS, Brasil
2015

**Universidade Federal de Santa Maria
Centra de ciências naturais e exatas
Programa de Pós-graduação em Química**

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de
Mestrado

**ANÁLISE DE ESTIMULANTES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES E
PRODUTOS NATURAIS A BASE DE PLANTAS COMERCIALIZADOS
PARA FINS DE EMAGRECIMENTO NO BRASIL**

elaborada por
Gabriela Mezzomo Zemolin

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho
(Presidente/Orientador)

Dr. Gustavo Tayar Peres (ANVISA)
(Banca examinadora)

Prof^a. Dr^a. Scheila Rezende Schaffazick (UFSM)
(Banca examinadora)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015

Dedico este trabalho àqueles que estiveram ao meu lado nesta caminhada. Principalmente aos meus pais, por me ensinarem a importância de buscarmos aquilo que verdadeiramente almejamos, e o quão digno é, mesmo frente a dificuldades e incertezas, concluirmos os compromissos que assumimos em nossa vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho, por ter me acolhido ainda na iniciação científica, e por ter permanecido meu orientador no mestrado. Obrigada por todo crescimento.

Aos meus pais, Carlos Alberto e Denise, por me incentivarem desde pequena a ter gosto pelo estudo e dar valor aos bons hobbies da vida. Eles foram essenciais para equilibrar minha mente, corpo e alma nesta etapa da vida. Obrigada pelo apoio constante em minhas decisões e pelo impulso em meus sonhos. Sou eternamente grata por nunca distanciarem esse “porto seguro” de mim. Amo vocês.

Ao meu irmão, João Alberto, anjo que Deus me deu. Obrigada por me mostrar sempre a importância de sorrir. A felicidade é o bem mais precioso que carregamos nesta vida, por isso continue enchendo a vida das pessoas ao teu redor com este sentimento lindo e nobre. Você é o maior presente da minha vida.

Ao meu companheiro Alexandre. Saiba que você é meu orgulho e meu exemplo em relação à pesquisa. Obrigada por todo amor e compreensão nesses anos ao meu lado, e pelo incentivo constante de me manter em meu foco.

Às minhas queridas, Ana Paula, Diana, Géssica, Larissa, Luciana, Mariele e Monique. Cada uma de vocês foi responsável por lapidar um pedacinho de mim, por isso hoje me sinto mais forte e completa. Muito obrigada por tornarem a minha rotina mais feliz.

A minha amiga Luciana Gobo, pela confiança e pelo forte laço de amizade neste percurso. Obrigada por acalmar meu coração sempre que precisei, e também por dividir comigo além de cervejas, músicas, filmes, livros, jantas e risos, tantas conversas e momentos de sabedoria a respeito da vida. Contigo por perto os dias se tornaram leves e cheios de alegria. Seja para sempre esse espírito livre, lindo e pleno que você é. No que depender de minhas preces, Bililim sempre guiará teus passos. Câmbio desligo.

As minhas queridas companheiras de apartamento, Luíza e Cristiane, por toda compreensão nos dias difíceis, pelas palavras de apoio e jantas deliciosas.

Aos meus amigos paranaenses de longa data Nicole, Ana Flávia, Marielly, Nayara e Ezídio, obrigada pela irmandade de sempre, mesmo longe.

Aos meus colegas que trouxe da graduação e levarei para o resto da minha vida Marcel e Quelen, sou grata pela convivência maravilhosa que tive com vocês nestes sete anos de estrada.

Aos meus iniciadores científicos Mateus, Janice e Francieli, obrigada por todo crescimento. Saibam que a amizade de vocês muito me motivou e fortaleceu até o presente momento.

Aos meus fiéis companheiros, de festas, Wagner, Vanderlei, Janine, Pedro, Dani, André, Luis Mário, Thais, Johnatan, Douglas, Adriano, Leonardo, Juliana, e Marcelo, foi muito bom ter vocês por perto.

Aos meus colegas do LACHEM pela convivência, amizade e lanches da tarde.
À CAPES pela concessão da bolsa.

Deus, obrigada pelo fortalecimento que cada obstáculo da vida me proporcionou, e por nunca me deixar sentir desamparada frente a eles. Anjo da guarda, obrigada por iluminar meus passos.

"Pessoas com vidas interessantes não têm fricote. Elas trocam de cidade. Sentem-se em casa em qualquer lugar. Investem em projetos sem garantia. Interessam-se por gente que é o oposto delas. Pedem demissão sem ter outro emprego em vista. Aceitam um convite para fazer o que nunca fizeram. Estão dispostas a mudar de cor preferida, de prato predileto. Começam do zero inúmeras vezes. Não se assustam com a passagem do tempo. Sobem no palco, tosam o cabelo, fazem loucuras por amor e compram passagem só de ida..."

Martha Medeiros

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

ANÁLISE DE ESTIMULANTES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES E PRODUTOS NATURAIS A BASE DE PLANTAS COMERCIALIZADOS PARA FINS DE EMAGRECIMENTO NO BRASIL

AUTORA: Gabriela Mezzomo Zemolin
ORIENTADOR: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho
Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015.

O forte apelo do mercado publicitário, aliado à busca por um corpo padrão e à melhora no desempenho físico faz com que a popularidade dos suplementos alimentares e a associação destes com outras terapias envolvendo compostos emagrecedores a base de plantas seja cada vez maior. A lei que isenta de registro os suplementos alimentares, os torna alvo de fácil importação, comercialização e consumo pela população em geral, agravando ainda a prática de adulteração sobre os mesmos. Logo, este trabalho teve como objetivos: pesquisar a presença de estimulantes em suplementos alimentares para fins de emagrecimento, estudar a incidência de cafeína sintética adicionada em produtos naturais à base de plantas utilizadas para perda de peso; desenvolver métodos cromatográficos empregando HPLC com detecção com arranjo de fotodiodos (DAD) para a determinação de cafeína, salicina, efedrina, hordenina, tiramina, octopamina e sinefrina (incluindo seus enantiômeros L e D). Os estimulantes foram separados por cromatografia de fase reversa em colunas de octadecilsilano (C_{18}) e os enantiômeros por cromatografia de par iônico com fase quiral de β ciclodextrina. Os limites de detecção (LD) variaram de $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ a $0,35 \text{ mg L}^{-1}$, já os limites de quantificação (LQ) ficaram na faixa de $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,16 \text{ mg L}^{-1}$ na separação dos estimulantes em suplementos alimentares. Para as análises de cafeína em produtos naturais a base de plantas, os LD e LQ foram $0,048 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,16 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente. Para os enantiômeros da *p*-sinefrina, o enantiômero L apresentou LD de $0,11 \text{ mg L}^{-1}$ e LQ de $0,36 \text{ mg L}^{-1}$, já o enantiômero D exibiu um LD de $0,41 \text{ mg L}^{-1}$ e LQ de $1,36 \text{ mg L}^{-1}$. Cada método desenvolvido foi posteriormente aplicado em amostras de suplementos alimentares ($n=47$), produtos naturais à base de plantas ($n=100$) e fruto de *Citrus aurantium*. Dos compostos estudados, a cafeína foi a que se apresentou mais frequente, muitas vezes excedendo os teores rotulados nos produtos, ou então a dose máxima recomendada por dia (420 mg). Já os suplementos alimentares apresentaram cafeína, sinefrina e efedrina como principais estimulantes em 53% das amostras estudadas.

Palavras chave: HPLC; Termogênicos; Suplementos alimentares; Sinefrina, Cafeína, *Citrus aurantium*

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

ANALYSIS OF STIMULANTS IN DIETARY SUPPLEMENTS AND PLANT-BASED NATURAL PRODUCTS MARKETED FOR WEIGHT LOSS IN BRAZIL

AUTHOR: Gabriela Mezzomo Zemolin
ADVISOR: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho
Santa Maria, February 27th, 2015

The strong advertising appeal, the search for a good physique, and the improvement in physical performance, has risen the popularity of food supplements and other therapies with slimming supplements based on plant extracts. Since the law exempts food supplements from registration, they are easy targets for importation, commercialization e consumption by the population, which worsens malpractice cases of adulterations. Thus, the objectives of the present work were: research the presence of stimulants in food supplements for both slimming and weight gain; study the addition of synthetic caffeine in natural products based on plants used for weight loss; develop chromatographic methods using HPLC with photodiode detection to detect caffeine, salicin, ephedrine, hordenine, tyramine, octopamine and synephrine (including the L and D enantiomers). The stimulants were separated by reverse phase chromatography using octadecylsilane columns (C₁₈). For L and D synephrine, chromatography with chiral phase of β-cyclodextrin was used. Detection limits varied from 0.02 mg L⁻¹ to 0.35 mg L⁻¹, while quantification limits ranged from 0.07 mg L⁻¹ to 1.16 mg L⁻¹ for the separation of stimulants in food supplements. For analyses of caffeine in herbal products, the LOD and LOQ were 0.048 mg L⁻¹ and 0.16 mg L⁻¹, respectively. For the analysis of the enantiomers of *p*-synephrine, the L enantiomer presented a detection limit of 0.11 mg L⁻¹ and quantification limit of 0.36 mg L⁻¹, while the D enantiomer exhibited a detection limit of 0.41 mg L⁻¹ and a quantification limit of 1.36 mg L⁻¹. Each method developed was then applied to the sample, which were, dietary supplement samples (n = 47), herbal products (n = 100), and fruits of *Citrus aurantium*. Caffeine was the most frequent of the studied stimulants, often exceeding the labeled content and the maximum dose per day recommended (420 mg). The food supplements presented caffeine, synephrine and ephedrine as main stimulants in 53% of the studied samples.

Key words:HPLC; thermogenic; Food supplements; Synephrine, Caffeine, *Citrus aurantium*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da anfetamina	31
Figura 2. Estrutura química da cafeína	33
Figura 3. Estrutura química da efedrina.....	34
Figura 4. Estrutura química da salicina.....	36
Figura 5. Fruto de <i>Citrus aurantium</i>	37
Figura 6. Estrutura química da sinefrina	38
Figura 7. Via biossintética para formação da sinefrina a partir de seus precursores.	39
Figura 8. Enantiômeros da p-sinefrina	41
Figura 9. Mecanismo de reconhecimento quiral de uma molécula com o cone truncado da ciclodextrina.....	42
Figura 10. Sistema cromatográfico utilizado no trabalho.	47
Figura 11. Esquema do preparo das amostras de suplementos alimentares	52
Figura 12. Esquema do preparo dos produtos naturais a base de plantas	53
Figura 13. Sistema de SPE utilizado para limpeza da amostra de fruto de <i>C. aurantium</i>	54
Figura 14. Representação dos espectros de absorção molecular dos estimulantes estudados.....	56
Figura 15. Gráfico demonstrando gradiente de fase móvel e de vazão utilizado no método otimizado para a determinação da octopamina, sinefrina, tiramina, hordenina, efedrina, salicina e cafeína.....	57
Figura 16. Cromatograma otimizado de acordo com o gradiente de vazão e solvente como exposto na Figura 15, em temperatura ambiente (24°C) com detecção em 222 nm e injeção 20µL.	58
Figura 17. Cromatograma A: Sibutramina. Cromatograma B: Femproporex. Anorexígenos não interferentes na análise de estimulantes. Gradiente de vazão e de fase móvel conforme Figura 15, em temperatura ambiente (24°C) com detecção em 222 nm e injeção 20µL.	63
Figura 18. Espectro de absorção da cafeína obtido pelo detector arranjo de fotodiodos no HPLC.	64

Figura 19. Gráfico demonstrando método isocrático aplicando gradiente de vazão para determinação de cafeína em produtos naturais a base de plantas.....	64
Figura 20. Cromatograma obtido para o padrão de cafeína, a partir da adaptação de método demonstrado na Figura 19, temperatura ambiente (24°C), injeção 20 µL, detecção em 220 nm.....	65
Figura 21. Cromatogramas sobrepostos das matérias primas frente ao método da cafeína para avaliar o parâmetro especificidade do mesmo. Método conforme Figura 19. Temperatura ambiente (24°C). Detecção em 220 nm. Injeção de 20 µL.....	67
Figura 22. Espectro da sinefrina obtido pelo detector arranjo de fotodiodos.....	68
Figura 23. Cromatograma obtido pela injeção do padrão de (±) p-sinefrina na condição água:metanol (40:60) como eluente, em fluxo de 0,7 mL L ⁻¹ , detecção em 255 nm. Coluna β ciclodextrina.....	69
Figura 24. Valores de pH testados em fase móvel água:metanol (40:60). Fluxo 0,9 mL min ⁻¹ . Detecção 255 nm em coluna de β ciclodextrina.....	70
Figura 25. Resolução (A) e fator de retenção (B) dos enantiômeros da (±) p-sinefrina de acordo com a temperatura.....	72
Figura 26. Cromatograma obtido do padrão (±) p-sinefrina após otimização do método. Eluente: 50% SDS 6 mM acidificado pH 4,0 com ácido fosfórico 50% metanol. Vazão 0,6 mL min ⁻¹ . Temperatura 20°C, Detecção 255 nm. Injeção 20 µL. Coluna β Ciclodextrina.....	73
Figura 27. Esquema demonstrativo das amostras de suplementos alimentares estudadas.....	81
Figura 28. Cromatograma referente à Amostra 34 (N) e sua respectiva fortificação: Presença de sinefrina e cafeína.....	83
Figura 29. Cromatograma referente à Amostra 12 (F) e sua respectiva fortificação: Presença de efedrina e cafeína.....	84
Figura 30. Cromatograma referente à amostra 46 (X). Presença de cafeína de dose não declarada e possível presença de DMAA (declarado em rótulo) em 9,7 min (não houve confirmação com adição de padrão nem espectro para o DMAA).....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de frequência absoluta das razões para o consumo de diferentes tipos de suplementos. Adaptado de Hirschbruch et al. (2008).....	20
Tabela 2. Ingredientes mais comuns encontrados em suplementos dietéticos para perda de peso. Adaptado de Dietary Supplements for Weight Loss Fact Sheet for Health Professionals, (2014).....	23
Tabela 3. Diferenças entre Medicamentos Fitoterápicos e Produtos Tradicionais fitoterápicos tratadas pela RDC 26/2014.....	30
Tabela 4. Metodologias empregadas para separação dos enantiômeros da (±) sinefrina.....	43
Tabela 5. pKa dos compostos trabalhados.....	45
Tabela 6. Método final otimizado e validado para sete estimulantes por HPLC com eluição por gradiente.....	49
Tabela 7. Método final otimizado e validado para cafeína por HPLC.....	50
Tabela 9. Tempo de retenção, faixa linear e faixa de trabalho para os padrões analisados.....	59
Tabela 10. Equação da reta e coeficiente de correlação, obtidos a partir da análise da faixa de trabalho em triplicata de cada estimulante.....	59
Tabela 11. Valores referentes ao LD e LQ de cada estimulante.....	59
Tabela 12. Precisão intradia e interdía dos estimulantes realizada em três níveis de concentração e em triplicata.....	61
Tabela 13. Faixa de recuperação obtida para os sete estimulantes durante os ensaios de exatidão.....	62
Tabela 14. Parâmetros de validação para o método da cafeína.....	66
Tabela 15. Parâmetros de validação para enantiômeros da p-sinefrina.....	74
Tabela 16. Amostras de suplementos alimentares analisados com as respectivas descrições, doses recomendadas em rótulo e nome comercial.....	75
Tabela 17. Amostras que apresentaram estimulantes em sua composição, teor do estimulante encontrado pelo método desenvolvido e teor que deveria estar presente (rotulado).....	80

Tabela 18. Teor de cafeína basal encontrado nas matérias primas utilizadas em produtos naturais	87
Tabela 19. Amostras de produtos naturais a base de plantas analisadas, com suas respectivas descrições e concentração de cafeína encontrada	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABESO** Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica
- ANVISA** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CCD** Cromatografia em Camada Delgada
- CDR** Reagente Derivatizante Quiral, do inglês Chiral Derivatizing Reagent
- CE** Eletroforese Capilar, do inglês Capillary Electrophoresis
- CFS** Cromatografia com Fluido Supercritico
- CMFA** Aditivo Quiral de Fase Móvel, do inglês Chiral Movel Phase Aditive
- CSP** Fase Estacionária Quiral, do inglês Chiral Phase Stacionary
- DPR** Desvio Padrão Relativo
- FDA** Food and Drug Administration
- FE** Fase estacionária
- FM** Fase Movel
- FFFB** Formulário de Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira
- GC** Cromatografia gasosa, do inglês Gas Chromatography
- HPLC** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês High Performance Liquid Chromatography
- INMETRO** Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- IFVA** Insumos Farmacêuticos Ativos Vegetais
- LC** Cromatografia Líquida, do inglês Liquid Chromatography
- LD** Limite de Detecção
- LQ** Limite de Quantificação
- MF** Medicamento Fitoterápico
- MS** Ministério da Saúde
- PTF** Produto Tradicional Fitoterápico
- RDC** Resolução da Diretoria Colegiada
- SDS** Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês Sodium Dodecyl Sulfato
- SPE** Extração em fase sólida, do inglês Solid Phase Extraction
- SVS** Secretaria de Vigilância Sanitária
- UV** Ultravioleta
- WHO** Organização Mundial da Saúde, do inglês World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO.....	17
2.1 Objetivos específicos:	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 Produtos para controle e perda de peso.....	18
3.1.1 Suplementos alimentares e legislação	19
3.2 Produtos Naturais a Base de Plantas e legislação.....	27
3.3 Aspectos Relevantes sobre Estimulantes.....	30
3.3.1 Cafeína	32
3.3.2 Efedrina	34
3.3.3 Salicina	36
3.3.4 <i>Citrus aurantium</i> e aminas biogênicas.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Reagentes, soluções e instrumentação	45
4.2 Rotina analítica dos métodos desenvolvidos	47
4.2.1 Preparo dos eluentes e do método aplicado para determinação dos sete estimulantes em suplementos alimentares	48
4.2.2 Preparo dos eluentes e do método aplicado para determinação da cafeína em produtos naturais a base de plantas.....	49
4.2.3 Preparo dos eluentes e do método aplicado para determinação da (\pm) <i>p</i> -sinefrina 50	
4.3 Suplementos alimentares	50
4.3.1 Amostragem	51
4.3.2 Preparo das amostras de suplementos alimentares.....	51
4.4 Produtos naturais a base de plantas	52
4.4.1 Amostragem	52
4.4.2 Preparo dos produtos naturais a base de plantas	52
4.5 Fruto <i>Citrus aurantium</i>.....	53
4.5.1 Amostragem	53
4.5.2 Preparo da amostra de fruto de <i>Citrus aurantium</i>	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55

5.1	Métodos desenvolvidos	55
5.1.1	Otimização do método para determinação de octopamina, sinefrina, tiramina, hordenina, efedrina, salicina e cafeína.	55
5.1.2	Otimização do método para determinação da cafeína na presença de outras aminas.....	63
5.1.3	Otimização do método para determinação dos enantiômeros da (\pm) <i>p</i> -sinefrina. 67	
5.2	Aplicação dos métodos desenvolvidos nas amostras	74
5.2.1	Suplementos alimentares	75
6.	CONCLUSÃO.....	95
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1. INTRODUÇÃO

A incidência de sobrepeso e obesidade que se constitui uma epidemia mundial (HALLER, 2004; WHO, 2009), aliada ao culto social à magreza, acaba gerando um consumo exacerbado de produtos emagrecedores. No Brasil, tem sido observado o uso abusivo de suplementos com propósito puramente ergogênico e estético, o que gera preocupação em termos de saúde pública, pois além da falta de informação da população frente a esses produtos (HERNANDEZ e NAHAS, 2009), eles são isentos de registro. Por isso, se tornam facilmente importados e comercializados (BRASIL, 2010; USA, 2010), tornando a prática de adulteração cada vez mais freqüente (CARVALHO et al., 2011a,b; CARVALHO et al., 2012; MOREIRA et al., 2013a; MOREIRA et al., 2014; CHO et al., 2014; SONG et al., 2014; USA, 2014;).

A comercialização desses suplementos é feita com diferentes designações e classificações, o que leva a um cenário regulatório inseguro e confuso tanto para o consumidor quanto para o setor regulado e os agentes da vigilância sanitária (BRASIL, 2014a). Por outro lado, produtos naturais a base de plantas, considerados terapia alternativa com embasamento científico pelo Ministério da Saúde desde 1981 pela Portaria 212 (BRASIL, 2011), primeiramente foram regulamentados pela Portaria 06/1995, hoje regulamentados pela RDC nº 26/2014, as quais contêm basicamente aspectos pertinentes ao registro de fitoterápicos industrializados. Já os fitoterápicos manipulados são regidos pela RDC nº 87/2008 (BRASIL, 2008), a qual define as boas praticas de manipulação dos mesmos.

No mercado atual, as formulações de suplementos e produtos naturais emagrecedores possuem uma composição inconstante. Além disso, não é raro a associação de *p*-sinefrina (*Citrus aurantium*), cafeína (*Paullinia cupana*, *Cola nítida*, *Cola acuminata*, *Camelia sinensis*), salicina (*Salix* sp.) e efedrina (Ma Huang, *Ephedra sinica*, *Sida cordifolia*) (SCHMITT, 2012). Apesar dessa última ser permitida no Brasil, é regulamentada pela portaria nº 344/1998 (BRASIL, 1998), e proibida em vários outros países (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004) devido aos severos efeitos adversos (HALLER e BENOWITZ, 2005; FUGH-BERMAN e MYERS, 2004). Neste contexto, a associação de compostos estimulantes como aminas adrenérgicas

simpaticomiméticas e metilxantinas pode se tornar bastante comum, representando um grande problema em relação à segurança e eficácia dos produtos uma vez que os efeitos destas combinações ainda não são totalmente conhecidos (SCHMITT, 2012).

A presença de *Citrus aurantium* em formulações a base de plantas e suplementos alimentares com fins emagrecedores tem se tornado comum, uma vez que esta espécie contém aminas biogênicas como a *p*-sinefrina, encontrada majoritariamente, octopamina, tiramina e hordenina, consideradas aminas precursoras que participam da via biossintética para formação da sinefrina. Essas aminas agem sobre o sistema nervoso e cardiovascular através da estimulação adrenérgica central (WILLIAMS et al., 1987; CALAPAI et al., 1999), a qual inclui o aumento do débito cardíaco que, quando associadas com outros estimulantes, pode agravar ainda mais o risco de cardiotoxicidade desses compostos (ROSSATO, 2009).

Considerando o expressivo número de consumidores de produtos emagrecedores no país (ABESO 2013), a diversidade desses disponíveis no mercado e a facilidade de acesso a eles, torna-se justificável e relevante o estudo da presença de compostos estimulantes em amostras para perda de peso. Nesse sentido, esse trabalho trata do desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar e quantificar a presença desses compostos em amostras emagrecedoras consumidas no Brasil.

2. OBJETIVO

Desenvolver métodos analíticos para a avaliação da presença de estimulantes em amostras de produtos naturais e suplementos alimentares que são comercializadas com apelo ao emagrecimento, empregando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos.

2.1 Objetivos específicos:

Desenvolver e validar um método analítico para a detecção e quantificação de sinefrina, efedrina, salicina, cafeína, octopamina, tiramina e hordenina em amostras comerciais de suplementos alimentares;

Realizar a amostragem de suplementos alimentares comercializados no Brasil, que tenham como apelo o emagrecimento, perda de peso e redução de gordura;

Desenvolver e validar um método analítico para a detecção e quantificação de cafeína sintética em amostras de produtos naturais a base de plantas;

Desenvolver e validar um método analítico para a separação de enantiômeros da *p*-sinefrina por cromatografia líquida com fase estacionária utilizando β ciclodextrina como seletor quiral;

Avaliar a presença de estimulantes em formulações emagrecedoras em relação aos níveis de concentração, às associações farmacológicas e à rotulagem dos produtos;

Avaliar a qualidade de suplementos alimentares quanto ao uso de estimulantes, com base no estudo de 47 produtos comercializados em território nacional.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Desde 1997 a Organização Mundial da Saúde (*World's Health Organization - WHO*) considera a obesidade uma epidemia global (AULD e POWELL, 2009; CABALERO, 2007) e a relaciona com doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, distúrbios metabólicos, doenças pulmonares, dentre outras (WHO, 2009).

Em 2005 o sobrepeso já afetava 400 milhões de adultos (WOLF, 1998) no mundo e, segundo a Associação Brasileira para Estudos da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO), a projeção para 2015 é de que 2,3 bilhões de pessoas estejam com excesso de peso e 700 milhões sejam considerados obesos. Em decorrência disso, prolifera-se no mercado alimentício e farmacêutico uma infinidade de produtos antiobesidade, uma vez que estar acima do peso nos dias de hoje é, acima de tudo, uma questão de estética (KOPELMAN, 2000). No entanto, a conscientização das pessoas que fazem uso de produtos para controle e perda de peso é ainda insuficiente (ESMAILZADEH, 2008).

3.1 Produtos para controle e perda de peso

Muitos são os fármacos utilizados no tratamento da obesidade. Eles podem agir de diferentes formas, como redução do apetite, estímulo da sensação de saciedade, e aumento da termogênese. Por apresentarem efeitos colaterais e alto potencial de uso abusivo, muitos fármacos acabam sendo controlados por lei, a exemplo dos regulados pela Portaria 344/98 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Entretanto, a automedicação, as prescrições e as vendas ilegais ainda são bastante comuns (RIBEIRO e CARVALHO, 2009).

Segundo a ANVISA, o Brasil foi apontado como o maior consumidor de inibidores de apetite do mundo nos últimos anos (BRASIL, 2012a), tanto que em 2011, a Diretoria Colegiada deste mesmo órgão decidiu retirar do mercado os inibidores de apetite do tipo anfetamínicos. Assim, fármacos como femproporex, mazindol e anfepramona tiveram seus registros cancelados e a sibutramina passou a ter sua venda controlada. Tal norma consta na Resolução RDC nº 52/2011 da ANVISA (MOURA, 2011; BRASIL, 2011).

Por essa razão, esses medicamentos deixam muitas vezes de ser a primeira opção de escolha no combate ao excesso de peso e acabam sendo substituídos por formas de tratamento alternativas, como o uso de suplementos alimentares (ALLISON, 2001) e terapias que incluem os produtos naturais a base de plantas medicinais.

3.1.1 Suplementos alimentares e legislação

Suplementos alimentares são produtos constituídos de vitaminas, minerais, plantas, e aminoácidos, ou combinações de qualquer desses ingredientes (WILLIAMS, 2004). O objetivo primordial do consumo desses suplementos deveria ser o de melhorar a saúde, prevenir doenças (FDA, 1998), suprir necessidades nutricionais do indivíduo (PETRÓCZI et al., 2008), visando principalmente complementar a dieta (ZEISER, HALLAK, 2007). No entanto, a maioria desses produtos, são consumidos para outras finalidades, como mostra a Tabela 1. Esses produtos são utilizados muitas vezes de forma equivocada (HIRSCHBRUCH et al., 2008; BACURAU, 2005), a exemplo do uso de hipercalóricos para perda de peso, o que evidencia ainda mais a falta de informação dos indivíduos sobre esse assunto. Além disso, o forte apelo do marketing populariza os suplementos com frases como: “Pílula natural do emagrecimento !”; “Promove rapidamente o ganho de massa muscular !”, fazendo com que o número de usuários desses produtos seja cada vez mais expressivo, tanto em atletas quanto no público apenas praticante de atividade física (HIRSHBRUCH et al, 2008; ALBINO et al., 2009; ARANHA et al., 2012). Estudos apontam ainda que treinadores físicos, vendedores de lojas, amigos e profissionais inaptos sejam as principais fontes de indicação para essa categoria de produtos (ARAUJO et al., 1999; ASSUNÇÃO et al., 2002; ALVES e LIMA, 2008).

A indústria de suplementos alimentares é reconhecida mundialmente como um empreendimento multimilionário (FLORES, 2008), a qual desenvolve estratégias comerciais e políticas para a manutenção da sua lucratividade (SCHMITT, 2012). Nos Estados Unidos, mais de 40% da população adulta fazia uso de suplementos entre 1988 e 1994. Entre 2003 e 2006 este número aumentou para mais da metade da população (GAHCHE et al., 2011; LENZ e HAMILTON, 2003), sendo que apenas

um terço dos consumidores discutem este uso com um profissional da saúde (BLANCK, 2007).

Tabela 1. Distribuição de frequência absoluta das razões para o consumo de diferentes tipos de suplementos. Adaptado de Hirschbruch et al. (2008).

Objetivo/Suplemento	Ganho de massa	Perda de peso	Melhora no desempenho	Complemento na dieta	Prevenir doenças
Bebida esportiva	1	1			
Hiperclórico	2	1			
Aminoácidos	3	1	1		
BCAA*	6	1	2		
Glutamina	2	1			
Proteína	7	3		1	
WheyProtein	11	2	1		
Creatinina	5	1	3		
Carboidratos	4	1	2		
Termogênico	1	9	2		
CLA*	1	1			
Animal Pak	3	1	1		
Vitaminas e minerais				3	3
Total	46	23	11	4	3

*BCAA: Aminoácidos de cadeia ramificada (*Branch Chain Amino Acids*); CLA: Acido Linoléico Conjugado (*Conjugated Linoleic Acid*)

Qualquer suplemento vendido nos EUA pode ser legalmente promovido para perda de peso sem mesmo demonstrar evidências de sua eficácia ou segurança (COHEN, 2012). A legislação aplicável aos suplementos, o DSHEA (*Dietary Supplement Health and Education Act*) de 1994, permite a venda de pílulas para emagrecimento, mesmo estas não tendo passado por estudos científicos. Logo, todos os suplementos são presumidamente seguros, até que o FDA prove o contrário (COHEN, 2014a).

O mercado dos suplementos alimentares cresce no mundo inteiro, sendo que o Brasil chega a movimentar anualmente cerca de 1 bilhão de reais. Em 2012, a ANVISA emitiu um comunicado sobre o uso indiscriminado de suplementos alimentares e ressaltou que alguns produtos apresentavam ingredientes inseguros para o consumo (BRASIL, 2012b).

Os suplementos responsáveis por promover a perda de peso abrangem uma ampla variedade de produtos, os quais são comercializados em uma variedade de formas, incluindo comprimidos, cápsulas, líquidos e pó. Em média, os produtos contêm cerca de dez ingredientes diferentes, mas alguns podem apresentar até 96 componentes, sendo os vegetais (ervas e outros componentes de plantas), as fibras alimentares e os minerais os ingredientes mais comumente encontrados (SHARPE et al., 2006).

Alguns produtos já têm sido associados como potenciais causadores de dano físico (U.S. General Accounting Office, 2002), uma vez que são compostos por uma variedade de substâncias (Tabela 2), podendo elas interagir entre si ou com outros medicamentos. Uma equipe de pesquisadores dos EUA publicou recentemente que a taxa de insuficiência hepática ocasionada pelo uso de suplementos aumentou 185% em relação à última década (COHEN, 2014a). No entanto, as informações científicas disponíveis sobre estes ingredientes variam muito e pesquisas adicionais são necessárias para compreender a segurança e eficácia de uma determinada substância (LENZ e HAMILTON, 2003).

A detecção de efeitos adversos ao consumo de suplementos é bastante complicada, pois esses produtos são vendidos diretamente aos consumidores, os ingredientes ativos são variados e ainda, muitas vezes, se apresentam erroneamente rotulados (COHEN, 2014b). Assim, muitos desses suplementos que são considerados alimentos, não cumprem com o que está sendo anunciado em suas embalagens (BRASIL, 2013).

Os rótulos são considerados um meio de assegurar o acesso a toda informação sobre um produto alimentício, pois quando são bem compreendidos permitem que as escolhas alimentares sejam feitas de forma mais sensata e segura. Entretanto, as não conformidades contidas nos mesmos podem afetar negativamente a saúde de quem os consome (MOREIRA et al., 2013).

Pela legislação sanitária brasileira, a categoria “suplemento alimentar” não é prevista. Logo, produtos que se apresentam em formatos farmacêuticos fabricados no país ou importados devem passar por processo de regularização como medicamentos ou alimentos, de acordo com a sua composição e finalidade de uso.

Os produtos regularizados estão enquadrados em diferentes categorias de alimentos e esse enquadramento é de responsabilidade do fabricante/importador. O que ocorre muitas vezes é o produto não atender aos requisitos definidos em

regulamento específico. Isso faz com que as empresas “forcem” o enquadramento dele devido à ausência de previsão para uso de alguns de seus ingredientes, omitindo informações de sua composição.

Em 1969, o Decreto-Lei nº 986, emitido pela Secretaria da Vigilância Sanitária (SVS) juntamente com o Ministério da Saúde (MS), entrou em vigor a fim de instituir normas básicas sobre alimentos visando a defesa e a proteção da saúde do indivíduo consumidor quando relacionada à categoria alimentícia. De acordo com este decreto, alimentos não podem ter indicações terapêuticas ou medicamentosas (BRASIL, 1969).

Tabela 2. Ingredientes mais comuns encontrados em suplementos dietéticos para perda de peso. Adaptado de Dietary Supplements for Weight Loss Fact Sheet for Health Professionals, (2014).

Ingrediente	Mecanismo de ação proposto	Eficácia	Segurança
Laranja amarga/sinefrina	Aumenta gasto de energia e lipólise, atuando também como supressor de apetite. Agonista alfa adrenérgico mimetizando a ação da epinefrina.	Poucos ensaios clínicos Repercussão sobre a taxa metabólica basal, e gasto de energia; efeitos inconclusivos na perda de peso	Alguns problemas de segurança relatados. Efeitos adversos: dor no peito, ansiedade, aumento da pressão arterial e frequência cardíaca
Cafeína (incluindo, guaraná, erva mate, noz de cola e outras ervas)	Estimula o sistema nervoso central, aumenta termogênese e oxidação da gordura, aumenta a diurese	Ensaios clínicos de curto prazo Efeito modesto sobre o peso corporal; diminuição de peso ao longo do tempo	Em doses inferiores a 400mg/dia para adultos existem poucos relatos de preocupação quanto à segurança; em doses mais elevadas as preocupações foram significativamente maiores. Efeitos adversos: tremores, nervosismo, taquicardia, vômitos, distúrbio do sono
Quitosana	Adere a gordura da dieta do trato digestivo	Poucos ensaios clínicos/efeito mínimo sobre o peso corporal	Poucos relatos de preocupação. Efeitos adversos: flatulências, reações alérgicas, distensão abdominal, indigestão
Picolinato de Cromo	Aumenta a massa muscular magra, promove a perda de gordura, reduz a ingestão de alimentos	Vários ensaios clínicos Efeito mínimo sobre o peso corporal	Não existe relatos de preocupação quanto a ingestão da substância na dose recomendada de 25-45mcg/dia para adultos. Efeitos adversos: dor de cabeça, constipação, fraquesa, vertigem, náuseas, vômito, urticária, fezes aquosas
Ácido linoleico	Promove apoptose do tecido adiposo	Vários ensaios clínicos Efeito mínimo sobre o peso corporal	Poucas questões de segurança foram reportadas Efeitos adversos: dor abdominal, constipação, dispepsia, fezes aquosas, efeitos adversos sobre o perfil lipídico no sangue

Efedra (Ma Huang)	Estimula sistema nervoso central, aumenta a termogênese, reduz apetite	Vários ensaios clínicos. Efeito modesto sobre a perda de peso	Questão de segurança significativamente relatada; banida como ingrediente de suplemento dietético. Efeitos adversos: ansiedade, alteração de humor, náuseas, vômito, hipertensão, palpitação, derrame, ataque cardíaco, morte
<i>Garcinia cambogia</i>	Inibe a lipogênese e suprime a ingestão de alimentos	Vários ensaios clínicos Pouco/nenhum efeito sobre o peso corporal	Poucas questões de segurança relatadas. Efeitos adversos: cefaleia, náuseas, sintomas no trato respiratório superior, sintomas no trato gastrointestinal
Café verde	Inibe a acumulação de gordura e modula o metabolismo da glicose	Poucos estudos clínicos Efeito modesto sobre o peso corporal	Poucas questões de segurança relatadas Efeitos adversos: dor de cabeça, infecções do trato urinário
Chá verde	Aumenta o gasto energético e a oxidação de gordura. Reduz a absorção de gordura e a lipogênese	Vários ensaios clínicos Efeito modesto sobre o peso corporal	Não existem problemas de segurança relatados quando utilizado como bebida. Algumas preocupações relatadas quanto ao extrato de chá verde Efeitos adversos: prisão de ventre, dor abdominal, náuseas, vômito, aumento da pressão arterial, danos ao fígado
Faseolamina	Age como um bloqueador de amido, interferindo na quebra e absorção de carboidratos	Poucos estudos clínicos Efeito modesto sobre a gordura corporal, nenhum efeito significativo sobre o peso	Poucas questões de segurança relatadas Efeitos adversos: dor de cabeça, flatulência, constipação, fezes aquosas

No ano de 1993, o MS publicou a Portaria n° 1428, a qual visava, por meio de um regulamento técnico e de diretrizes de boas práticas de produção e prestação de serviços, estabelecer a necessidade da melhoria da qualidade de vida decorrente da utilização de bens, serviços e ambientes oferecidos à população na área de alimentos (BRASIL, 1993). Já em 1997, a Portaria SVS/MS n° 326, baseada no Codex Alimentarius e harmonizada no MERCOSUL, estabelecia requisitos gerais sobre condições higiênico-sanitárias e boas práticas de fabricação para estabelecimentos, produtores e industrializadores de alimentos a qual foi atualizada e complementada no ano de 2002 pela RDC n° 275 (BRASIL, 1997, 2002).

No que se refere a alimentos destinados ao controle de peso, a Portaria n° 30 aprovou em janeiro de 1998 um Regulamento técnico a fim de fixar a identidade e as características mínimas de qualidade desses produtos, excluindo desta categoria os alimentos para praticantes de atividade física. A Portaria deixa claro que esses alimentos devem ser elaborados com elementos constituintes de proteínas de origem animal ou vegetal próprios para consumo humano. No rótulo desses produtos deve constar a instrução do modo de uso do alimento, sem fazer menção à quantidade de redução ou ganho de peso nem a qualquer diminuição ou aumento da sensação de saciedade. Em questão de registro, esses produtos frente a esta Portaria estão sujeitos aos mesmos procedimentos administrativos exigidos para o registro de alimentos em geral (BRASIL, 1998a).

Na necessidade de normalizar o uso de Suplementos Vitamínicos e Minerais e controlar efetivamente sua produção e comercialização, a Portaria n° 32 de janeiro de 1998 aprovou o Regulamento Técnico para Suplementos Vitamínicos e ou Minerais, o qual define esses produtos simplesmente como "suplementos". Esses produtos são considerados alimentos para complementar a dieta diária de uma pessoa com apenas vitaminas e minerais, excluindo dessa categoria alimentos enriquecidos ou fortificados, hormônios, produtos que contenham substâncias medicamentosas e produtos fitoterápicos aos quais se atribuem ação terapêutica (BRASIL, 1998b).

Devido ao uso indiscriminado de formulações à base de aminoácidos e de outros produtos destinados à suplementação alimentar de praticantes de atividade física, a Portaria n° 222 aprovou, em 1998, um regulamento o qual se aplica aos alimentos especialmente formulados e elaborados para praticantes de tais atividades, incluindo formulações contendo aminoácidos oriundos da hidrólise de

proteínas, aminoácidos essenciais, aminoácidos de cadeia ramificada, repositores hidroeletrólíticos e energéticos, alimentos protéicos e alimentos compensadores para praticantes de atividade física (BRASIL, 1998c).

Em janeiro de 1999, a ANVISA é criada pela Lei 9.782, tendo como campo de atuação os setores relacionados a produtos e serviços que possam afetar a saúde da população brasileira (BRASIL, 1999a). A ela foi atribuída a competência para regulamentação, controle e fiscalização de alimentos. Neste contexto, a ANVISA aprovou o Resolução n° 16 e a Resolução n° 17. A primeira se aplica ao registro de novos alimentos ou ingredientes para o consumo humano, sem histórico de consumo no País, ou alimentos contendo substâncias utilizadas em níveis muito superiores aos observados nos alimentos. A segunda aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos (BRASIL, 1999b,c).

Em março do ano 2000 a ANVISA aprovava a Resolução n° 22 e a Resolução n° 23, as quais dispunham a respeito dos manuais de procedimentos básicos de registro e dispensa da obrigatoriedade de registro de produtos pertinentes à área de alimentos. O primeiro regulamento aborda apenas produtos importados, sendo os procedimentos e formulários para esses produtos os mesmos estabelecidos para os produtos nacionais. Já o segundo aborda exclusivamente os produtos nacionais, onde a maioria dos alimentos, incluindo alimentos com alegações de propriedades funcionais, alimentos para controle de peso, alimentos para praticantes de atividade física, novos alimentos e suplemento vitamínico/mineral possui obrigatoriedade de registro (BRASIL, 2000a, b).

Em setembro de 2005, a ANVISA aprovou as categorias de Alimentos e Embalagens Dispensados e com Obrigatoriedade de Registro através da Resolução n° 278, onde alimentos com alegações de propriedades funcionais, alimentos para controle de peso, alimentos para praticantes de atividade física, novos alimentos e suplemento vitamínico e mineral são considerados alimentos com obrigatoriedade de registro (BRASIL, 2005). Em agosto de 2010, esta Resolução foi revogada pela RDC n° 27 onde alimentos para controle de peso, alimentos para atletas, e suplemento vitamínico ou mineral ficavam isentos da obrigatoriedade de registro sanitário (BRASIL, 2010a). Ainda em 2010 a RDC n° 18 aprovava o Regulamento Técnico sobre alimentos para atletas, o qual adotava a seguinte classificação para os produtos abrangidos:

- I - suplemento hidroeletrolítico para atletas;
- II - suplemento energético para atletas;
- III - suplemento protéico para atletas;
- IV - suplemento para substituição parcial de refeições de atletas;
- V - suplemento de creatina para atletas;
- VI - suplemento de cafeína para atletas.

De acordo com o artigo 11 deste regulamento, os suplementos de cafeína para atletas devem atender a alguns requisitos, como fornecer entre 210 e 420 mg de cafeína na porção diária, sendo que o produto não pode ser adicionado de nutrientes e de outros não nutrientes. Nos rótulos de suplementos de cafeína para atletas deve constar a advertência em destaque e negrito: "Este produto não deve ser consumido por crianças, gestantes, idosos e portadores de enfermidades". E ainda a quantidade de cafeína na porção deve ser declarada no rótulo do produto (BRASIL 2010b).

Em um estudo visando analisar a rotulagem de suplementos alimentares, quanto à RDC 18/10 da ANVISA (BRASIL, 2010b), foram identificados diferentes tipos de inadequações, inclusive a presença de imagens e expressões como "anabólico", "queimador de gorduras", "fat burners", entre outras, as quais induzem o consumidor a fazer uso desses produtos e eram proibidas de acordo com o artigo 27 da RDC nº 18/10 e Portaria nº 222/1998 (BRASIL, 1998c, 2010b).

No início de 2014, a ANVISA avaliou 25 marcas de suplementos protéicos para atletas e encontrou, em 20 lotes de diferentes marcas, irregularidades na quantidade de algumas substâncias declaradas na embalagem. Esses produtos tiveram sua comercialização proibida, uma vez que informações falsas caracterizam fraude contra o consumidor. Em testes realizados pela ANVISA, apenas um produto apresentou resultados satisfatórios quanto as quantidades de nutrientes declarados na rotulagem (BRASIL, 2014b).

3.2 Produtos Naturais a Base de Plantas e legislação

Os conhecimentos sobre os efeitos medicinais das plantas são de longa data, sendo eles utilizados em diversos períodos da história da humanidade, por vários povos e culturas. Nas últimas décadas, o interesse populacional pelas terapias naturais tem aumentado significativamente (WHO, 2003) e hoje a utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso alternativo de grande aceitação pela população (NOLDIN et al., 2003). Considera-se que as vendas neste setor crescem em torno de 10% ao ano (KNAPP, 2001).

É reconhecida a importância dos produtos naturais, principalmente na questão do desenvolvimento de drogas terapêuticas modernas (CALIXTO, 1997). Em relação às pesquisas farmacológicas, as plantas medicinais são importantes também para quando utilizadas como matérias-primas para a síntese, ou como modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 1998). Estima-se que de 40% dos medicamentos desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, 25% são provindos de plantas (CALIXTO, 2001) e que das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias delas (RATES, 2001).

A eficácia e a segurança desses produtos podem ser avaliadas através de levantamentos etnofarmacológicos e estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos, além de ensaios que comprovem a identidade da planta e a ausência de contaminantes. Já para a qualidade ser alcançada, é imprescindível que seja realizado o controle das matérias-primas, do produto acabado, dos materiais de embalagem e estudos de estabilidade (NETTO, 2006). No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação de produtos fitoterápicos é a ANVISA. Na década de 60, em relação aos medicamentos fitoterápicos, o MS formulou a Portaria nº 22 (BRASIL, 1967), na qual estabelecia normas para o emprego de preparações fitoterápicas. Essa portaria expunha uma nova realidade na fitoterapia, ressaltando conceitos importantes para o controle de qualidade desses medicamentos, com uma preocupação acentuada na questão toxicológica.

Na década seguinte, foi publicada a Lei nº 5991 de 1973 e a Lei nº 6360 de 1976, em vigor até hoje, as quais dispõem sobre ações de fiscalização e controle dos estabelecimentos produtores e de comercialização dos produtos farmacêuticos, produtos dietéticos, cosméticos e saneantes (BRASIL, 1973; BRASIL 1976).

Em 1995, na tentativa de atualizar as normas anteriores de fitoterápicos, foi formulada a Portaria nº 6 (BRASIL, 1995), a qual instituiu e normatizou o registro de produtos fitoterápicos junto ao sistema de vigilância sanitária.

A RDC nº 17 de 2000 introduziu o conceito do uso tradicional e da história de uso como fator influente no registro desses produtos. A RDC também restringiu novos registros de associações de plantas medicinais, introduzindo o conceito de Registro Simplificado, o qual dispensa a comprovação de eficácia e segurança do produto, desde que o mesmo adotasse parâmetros estabelecidos na norma (NETTO, 2006). Visando atualizar a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos em 2004, a RDC nº 17/00 sofreu uma pequena revisão, dando lugar a RDC nº 48. A estrutura do regulamento foi modificada, transformando os anexos da RDC nº 17/00 em quatro Resoluções Específicas (RE): RE 88, RE 89, RE 90 e RE 91 (NETTO, 2006).

Nos últimos anos, a legislação brasileira para medicamentos naturais tem evoluído em muitos aspectos. Neste contexto, em 2006 foi implantada a Política Nacional de Plantas Medicinais pela Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006 (BRASIL, 2006a), que aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS); e pelo Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006b), que aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Ambas apresentam em suas diretrizes o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais priorizando a biodiversidade do país (CARVALHO, 2008).

A fim de atualizar a RDC nº 48/2004, a RDC nº 14 foi aprovada em 2010. Ela determina que são considerados medicamentos fitoterápicos aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas (BRASIL, 2010c).

Em 2014, a RDC nº 14/2010 foi revogada e os fitoterápicos foram diferenciados em medicamentos fitoterápicos (MF) e produtos tradicionais fitoterápicos (PTF), passando a ser regulamentados pela RDC nº 26/2014. Para serem disponibilizados ao consumo, tanto o MF quanto o PTF precisam apresentar semelhanças quanto aos requisitos de controle de qualidade, diferenciando-se em alguns outros requisitos conforme a Tabela 3 (BRASIL, 2014c).

Tabela 3. Diferenças entre Medicamentos Fitoterápicos e Produtos Tradicionais fitoterápicos tratadas pela RDC 26/2014.

Diferenças	MF	PTF
Comprovação de segurança, eficácia e efetividade	Por estudos clínicos	Por demonstração de tempo de uso
Boas Práticas de Fabricação	Segue RDC nº 17/2010	Segue RDC nº 13/2013
Informação para o consumidor	Bula RDC nº 47/2009	Folheto informativo RDC nº 26/2014
Formas de obter a autorização de comercialização junto a ANVISA	Registro/Registro Simplificado	Registro, Registro simplificado ou notificação

Os MF e PTF devem estar regularizados junto à ANVISA para serem comercializados, sendo que os MF sempre terão de ser registrados e os PTF poderão ser apenas notificados quando seus Insumos Farmacêuticos Ativos Vegetais (IFAV) estiverem descritos no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FFFB) (BRASIL, 2011).

A norma para o registro de MF e PTF é aplicada somente para fitoterápicos industrializados (BRASIL, 2014d), uma vez que produtos manipulados são regidos pela RDC nº 67/2007 (BRASIL, 2007) atualizada pela RDC nº 87/2008 (BRASIL, 2008), a qual define as boas praticas de manipulação de preparações magistrais e oficinais para uso humano em farmácias.

Quando um derivado vegetal é associado com um opoterápico, vitaminas/minerais, aminoácidos, proteínas ou fitofármaco, o produto deve ser registrado como medicamento específico, obedecendo a RDC nº 24/2011 (BRASIL, 2014d).

3.3 Aspectos Relevantes sobre Estimulantes

No passado, os estimulantes eram prescritos inicialmente para o tratamento da obesidade, mas hoje são usados também para tratar distúrbios neurológicos, pois demonstram ter efeitos como a melhora do estado de alerta e sensação de bem

estar (NOVAK et al., 2007). Assim, o aumento das prescrições médicas, o abuso e mau uso dessa classe de compostos levaram a preocupações de saúde pública, pois a utilização de estimulantes pode levar à insuficiência cardíaca, hipertensão pulmonar, hipertermia, convulsões, acidente vascular cerebral, hepatotoxicidade e distúrbios psiquiátricos (CARVALHO et al., 2012).

De acordo com Massoudi (1983), um estimulante termogênico ideal para o tratamento da obesidade é aquele que não só aumenta a taxa metabólica e provoca a perda de peso, mas que consegue atingir esses resultados sem a redução da ingestão de alimentos ou perda de proteínas do corpo. A efedrina, considerada um estimulante do sistema nervoso central (SNC), naquele contexto histórico era considerada uma droga bastante promissora (DULLOO e MILLER, 1984).

Farmacologicamente, anfetaminas (Figura 1) são consideradas estimulantes corticais do SNC, potencialmente anoréxicas, vasoconstritoras com propriedades de induzir a hipertermia. Bioquimicamente, ela é responsável por liberar catecolaminas dos neurônios, inibir a reabsorção de neurotransmissores e ativar o inibidor da enzima monoamina oxidase (MAO), alterando o sistema de ação da dopamina. Clinicamente, a anfetamina é utilizada como estimulante, antidepressivo e supressor do apetite. Quimicamente, a anfetamina tornou-se alvo de extensas modificações moleculares, uma vez que as características estruturais são importantes no quesito de atuação e potência da droga (IVERSEN et al., 1978).

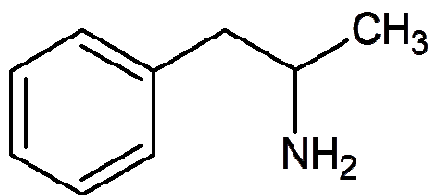


Figura 1. Estrutura química da anfetamina

Várias linhas de pesquisa sugerem a participação da dopamina nos efeitos estimulantes psicomotores causados também por metilxantinas como a cafeína (JOHANSSON et al., 1994), considerada um estimulante cortical assim como as anfetaminas. Devido aos seus efeitos farmacológicos, a anfetamina e seus derivados já são considerados droga de abuso com um grande número de casos

fatais. Ainda não se conhece o processo pelo qual o organismo humano cria a tolerância, mas sabe-se que a anfetamina provoca mudanças nos neurônios e nas enzimas do fígado sendo que seu uso continuado inibe a ativação desses neurônios provocando a necessidade do aumento de sua dosagem. A dependência causada pela cafeína difere da dependência causada pelas anfetaminas, mas ela já tem sido descrita (JOHANSSON et al., 1994) quando utilizada cronicamente (350 mg/dia).

A categoria mais comum de ingredientes à base de plantas potenciais causadores de efeitos adversos cardiovasculares são as ervas estimulantes. Em 2004, o Ma Huang (*Ephedra*) foi proibido nos Estados Unidos, pois seu uso se relacionou com efeitos cardiovasculares adversos, incluindo infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e morte. No entanto, uma grande variedade de ervas estimulantes permanecem disponíveis no mercado, incluindo laranja amarga, cafeína, guaraná, mate, dentre outros (COHEN e ERNST, 2010).

3.3.1 Cafeína

A cafeína (Figura 2), ou 1,3,7-trimetilxantina, é um pseudoalcalóide pertencente ao grupo das metilxantinas (MARTINDALE, 2005). Muito consumida e amplamente estudada (GURLEY et al., 2014), a cafeína é considerada um estimulante que promove o aumento da excitabilidade do sistema nervoso simpático sensível à adenosina (BIAGGIONI et al., 1991; KALMAR e CAFARELLI, 1999) promovendo a lipólise da gordura corporal (BELZA et al., 2009)

Apesar de possuir algum potencial de abuso, a cafeína é um composto socialmente aceito (GRIFFITHS e MUMFORD, 1995) e pode estar presente em muitas espécies vegetais, como nas sementes de café (*Coffea* sp.), folhas de chá verde (*Camellia sinensis*), cacau (*Theobroma cacao*), guaraná (*Paullinia cupana*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e na cola (*Cola nitida* e *Cola acuminata*) (SILVA-NETO e SOARES, 2006). Estas espécies são muito consumidas na forma de bebidas, as quais constituem as principais fontes de cafeína na dieta moderna (GURLEY et al., 2014).

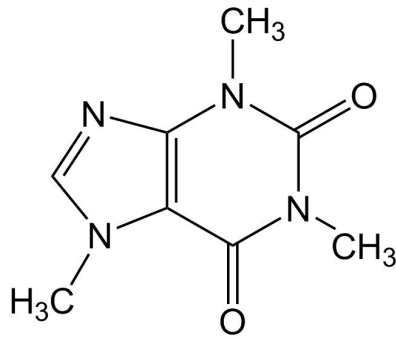


Figura 2. Estrutura química da cafeína

Sua popularidade se deve muito ao efeito psicoestimulante (RIBEIRO 2010), pois uma vez absorvida, a cafeína exerce uma variedade de ações farmacológicas central e periférica, atuando como antagonista da adenosina devido à sua similaridade estrutural (KERRIGAN e LINDSEY, 2005). De acordo com estudos, funções cognitivas como a capacidade de concentração são reforçadas após a ingestão de cafeína. Esse consumo, quando feito diariamente, diminuiu de forma significativa o risco de falhas cognitivas (SMITH, 2009; CARRIER et al., 2007). Devido a estas propriedades, a cafeína pode ser encontrada também na forma purificada em vários medicamentos não sujeitos a receita médica (GURLEY et al., 2014). Sendo utilizada moderadamente (200 mg), a cafeína apresenta um excelente perfil no quesito segurança. Porém, em doses mais elevadas (2000 mg), efeitos tóxicos como náuseas, taquicardia, convulsão e morte, podem ocorrer (HOFFMAN, 2011). Em estudo realizado em 14 vítimas fatais de intoxicação por cafeína, a concentração média deste estimulante no sangue foi de 183 mg L^{-1} (MOFFATT et al., 2004). Apesar de a dose fatal de cafeína ser bastante incomum, um estudo reportado em 2005 por KERRIGAN e LINDSEY relatou que uma das mortes acidentais por intoxicação com essa substância parece envolver o uso indevido de um suplemento dietético (KERRIGAN e LINDSEY, 2005).

Desde 2005, uma proliferação de suplementos alimentares e bebidas energéticas contendo cafeína têm sido observada no mercado mundial. Considerada aparentemente um ingrediente alimentar inócuo, tornou-se uma causa célebre para os problemas de saúde, uma vez que a ela pode ser atribuída à capacidade de potencializar os efeitos farmacológicos de aminas simpatomiméticas (GURLEY et al., 2014). Este efeito chamou a atenção da comunidade médica no final de 1970,

quando combinações sintéticas de cafeína, fenilpropanolamina, e efedrina ganhou notoriedade como inibidores de apetite (LAKE e QUIRK, 1984)

Estudos sugerem ainda que a cafeína pode facilitar a perda e manutenção do peso corpóreo pelo aumento da termogênese, oxidação de gordura e lipólise (COFFEY et al., 2004; LOPEZ-GARCIA, 2006). Por se acreditar também que a mesma amplifique os efeitos de substâncias simpatomiméticas como a efedrina (HALLER, 2004), a cafeína acaba sendo amplamente utilizada em formulações destinadas ao emagrecimento.

3.3.2 Efedrina

A efedrina (Figura 3) é uma amina simpatomimética considerada o principal alcaloide encontrado em plantas do gênero *Ephedra sinica*, conhecida também como Ma Huang, a qual pode ser encontrada na Ásia, Europa e Américas (WHO, 1999; SONI, 2004).

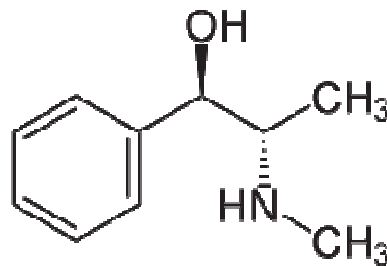


Figura 3. Estrutura química da efedrina

É um dos estimulantes mais antigos que se tem conhecimento (IVERSEN et al., 1978). Quimicamente é uma feniletilamina, a qual faz parte de um grupo de estimulantes do SNC e periférico assim como o MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina), a metanfetamina e outras anfetaminas (FREY et al., 2006). Além de agir no SNC, possui ação agonista sobre receptores α e β adrenérgicos no sistema cardiovascular (ROTHMAN et al., 2003; SCHANEBERG et al., 2003), podendo também ser utilizada no tratamento da asma por ser

considerada um potente broncodilatador e descongestionante (CHEN e SCHMIDT, 1925; MARTINDALE, 2005).

Suplementos alimentares à base de *Ephedra* sp. são utilizados como promotores do emagrecimento devido à liberação de catecolaminas as quais estimulam receptores β 3-adrenérgicos no tecido adiposo promovendo consequente efeito termogênico (KRISTEL et al., 2007). Entretanto, sua atividade simpaticomimética não é específica, exercendo efeitos sobre o débito cardíaco e aumentando a pressão arterial (HOFFMAN et al., 1996). Muitas vezes o extrato de *Ephedra* é utilizado concomitantemente com a cafeína (provinda do Guaraná) em suplementos alimentares, sendo a dosagem dessas substâncias em torno de 20 mg/200 mg, respectivamente (HALLER et al., 2004; JACOB et al., 2004). Num ensaio controlado por 24 semanas, com a combinação desses estimulantes nessas proporções três vezes ao dia, foi percebido que houve melhora no perfil lipídico sanguíneo além da perda de massa gorda ter sido mais eficaz do que a utilização da efedrina e da cafeína separadamente (BUEMANN et al., 1994).

Um estudo realizado por Niska (2005) demonstrou que a efedrina administrada em combinação com cafeína causou severa hemorragia aguda, necrose no miocárdio e inflamação em ratos após uma a três exposições diárias. Este mesmo tratamento após algumas semanas evoluiu para um quadro de toxicidade cardíaca e morte dos ratos.

Haller (2004) compilaram 140 casos de efeitos adversos envolvendo sistema cardiovascular (ZAACKS et al., 1999; WETTACH et al., 2002), SNC (POWELL et al., 1998; VAHEDI et al., 2000; WARNER et al., 2002) e desordens psíquicas (DOYLE e KARGIN, 1996; JACOBS e HIRSH, 2000; TORMEY e BRUZZI, 2001) relacionados ao consumo de produtos dietéticos contendo alcaloides de *Ephedra* sp. Preocupado com o crescente consumo destes produtos, o Food and Drug Administration (FDA) banuiu a venda de suplementos contendo efedrina no ano de 2004 (BENT et al., 2004; GROLLMAN, 2005).

No Brasil, as formulações contendo esta substância não são proibidas, mas possuem venda regulamentada pela Portaria 344/1998 (BRASIL, 1998). A legislação brasileira considera a efedrina uma substância sujeita a controle especial pela Polícia Federal. Entretanto, é frequente o comércio ilegal destes produtos devido à falta de fiscalização.

3.3.3 Salicina

A salicina (Figura 4), glicosídeo fenólico com propriedades analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias, é um metabólito secundário extraído do salgueiro branco de espécies do gênero *Salix* (Salicaceae), e usualmente é obtida fazendo-se um extrato aquoso da casca desta espécie (MERK, 1996).

Apesar de os salicilatos serem utilizados em formulações emagrecedoras termogênicas, o respaldo científico é limitado e pouco se justifica seu emprego nessas formulações. Literaturas não científicas apresentam a salicina como uma substância potencializadora de outros estimulantes, prolongando por exemplo o tempo de ação da cafeína, para reforçar sua eficácia como agente de perda de peso (SCHMITT, 2012). Há também uma hipótese de que a combinação da cafeína e salicina melhora as propriedades de promoção à saúde de ambas (DURAK et al., 2014).

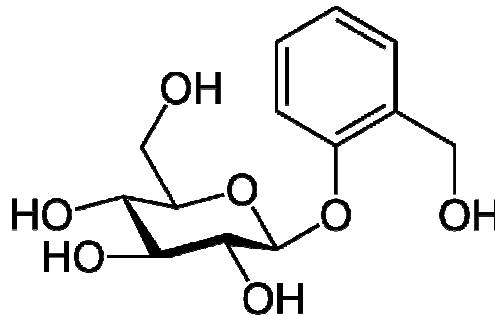


Figura 4. Estrutura química da salicina

Apenas a Aspirina, que pertence a família de salicilatos como a salicina, tem sido relacionada com o aumento da indução da termogênese (DULLOO e MILLER (1987; HORTON e GEISSIER, 1991).

3.3.4 *Citrus aurantium* e aminas biogênicas

Citrus aurantium é uma árvore frutífera de pequeno porte, nativa do sudoeste asiático pertence à família Rutaceae (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004; MARCHEI et al., 2006), popularmente conhecida como laranja-amarga. Os frutos (Figura 5) do tipo baga, possuem casca rugosa e muitas sementes (HARRI e MATOS, 2002), sendo seu sabor amargo e odor forte bastante característicos (OLIVEIRA et al., 2005).

Por suas propriedades medicinais, os produtos derivados desta espécie são muito utilizados (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004). Na Medicina Tradicional Chinesa utiliza-se o fruto seco e imaturo de *C. aurantium* para tratar problemas digestivos (BLUMENTHAL, 2005) e a infusão intravenosa é utilizada no tratamento do choque anafilático e em problemas cardíacos (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004). Já na região do Mediterrâneo esta espécie é utilizada como estimulante vascular e cardíaco (ARIAS e RAMON-LACA, 2005).



Figura 5. Fruto de *Citrus aurantium*

O fruto em amadurecimento de *C. aurantium* contém flavonoides (até 10%), mas os compostos mais ativos são as aminas com atividade adrenérgica como a octopamina, tiramina, hordenina e principalmente a *p*-sinefrina (0,2%) (MATOLLI et al., 2005; LORENZO et al., 2014).

A parte geralmente utilizada para obtenção de sinefrina (Figura 6) é o pericarpo do fruto. Entretanto, Arbo (2008) relata que além do pericarpo, ela pode ser encontrada também em outras partes do fruto, nas folhas e flores da planta.

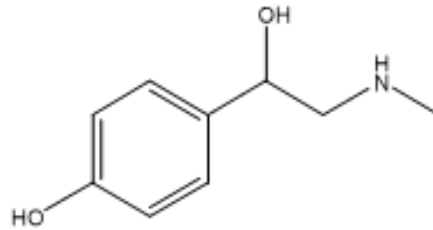


Figura 6. Estrutura química da sinefrina

O extrato de *Citrus* é permitido e utilizado como ingrediente em muitos suplementos alimentares destinados a reduzir o peso corporal, mas vários países estabelecem limites para o conteúdo de aminas ativas (LORENZO et al., 2014). Esses suplementos são amplamente consumidos, e geralmente são encarados de forma positiva pelos consumidores, uma vez que o que é "Natural" é considerado sinônimo de segurança (HUNG et al., 2011). O problema se torna significativo quando eles são obtidos a partir de mercados não regulamentados, onde é comum a prática de atividades ilícitas (ANGELL e KASSIRER, 1998; GURLEY et al., 2000). Logo, o controle de qualidade desses produtos contendo *C. aurantium* é muito importante e necessário (LORENZO et al, 2014).

Aminas biogênicas como a tiramina, octopamina e hordenina, participam na via biossintética (Figura 7) para síntese da sinefrina, a qual ocorre endogenamente após diversas reações, começando pela descarboxilação da tirosina à tiramina seguido por um passo de hidroxilação, que resulta em octopamina, a qual por sua vez é transformada em sinefrina (PELLATI et al., 2007). Nos animais, a biossíntese envolve a conversão da tiramina em octopamina a qual é catalizada e transformada em sinefrina (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004). Elas também agem sobre o sistema nervoso e cardiovascular através da estimulação adrenérgica (WILLIAMS et al., 1987; CALAPAI et al., 1999).

Apesar de serem vários os métodos analíticos desenvolvidos para a detecção e quantificação de aminas contidas em *C. aurantium* (PELLATI e BENVENUTI, 2002), a maioria deles não são totalmente satisfatórios para a análise de matrizes

complexas, tais como extratos ou suplementos alimentares. A octopamina pode interferir na análise de amostras complexas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada a detector ultravioleta (UV) (MATOLLI et al., 2005; PUTZBACH et al., 2007; SLEZAC et al., 2007). Desta forma, sugere-se acoplar detectores de maior seletividade e sensibilidade como Arranjo de Diodos, Fluorescência, Quimiluminescência ou Espectrômetro de Massas. Por se tratar de um precursor biossintético, a octopamina raramente é detectada, assim como a tiramina (PELLATI e BENVENUTI, 2002).

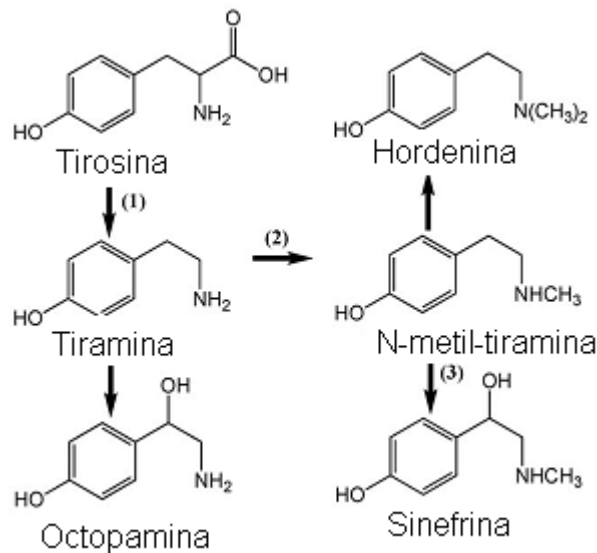


Figura 7. Via biossintética para formação da sinefrina a partir de seus precursores

Por ser encontrada majoritariamente em *C. aurantium*, os produtos à base de sinefrina ganharam grande atenção a partir de 2004, quando produtos contendo efedrina foram banidos pelo FDA e retirados do mercado norte-americano (ROSSATO, 2009). O interesse por produtos contendo essa amina se deve ao seu efeito emagrecedor, o qual é atribuído ao aumento da lipólise através da promoção da termogênese. Diferentemente da efedrina, ela apresenta uma propriedade estimulante mais específica sobre os receptores β_3 -adrenérgico, exercendo menores efeitos sobre o SNC e sistema cardiovascular (ANDRADE, 2008). Entretanto, seu uso indiscriminado pode levar ao desenvolvimento de efeitos

adversos e a associação com outros estimulantes pode agravar o risco de cardiotoxicidade (ROSSATO, 2009).

Devido ao seu caráter simpaticomimético, possui atividades farmacológicas como vasoconstrição, elevação da pressão arterial, relaxamento muscular e brônquico (WEATHON e STEWART, 1970; STEWARD et al., 1964). Desta forma, pacientes com problemas de hipertensão, arritmias, glaucoma ou que fazem uso de inibidores da MAO devem evitar o consumo de extratos contendo esta espécie cítrica (PENZAC et al., 2001). Em 2009, a sinefrina foi incluída no Programa de Monitoramento de Competições pela World Anti-Doping Agency (WADA). Este programa inclui a cafeína e a fenilpropanolamina, substâncias estimulantes que não são proibidas. Porém, de acordo com a WADA, precisam ser monitoradas a fim de evitar o uso indevido no esporte (WADA, 2009).

3.3.4.1 Abordagens sobre a quiralidade da (\pm) *p*-sinefrina e metodologias empregadas para separação de compostos quirais

Por se tratar de uma amina quiral, a sinefrina pode existir em três diferentes formas de isômeros posicionais (orto *o*-, meta *m*- e para *p*-), os quais não possuem atividade farmacológica equivalente (SANTANA et al., 2008). Cada isômero posicional pode originar dois enantiômeros, resultantes da presença de um carbono quiral assimétrico (ALLISON et al., 2005; PELLATI et al., 2005, HAAZ et al., 2006).

O isômero *p* da sinefrina é o único de ocorrência natural, sendo ele um protoalcalóide primário da espécie de *C. aurantium* (STOHS et al., 2011a) de caráter básico, polar e solúvel em água (NIEMANN e GAY, 2003; PELLATI et al., 2007).

A *p*-sinefrina sintética tem sido comercializada como uma alternativa à que ocorre naturalmente, sendo ela uma mistura racêmica das formas enantioméricas levógira ((-)*R*, ou *l*) e dextrógira ((+)*S* ou *d*) (KUSU et al., 1996; MERCADER et al., 2011), como mostra a Figura 8. Este produto sintético exerce aproximadamente metade da atividade farmacológica quando comparada ao protoalcalóide de ocorrência natural, uma vez que seus enantiômeros possuam atividades farmacológicas distintas entre α e β adrenoreceptores (BROWN et al., 1988).

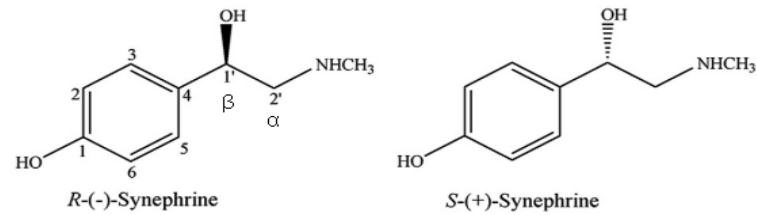


Figura 8. Enantiômeros da *p*-sinefrina

A atividade farmacológica depende das substituições que ocorrem no anel aromático e dos ligantes ao carbono α e β . A presença de um grupamento hidroxila no carbono β e no anel aromático por exemplo, reduz a capacidade do composto atravessar a barreira hematoencefálica, o que resulta em uma atividade central mais branda (BRUNTON et al., 2005).

Na natureza somente a forma levógira ($R(-)$) da *p*-sinefrina está presente, sendo considerada mais potente em uma ou até duas ordens de magnitude que a forma dextrógira ($S(+)$). Observa-se que este composto pode sofrer isomerização óptica quando submetido a procedimentos extrativos com temperaturas elevadas ou quando o tempo de aquecimento é prolongado (PELLATI et al., 2007). Logo, a produção de extratos para posterior manipulação de formulações farmacêuticas, pode contribuir para um aumento nos teores de ($S(+)$)-sinefrina.

Numerosos estudos mostram que um determinado enantiômero de um par enantiomérico reage com receptores como agonista muito mais facilmente do que o outro enantiômero, devido às diferenças estereoquímicas (ERB, 2006), as quais serão responsáveis por fornecer diferentes atividades farmacológicas e farmacocinéticas entre os enantiômeros (METZ et al., 2009). A forma levógira (*l*) se liga mais facilmente à receptores adrenérgicos quando comparada a forma dextrógira (*d*) da *p*-sinefrina, que é cem vezes menos vinculativa à β adrenoreceptores, não exercendo portanto atividade farmacológica significativa (JORDAN et al., 1987). A ligação com adrenoreceptores β_1 e β_2 está associado ao aumento dos batimentos cardíacos e da pressão arterial (INCHIOSA, 2011), enquanto que a atividade lipolítica ocorre devido à ligação com receptores β_3 em tecidos (STOHS et al., 2011b).

Metodologias analíticas empregadas para a separação, identificação e quantificação de enantiômeros incluem eletroforese capilar (CE), cromatografia

gasosa (GC), cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia com fluido super (CFS) e sub-críticos. Entretanto, desde a década de 70 o uso de HPLC na separação de compostos quirais tem sido empregada em constante evolução (SANTORO, 1992).

Entre as ferramentas disponíveis para uma adequada separação enantiomérica, a separação direta, empregando uma fase estacionária quiral enantioselectiva, tornou-se o procedimento mais aceito. No entanto, a identificação de uma fase estacionária quiral em combinação de uma fase móvel para um determinado analito pode ser um desafio bastante grande (LAMMERHOFER et al., 2010). Devido à especificidade de reconhecimento molecular para cada combinação entre a fase estacionária quiral e o analito e sua sensibilidade a pequenas variações estruturais, previsões confiáveis de uma coluna apropriada para um determinado analito, são ainda praticamente impossíveis (LAMMERHOFER et al., 2010).

São variadas as colunas quirais encontradas hoje no mercado: Tipo Pirkle, do tipo proteína, do tipo cavidade, do tipo ciclodextrina, do tipo celulose, do tipo polímeros, derivada de enzima, derivada de albumina, e do tipo antibióticos macrocíclicos (LOURENÇO et al., 2010), são alguns exemplos. As colunas de ciclodextrinas comercialmente disponíveis são as que possuem seis, sete ou oito unidades de α -D-glicose, as quais são denominadas α -, β - e γ -ciclodextrina (LOURENÇO et al., 2010). No processo de reconhecimento quiral, os enantiômeros entram, pelo menos parcialmente, na cavidade das moléculas de ciclodextrina formando complexos diastereoisoméricos, como exemplificado na Figura 9.

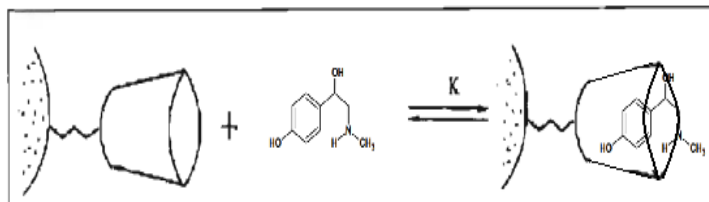


Figura 9. Mecanismo de reconhecimento quiral de uma molécula com o cone truncado da ciclodextrina

Estes complexos de inclusão são estabilizados por interações dipolo-dipolo induzido, dispersões de London e estéricas entre os enantiômeros do analito e a

fase estacionária. Interações secundárias do tipo ligações de hidrogênio, entre os grupos hidroxila da superfície externa da ciclodextrina e parte da molécula do analito que ficou fora da cavidade, também contribuem para a estabilização dos complexos diastereoisoméricos (WAINER, 1993; ALI et al., 2006).

Algumas metodologias desenvolvidas até o presente momento para separação de enantiômeros da sinefrina por HPLC estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Metodologias empregadas para separação dos enantiômeros da (\pm) sinefrina

Metodologia	Condições empregadas	Amostra aplicada	Considerações	Ano	Referências
HPLC	F.E: β ciclodextrina F.M: Metanol NaH ₂ PO ₄ 25 mM pH 3.5 (20:80 v/ v) Sulfato de tetrabutilamônio 10 mM 3°C 220 nm.	Fruto de <i>Citrus</i>	Baixa resolução para quantificação	2002	PELLATI e BENVENUTI, 2002
HPLC	F.E cellobio-hydrolase (CBH) FM: Tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6.0) 2-propanol (95:5, v/v), 50 μ M EDTA 0.8 mL/min. 20°C 225 nm	Padrões	Boa resolução	2010	PELLATI et al., 2010
HPLC	FE: β ciclodextrina (LiChroCART Chiradex) FM metanol-NaH ₂ PO ₄ pH 3.5; (25 mM) (2:98) Sulfato de tetrabutilamonio 10 mM. 0.4 mL/min. 2°C 225 nm	Fruto <i>Citrus</i> , extrato de <i>Citrus</i> , e suplementos alimentares	Baixa resolução	2005	PELLATI et al, 2005

	FE: (Sumichiral OA-6000)				
	FM: Solução aquosa de acetato de cobre (II) 1mM Acetato de amônio 10 mM pH 6.4 1.7 mL/min 26° C. 225 nm.		Baixa resolução		
	FE: (Chiral-CBH), ligada à proteína				
	FM: 2-propanol (5%, w/w) tampão fosfato de sódio 10mM pH 6.0 50µM EDTA 0.8 mL/min. 20° C 225 nm		Boa resolução		
HPLC	FE β CD FM TEA/Metanol ou fosfato/Metanol	Padrão	Boa resolução	2008	LIN et al., 2008
HPLC	FE coluna, Sumichiral OA-6000 FM acetate de cobre (II) 1 mM acetato de amônio 20 mM pH 6.4) 1.5 ml/min Detecção eletroquímica 1.0 V vs Ag/AgCl.	Comida e urina	Boa resolução	1996	KUSU et al., 1996

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes, soluções e instrumentação

Para o desenvolvimento dos métodos foram utilizados padrões (Sigma-Aldrich) especificados na Tabela 5 com os respectivos valores de pKa.

Tabela 5. pKa dos compostos trabalhados

Estimulantes	pKa
Octopamina	8,66 - 9,97
Sinefrina	9,37 - 9,98
Tiramina	9,51 - 10,49
Hordenina	9,51 - 10,05
Efedrina	9,65 - 10,25
Salicina	2,80 - 12,20
Cafeína	10,4 - 14,0

Para a análise dos sete estimulantes, as soluções estoque dos padrões foram preparadas em metanol nas concentrações de 500 mg L⁻¹ para octopamina, sinefrina, tiramina, hordenina e cafeína; 460 mg L⁻¹ para salicina e 290 mg L⁻¹ para efedrina.

A partir das soluções estoque, foi preparado uma mistura de padrões em fase móvel em diferentes concentrações, para obtenção dos pontos de uma determinada curva analítica.

No método desenvolvido para a cafeína a faixa de trabalho foi de 1,0 mg L⁻¹ a 20,0 mg L⁻¹, sendo que os pontos da curva foram preparados em fase móvel a partir de uma solução estoque de 500 mg L⁻¹ em acetonitrila.

No método desenvolvido para os enantiômeros da sinefrina, a faixa linear foi equivalente a faixa de trabalho, a qual foi de 1,0 mg L⁻¹ a 15,0 mg L⁻¹ para sinefrina

levógira e de 2,0 mg L⁻¹ à 15,0 mg L⁻¹ para a sinefrina dextrógira, sendo a solução estoque de (±) *p*-sinefrina preparada em metanol em uma concentração de 100 mg L⁻¹.

Os solventes e reagentes utilizados foram todos de grau HPLC: Acetonitrila (Tedia), Metanol (Tedia), Tetrahidrofurano (THF - Tedia), Dodecil sulfato de sódio (SDS - Tedia), Ácido fosfórico P.A de 85% de pureza (Vetec), Trietilamina (Vetec), Fosfato de sódio monobásico (Nuclear), β ciclodextrina (Sigma-Aldrich).

Os reagentes sólidos foram pesados utilizando balança analítica Sartorius (Goettingen, Alemanha) com quatro casas decimais de precisão.

As medidas do pH foram realizadas em pHmetro digital (Digimed DM 20, São Paulo, Brasil) com eletrodo de vidro combinado.

A água utilizada no preparo das soluções primeiramente sofreu um processo de destilação, seguido de deionização e, após, purificação em um sistema Milli-Q de resistividade de 18,2 MΩ cm⁻¹.

Na filtração das amostras, uso-se previamente algodão e funil de separação e, posteriormente, foi utilizado um sistema de filtração à vácuo com filtro de acetato de celulose 0,45 μm (Sartorius, Alemanha) para amostras extraídas em água. Quando as amostras eram extraídas em metanol, a filtração se dava com membrana de acetato de celulose regenerada de mesma dimensão.

Para a extração das amostras referente aos produtos naturais e para a degaseificação diária dos eluentes, foi utilizado um banho de ultrassom (Unique, São Paulo, Brasil) durante 30 e 60 minutos respectivamente.

Para a amostra do fruto de *Citrus* foi realizado uma etapa de limpeza em cartucho para extração em fase sólida LiChrolut SCX (40 – 63 μm, 500 mg 3mL).

O desenvolvimento dos métodos e posterior análises das amostras, deu-se pela utilização de um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Knauer (Figura 10), com bomba Smartline pump 1000 acoplado a Smartline Manager 5000, com detector de conjunto de fotodiodos Smartline UV, software ChromGate[®] version 3.3.1, com sistema de separação por gradiente (canais A, B, C e D) e injetor manual de volume fixo de 20 μL.



Figura 10. Sistema cromatográfico utilizado no trabalho.

Para a separação cromatográfica dos sete estimulantes e análise dos suplementos alimentares, foi utilizada uma coluna de fase reversa C_{18} (250 x 4,6 mm x 5 μ m) (Phenomenex). Para a determinação da cafeína em um segundo método desenvolvido para aplicação do mesmo em produtos naturais a base de plantas foi utilizada coluna de fase reversa C_{18} 250 x 4,6 mm x 5 μ m (Thermo Scientific) e pré coluna de mesma natureza acoplada (50 x 4,6 mm). Para a separação dos enantiômeros da sinefrina utilizou-se Coluna Quiral Chiradex (250 x 4 mm) (LiChroCART), composta por partículas esféricas de gel de sílica contendo β -ciclodextrina (5 μ m).

4.2 Rotina analítica dos métodos desenvolvidos

Para todos os métodos desenvolvidos, a rotina de condicionamento do sistema cromatográfico era a mesma. A fim de diminuir a oscilação de absorvância da linha base, a coluna era diariamente condicionada com a fase móvel por aproximadamente 1 h. Após esse tempo, os padrões e amostras eram injetados de forma manual utilizando seringa de vidro de 1 mL.

Entre uma análise e outra era realizado um recondicionamento da coluna por um tempo de 10 minutos para o reequilíbrio da mesma.

A etapa de lavagem, no final do dia, ocorria da seguinte maneira:

- 40 minutos iniciais: 100% água milli-Q
Fluxo: 1,0 mL min⁻¹.
- 60 minutos finais: 80% solvente orgânico (acetonitrila/metanol), 20% água milli-Q
Fluxo: 1,0 mL min⁻¹.

4.2.1 Preparação dos eluentes e método aplicado para determinação dos sete estimulantes em suplementos alimentares

A bomba quaternária utilizada permite o trabalho com quatro canais de solventes concomitantes, sendo eles:

- Canal A: ácido fosfórico 0,1%: A partir de um ácido com 85% de pureza, era preparado ácido fosfórico 0,1% pipetando-se 1,18 mL do ácido concentrado em 1 L de água milli-Q. O eluente que atingia um pH 2,0 era então filtrado em membrana de acetato de celulose 0,45 µm e posteriormente sonicado por 1 h para a remoção de bolhas de gás.
- Canal B: Metanol. Metanol sonicado por uma hora antes do uso.
- Canal C e D: Água Milli-Q para lavagem. Diariamente a água para lavagem era trocada e sonicada por 1 h.

Para a validação do método e análise dos suplementos, o comprimento de onda utilizado foi de 222 nm.

Apesar de o método final otimizado (Tabela 6), apresentar um tempo de corrida de 20 min, todos os compostos eram eluídos até 10 min.

Tabela 6. Método final otimizado e validado para sete estimulantes por HPLC com eluição por gradiente.

Tempo (min)	Fluxo (mL min ⁻¹)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	0,7	98	2
2	0,6	95	5
4	0,8	95	5
5	1,5	80	20
7	2,0	75	25
9	2,3	55	45
10	2,5	30	70
12	2,5	40	60
15	2,0	50	50
20	0,7	98	2

4.2.2 Preparo dos eluentes e método aplicado para determinação da cafeína em produtos naturais a base de plantas

- Canal A: ácido fosfórico 0,1%: A partir de um ácido com 85% de pureza, era preparado ácido fosfórico 0,1% pipetando-se 1,18 mL do ácido concentrado em 1 L de água milli-Q. O eluente que atingia um pH 2,0 era então filtrado em membrana de acetato de celulose 0,45 µm e posteriormente sonificado por 1 h para a remoção de bolhas de gás.
- Canal B: Acetonitrila. Acetonitrila sonificada por 1 h antes do uso.
- Canal C e D: Água Milli-Q para lavagem. Diariamente a água para lavagem era trocada e sonificada por 1 h.

Para a validação do método e análise dos produtos naturais a base de plantas foi utilizado um comprimento de onda de 220 nm.

Apesar de o método final otimizado (Tabela 7) apresentar um tempo de 10 min, a cafeína pode ser analisada no tempo de 4,2 min.

Tabela 7. Método final otimizado e validado para cafeína por HPLC.

Tempo (min)	Fluxo (mL min ⁻¹)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	0,8	70	30
4,5	0,5	70	30
5	0,5	70	30
10	1,5	70	30

4.2.3 Preparo dos eluentes e método aplicado para determinação da (\pm) *p*-sinefrina

- Canal A: SDS 6 mM acidificado. Pesava-se quantidade suficiente de SDS para o preparo de uma solução de concentração 6 mM em 1 L de água milli-Q. O eluente era então ajustado a um pH de 4,0 com ácido fosfórico, filtrado em membrana de acetato de celulose 0,45 μ m e posteriormente sonicado por 1 h.
- Canal B: Metanol. Metanol sonicado por 1 h antes do uso.
- Canal C e D: Água Milli-Q para lavagem. Diariamente a água para lavagem era trocada e sonificada por 1 h.

A *p*-sinefrina foi analisada em comprimento de onda 255 nm

O método final otimizado e validado para a (\pm) *p*-sinefrina apesar de apresentar um tempo de 10 min, ela pôde ser analisada em 5 min em vazão 0,6 mL min⁻¹, utilizando 50% do canal “A” e 50% do canal “B”.

4.3 Suplementos alimentares

Para a análise dessas dessas amostras foi utilizado o método desenvolvido e validado para determinação simultânea dos sete estimulantes.

4.3.1 Amostragem

Até o presente momento foi realizada a compra de 100 suplementos alimentares para perda de peso e ganho de massa muscular via internet. Os *sites* onde foram compradas as amostras foram escolhidos aleatoriamente, porém, com o pré requisito de o mesmo ser brasileiro, uma vez que esse estudo visa atingir os consumidores do território nacional. Dos 100 suplementos adquiridos, 47 foram selecionados para serem analisados neste trabalho, sendo estes produtos sólidos acabados na forma de pó.

4.3.2 Preparação das amostras de suplementos alimentares

Neste estudo, trabalhou-se apenas com amostras sólidas, incluindo cápsulas em pó, saches e à granel. Para as amostras encapsuladas foi realizado um *pool* de dez cápsulas para uma análise mais homogênea. Calculou-se o peso médio de cada uma, o qual foi pesado e posteriormente extraído com 25 mL de metanol e filtrado duas vezes, uma em algodão e outra em membrana de acetato de celulose regenerada (0,45 μm). Por fim, o extrato foi diluído 200 vezes na fase móvel antes de ser injetado no sistema cromatográfico. Este procedimento está exposto na Figura 11.

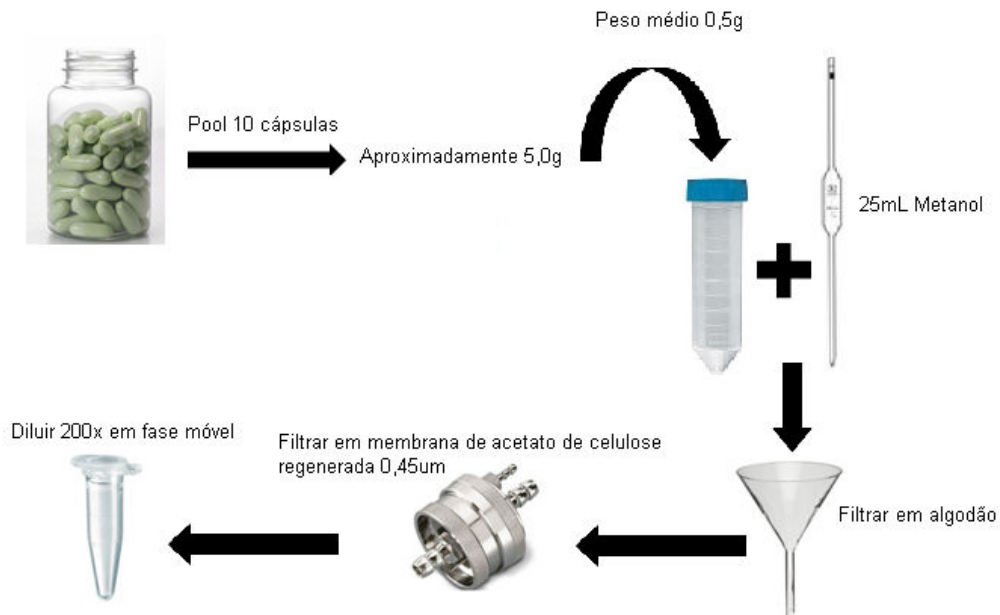


Figura 11. Esquema do preparo das amostras de suplementos alimentares

4.4 Produtos naturais a base de plantas

Para a análise dessas amostras foi utilizado o método adaptado e validado para a determinação de cafeína.

4.4.1 Amostragem

As amostras de produtos naturais à base de plantas ($n = 100$), entre elas manipuladas e industrializadas, foram obtidas em nove estados brasileiros: Ceará, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo e Paraná, no período compreendido entre os anos de 2008 e 2012, desconsiderando-se as variáveis de lotes e prazos de vencimento.

4.4.2 Preparo dos produtos naturais a base de plantas

Após realizar um *pool* de dez cápsulas, calculou-se o peso médio de cada uma das amostras, o qual foi pesado e posteriormente extraído. A extração desse

material consistia na extração aquosa à quente (infusão) de 25 mL de água à 90°C e sonicação por 30 minutos. Após esta etapa, o extrato foi filtrado em algodão e em membrana de acetato de celulose (0,45 µm) e diluído 40 vezes antes de ser injetado, como mostra a Figura 12.

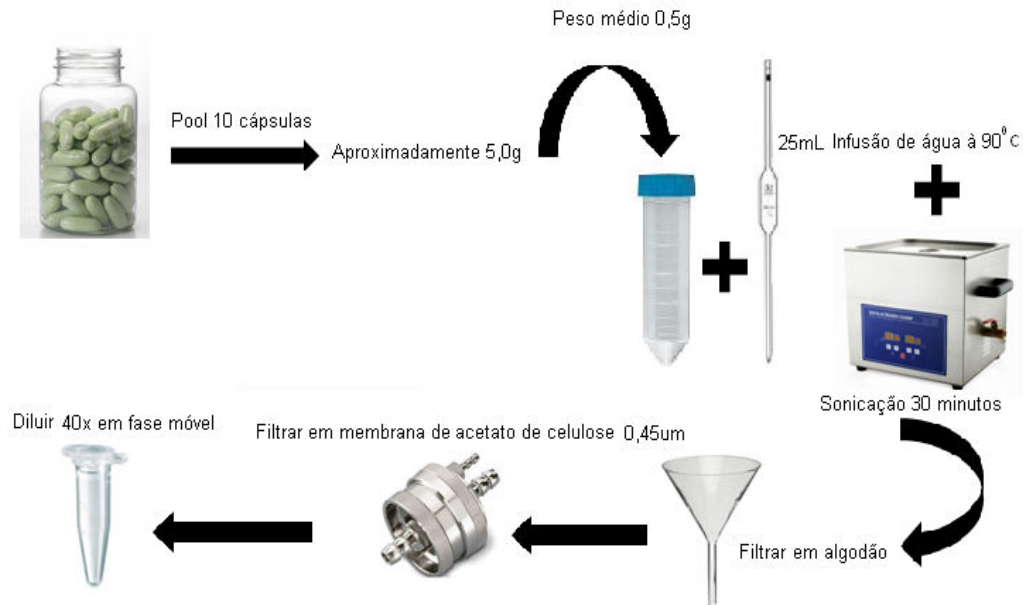


Figura 12. Esquema do preparo dos produtos naturais a base de plantas

4.5 Fruto *Citrus aurantium*

4.5.1 Amostragem

Para a determinação da *p*-sinefrina levógira no método de separação dos enantiômeros, um material vegetal de *Citrus aurantium* (fruto moído), coletado na cidade de Cruz Alta (RS), foi utilizado.

4.5.2 Preparação da amostra de fruto de *Citrus aurantium*

O extrato referente à amostra de *C. aurantium* se deu com a pesagem de 0,5 g do pó do fruto moído e extração aquosa à quente (infusão) de 25 mL de água à 90

°C, com posterior sonicação por 30 min. Após as duas etapas de filtração, como as realizadas para produtos naturais, o extrato passou por um processo de limpeza em cartucho de SPE (solid phase extraction) LiChrolut SCX (40 – 63 μm) 500 mg/3mL (Figura 13) e por fim diluído 40 vezes em fase móvel para então ser realizada a análise. A limpeza da amostra foi conduzida segundo Pellati et al. (2005), onde a ativação do cartucho de SPE ocorria com uma pré lavagem utilizando 2 mL de metanol, seguido de 2 mL de água. Era então passado por esse cartucho a solução referente ao extrato do fruto de *C. aurantium*. Posteriormente, ocorria a etapa de lavagem do cartucho com 5 mL de água, seguido de 2 mL de uma mistura água:metanol (75:25 v/v). O eluato adquirido até a presente etapa era todo descartado. Após isso a (\pm) *p*-sinefrina era então eluída e coletada com 6 mL de uma mistura metanol:HCl (9:1 v/v).

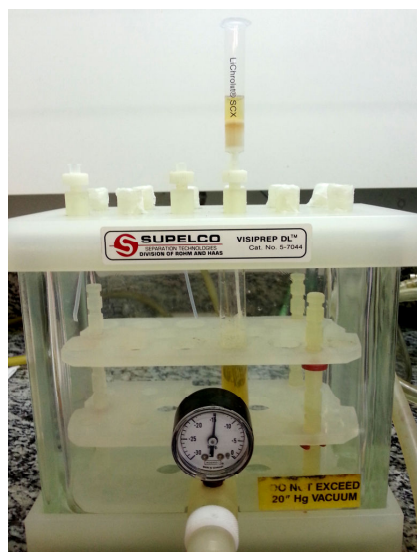


Figura 13. Sistema de SPE utilizado para limpeza da amostra de fruto de *C. aurantium*

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Métodos desenvolvidos

5.1.1 Otimização do método para determinação simultânea de octopamina, sinefrina, tiramina, hordenina, efedrina, salicina e cafeína para aplicação em suplementos alimentares

O primeiro parâmetro estudado para a análise destes compostos foi o comprimento de onda (λ) a ser utilizado na detecção dos picos cromatográficos. Para a escolha de um comprimento de onda que fosse capaz de detectar satisfatoriamente os sete estimulantes, foi analisado o espectro de absorção molecular de cada analito, a partir de soluções aquosas de seus padrões, conforme Figura 14.

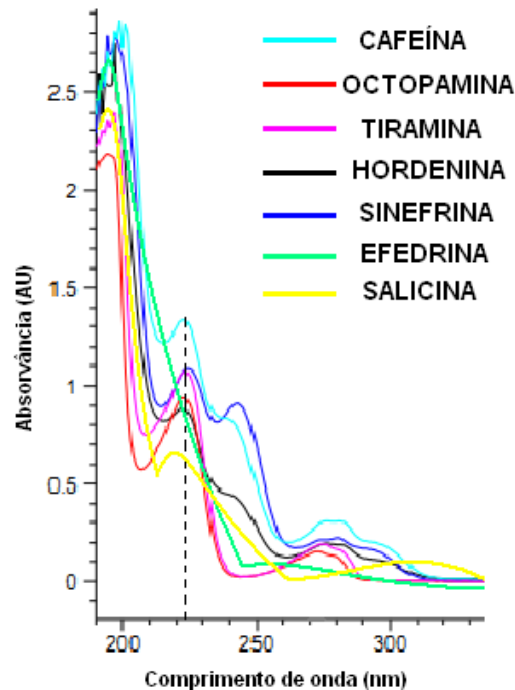


Figura 14. Representação dos espectros de absorção molecular dos estimulantes estudados

Os λ monitorados durante a etapa de otimização do método foram 200 nm, 222 nm, 245 nm e 275 nm, uma vez que o detector utilizado (DAD) permite a escolha simultânea de quatro λ em uma mesma análise.

O λ de 200 nm foi descartado, pois é uma região onde ocorre elevada absorção molecular dos solventes utilizados na fase móvel, provocando assim o surgimento de uma linha base bastante instável. O λ de 245 nm não se mostrou sensível para os compostos tiramina, octopamina e efedrina. Já o λ 275 nm não foi satisfatório para a análise da efedrina e da salicina, uma vez que não se mostraram sensíveis. Portanto, o comprimento de onda escolhido para monitorar todos os analitos foi λ 222 nm, pois além de ter sido considerado sensível a todos os compostos, a linha base se comportou de forma estável durante a corrida cromatográfica.

Para a escolha da fase móvel, foi utilizado como base um método já desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (VIANA et al., 2013), para a realização da separação de cinco aminas (tirosina, octopamina, sinefrina, tiramina e hordenina). Para isto, foi conduzido um estudo de pH de fase móvel, combinações binárias, ternárias e quaternárias de solventes, de acordo com o diagrama triangular para o desenvolvimento de métodos em HPLC (HARRIS, 2003). O método de partida

consistia em uma corrida isocrática de 70% ácido fosfórico 0,1% (v/v) e 30% de acetonitrila com fluxo variando de 0,8 a 1,5 mL min⁻¹ em coluna C₁₈ (Thermo Scientific). Ao aplicar estas condições para a separação de mais compostos em uma nova coluna C₁₈ (Phenomenex), o método não se mostrou satisfatório uma vez que houveram coeluições.

Tendo em vista que os pKa dos compostos adicionados neste método não diferiam significativamente dos pKa das aminas já estudadas anteriormente e que a sensibilidade dos sinais não se alteraram, optou-se por continuar o trabalho com ácido fosfórico 0,1%, uma vez que uma faixa de pH já havia sido testada anteriormente (2,0 – 4,0) em função dos pKa dos analitos, que nesta faixa encontram-se protonados.

A mudança do solvente orgânico precisou ser realizada uma vez que a utilização de acetonitrila aumentou a força de eluição da fase móvel, diminuindo o tempo de retenção dos compostos, provocando a sobreposição dos picos logo no início da corrida. Enquanto isso o metanol, por possuir uma força de eluição menor, provocou um aumento do tempo de análise, porém favoreceu a separação dos analitos. A análise isocrática utilizando ácido fosfórico 0,1% e metanol não foi suficiente para uma boa resolução dos picos. Por isso, fez-se necessário um gradiente de fase móvel e de vazão, de acordo com a Tabela 6 e Figura 15.

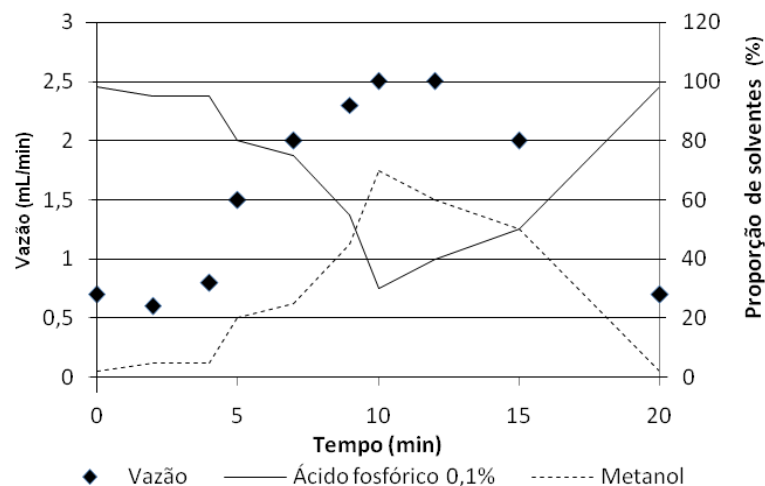


Figura 15. Gráfico demonstrando gradiente de fase móvel e de vazão utilizado no método otimizado para a determinação da octopamina, sinefrina, tiramina, hordenina, efedrina, salicina e cafeína

A otimização do gradiente de eluição ocasionou uma boa separação dos estimulantes em estudo, como mostra o cromatograma da Figura 16.

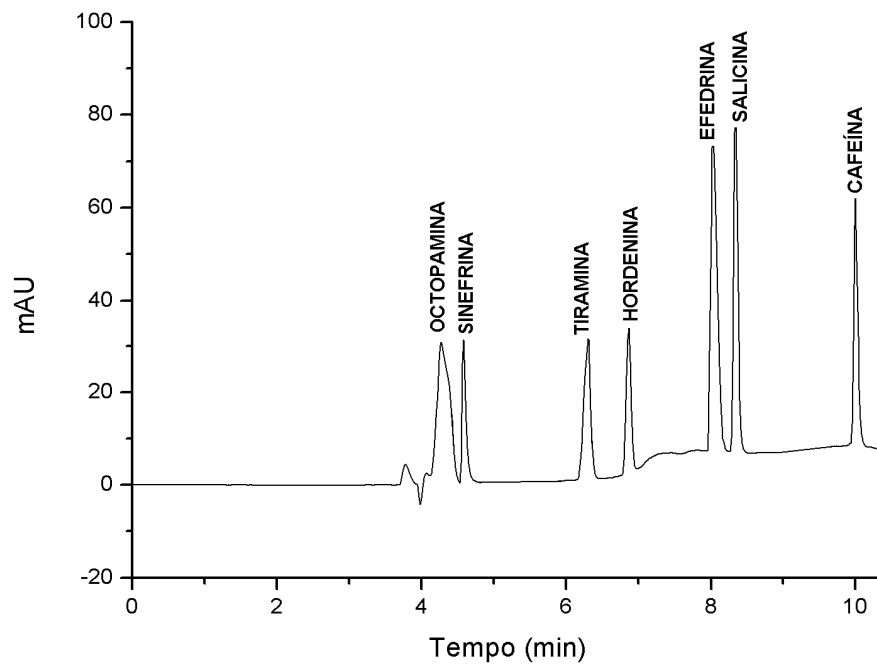


Figura 16. Cromatograma otimizado de acordo com o gradiente de vazão e solvente como exposto na Figura 15, em temperatura ambiente (24°C) com detecção em 222 nm e injeção 20µL.

5.1.1.1 Validação do método para determinação de octopamina, sinefrina, tiramina, hordenina, efedrina, salicina e cafeína

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curvas analíticas descritas na Tabela 9 (calibração externa). Analisando as equações das retas obtidas, podemos concluir que o método apresenta uma linearidade satisfatória para todos os estimulantes estudados. A Tabela 10 apresenta as equações da curva analítica e coeficiente de correlação para os analitos em questão.

Na prática, o LD é determinado como a menor concentração do analito que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança; e o LQ corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada (LANÇAS, 2004). Neste trabalho, os limites de detecção e de quantificação foram calculados pela determinação do ruído da linha base a partir da injeção de seis replicatas da fase móvel (branco). O limite de detecção teve por base a relação de três vezes o ruído da linha base, enquanto que o limite de quantificação foi considerado dez vezes o ruído desta. Ambos estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 8. Tempo de retenção, faixa linear e faixa de trabalho para os padrões analisados

Estimulantes	Tempo de retenção (min)	Faixa linear (mg L⁻¹)	Faixa de trabalho (mg L⁻¹)
Octopamina	4,1	0,5 – 100	1 – 50
Sinefrina	4,8	0,5 – 200	2 – 90
Tiramina	6,2	0,156 – 120	2,5 – 80
Hordenina	6,9	0,203 – 150	3,25 – 60
Efedrina	8,0	0,09 – 190	1,25 – 60
Salicina	8,3	0,39 – 250	3,12 – 50
Cafeína	10,0	0,078 – 50	2,5 – 50

Tabela 9. Equação da reta e coeficiente de correlação, obtidos a partir da análise da faixa de trabalho em triplicata de cada estimulante

Estimulantes	Equação da reta	R
Octopamina	$y=23435,29x - 3315,66$	0,99
Sinefrina	$y=5181,83x - 17627,6$	0,99
Tiramina	$y=12562,46x + 13,997,28$	0,99
Hordenina	$y=10239,88x + 34364,64$	0,99
Efedrina	$y=13838,26x + 7041,09$	0,99
Salicina	$y=2873,84x + 2280,10$	0,99
Cafeína	$y=17663,21x + 522,12$	0,99

Tabela 10. Valores referentes ao LD e LQ de cada estimulante

Estimulantes	LD (mg L⁻¹)	LQ (mg L⁻¹)
Octopamina	0,108	0,36
Sinefrina	0,200	0,669
Tiramina	0,143	0,478
Hordenina	0,351	1,169
Efedrina	0,021	0,072
Salicina	0,189	0,631
Cafeína	0,058	0,192

Em cromatografia, a precisão é determinada por intermédio da injeção de padrões analíticos (LANÇAS, 2004). Neste trabalho tanto a precisão intradia quanto a interdia (Tabela 12) foram analisadas em três concentrações diferentes, a partir de injeções realizadas em triplicatas, e foram expressas em DPR, os quais foram considerados aceitáveis de acordo com a AOAC, guia de validação utilizado neste trabalho.

Para o cálculo das recuperações, foram construídas curvas analíticas através da adição de padrão (n=3) sobre três amostras de suplementos alimentares sólidos, escolhidas aleatoriamente (designadas de A, B e C), visando minimizar a interferência da matriz. Sobre a amostra (A) foi feito o estudo de recuperação de octopamina, tiramina e salicina. Em uma amostra (B) foi realizado a recuperação da sinefrina e hordenina. E em uma terceira amostra (C) foi determinada a recuperação da cafeína e efedrina.

De acordo com a AOAC (AOAC, 2013), um apêndice para validação de suplementos alimentares e produtos botânicos, as recuperações e a precisão permaneceram dentro da faixa aceitável, como apresentado na Tabela 12 e 13.

Tabela 11. Precisão intradia e interdia dos estimulantes realizada em três níveis de concentração e em triplicata.

Analito	Nível 1			Nível 2			Nível 3		
	Concentração	DPR (%)	DPR (%)	Concentração	DPR (%)	DPR (%)	Concentração	DPR (%)	DPR (%)
	(mg L ⁻¹)	Intradia	Interdia	(mg L ⁻¹)	Intradia	Interdia	(mg L ⁻¹)	Intradia	Interdia
Octopamina	1	4,8	3,3	15	5,1	4,8	50	5,7	3,2
Sinefrina	2	5,3	0,7	20	1,6	1,8	90	2,9	4,6
Tiramina	2,5	4,1	0,9	20	4,5	5,5	80	4,4	2,4
Hordenina	3,25	2,8	2,3	15	4,9	5,6	60	2,5	2,3
Efedrina	1,25	5,7	6,6	10	2,2	6,7	60	1,3	5,4
Salicina	3,1	6,3	6,7	12,5	3,1	8,2	50	8,4	6,7
Cafeína	2,5	4,8	2,1	15	0,8	0,7	50	2,8	1,4

n=3

Tabela 12. Faixa de recuperação obtida para os sete estimulantes durante os ensaios de exatidão.

Estimulantes	Faixa de Recuperação %
Octopamina	91 – 120
Sinefrina	82 – 97
Tiramina	74 – 97
Hordenina	95 – 120
Efedrina	81 – 117
Salicina	95 – 119
Cafeína	84 – 120

n=3

Com relação à especificidade, foram testados dois anorexígenos como possíveis interferentes, sendo eles a sibutramina (A) e o femproporex (B), como apresentado na Tabela 17.

De acordo com os cromatogramas A e B, percebemos que ambos não interferem na análise dos estimulantes em questão, uma vez que a sibutramina possui tempo de retenção em 12,5 min e o femproporex em 8,7 min. Logo, frente a essas substâncias, fortes candidatas a estarem presentes como adulterantes nessa classe de produtos estudados (COHEN, 2014c), o método se mostrou seletivo para os compostos estudados.

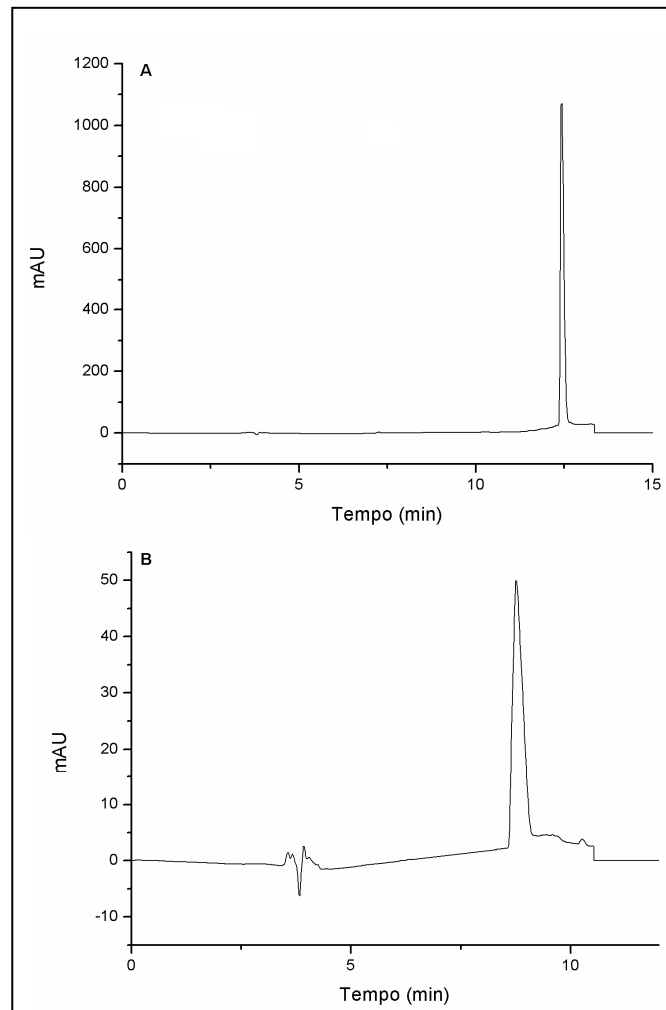


Figura 17. Cromatograma A: Sibutramina. Cromatograma B: Femproporex. Anorexígenos não interferentes na análise de estimulantes. Gradiente de vazão e de fase móvel conforme Figura 15, em temperatura ambiente (24°C) com detecção em 222 nm e injeção 20 μ L.

5.1.2 Otimização do método para determinação da cafeína na presença de outras aminas

De acordo com o espectro de absorção desta metilxantina (Figura 18), os comprimentos de onda escolhidos para monitorar as análises foram 200, 220, 275 e 280 nm.

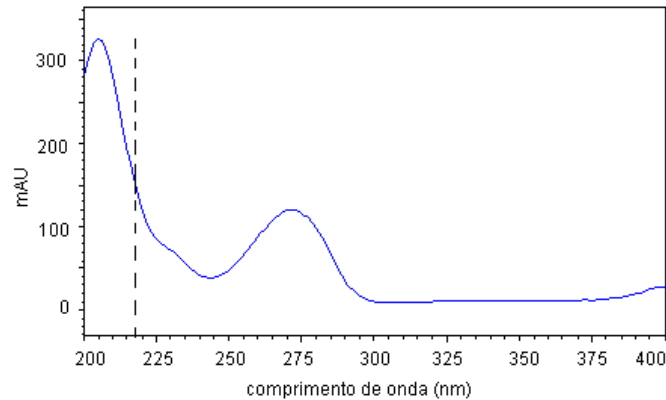


Figura 18. Espectro de absorção da cafeína obtido pelo detector arranjo de fotodiodos no HPLC.

O λ escolhido foi de 220 nm, uma vez que os outros comprimentos de onda se mostraram sensíveis às variações da linha base, devido ao solvente absorver na mesma faixa de comprimento de onda.

Em um trabalho realizado anteriormente por VIANA (2013) em nosso grupo de pesquisa, a cafeína foi um dos compostos testados na seletividade do método na análise de cinco aminas biogênicas. Este derivado das xantinas não se mostrou interferente e teve seu tempo de retenção em 4,2 min, um tempo considerado adequado para a análise de 100 amostras de produtos naturais como objetivava este trabalho. Portanto, este método foi adaptado para o estudo dos produtos naturais reduzindo-se o tempo de análise do método exposto na Tabela 7 e na Figura 19, o qual foi posteriormente validado.

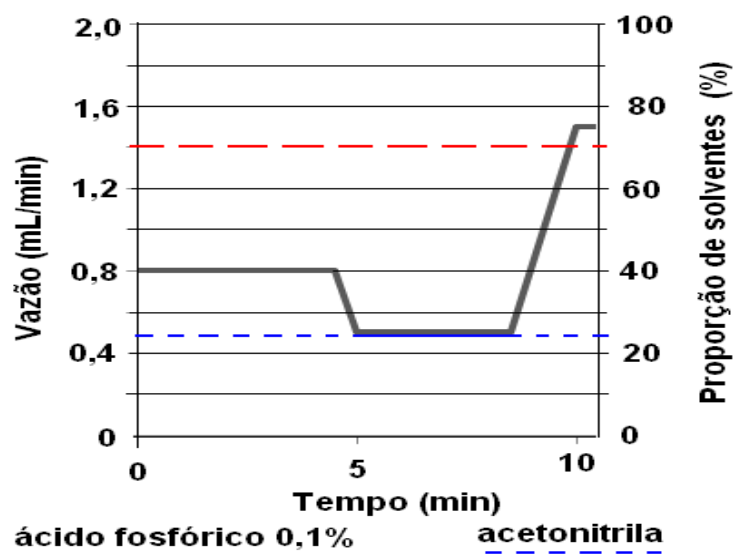


Figura 19. Gráfico demonstrando método isocrático aplicando gradiente de vazão para determinação de cafeína em produtos naturais a base de plantas.

Após a otimização do método pode-se obter o cromatograma exposto na Figura 20 a seguir.

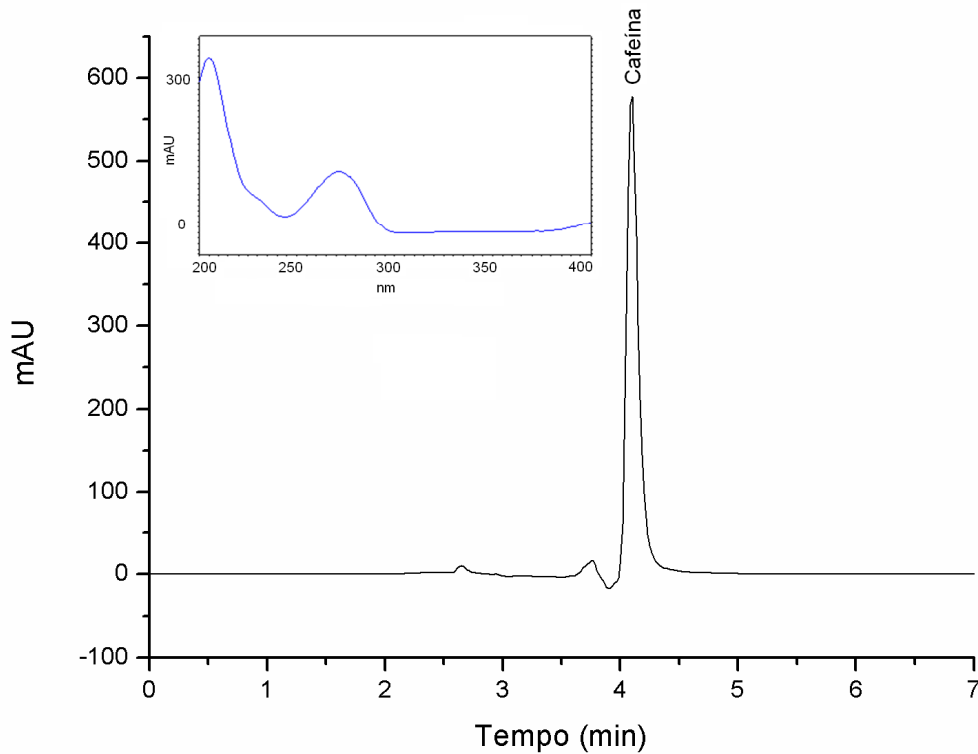


Figura 20. Cromatograma obtido para o padrão de cafeína, a partir da adaptação de método demonstrado na Figura 19, temperatura ambiente (24°C), injeção 20 μ L, detecção em 220 nm.

5.1.2.1 Validação para o método da cafeína

A linearidade do método, avaliada através da construção de uma curva analítica com faixa de trabalho de 1,0 a 20,0 mg L^{-1} , foi obtida a partir de uma solução estoque de cafeína 500 mg L^{-1} em acetonitrila, e foi considerada adequada, uma vez que seu coeficiente de correlação foi acima de 0,99. O LD e LQ foram calculados pela determinação do ruído da linha base pela injeção de dez replicatas da mesma. O valor de LD teve por base a relação de três vezes o ruído, enquanto que o LQ foi considerado dez vezes o mesmo. A precisão intradia e interdia foi realizada em triplicata e em três níveis de concentração, 1,0 10,0 e 20,0 mg L^{-1} com padrão. A exatidão foi calculada pelo método da adição do padrão, igualmente em

três níveis (1,0 10,0 e 20,0 mg L⁻¹), sobre uma amostra isenta de cafeína. Todos os parâmetros avaliados na validação deste método estão descritos na Tabela 14.

Tabela 13. Parâmetros de validação para o método da cafeína

Parâmetro validado	Resultados obtidos
Equação da reta	$y = 192706,6x + 623,01$
R	0,99
LD (mg L ⁻¹)	0,048
LQ (mg L ⁻¹)	0,16
Precisão - DPR (%) intradia	0,8 – 2,3
Precisão - DPR (%) interdia	1,9 – 2,5
Exatidão (recuperação %)	91,7 – 101,2

*Valores de DPR e Exatidão correspondem ao mínimo e máximo obtidos nas três concentrações

Para verificar a especificidade do método proposto, foram analisadas as seguintes matérias primas: Faseolamina, *Caralluma fimbriata*, Cassiolamina, *Fucus*, *Equisentum*, Psyllium, Pholia magra, Chá verde, *Spirulina*, *Passiflora*, Cáscara sagrada, Garcinia cambogia, *Citrus aurantium*, Glucomannan, Ma huang, Guaraná, Chitosana e Sene, as quais foram obtidas de farmácia de manipulação livres de excipientes, tratadas nas mesmas condições das amostras comerciais.

O estudo das matérias primas é importante, uma vez que elas podem estar presentes na matriz de produtos naturais, podendo vir a interferir na determinação e quantificação de outros compostos de interesse. Da forma como esses materiais vegetais foram preparados, eles não se mostraram interferentes no método (Figura 21). Além disso, foi verificado neste estudo de especificidade que a Pholia magra, o Guaraná e o Chá verde, apresentaram teores basais de cafeína natural. Por isso, foi possível prever se a cafeína encontrada nas amostras era de origem natural ou sintética.

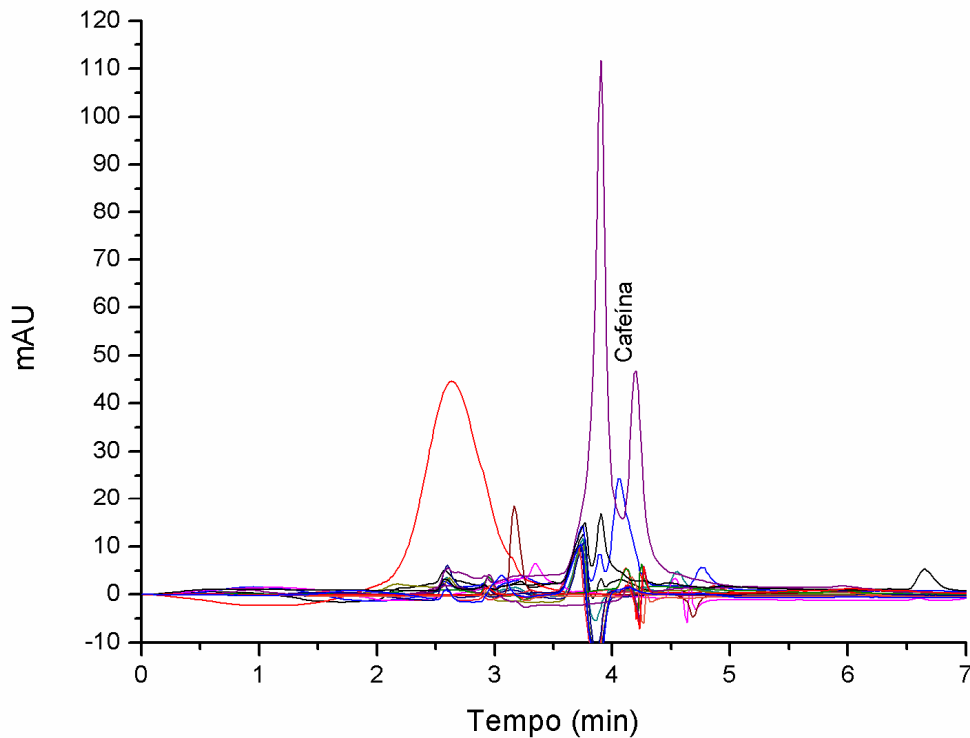


Figura 21. Cromatogramas sobrepostos das matérias primas frente ao método da cafeína para avaliar o parâmetro especificidade do mesmo. Método conforme Figura 19. Temperatura ambiente (24°C). Detecção em 220 nm. Injeção de 20 μ L.

5.1.3 Otimização do método para determinação dos enantiômeros da (\pm) *p*-sinefrina

A importância na determinação e diferenciação de entre os enantiômeros da sinefrina se dá pelo fato de que somente a conformação levógira do composto apareça naturalmente na espécie de *C. aurantium*, fazendo com que a presença do racemato em amostras naturais se torne bastante questionável em relação à adulteração deste produto com a substância sintética.

A escolha do comprimento de onda empregado nas análises de compostos quirais é de fundamental importância uma vez que possui grande efeito sobre o formato e simetria dos picos (SINGH, 2012). De acordo com o espectro de absorção desta amina biogênica quiral, os comprimentos de onda escolhidos para monitorar as análises foram 220, 225, 255 e 270 nm de acordo com o espectro molecular

(Figura 22). O λ escolhido foi de 255 nm, pois nesse comprimento de onda ambos enantiômeros apresentaram sensibilidade semelhantes de absorção e não houve interferência dos solventes utilizados na fase móvel escolhida.

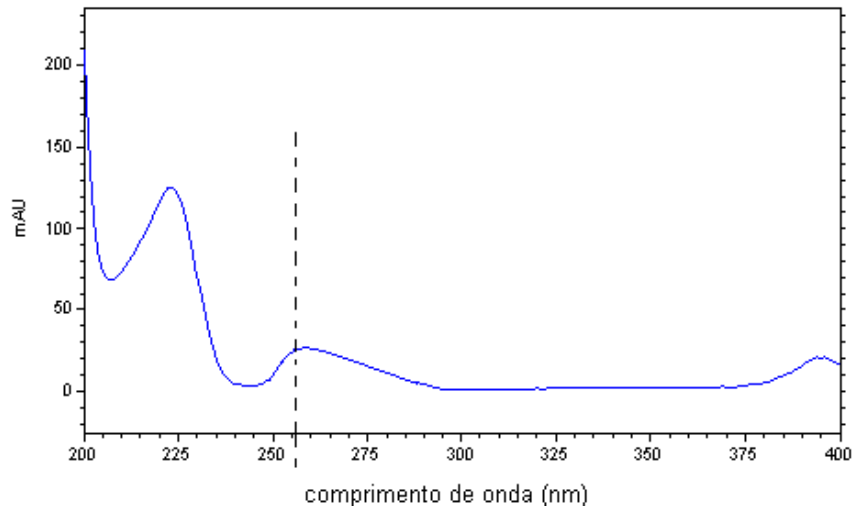


Figura 22. Espectro da sinefrina obtido pelo detector arranjo de fotodiodos

Essencialmente são três as variáveis de fases móveis que podem ser exploradas para otimizar a resolução de um determinado racemato, entre elas o pH, o modificador orgânico e a força iônica (ALLENMARK et al., 1984).

As fases móveis começaram a ser testadas a partir das especificações contidas no manual da própria coluna cromatográfica para separação de moléculas com centros quirais. O primeiro cuidado que precisamos ter ao testar os eluentes, foi a estreita faixa de pH suportada pela coluna quiral (3,0 – 7,0). Os testes se iniciaram com mistura de solventes básicos como misturas binárias, ternárias e quaternárias de água, com modificadores orgânicos como metanol, acetonitrila e tetraidrofurano, em proporções diversas. O melhor resultado obtido inicialmente foi a fase móvel de composição Água:Metanol (40:60) conforme a Figura 23.

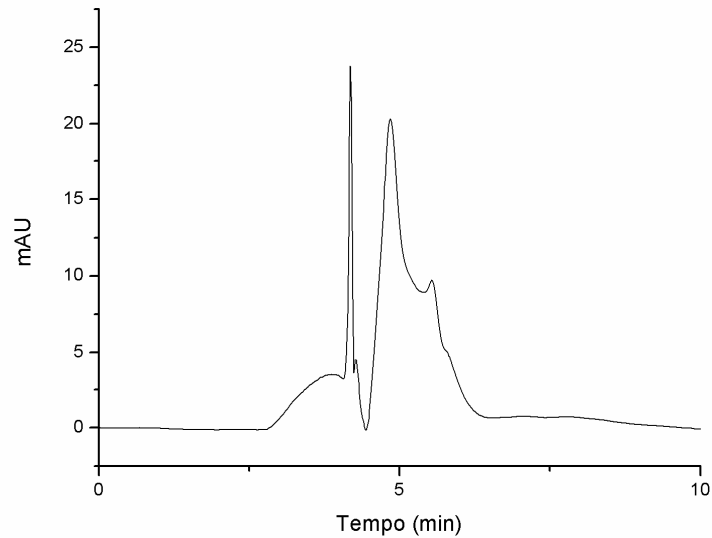


Figura 23. Cromatograma obtido pela injeção do padrão de (\pm) p-sinefrina na condição água:metanol (40:60) como eluente, em fluxo de $0,7 \text{ mL L}^{-1}$, detecção em 255 nm. Coluna β ciclodextrina.

A partir destes primeiros testes realizados, tomamos por base a utilização de água e metanol como solventes de ponto de partida para o aprimoramento da fase móvel. A faixa de pH testada (3,0 - 7,0) foi efetuada a fim de analisarmos a melhor resolução dos enantiômeros, pois na questão de carga molecular, em todos os pHs possíveis a serem testados, o composto estudado sempre se apresentará em sua forma protonada, uma vez que o seu pKa é de 9,37 – 9,98, como citado na Tabela 5. Na Figura 24 podemos perceber que o pH de 4,0 foi o que apresentou melhor sensibilidade, por isso foi o escolhido.

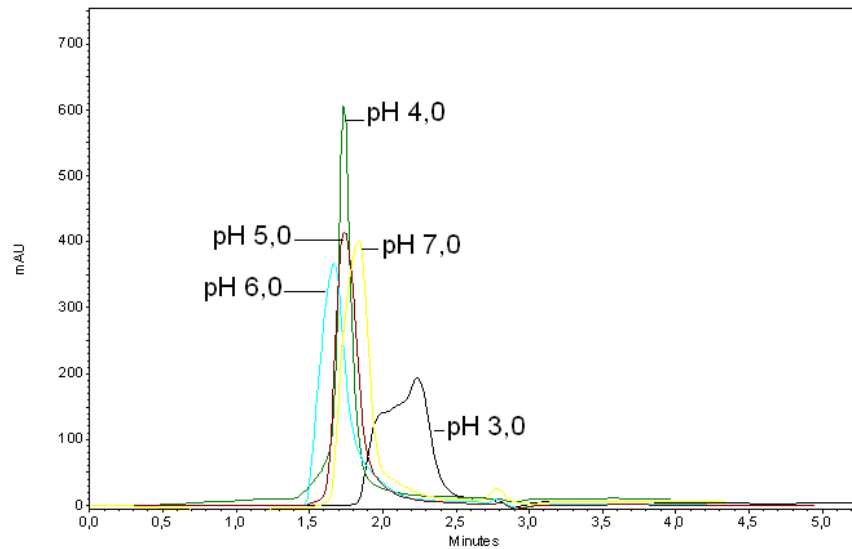


Figura 24. Valores de pH testados em fase móvel água:metanol (40:60). Fluxo $0,9 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção 255 nm em coluna de β ciclodextrina.

Posteriormente, a fase móvel passou a ser testada frente ao modificador trietilamina (TEA), ao tampão fosfato de sódio, à β ciclodextrina como seletor quiral de fase móvel e ao tensoativo aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) como reagente de pareamento iônico.

Dentre todos os testes realizados, a adição de SDS à fase móvel foi a que melhor respondeu à separação enantiomérica da (\pm) *p*-sinefrina. Em um segundo momento, analisamos que a utilização concomitante de SDS e β -ciclodextrina na fase móvel poderia ser a mais adequada. Entretanto, após ser feita uma curva de calibração do padrão racêmico da sinefrina, percebemos que apesar da boa separação dos picos, a presença da β -ciclodextrina interferiu na sensibilidade de detecção de um dos enantiômeros. Subsequentemente, foi testada a faixa de concentração de 1 a 20 mM de SDS na fase móvel, pois segundo Ganzera et al. (2005) a concentração de SDS é de grande importância, uma vez que aumentando a concentração do reagente de par iônico, o resultado das separações em estudo realizado com *Ephedra* e *Citrus* foi melhorado continuamente. Entretanto, concentrações muito elevadas deste agente tensoativo prolongam os tempos de separação além de prejudicar a vida útil da bomba do equipamento. A concentração de SDS escolhida como satisfatória foi de 6 mM.

Outro parâmetro testado foi a vazão da fase móvel, entre $0,5$ e $0,9 \text{ mL min}^{-1}$. Em fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ os picos se apresentaram alargados, sendo que fluxos

acima de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ ocorria a diminuição na resolução dos mesmos, além de aumentar significativamente a pressão do sistema cromatográfico. Logo, a vazão escolhida para a análise foi de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$.

Por último, um ajuste fino quanto as proporções do tensoativo (SDS 6 mM) e de metanol foi realizado em torno das melhores condições estabelecidas inicialmente (40:60), conforme mostrado no Figura 24. Aqui, podemos concluir que a proporção de 50% SDS 6 mM acidificado a pH 4,0 com ácido fosfórico e 50% metanol foi a condição mais adequada à uma boa separação cromatográfica.

Em separações quirais, a temperatura muitas vezes se apresenta como sendo um fator crítico na análise. Ela é um parâmetro importante para a otimização na separação enantiomérica de catecolaminas quando empregando ciclodextrina como seletor quiral (LIN et al., 2006). Ao analisarmos outros trabalhos aplicando cromatografia líquida e β ciclodextrina como seletor quiral, percebemos que não é rara a utilização de fornos acoplados ao cromatógrafo para o resfriamento da coluna ($\sim 2^\circ\text{C}$), e que estes seletores podem sofrer mudanças conformacionais induzidas pela temperatura (MA et al., 2009). Sendo assim a temperatura ambiental no laboratório foi monitorada entre 18°C e 30°C a fim de encontrarmos uma temperatura ótima de análise capaz de proporcionar adequada resolução dos picos cromatográficos. O fator de resolução (α) da separação cromatográfica leva em consideração o tempo de retenção (T_r) dos analitos, o fator de retenção e o tempo morto (T_0) (pico inicial do solvente). Quanto maior α , maior a separação e melhor a resolução da mesma. Como podemos perceber na Figura 25, quanto menor a temperatura empregada, maior o fator de retenção, logo maior o α .

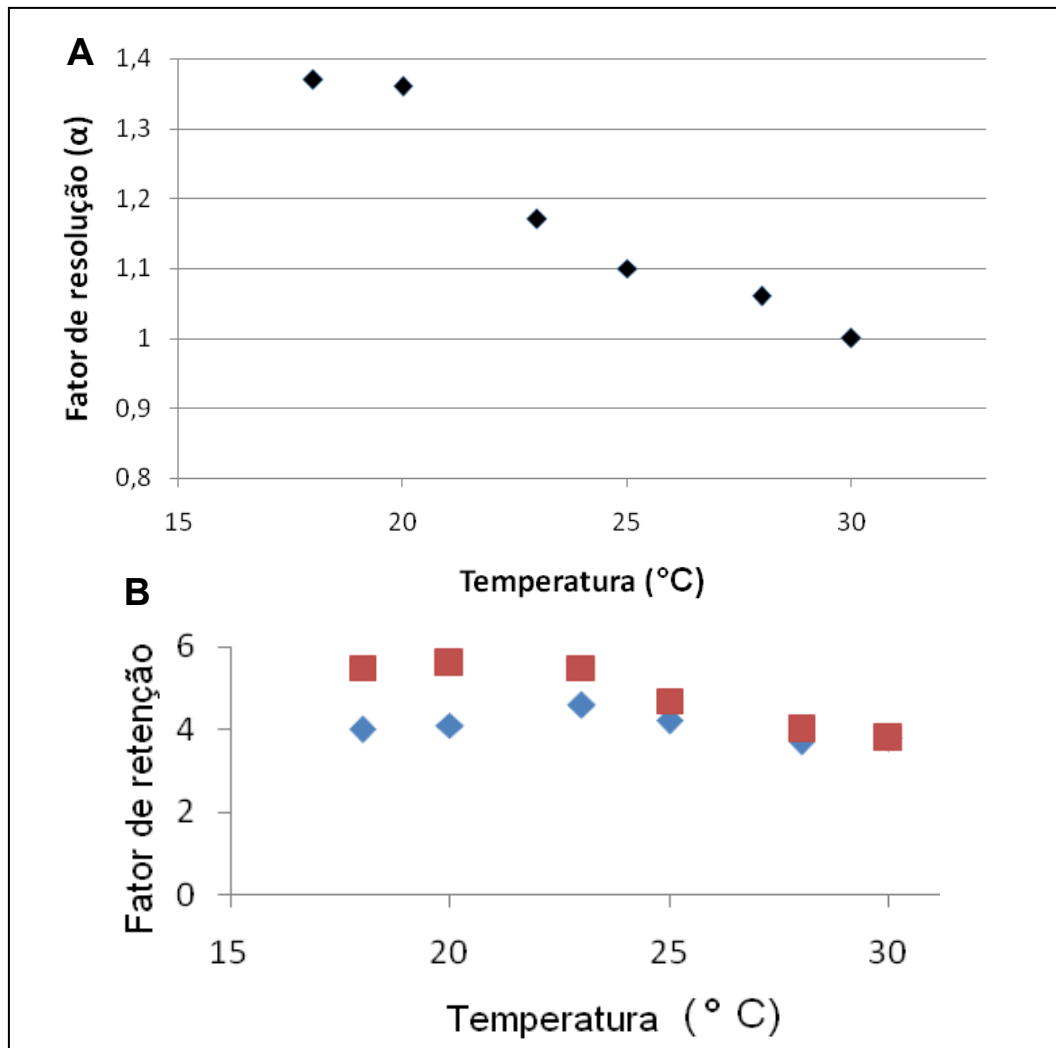


Figura 25. Resolução (A) e fator de retenção (B) dos enantiômeros da (\pm) p-sinefrina de acordo com a temperatura.

As temperaturas mais elevadas prejudicaram a resolução dos picos, já a menor temperatura monitorada (18 °C), apesar de apresentar a melhor resposta em termos de resolução cromatográfica foi considerada inviável de ser utilizada, uma vez que em estações mais quentes seria difícil mantê-la. Logo, optou-se pela temperatura de 20 °C.

O método ficou otimizado isocraticamente com fase móvel composta de 50% SDS 6 mM pH 4,0 (ajustado com ácido fosfórico) e 50%Metanol, vazão 0,6 mL min⁻¹, λ monitorado em 255 nm e temperatura controlada em 20°C. A Figura 26 apresenta o cromatograma da separação dos enantiômeros obtido a partir das condições então otimizadas.

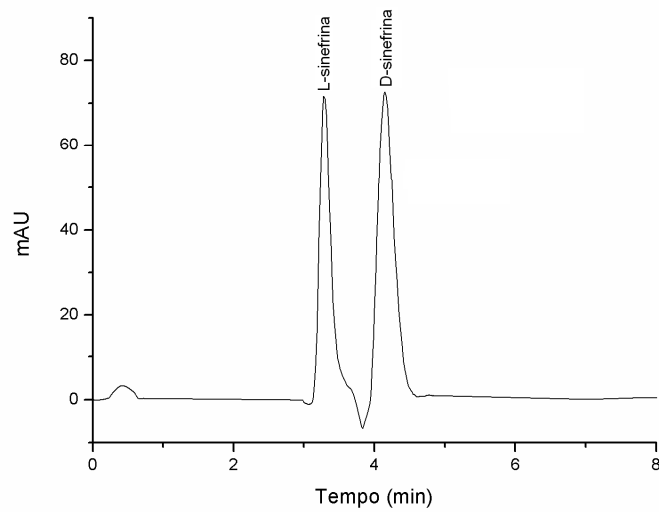


Figura 26. Cromatograma obtido do padrão (\pm) *p*-sinefrina após otimização do método. Eluente: 50% SDS 6 mM acidificado pH 4,0 com ácido fosfórico 50% metanol. Vazão $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. Temperatura 20°C , Detecção 255 nm. Injeção $20 \mu\text{L}$. Coluna β Ciclodextrina.

5.1.3.1 Validação do método desenvolvido para determinação dos enantiômeros da (\pm) *p*-sinefrina

A linearidade do método, avaliada através da construção de uma curva analítica com faixa de trabalho de $1,0$ a $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ para a L-sinefrina e $2,0$ a $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ para a D-sinefrina, obtida a partir de uma solução estoque de (\pm) *p*-sinefrina 100 mg L^{-1} em metanol, e foi considerada adequada, uma vez que seu coeficiente de correlação foi acima de $0,99$ para ambas. O LD e LQ foram calculados pela determinação do ruído da linha base pela injeção de dez replicatas da mesma. O valor de LD teve por base a relação de três vezes o sinal ruído, enquanto que o LQ foi considerado dez vezes este sinal. A precisão intradia foi realizada em triplicata sobre três pontos da curva (L-sinefrina: $5,0$; $10,0$ e $12,0 \text{ mg L}^{-1}$; D-sinefrina: $2,0$; $5,0$ e $12,0 \text{ mg L}^{-1}$), já a precisão interdia foi realizada em triplicata sobre o ponto $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ da mesma. A exatidão foi calculada a partir da adição de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ do padrão sobre uma amostra do fruto de *C. aurantium*. Todos os parâmetros avaliados estão descritos na Tabela 15.

Tabela 14. Parâmetros de validação para enantiômeros da p-sinefrina

Parâmetro validado	L-sinefrina	D-sinefrina
Equação da reta	$y = 6.815,4x + 1091,5$	$y = 6.509,9x + 36193,4$
r	0,99	0,99
LD (mg L ⁻¹)	0,11	0,41
LQ (mg L ⁻¹)	0,36	1,36
DPR (%) intradia	1,01 – 4,95	0,85 – 6,0
DPR (%) interdia	3,67	1,21
Exatidão (recuperação %)	110	92

*Valores de DPR intradia para ambos enantiômeros corresponde ao mínimo e máximo obtidos em três concentrações

Para verificar a especificidade, o método foi testado frente à tirosina, octopamina, tiramina, hordenina, efedrina, salicina e cafeína, separadamente. A tirosina e a cafeína não foram consideradas interferentes neste método, uma vez que tiveram tempo de retenção de 5,2 e 4,9 min, respectivamente. Os outros analitos testados interferiram não só pelo mesmo tempo de retenção, mas também pela supressão do sinal causado no analito de interesse. Entretanto, as outras aminas como possíveis interferentes (octopamina, hordenina, tiramina efedrina e salicina) se encontram geralmente em baixas concentrações em amostras contendo *C. aurantium*, de modo que a determinação de (\pm) sinefrina se torna possível pelo método da adição do padrão.

Em relação a robustez, o método se mostrou bastante sensível frente a pequenas variáveis, sendo a temperatura o parâmetro mais crítico a ser controlado.

5.2 Aplicação dos métodos desenvolvidos em produtos para perda de peso

Os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados em uma série de amostras reais a fim de verificar a aplicabilidade dos mesmos.

Todas as amostras positivas para os compostos de interesse tiveram seus *pools* analisados em triplicata, ou seja, o procedimento de extração a partir do *pool* das cápsulas era feito três vezes.

A fim de se proceder com a quantificação das amostras, foram realizados ensaios prévios à extração através do método de adição de padrão na amostra. Dessa forma garantiu-se que os compostos de interesse fossem extraídos

completamente da matriz analisada. Após ser determinado o procedimento de extração para cada tipo de amostra (suplemento / produto natural), foi realizada uma curva de calibração interna para cada composto estudado. Esta curva na amostra se mostrou equivalente à curva de calibração externa. Devido ao amplo número de produtos amostrados, optou-se por realizar a etapa de quantificação através da curva de calibração externa obtida com os padrões analíticos.

Para os cálculos de quantificação e determinação do teor (mg/dia) de cada produto, foram consideradas as diluições, o peso médio e a dose diária recomendada em cada rótulo. A etapa de quantificação nas amostras se deu pela regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados.

5.2.1 Suplementos alimentares

O método validado para a determinação e quantificação de octopamina, sinefrina, tiramina, hordenina, efedrina, salicina e cafeína foi utilizado para fazer o *screening* de 47 amostras de suplementos alimentares comercializadas na forma sólida (pó).

De todas as amostras analisadas (Tabela 16), 53% delas apresentaram estimulantes (marcadas com letra alfabética) as quais estão posteriormente descritas na Tabela 17.

Tabela 15. Amostras de suplementos alimentares analisados com as respectivas descrições, doses recomendadas em rótulo e nome comercial.

Amostra	Descrição	Rótulo	Nome comercial
1 – A	Picolinato de cromo, cafeína (225mg), guaraná, mate, vitaminas e minerais (cápsula em pó)	4 caps/dia	Ripp ABS
2 – B	Produto a base de guaraná que possui naturalmente altas concentrações de cafeína (cápsula em pó)	2 caps/dia	Therma Pro Hardcore
3	Maltodextrina, contém	40 g/250 mL	Mega

	fenilalanina (a granel)		Maltodextrina
4 – C	Maltodextrina, guaraná, laranja amarga, chá verde (a granel)	4 g/250 mL (2xdia)	Thermo Syn
5	Extrato de acerola, extrato de café verde, extrato de chá verde, extrato de Goji Berry (cápsula em pó)	1 caps (2xdia)	Goji Green
6	Café verde picolinato de cromo extrato de acerola (capsula em pó)	2 caps (2xdia)	Café verde com picolinato de cromo
7 – D	Cafeína anidra (capsula vermelha), fibra de laranja, psyllium, quitosana, vitamina e minerais (cápsula incolor) (capsula em pó)	Caps incolor (2xdia) Caps colorida (1xdia)	Sineflex
8	Amido de milho ceroso (carboidrato complexo) (a granel)	30 g/250 mL (2xdia)	Energy Waximaize
9	Proteína isolada e hidrolisada (a granel)	4 doses por dia (dose= 25 g/125 mL)	Hydro fusion
10	Proteína do soro do leite isolada e hidrolisada (a granel)	31 g/300 mL	Iso 100 hydrolyzed
11 – E	Guaraná, colina, psyllium, vitaminas (cápsula em pó)	2 caps (2xdia)	Charge!
12 – F	Colina, magnésio, vitaminas, cromo, ácido fólico,	2 caps (2xdia)	

	extrato de chá verde, extrato de guaraná, extrato de laranja amarga, extrato de canela (cápsula em pó)		Ripped Rave
13 – G	Suplemento de cafeína para atletas (cápsula em pó)	1 caps/dia	Thermo Reduction
14	Fibra dietética natural (cápsula em pó)	2 caps (2x/dia)	Chitosan Plus
15 – H	Suplemento vitamínico cafeína (280mg), <i>Citrus aurantium</i> (364mg), guaraná (1.254mg), chá verde (282mg), cromo e biotina (cápsula em pó)	4 caps/dia	Thermo Active
16	Psyllium, 30 ervas, guaraná laranja amarga (cápsula em pó)	9 caps/dia	30 ervas
17	Aminoácidos de cadeia ramificada (cápsula em pó)	4 caps/dia	BCAA
18	Suplemento vitamínico/mineral cromo, colina café verde (cápsula em pó)	3 caps/dia	Cellu Control Green Coffee
19	Chá verde, colágeno, inulina, gengibre, vitamina e minerais (a granel)	5 g/200 mL	Blue Burn Control
20	Colágeno, betacaroteno vitamina C (a granel)	10 g/200 mL	Colágeno hidrolisado
21	Fibra de laranja amarga (cápsula em pó)	2 caps (2x/dia)	Citrus
22 – I	Cafeína (420 mg/porção) (cápsula em pó)	1 porção/dia (porção=2 cáps)	Adrena Sintex

23 – J	Cafeína (420 mg/porção) (cápsula em pó)	1 porção/dia (porção=2 cáps)	Caffeine Black Jack
24	Triglicerídeos de cadeia média (a granel)	10 g/150 mL	MCT
25	Fibras de aminopolissacarídeos (cápsula em pó)	2 caps (3x ao dia)	Fat Bloker
26	Elevado teor de proteína e baixa caloria (a granel)	25 g/200 mL	FitMiss Delight
27	Faseolamina, chá branco, colágeno e cromo (a granel)	5 g/200 mL	Carb Locker
28 – K	Cafeína (300 mg/porção) (cápsula em pó)	1 porção/dia (porção=2 cáps)	Ultimate Fire White
29 – L	Cafeína (420 mg/porção) (cápsula em pó)	1 porção/dia (porção=2 cáps)	Black Burn Ultraconcentrada
30	Proteína isolada (a granel)	32 g/300 mL	Gold Standard Whey
31	L-glutamina (a granel)	5 g/60 mL	Glutamine Fuel
32 – M	Cafeína (420 mg/porção)	1 porção/dia (porção=2 cáps)	Ultimate Fire Black
33	Óleo vegetal em pó, triglicerídeos de cadeia média (a granel)	10 g/200 mL	MCT Powder
34 – N	<i>Citrus aurantium</i> , colina, chá verde, cromo, vitaminas e minerais (cápsula em pó)	2 caps (2xdia)	Thermo Max
35 – O	Proteína isolada do leite, extrato de chá verde, laranja amarga, guaraná, vitaminas e minerais (saches)	4 g/300 mL	Thermo plus
36 – P	Suplemento vitamínico e mineral cromo, magnésio, <i>Citrus aurantium</i> (cápsula em pó)	2 caps/dia	Silouet

37	Aminoácido de cadeia ramificada (a granel)	13 g/350 mL	Amino 1
38	Proteína de carne bovina hidrolisada e isolada e maltodextrina (a granel)	31 g/300 mL	Carnivor
39 – Q	Suplemento de cafeína para atletas (cápsulas em pó)	1 caps/dia	Oxyelite Pro (BR)
40 – R	Chá misto de laranja amarga, chá verde, mate, guaraná (a granel)	3 g/250 mL	Jack 3D
41 – S	Sinefrina, picolinato de cromo, café verde, cafeína (70 mg/porção) (a granel)	5 g/200 mL	F-destroyer
42 – T	Cafeína (cápsula em pó)	1 caps/dia	Extreme Black
43 – U	Proteínas, Vitaminas e minerais cafeína (440 mg) (a granel)	15g em 200mL	Blast combat
44 – V	<i>Citrus aurantium</i> , guaraná, erva mate, chá verde, termogênico ultra concentrado (a granel)	5 g/240 mL	Furian
45 – W	Guaraná adicionado de fibras, chá verde, vitaminas e minerais, psyllium, cafeína (446 mg/porção), picolinato de cromo (cápsula em pó)	3 caps/dia	Thermo Dragon
46 – X	Cafeína, dimetilamilamina (cápsulas em pó)	3 caps/dia	Oxyelite Pro (Rivera)
47 – Y	Ma Huang (400mg), hidroclorotiazida (25mg), guanidina (100mg)	1 cap (3x/dia)	Composto emagrecedor

(cápsula em pó)

Das 47 amostras analisadas, 25 apresentaram cafeína e/ou efedrina e/ou sinefrina como estimulantes. A Tabela 17 mostra os resultados de quantificação dos estimulantes encontrados nos produtos estudados. O teor (mg/dia) encontrado é referente à uma análise em triplicata das amostras. Os resultados são apresentados já em relação ao teor consumido por dia pelo usuário tomando por base a quantidade sugerida no rótulo.

Tabela 16. Amostras que apresentaram estimulantes em sua composição, teor do estimulante encontrado pelo método desenvolvido, desvio padrão absoluto do teor encontrado e teor que deveria estar presente (rotulado)

Amostra	Estimulante presente	Teor mg/dia encontrado	Desvio padrão absoluto (mg/dia)*	Teor mg/dia rotulado
Amostra A	Cafeína	372,5	9,5	225,0
Amostra B	Cafeína	505,1	42,3	280,0
Amostra C	Cafeína	661,8	55,2	400,0
Amostra D	Cafeína	232,2	8,9	210,0
Amostra E	Cafeína	388,3	13,1	-
Amostra F	Cafeína	105,8	2,8	-
	Efedrina	26,1	2,3	-
Amostra G	Cafeína	291,2	33,7	- ^a
Amostra H	Cafeína	362,4	16,3	280,0
	Sinefrina	59,1	6,1	- ^b
Amostra I	Cafeína	539,2	25,0	420,0
Amostra J	Cafeína	641,7	23,4	420,0
Amostra K	Cafeína	536,0	32,0	300,0
Amostra L	Cafeína	500,0	79,8	420,0
Amostra M	Cafeína	646,2	73,5	420,0
Amostra N	Cafeína	25,0	3,4	-
	Sinefrina	61,0	2,8	- ^c
Amostra O	Sinefrina	86,8	11,0	- ^c

Amostra P	Sinefrina	127,0	11,1	- ^c
Amostra Q	Cafeína	395,0	26,8	- ^a
Amostra R	Cafeína	402,2	28,7	-
Amostra S	Cafeína	367,0	19,6	70,0
Amostra T	Cafeína	543,0	38,9	- ^a
Amostra U	Cafeína	1476,7	78,5	440,0
Amostra V	Cafeína	754,0	60,9	-
Amostra W	Cafeína	223,6	8,0	446,0
Amostra X	Cafeína	426,8	21,5	- ^a
Amostra Y	Efedrina	45,3	2,9	- ^d

a: Declara cafeína sem teor

b: Declara *Citrus* com teor de 364,0 mg/dia

c: Declara *Citrus* sem teor

d: Declara Ma Huang 400,0 mg/dia

*: Desvio padrão obtido de análises em triplicata

O cenário das amostras de suplementos quanto aos estimulantes presentes, associações dos mesmos e rotulagem pode ser entendido esquematicamente pela Figura 27.

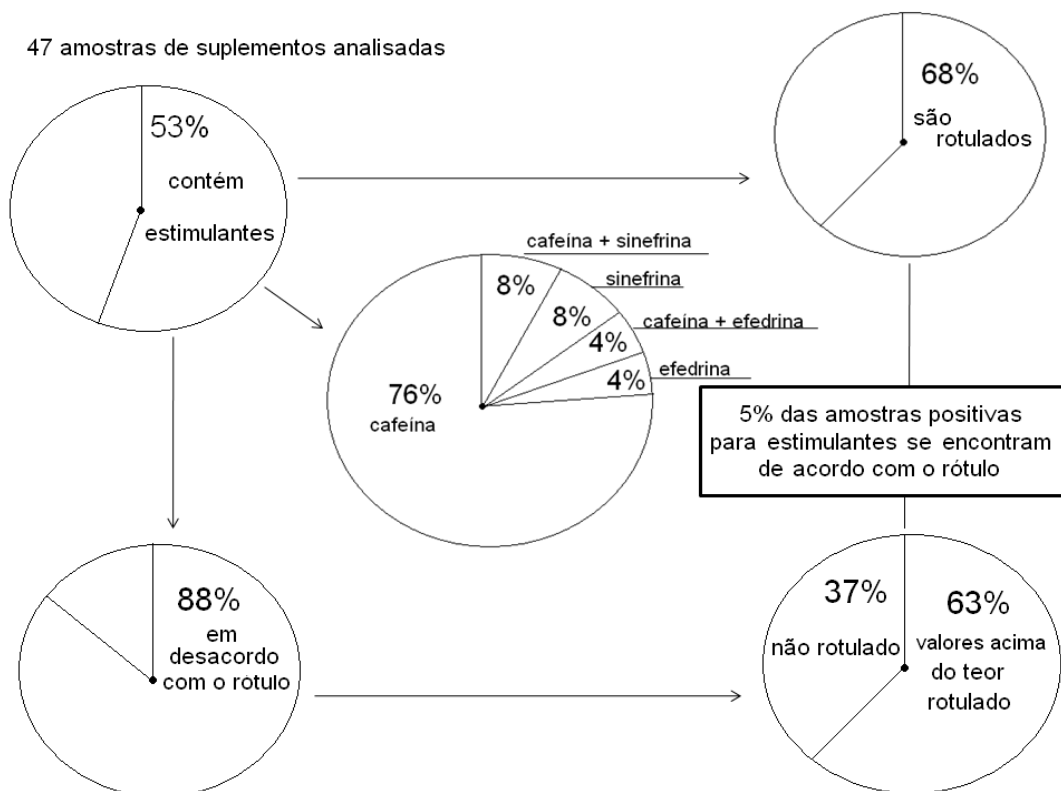


Figura 27. Esquema demonstrativo das amostras de suplementos alimentares estudadas

A cafeína foi o estimulante encontrado majoritariamente entre os suplementos analisados. Muitas vezes ela se fez presente sem necessariamente estar declarada em rótulo, isso porque alguns produtos apresentavam em sua composição ingredientes fornecedores de cafeína basal. Entretanto, em muitas amostras a cafeína apareceu em concentrações exacerbadas, extrapolando teores rotulados e doses máximas diárias recomendadas (420 mg). Este é o caso a amostra 43 (U), em que o teor diário encontrado (1.476,7 mg/dia) é maior que o triplo do teor diário declarado em rótulo (440 mg/dia).

Juntamente com o aumento do consumo da cafeína, seja por ingestão de bebidas energéticas (fontes naturais), seja pela utilização de suplementos alimentares à base de cafeína, vêm as preocupações em relação à tolerabilidade e eficácia desses produtos. Apesar de existirem pesquisas relacionadas à administração da cafeína purificada na forma farmacêutica ou na forma de café/chá, ainda são insuficientes os estudos que avaliam a farmacotoxicologia dela frente a outros multiingredientes presentes em suplementos alimentares. Contudo, dados recentes, sugerem que essas atividades farmacotológicas podem ser influenciadas por fitoquímicos presentes nas formulações desses produtos. (GURLEY et al., 2014).

Quando comercializada com o apelo à melhora da performance física, o teor de cafeína presente nesses produtos excede àquele presente naturalmente em bebidas, como café, chá e refrigerantes, uma vez que objetivos puramente ergogênicos somente são alcançados quando este estimulante se faz presente em altas concentrações. Este problema é agravado ainda mais pelo fato deste teor não estar indicado fielmente nos rótulos dos produtos, expondo os consumidores a efeitos adversos imprevistos (KOLE e BARNHILL, 2013). Além do rápido desenvolvimento de tolerância, a cafeína pode reduzir a atividade cerebral e hepática (SHEINER, 1990), sendo que em doses mais elevadas pode causar além da lipólise (efeito desejado em suplementos para perda de peso), efeitos de broncodilatação, hiperglicemia, hipocalcemia, arritmias cardíacas e morte súbita (BENOWITZ, 1990).

Em algumas amostras a cafeína pôde ser encontrada associada a outros estimulantes, como é o caso da amostra 34 (N) em que ela está presente com a sinefrina (Figura 28) e amostra 12 (F) com a efedrina (Figura 29).

A determinação dos estimulantes nas amostras foi avaliada frente a três critérios, sendo eles: tempo de retenção, aumento da concentração quando fortificada com padrão e espectros de absorção semelhantes.

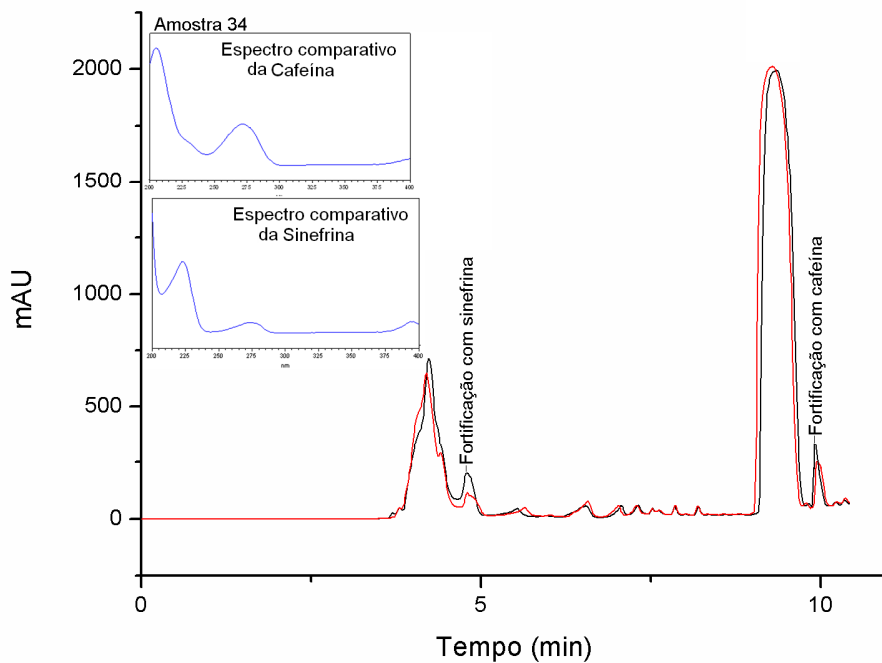


Figura 28. Cromatograma referente à Amostra 34 (N) e sua respectiva fortificação: Presença de sinefrina e cafeína.

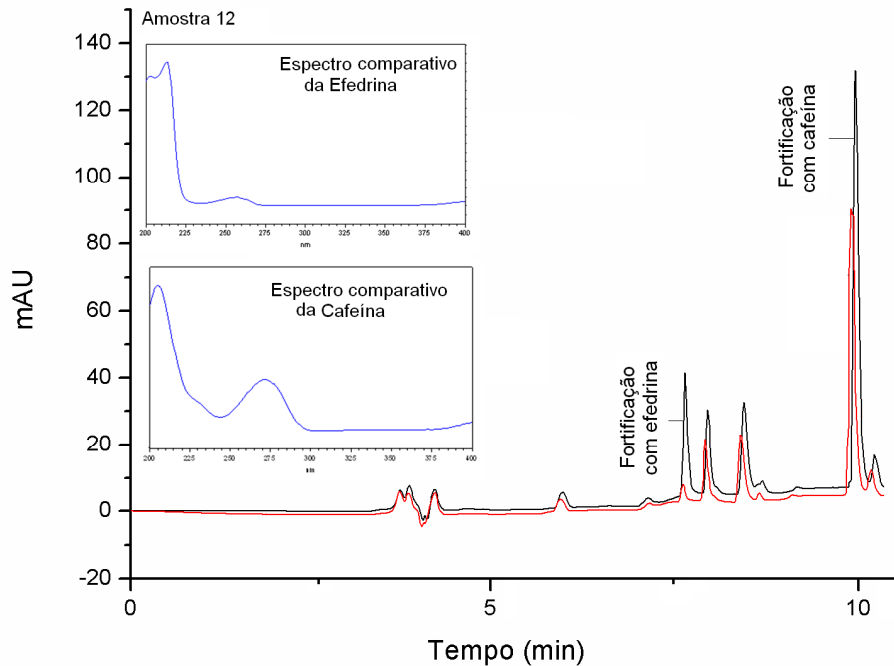


Figura 29. Cromatograma referente à Amostra 12 (F) e sua respectiva fortificação: Presença de efedrina e cafeína

A categoria de suplementos alimentares em que se faz presente multiingredientes contendo *Ephedra*, tem se tornado bastante popular. Comercializados com forte apelo à perda de peso, reforço de energia e aumento de rendimento físico, a cafeína tem sido incorporada a esses produtos através de fontes naturais, como guaraná e chá verde (GURLEY et al., 2014). Alguns produtos declaram em seus rótulos utilizar apenas matérias primas naturais como única fonte de cafeína, como é o caso da amostra 44 (V). Entretanto, é improvável que concentrações tão elevadas deste composto possam ser obtidas apenas de origem natural.

Recentemente, Dr. Mehmet Oz, testemunhou perante o Congresso dos EUA, sobre suplementos que ele mesmo promovia como milagres do emagrecimento. Suplementos os quais possuem constituintes como a *Garcinia cambogia*, extrato de café verde e outros ingredientes não comprovados. Entretanto, ele reconheceu que esses produtos não passam pelo escrutínio científico para a comprovação da eficácia e segurança (COHEN, 2014a).

Não existe suplemento botânico legal que tenha demonstrado eficácia clínica como uma pílula da dieta, sendo a combinação efedrina/cafeína o único tratamento que pode levar a modesta perda de peso (COHEN, 2014a). No entanto, é compreensível a associação da cafeína com outros estimulantes, uma vez que ela é capaz de potencializar os efeitos adrenérgicos de outros compostos. Isso faz com que esses produtos contendo tais associações sejam considerados suplementos supersimpatomiméticos. A combinação desses suplementos com uma atividade física vigorosa tem sido relacionada a efeitos adversos graves (YOUNG et al., 2012) incluindo sérios acidentes vasculares cerebrais, ataques cardíacos e morte súbita (COHEN, 2014a).

Neste trabalho foi realizada a análise de dois produtos de nome comercial Oxyelite Pro. Um deles comercializado no Brasil (amostra 39-Q) e o outro comercializado no Uruguai (amostra 46-X) (Figura 30), porém ambos consumidos pela população brasileira. Na embalagem do produto importado é reportada a informação de que o mesmo apresenta a substância DMAA (dimetilamilamina), a qual é proibida no Brasil.

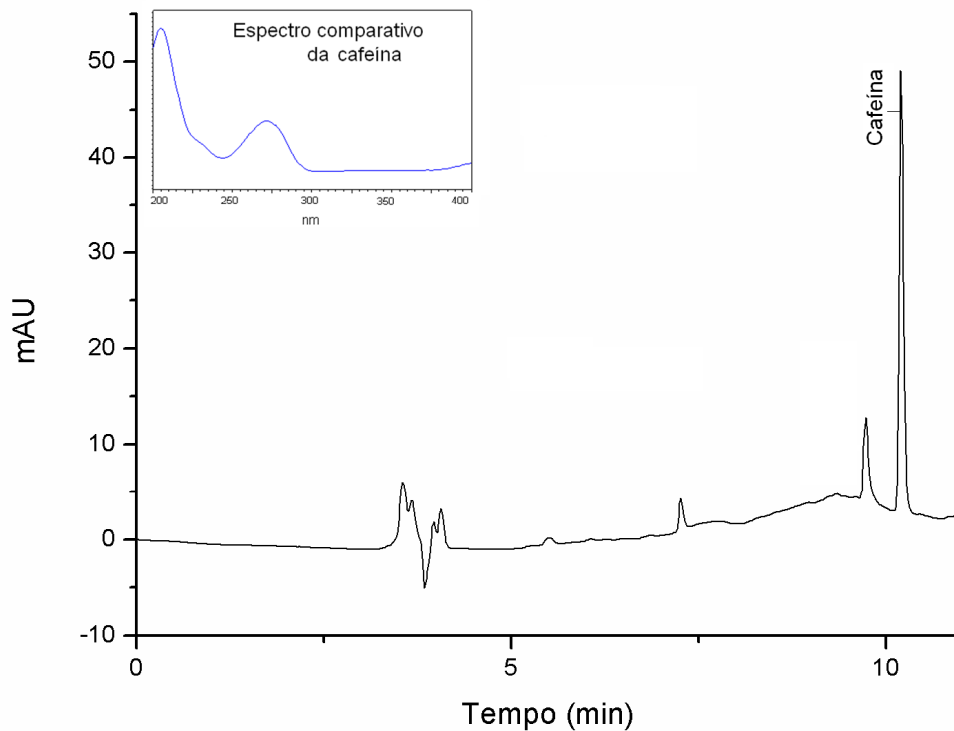


Figura 30. Cromatograma referente à amostra 46 (X). Presença de cafeína de dose não declarada e possível presença de DMAA (declarado em rótulo) em 9,7 min (não houve confirmação com adição de padrão nem espectro para o DMAA).

Recentemente, a OMS alertou que vários países têm identificado efeitos adversos associados ao consumo dessa substância presente em alguns suplementos alimentares. O DMAA é um estimulante do sistema nervoso central usado no auxílio ao emagrecimento e aumento do rendimento atlético, podendo causar dependência, além de outros efeitos adversos, como insuficiência renal, falência do fígado, alterações cardíacas e morte. Países como Austrália e Nova Zelândia já proibiram a comercialização de produtos contendo essa substância.

Por não existir estudos conclusivos sobre a segurança do DMAA, em julho de 2012 a ANVISA o incluiu na lista de substâncias proscritas no país, impedindo assim a importação de suplementos que contenham a substância, mesmo que por pessoa física e para consumo pessoal.

Em fevereiro de 2014, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) relacionou 97 casos problemáticos de saúde associados ao uso do produto Oxyelite

Pro. Desses casos, resultaram 47 internações, três transplantes de fígado e uma morte, sendo este suplemento então recolhido do mercado (COHEN, 2014b).

5.2.2 Produtos naturais a base de plantas

Sendo a cafeína um dos estimulantes mais utilizados na perda de peso, o estudo com produtos naturais a base de plantas para fins de emagrecimento, buscou avaliar a composição das amostras quanto à origem da cafeína (natural ou sintética), quando presente. A determinação da cafeína nesses produtos foi avaliada frente a quatro critérios, sendo eles: tempo de retenção, aumento da área de pico quando fortificada com padrão, espectros semelhantes e confirmação por LC-MS/MS.

Das 100 amostras analisadas, 19 apresentaram cafeína em sua composição (Tabela 19). Levando-se em consideração que matérias primas como Pholia magra, sene, guaraná e chá verde podem oferecer um teor basal de cafeína em algumas das amostras analisadas (Tabela 18), podemos ter uma previsão da fonte deste composto (natural ou sintética).

Tabela 17. Teor de cafeína basal encontrado nas matérias primas utilizadas em produtos naturais

Matéria Prima (Cafeína basal)	Teor (mg/Kg)
Pholia magra	47.100
Chá verde	28.152
Guaraná	21.549
Sene	727

Tabela 18. Amostras de produtos naturais a base de plantas analisadas, com suas respectivas descrições e concentração de cafeína encontrada

Amostras	Descrição da formulação	Rótulo	Cafeína basal (mg/dose)	Cafeína determinada (mg/dose)	Consumo de cafeína real (mg/dia) / *DPR (%)
A	Faseolamina 200 mg; <i>Caralluma fimbriata</i> 200 mg; Cassiolamina 100 mg; Chá branco 100 mg; <i>Fucus vesiculosus</i> 100 mg; Equisetum 100 mg; Psyllium 200 mg.	Composto redutor de medidas	-	6,1	20,45 ± 2,46
B	Pholia magra 300 mg	-	12,9	2,8	4,04 ± 1,33
C	Pholia magra; Chá verde; <i>Garcinia cambogia</i> .	Composto para perda de peso	***	1,1	4,70 ± 1,48
D	Faseolamina; <i>Caralluma fimbriata</i> ; <i>Citrus aurantium</i> ; Chá verde.	Composto para perda de peso	***	3,8	6,0 ± 1,37
E	Sene 350 mg	Composto para perda de peso	0,25	11,2	27,05 ± 4,3

F	Pholia magra 200 mg; Slendesta 200 mg; Chá verde 150 mg.	–	12,8	32,2	74,88 ± 12,07
G	<i>Fucus vesiculosus</i> 80 mg; <i>Centella asiática</i> 80 mg; <i>Spirulina</i> 80 mg; <i>Passiflora</i> 50 mg; Cáscara sagrada 100 mg; Cafeína 30 mg; Hidroclorotiazida 10 mg.	Composto para perda de peso	30,0	41,4	70,20 ± 11,53
H	Slendesta 300mg	-	–	0,6	1.46 ± 0,44
I	<i>Centella asiática</i> 200 mg; <i>Fucus vesiculosus</i> 200 mg; Chá verde 100 mg; Advantra Z <i>Citrus aurantium</i> 400 mg.	-	5,6	3,0	8,81 ± 2,49

J	Mahuang 250 mg; Pholia magra 200 mg; Slendesta 300 mg; Cassiolamina 200 mg; <i>Citrus aurantium</i> 300 mg; Picolinato de cromo 100 mcg; <i>Faseolamina</i> 350 mg; <i>Garcinia cambogia</i> 100mg	Plus Slimming	10,3	82,1	448,7 ± 48,26
K	<i>Caralluma fimbriata</i> 500 mg	-	-	0,2	0,54 ± 0,072
L	Chá verde 250 mg	-	7,0	3,4	5,16 ± 1,36
M	<i>Fucus vesiculosus</i> 90 mg; <i>Centella asiática</i> 150 mg; <i>Cáscara sagrada</i> 5 mg; <i>Citrus aurantium</i> 80 mg.	Fine Fit	-	2,1	4,19 ± 0,42
N	Pholia magra 300 mg	-	12,9	4,4	11,97 ± 1,15
O	Chá verde 200 mg; <i>Garcinia cambogia</i> 500 mg; Advantra Z® (<i>Citrus aurantium</i>) 200 mg; Glucomanann 200 mg; Benzocaine 30 mg.	-	5,6	2,2	3,81 ± 0,45

P	Faseolamina 100 mg; <i>Caralluma fimbriata</i> 200 mg; Chá branco 200 mg.	Supressor de apetite	-	77,9	212,45 ± 22,56
Q	<i>Citrus aurantium</i> 200 mg; L-carnitina 100 mg; Chá verde 100 mg; Chitosana 100 mg	Composto redutor de massa gorda	8,4	32,0	96,10 ± 3,41
R	<i>Gengibre</i> ; Chá verde; Canela; <i>Pimenta</i>	Composto emagrecedor	***	1,0	3,1 ± 0,82
S	<i>Camellia sinensis</i> L. 500mg	-	-	4,8	15,05 ± 4,45

*DPR obtido a partir da análise em triplicata dos *pools* amostrados

***Quantidade basal não estimada por falta de informações no rótulo

É possível observar que, na maioria dos casos, os teores basais não condizem com os teores obtidos experimentalmente, como é o caso da amostra F (Figura 31). Nota-se que apesar desta amostra apresentar Pholia magra e chá verde como constituintes da formulação, o teor de cafeína encontrado é relativamente alto para ser obtido essencialmente das matérias primas. Logo, é possível afirmar que muitas dessas formulações podem ser adulteradas com cafeína sintética, a fim de se obter um efeito estimulante mais expressivo.

Em outros casos pode ocorrer o inverso, ou seja, ser declarado em rótulo um teor maior da matéria prima do que realmente existe. Um exemplo é exemplo a amostra N (Tabela 19), onde o teor de cafeína basal, levando-se em consideração o rótulo, é maior do que a cafeína encontrada experimentalmente, onde o consumidor acaba por consumir um produto o qual não necessariamente irá fornecer o resultado esperado em termos de termogênese.

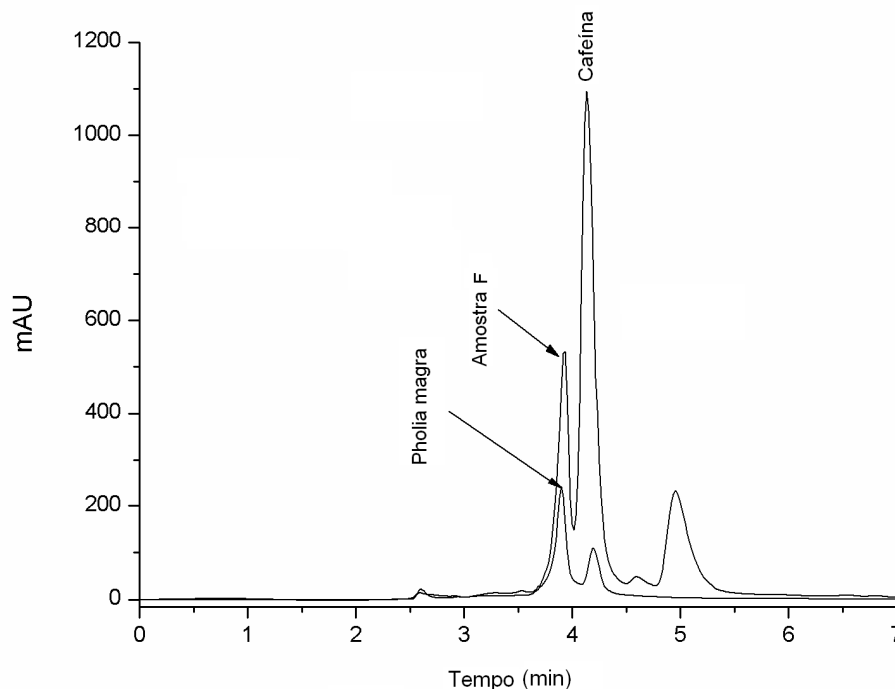


Figura 31. Cromatograma referente à amostra F sobreposta com cromatograma referente à matéria prima fornecedora da cafeína basal.

5.2.3 Fruto de *Citrus aurantium* e enantiômeros da sinefrina

A sinefrina é um estimulante adrenérgico quiral, a qual pode ser utilizada em formulações para perda de peso. A maioria desses produtos, nos quais ela pode estar presente, não rotulam o composto sinefrina, mas sim a espécie *Citrus aurantium*, laranja amarga ou extrato de laranja amarga.

Naturalmente, somente a configuração levógira (L) dessa amina é encontrada, logo, apenas essa configuração pode estar presente em produtos ditos naturais. Entretanto, a sinefrina pode ser empregada sinteticamente na forma de racematos, o que a torna um potencial adulterante de produtos naturais. Com o intuito de se determinar a ordem de eluição dos enantiômeros L e D do padrão (\pm) *p*-sinefrina, foi analisado um fruto de *C. aurantium* no método desenvolvido (Figura 32) para a análise quiral.

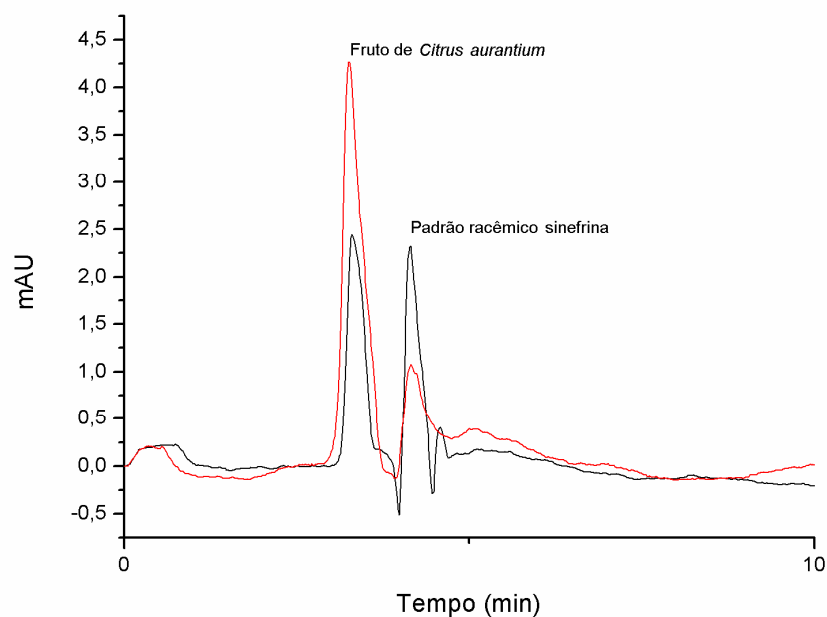


Figura 32. Cromatograma referente ao fruto de *Citrus aurantium* com sobreposição do padrão racêmico da *p*-sinefrina. Determina o primeiro pico do racemato como sendo L-sinefrina

Considerando, na amostra analisada, que apenas o primeiro pico de eluição apresentou espectro condizente com o padrão tido como referência, conseguimos afirmar que o método desenvolvido se mostrou capaz de avaliar esses dois

enantiômeros propostos. Em um segundo momento, foi realizada a análise de um produto natural a base de plantas (amostra Q da Tabela 19) (Figura 33) contendo a espécie de *C. aurantium*. Nele verificou-se, além de um primeiro pico (referente a configuração L), a presença de um segundo pico com mesmo tempo de retenção referente ao pico de configuração D do padrão de (\pm) *p*-sinefrina, o que sugere uma possível adulteração deste produto com sinefrina sintética e não necessariamente a utilização apenas de *C. aurantium* como fonte natural desta amina.

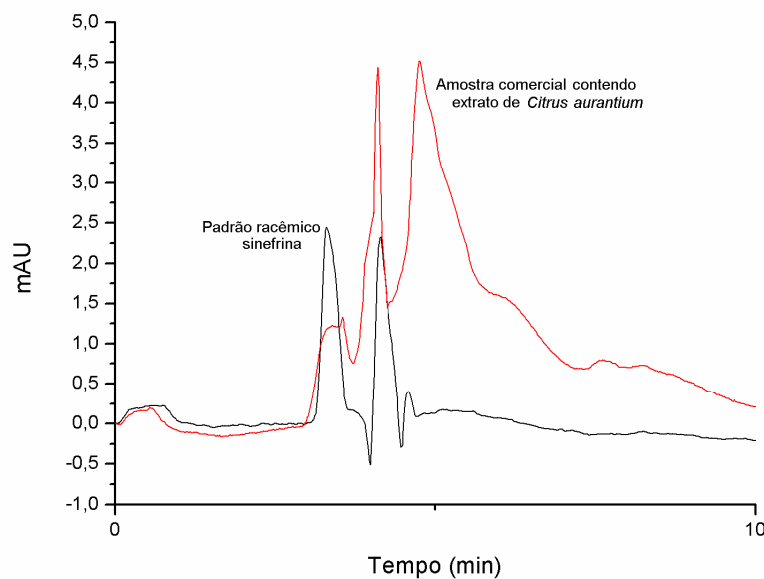


Figura 33. Cromatograma referente a amostra comercial contendo *Citrus aurantium* com sobreposição do padrão racêmico da *p*-sinefrina.

Ambas as amostras (Figura 32 e Figura 33) foram submetidas ao procedimento de limpeza em cartucho de SPE, entretanto a etapa de *clean-up* precisa ser melhor otimizada a fim de diminuirmos a interferência da matriz na análise desses enantiômeros em amostras comerciais, facilitando assim a quantificação tanto da sinefrina levógira, quanto dextrógira.

6. CONCLUSÃO

O forte apelo do mercado publicitário e o marketing expressivo realizado sobre determinados padrões de beleza, tem feito com que o consumo de emagrecedores seja exacerbado no mundo todo. O fácil acesso a esses produtos é considerado preocupante, uma vez que com o advento de compras pela internet, o público tem acesso a uma maior variedade de mercadorias, as quais não necessariamente passam por um determinado controle de qualidade para garantir o mínimo de segurança e eficácia.

Essa falta de controle faz com que esses produtos expostos à venda se apresentem muitas vezes rotulados indevidamente, como ausência de declaração de ingredientes e dosagem dos mesmos, deixando o consumidor sem as mínimas informações necessárias para optar pelo seu uso. Os produtos podem ser ainda adulterados com estimulantes sintéticos em doses arriscadas para consumo humano, ou então estarem associados de forma inadequada.

Os métodos desenvolvidos neste trabalho se mostraram satisfatórios para determinar possíveis estimulantes a serem encontrados em produtos emagrecedores, como a octopamina, (\pm) *p*-sinefrina, tiramina, hordenina, efedrina, salicina e cafeína. Com a amostragem realizada neste trabalho, percebemos que os suplementos com apelo à perda de peso e redução da gordura corporal, apesar de serem obtidos por *sites* brasileiros, não necessariamente são produzidos em território nacional. Isso aproxima os consumidores de mercadorias fraudadas, expondo-os à riscos, além de dificultar o controle da vigilância sanitária sobre esses produtos.

Com este trabalho, percebemos que os produtos analisados ainda não se enquadram por completo nos padrões ideais para consumo, pois, o percentual de desconformidade nos rótulos é bastante significativo (apenas 5% dos produtos analisados se apresentaram conforme o rótulo), muitas vezes as doses diárias encontradas de cafeína ultrapassam as doses seguras recomendadas (41% das amostras neste estudo ultrapassou essa dose), ou não obedecem a quantidade especificada na embalagem.

Ao analisarmos os produtos naturais, podemos notar que estes também estão passíveis de adulterações com cafeína sintética, o que é preocupante, pois, terapias naturais estão sendo cada vez mais procuradas pela população.

Em relação a separação quiral, o método desenvolvido permitiu a identificação das enantiômeros da sinefrina, permitindo a diferenciação entre a sinefrina natural ou sintética presente na amostra.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO, **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica**, 2013.

ALBINO, C. S.; CAMPOS, P. E.; MARTINS, R. L. Avaliação do uso de suplementos nutricionais em academias de Lages, SC. **Lecturas Educación Física y Deportes**, v. 14, n. 134, 2009.

ALI, I.; KUMERER, K.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Mechanistic principles in chiral separations using liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Chromatographia**, v. 63, n. 7-8, p. 295-307, 2006.

ALLENMARK, S.; BOMGREN, B.; BORÉN, H. Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases: IV. Molecular interaction forces and retention behaviour in chromatography on bovine serum albumin as a stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 316, p. 617-624, 1984.

ALLISON, D. B. et al. Exactly which synephrine alkaloids does *Citrus aurantium* (Bitter Orange) contain? **International Journal of Obesity**, v.29, p. 443–446, 2005.

ALLISON, D.B. et al. Alternative Treatments for Weight Loss: a critical review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, p.1-28, 2001.

ALVES, C.; LIMA, R. V. B. Impacto da atividade física e esportes sobre o crescimento e puberdade de crianças e adolescentes. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 26, n. 4, p. 383-391, 2008.

ANDRADE, A.S. **Estabelecimento e validação de metodologia para quantificação de p-sinefrina em produtos derivados de *Citrus aurantium* por cromatografia a gás**. 2008. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ANDRADE, L.A., et al. Consumo de suplementos alimentares por clientes de uma Clínica de Nutrição Esportiva de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 20, n. 3, p. 27-36, 2012.

ANGELL, M.; KASSIRER, J. P. Alternative medicine-the risks of untested and unregulated remedies. **New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 839-840, 1998.

AOAC. Guidelines for dietary supplements and botanicals. AOAC Official methods: Appendix K, p. 32, 2013.

ARANHA, M. C. G. S. et al. O uso dos suplementos WheyProtein e BCAA em adultos praticantes de musculação em uma academia de Belém, Pará. FIEP Bulletin, v. 82, 2012. Disponível em: <<http://fiepbulletin.net/index.php/fiepbulletin/article/view/2231>>.

ARAÚJO, C. J. P. R. **Estudo dos indicadores de seleção do jogador distribuidor e análise do seu quadro caracterizador nos escalões de formação do estado do Rio de Janeiro**.1999. 103 f. Monografia (Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física)- Universidade do Porto, Porto, 1999.

ARBO, M. D. et al. Concentrations of p-synephrine in fruits and leaves of Citrus species (Rutaceae) and the acute toxicity testing of *Citrus aurantium* extract and p-synephrine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2770-2775, 2008.

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.

ASSUNÇÃO, S. S. M.; CORDÁS, T. A.; ARAÚJO, L. A. S. B. Atividade física e transtornos alimentares. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 29, p. 4-13, 2002.

AULD, M. C.; POWELL, L. M. Economics of food energy density and adolescent body weight. **Economica**, v. 76, n. 304, p. 719-740, 2009.

BACURAU, R. F. **Nutrição e suplementação esportiva** (3ª ed.). São Paulo: Phorte, 2005. p. 290.

BELZA, A.; TOUBRO, S.; ASTRUP, A. The effect of caffeine, green tea and tyrosine on thermogenesis and energy intake. **European journal of clinical nutrition**, v. 63, n. 1, p. 57-64, 2009.

BENOWITZ, Neal L. Clinical pharmacology of caffeine. **Annual review of medicine**, v. 41, n. 1, p. 277-288, 1990.

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.

BIAGGIONI, I. et al. Caffeine and theophylline as adenosine receptor antagonists in humans. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 258, n. 2, p. 588-593, 1991.

BLANCK H. M. et al. Use of nonprescription dietary supplements for weight loss is common among Americans. **Journal of American Dietetic Association**, v. 107, p. 441-447, 2007.

BLUMENTHAL, M. Bitter orange peel and synephrine. **Austin**, 2005.

BRASIL. Portaria nº 22 de 30 de outubro de 1967. Estabelece as normas para o emprego de preparações fitoterápicas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de novembro de 1967.

BRASIL. Decreto - Lei nº 986 de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1969.

BRASIL. Lei nº 5991 de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o Controle Sanitário do Comércio de Drogas, Medicamentos, Insumos Farmacêuticos e Correlatos, e dá outras Providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 de dezembro de 1973.

BRASIL. Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de setembro de 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.º 212. Define o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação em saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 de setembro de 1981, Seção 1.

BRASIL. Portaria nº 1428 de 26 de novembro de 1993. Aprova o “Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos”, as “Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos” e o “Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ’s) para Serviços e Produtos na Área de Alimentos”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 de dezembro de 1993.

BRASIL. Portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995. Regulamenta o registro de fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 6 de fevereiro de 1995.

BRASIL. Portaria SVS/MS nº 326 de 30 de Julho de 1997. Estabelece Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Br.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 344 Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 de maio de 1998.

BRASIL. Portaria nº 30 de 13 de janeiro de 1998a. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos para Controle de Peso, constante do anexo desta Portaria. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de janeiro de 1998a.

BRASIL. Portaria nº 32 de 13 de janeiro de 1998b. Fixar a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer os Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 15 de janeiro de 1998b.

BRASIL. Portaria nº 222 de 24 de março de 1998c. Fixar a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer os Alimentos para

Praticantes de Atividade Física. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 de abril 1998c.

BRASIL. Lei nº 9.782 de 26 de janeiro de 1999a. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 de janeiro de 1999a.

BRASIL. Resolução nº 16 de 30 de abril de 1999b. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes, constante do anexo desta Portaria. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 3 de dezembro de 1999b.

BRASIL. Resolução nº 17 de 30 de abril de 1999c. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 3 de maio de 1999c.

BRASIL. Resolução nº 22 de 15 de março de 2000a. Dispõe sobre os Procedimentos Básicos de Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Importados Pertinentes à Área de Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de março de 2000a.

BRASIL. Resolução nº 23 de 15 de março de 2000b. Dispõe sobre O Manual de Procedimentos Básicos para Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de março de 2000b.

BRASIL. Resolução – RDC RDC nº 275 de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 06 de novembro de 2002.

BRASIL. Resolução RDC nº 216 de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de setembro de 2004.

BRASIL. Resolução RDC nº 278 de 22 de setembro de 2005. Aprova as categorias de Alimentos e Embalagens Dispensados e com Obrigatoriedade de Registro. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de setembro de 2004.

BRASIL. Portaria nº 971 de 03 de maio de 2006a. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 06 de maio de 2006a.

BRASIL. Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006b. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de setembro de 2006b.

BRASIL. Resolução RDC nº 67 de 8 de outubro de 2007. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de outubro de 2007.

BRASIL. Resolução RDC nº 87 de 21 de novembro de 2008. Altera o Regulamento Técnico sobre as Boas Práticas de Manipulação em Farmácias. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de novembro de 2008.

BRASIL. Resolução RDC nº 27 de 6 de agosto de 2010a. Dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de agosto de 2010a.

BRASIL. Resolução RDC nº 18 de 27 de abril de 2010b. Dispõe sobre alimentos para atletas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de abril de 2010b.

BRASIL. Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010c. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 de abril de 2010c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011. 126p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf>. Acesso em: 03 de dez. 2014.

BRASIL. ANVISA. Inibidores de apetite no Brasil: reflexões sobre o seu consumo nos anos de 2009 a 2011. **Boletim de Farmacoepidemiologia do Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados**, 2012a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/sngpc/boletins/2012/boletim_sngpc_1_2012_modificado.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2015.

BRASIL, ANVISA. Anvisa alerta risco de consumo de suplemento alimentar. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 10 jul. 2012b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/assunto+de+interesse/noticias/anvisa+alerta+para+risco+de+consumo+de+suplemento+alimentar%20>>. Acesso em: 18 dez. 2014.

BRASIL. Ouvidoria/Anvisa e Departamento de Proteção e Defesa do Consumidor. **Consumo e Saúde de Suplemento Alimentar**. Ano 5, n. 30, mar. 2013.

BRASIL. Projeto de Lei do Senado nº 233 de 2014a. Dispõe sobre os suplementos alimentares e nutricionais. **Congresso Nacional**, Brasília, DF, 22 de dezembro de 2014a.

BRASIL. Resolução nº 729 - 748, de 14 de fevereiro de 2014b. Proibir a distribuição e a comercialização, em todo território nacional de suplementos alimentares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 28 fev. 2014. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Acoes+Fiscais/Proibicoes/Ano+2014>>. Acesso em: 18 dez. 2014.

BRASIL. Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014c. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de maio de 2014c.

BRASIL. Instrução Normativa N° 02 de 13 de maio de 2014d. Publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de maio de 2014d.

BROWN, C. M. et al. Activities of octopamine and synephrine stereoisomers on α -adrenoceptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 93, n. 2, p. 417-429, 1988.

BRUNTON, L.; LAZO, J.; PARKER, K., In: Goodman, Gilman. (Ed.), **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 11th ed. McGraw-Hill, 2005.

BUEMANN, B. et al. The effect of ephedrine plus caffeine on plasma lipids and lipoproteins during a 4.2 MJ/day diet. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 18, n. 5, p. 329-332, 1994.

CABALLERO, B. The global epidemic of obesity: an overview. **Epidemiologic Reviews**, v. 29, n. 1, p. 1-5, 2007.

CALAPAI, G. et al. Antiobesity and cardiovascular toxic effects of Citrus aurantium extracts in the rat: a preliminary report. **Fitoterapia**, v. 70, n. 6, p. 586-592, 1999.

CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! **Ciência Hoje**, v. 21, n. 1234, p. 26-30, 1997.

CARRIER, J. et al. Effects of caffeine are more marked on daytime recovery sleep than on nocturnal sleep. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 4, p. 964-972, 2007.

CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

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

CARVALHO, LM de; MARTINI, M.; MOREIRA, A.; LIMA, A. P. S.; CORREIA, DANIELE; FALCÃO, TATIANA ; GARCIA, S. C.; BAIRROS, André Valle de; NASCIMENTO, P. C.; BOHRER, Denise . Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination. **Forensic Science International**, v. 204, p. 6-12, 2011a.

CARVALHO, LM de; MARTINI, M.; MOREIRA, A.; FALCÃO, TATIANA . The Illegal Use of Synthetic Pharmaceuticals in Herbal Formulations: an Overview of Adulteration Practices and Analytical Investigations. **Forensic Science Review**, v. 23, p. 73-89, 2011b.

CARVALHO, LM de; COHEN, P. ; SILVA, C. V. ; MOREIRA, A.; FALCÃO, TATIANA ; DAL MOLIN, T. R. ; ZEMOLIN. ; MARTINI, M.. A new approach to determining pharmacologic adulteration of herbal weight loss products. **Food Additives & Contaminants**. Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, v. 29, p. 1661-1667, 2012.

CHEN, K. K.; SCHMIDT, C. F. The action of ephedrine, the active principle of the Chinese drug Ma Huang. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 24, n. 5, p. 339-357, 1924.

CHO, S. et al. Monitoring of 35 illegally added steroid compounds in foods and dietary supplements. **Food Additives and Contaminants – Part A**, v. 31, n. 9, p. 1470-1475, 2014.

COFFEY, C. S. et al. 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, n. 11, p. 1411-1419, 2004.

COHEN, P. A.; ERNST, E. Safety of herbal supplements: a guide for cardiologists. **Cardiovascular therapeutics**, v. 28, n. 4, p. 246-253, 2010.

COHEN, P. A. Assessing supplement safety – the FDA’s controversial proposal. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 5, p. 389-391, 2012.

COHEN, P. A. How America’s Flawed Supplement Law Creates the Mirage of Weight Loss Cures. **Harvard Public Health Review**, v. 2, p. 1-3, 2014a.

COHEN, P. A. Hazards of hindsight — Monitoring the safety of nutritional supplements. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 14, p. 1227.-1280, 2014b.

COHEN, P. A. Presence of banned drugs in dietary supplements following FDA recalls. **JAMA**, v. 321, n. 16, p. 1691-1693, 2014c.

DOYLE, H.; KARGIN, M. Herbal stimulant containing ephedrine has also caused psychosis. **BMJ: British Medical Journal**, v. 313, n. 7059, p. 756, 1996.

DULLOO, A. G.; MILLER, D. S. Thermogenic drugs for the treatment of obesity: sympathetic stimulants in animal models. **British Journal of Nutrition**, v. 52, p. 179-196, 1984.

DULLOO, A. G.; MILLER, D. S. Reversal of obesity in the genetically obese fa/fa Zucker rat with an ephedrine/methylxanthines thermogenic mixture. **The Journal of Nutrition**, v. 117, n. 2, p. 383-389, 1987.

DURAK, A.; GAWLIK-DZIKI, U.; SUGIER, D. Coffee enriched with willow (*Salix purpurea* and *Salix myrsinifolia*) bark preparation—Interactions of antioxidative phytochemicals in a model system. **Journal of Functional Foods**, 2014.

ERB, S. Single-enantiomer drugs poised for further market growth. **Pharmaceutical Technology**, v. 30, n. Suppl., p. s14-s18, 2006.

ESMAILZADEH, A.; AZADBAKHT, L. Major dietary patterns in relation to general obesity and central adiposity among Iranian women. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 2, p. 358-363, 2008.

FDA – Food and Drug Administration. Supplements associated with illnesses and injuries. Food and Drug Administration, **Estados Unidos da América**, 1998. Disponível em: <http://www.fda.gov/fdac/features/1998/dietchrt.html>. Acessado em: 21 dez. 2014.

FLORES, A. A revolução do bem-estar: como fazer uma fortuna na próxima indústria de um trilhão de dólares. 2008. Resenha de: PILZER, P. Z. **The Wellness Revolution: How to make a fortune in the next trillion dollar industry**. New York: John Wiley & Sons, 2002.

FREY, B. N. et al. Increased oxidative stress in submitochondrial particles after chronic amphetamine exposure. **Brain Research**, v. 1097, n. 1, p. 224-229, 2006.

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

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

GANZERA, M.; LANSER, H.; STUPPNER. Simultaneous determination of Ephedra sinica and Citrus aurantium var. amara alkaloids by ion-pair chromatography. **Talanta** v, 66, p. 889–894, 2005.

GAHCHE, M. P. H. et al. Dietary supplement use among U.S. adults has increased since NHANES II (1988-1994). **NCHS Data Brief**, n. 61, 2011.

GRIFFITHS, R. R.; MUMFORD, G. K. Caffeine—A drug of abuse? In: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. (Org.). **Psychopharmacology: The fourth generation of progress**. New York: Raven Press, 1995. p. 1699–1713.

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

GURLEY, B. J. et al. Content versus label claims in ephedra-containing dietary supplements. **American Journal of Health System Pharmacy**, v. 57, n. 10, p. 963-969, 2000.

GURLEY, B. J., STEELMAN, S. C., THOMAS, S. L. Multi-ingredient, caffeine-containing dietary supplements: History, safety, and efficacy. **Clinical Therapy**, doi: 10.1016/j.clinthera.2014.08.012, 2014.

HAAZ, S. et al. *Citrus aurantium* and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update. **Obesity Reviews**, v. 7, p. 79–88, 2006.

HALLAK, A.; FRABRINI, S.; PELUZIO, M. C. G. Avaliação do consumo de suplementos nutricionais em academias da Zona Sul de Belo Horizonte, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 1, n. 2, p. 55-60, 2007.

HALLER, C.A.; BENOWITZ, N.L.; JACOB, P. Hemodynamic effects of ephedra-free weight-loss supplements in humans. **The American Journal of Medicine**, v.118, n. 9, p. 998-1003, 2005.

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.

HARRI, L.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. São Paulo (SP): Instituto Plantarum, 2002.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: LCT, 2003.

HERNANDEZ, A. J.; NAHAS, R. M. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 9, n.2, p. 43-46, 2003.

HIRSCHBRUCH, M. D.; FISBERG, M.; MOCHIZUKI, L. Consumo de Suplementos por Jovens Freqüentadores de Academias de Ginástica em São Paulo. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 6, p. 539-543, 2008.

HOFFMAN, B.B.; LEFKOWITZ, R.J. Catecholamines and sympathomimetic drugs and Adrenergic Receptor Antagonists. In: Goodman and Gillman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. **The McGraw-Hill Companies**, p.199-242, New York, 1996.

HOFFMAN, R. J. Methylxanthines and selective β_2 agonists. In: NELSON, L. S.; LEWIN, N. A.; HOWLAND, M. A; HOFFMAN, R. S.; GOLDFRANK, L. R.; FLOMENBAUM, N.E. (Org.). **Goldfrank's Toxicologic Emergencies**. Nova York: McGraw-Hill, 2011. 1968 p.

HORTON, T. J.; GEISLER, 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.

HUNG, S. K.; HILLIER, S.; ERNST, E. Case reports of adverse effects of herbal medicinal products (HMPs): A quality assessment. **Phytomedicine**, v. 18, n. 5, p. 335-343, 2011.

INCHIOSA, M. A. Experience (mostly negative) with the use of sympathomimetic agents for weight loss. **Journal of Obesity**, v. 2011, 2010.

IVERSEN, L. L.; IVESERN, S.D.; SNYDER, S. H. **Handbook of Psychopharmacology: Stimulants** (v. 11). New York: Plenum Press, 1978. 476 p.

JACOB, P. et al. Determination of ephedra alkaloid and caffeine concentrations in dietary supplements and biological fluids. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 152-159, 2004.

JACOBS, K. M; HIRSCH, K. A. Psychiatric complications of Ma-huang. **Psychosomatics Medicine**, v. 41, n. 1, p. 58-62, 2000.

JOHANSSON, B.; LINDSTRÖM, K.; FREDHOLM, B. B. Differences in the regional and cellular localization of c-fos messenger RNA induced by amphetamine, cocaine and caffeine in the rat. **Neuroscience**, v. 59, n. 4, p. 837-849, 1994

JORDAN, R., THONOOR, C. M., & WILLIAMS, C. M. Beta adrenergic activities of octopamine and synephrine stereoisomers on guinea-pig atria and trachea. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39, p. 752-754, 1987.

KALMAR, J. M.; CAFARELLI, E. Effects of caffeine on neuromuscular function. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 2, p. 801-808, 1999.

KERRIGAN, S.; LINDSEY, T. Fatal caffeine overdose: two case reports. **Forensic science international**, v. 153, n. 1, p. 67-69, 2005.

KNAPP, L. Fitoterapia abre novos campos de pesquisa. **Gazeta Mercantil**, n. 22170, 2001.

KOLE, J.; BARNHILL, A. Caffeine content labeling: a missed opportunity for promoting personal and public health. **Journal of Caffeine Research**, v. 3, n. 3, p. 108-113, 2013.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, p. 653-643, 2000.

KRISTEL, D.; WESTERTEP, K.R.; WESTERTEP-PLANTENGA M.S. Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin, and green tea. **American journal of physiology**. Regulatory, integrative and comparative physiology. p.292, 2007.

KUSU, F. et al. 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.

LAKE, C. R.; QUIRK, R. S. CNS stimulants and the look-alike drugs. **Psychiatric Clinics of North America**, 1984.

LAMMERHOFER, M.; MAIER, M. N.; LINDNER, W. Enantiomer separations. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, John W. Dolan. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. P. 666-755, 2010.

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**, São Carlos : RiMa, p. 11-21, 2004.

LENZ T. L.; HAMILTON, W. R. Supplemental products used for weight loss. **Journal of American Pharmacists Association**, v. 44, p. 59-67, 2003.

LIN, B.; NG, S. C.; FENG, Y. Q. Chromatographic evaluation and comparison of three β -cyclodextrin-based stationary phases by capillary liquid chromatography and pressure-assisted capillary electrochromatography. **Electrophoresis**, v. 29, p. 4045-4054, 2008.

LOPEZ-GARCIA, E. et al. Changes in caffeine intake and long-term weight change in men and women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 3, p. 674-680, 2006.

LORENZO, C. D. Development and validation of HPLC method to measure active amines in plant food supplements containing *Citrus aurantium*. **Food Control**, v. 46, p. 136-142, 2014.

LOURENÇO, C. T.; CASSIANO, M. N.; CASS, B. Q. Chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Química Nova**. v. 33, 2010.

MA, S.; SHEN, S.; HADDAD, N.; TANG, W.; WANG, J.; LEE, H.; YEE, N.; SENANAYAKE, C.; GRINBERG, N. Chromatographic and spectroscopic studies on the chiral recognition of sulfated β -cyclodextrin as chiral mobile phase additive. Enantiomeric separation of a chiral amine. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1232–1240, 2009.

MARCHEI, E. et al. A rapid and simple procedure for the determination of synephrine in dietary supplements by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1468-1472, 2006.

MARTINDALE, W. *The Complete Drug Reference*. London: The Pharmaceutical Press, 2005. 2756 p.

MASSOUDI, M.; EVANS, E.; MILLER, D.S. Thermogenic drugs for the treatment of obesity: screening using obese rats and mice. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 26-37, 1983.

MATTOLI, L. et al. 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, n. 26, p. 9860-9866, 2005.

MERCADER, J. et al. Isopropyl norepinephrine is a stronger lipolytic agent in human adipocytes than synephrine and other amines present in *Citrus aurantium*. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 67, n. 3, p. 443-452, 2011.

MERCK, N. J. **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. Whitehouse Station, 1996.

METZ, D. C.; VAKILY, M.; MULFORD, D. Review article: Dual delayed release formulation of dexlanoprazole MR, a novel approach to overcome the limitations of conventional single release proton pump inhibitor therapy. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p. 928-937, 2009.

MOFFAT, A.C. et al. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material**. Londres: Pharmaceutical Press, 2004. p. 2609.

MOREIRA, A.P.L.; MOTTA, M. J.; DAL MOLIN, T. R.; VIANA, CARINE; de Carvalho, L. M.; CARVALHO, L.M. de. Determination of diuretics and laxatives as adulterants in herbal formulations for weight loss. **Food Additives & Contaminants. Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment (Print)**, v. 30, p. 1230-1237, 2013a.

MOREIRA, S. S. P. et al. Avaliação da adequação da rotulagem de suplementos esportivos. **Corpus et Scientia**, v. 9, n. 2, p. 45-55, 2013b.

MOREIRA, A. P. L.; MARTINI, M.; CARVALHO, LM. Capillary Electrophoretic Methods for the Screening and Determination of Pharmacologic Adulterants in Herbal-based Pharmaceutical Formulations. **Electrophoresis**, v. 35, p. 3212-3230, 2014.

MOURA, C. A. Anvisa mantém registro de sibutramina e cancela anfetamínicos. In: ANVISA. Brasília, DF, 2011. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/hj>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

NETTO, E. M. et al. Comments on the phytomedicines register. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3, p. 1-9, 2006

NIEMANN, R. A.; GAY, M. L. Determination of ephedrine alkaloids and synephrine in dietary supplements by column-switching cation exchange high-performance liquid chromatography with scanning-wavelength ultraviolet and fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5630-5638, 2003.

NIH, National Institutes of Health. **Dietary Supplements for Weight Loss**. Fact Sheet for Health Professional, 2014.

NOLDIN, V. F. *et al.* Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

NOVAK, S. P. *et al.* The nonmedical use of prescription ADHD medications: results from a national internet panel. **Substance abuse treatment, prevention, and policy**, v. 2, p. 32, 2007.

NYSKA, A. *et al.* Acute hemorrhagic myocardial necrosis and sudden death of rats exposed to a combination of ephedrine and caffeine. **Toxicological Sciences**, v. 83, n. 2, p. 388-396, 2005.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 2005. 412p

PELLATI, F. *et al.* Determination of adrenergic agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantium* L. var. amara by LC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 1113-1119, 2002.

PELLATI, F.; BENVENUTTI, S. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of phenethylamine alkaloids in *Citrus aurantium*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.29, p. 1113-1119, 2002.

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

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, p. 3503–3510, 2010.

PENZAK, S.R. *et al.* Seville (sour) orange juice: synephrine content and cardiovascular effects in normotensive adults, **Journal Clinical of Pharmacology**. v. 41, p. 1059–1063, 2001.

PETRÓCZI, A. *et al.* Nutritional supplement use by elite young UK athletes: fallacies of advice regarding efficacy. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 5, n. 22, 2008.

POWELL, T.; HSU, F.F.; TURK, J.; HRUSKA, K.; MA-HUANG. Strikes again: ephedrine nephrolithiasis. **American Journal of Kidney Diseases**, Jul;32(1):153-9, 1998. Ok

PUTZBACH, K. *et al.* Determination of bitter orange alkaloids in dietary supplements standard reference materials by liquid chromatography with ultraviolet absorbance and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, n. 1, p. 304-311, 2007.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, p. 603-13, 2001.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIAO, A. M. Caffeine and adenosine. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, p. 3-15, 2010.

RIBEIRO, S.; CARVALHO, R. J. M. Uso de medicamentos para redução de peso corporal. **Revista Seminário de Nutrição**, Foz do Iguaçu, PR, Faculdade União das Américas, 2009. n. 1. Disponível em: <<http://revista.uniamerica.br/index.php/secnutri/article/view/104/94>>. Acesso em: 24 jan. 2015.

ROSSATO, L.G. **A sinefrina e o seu potencial cardiotoxico**: O uso no emagrecimento e metodologias analíticas para detectar a sinefrina. 2009. 74p. Dissertação (Mestrado em Toxicologia Analítica Clínica e Forense) – Programa de Pós-Graduação em Toxicologia Analítica Clínica e Forense, Universidade do Porto, Portugal, 2009.

ROTHMAN, R. B. et al. In vitro characterization of ephedrine-related stereoisomers at biogenic amine transporters and the receptorome reveals selective actions as norepinephrine transporter substrates. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 307, n. 1, p. 138-145, 2003.

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

SANTORO, M. I. R. M. Cromatografia em fase quiral: novos rumos no controle de qualidade de medicamentos. **Revista Farmácia e Bioquímica**, v. 28, p. 1-29, 1992.

SCHANEBERG, B. T. et al. The role of chemical fingerprinting: application to Ephedra. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 911-918, 2003.

SCHMITT, G. C. **Análise química e toxicológica de suplementos alimentares e compostos emagrecedores contendo *p*-sinefrina associada a efedrina, salicina e cafeína**. 2012. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SHARPE, P. A. Availability of weight-loss supplements: Results of an audit of retail outlets in a southeastern city. **Journal of American Dietetic Association**, v. 106, p. 2045-2051, 2006.

SHI, J. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of caffeine: Tolerance to pressor effects. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 53, n. 1, p. 6-14, 1993.

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

SINGH, A. K. **Separação enantiomérica de fármacos em medicamentos por cromatografia líquida com fase estacionária quiral**. 2002. 263 f. Tese (Doutorado em Produção e Controle Farmacêutico) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SLEZAK, T. et al. Determination of sinephryne in weight loss products using high performance liquid chromatography with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 593, p. 98-102, 2007.

SMITH, A. P. Caffeine, cognitive failures and health in a non-working community sample. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 24, n. 1, p. 29-34, 2009.

SONG, F. et al. Screening of multiple weight loss and related drugs in dietary supplement materials by flow injection tandem mass spectrometry and their confirmation by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 136-143, 2014.

SONI, M. G. et al. Safety of ephedra: lessons learned. **Toxicology letters**, v. 150, n. 1, p. 97-110, 2004.

STEWART, I.; NEWHALL, W. F.; EDWARDS, G. J. The isolation and identification of *l*-synephrine in the leaves and fruit of *Citrus*. **Journal of Biological and Chemistry**. v. 239, p. 930–932, 1964.

STOHS, S. J.; PREUSS, H. G.; SHARA, M. A. review of the receptor binding properties of *p*-synephrine as related to its pharmacological effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2011b.

STOHS, S. J.; PREUSS, H. G.; SHARA, M. The Safety of *Citrus aurantium* (Bitter Orange) and its Primary Protoalkaloid *p*-Synephrine. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 10, p. 1421-1428, 2011a.

TORMEY, W. P; BRUZZI, A. Acute psychosis due to the interaction of legal compounds ephedra alkaloids in 'vigueur fit' tablets, caffeine in 'red bull' and alcohol. **Medicine Science, and the Law**, v. 41, n. 4, p. 331-6, 2001.

United States General Accounting Office (now the U.S. Government Accountability Office). **Dietary Supplements for Weight Loss: Limited Federal Oversight Has Focused More on Marketing than on Safety**. GAO-02-985T, Julho, 2002.

USA, Anvisa-FDA – Confidentiality Commitments. United States Food and Drugs Administration, **Estados Unidos da América**, 24 set. 2010. Disponível em: <<http://www.fda.gov/InternationalPrograms/Agreements/ConfidentialityCommitments/ucm228083.htm>>. Acesso em: 23 dez. 2014.

USA, Anvisa-FDA – Confidentiality Commitments. United States Food and Drugs Administration, **Estados Unidos da América**, 24 set. 2010. Disponível em: <<http://www.fda.gov/InternationalPrograms/Agreements/ConfidentialityCommitments/ucm228083.htm>>. Acesso em: 21 jan. 2015.

USA. Recalls of Foods and Dietary Supplements. United States Food and Drugs Administration, **Estados Unidos da América**, 4 jun. 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/recallsoutbreaksemergencies/recalls/default.htm>>. Acesso em 15 jan. 2015.

VAHEDI, K.; DOMIGO, V.; AMARENCO, P.; BOUSSER, M. G. Ischaemic stroke in a sportsman who consumed MaHuang extract and creatine monohydrate for body building. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 68, n. 1, p.112-123, 2000.

VIANA, C. et al. High-performance liquid chromatographic analysis of biogenic amines in pharmaceutical products containing *Citrus aurantium*. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 4, p. 634-642, 2013.

WADA, 2009. Monitoring Program. Available: <<http://www.wada-ama.org>>.

WAINER, I. W.; **Clinical Pharmacology**, 1993.

WARNER, R. B.; LEE, A. G. Leber hereditary optic neuropathy associated with use of ephedra alkaloids. **American Journal of Ophthalmology**, v. 134, n. 6, p. 918-920, 2002.

WETTACH, G.E; FALVEY, S.G. A mysterious blood pressure increase in a drilling Naval reservist. **Military Medicine**, v. 167, n. 6, p. 521-3, 2002.

WHEATON, T. A. et al. The distribution of tyramine, N-methyltyramine, hordenine, octopamine, and synephrine in higher plants. **Lloydia**, v. 33, p. 244-54, 1970.

WHO, World and Health Organization, **Obesity and overweight**, 2009.

WHO, World Health Organization. **Obesity and overweight**. Estados Unidos da América. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>. Acesso em: 23 jan. 2015.

WHO, World Health Organization. **Guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines**. Regional office for the Western Pacific: Manila, 1999. 1 vol.

WHO, World Health Organization. **Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants**. Geneve, 2003. 1 vol.

WHO, World Health Organization. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva, 1998. 1 vol.

WILLIAMS, C.M.; COUCH, M.W.; THONOOR, C.M.; MIDGLEY, J.M.J. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v.39, p.153–157, 1987.

WILLIAMS, M. Suplementos dietéticos e desempenho esportivo: Introdução e vitaminas. **Nutrição em Pauta**, n. 64, p. 56-61, 2004.

WOLF, M.; COLDITZ, G. A. Current estimates of the economic cost of obesity in the United States. **Obesity Research**, v. 6, n. 2, p. 97-106, 1998.

YOUNG, C. et al. Hemorrhagic stroke in young healthy male following use of sports supplement Jack3d. **Military Medicine**, v. 177, n. 12, p. 1450-1454, 2012.

ZAACKS, S.M; KLEIN, L; TAN, C.D; RODRIGUEZ, E.R; LEIKIN, J.B. Hypersensitivity myocarditis associated with ephedra use. **Journal of Toxicology**, v. 37, n 4, p. 485-489, 1999.

ZEISER, C.C.; SILVA, R. C. R. O uso de suplementos alimentares entre os profissionais de educação física atuantes em academias da cidade de Florianópolis. **Nutrição em Pauta**, v. 15, n. 86, p. 30-33, 2007.