

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

**AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE POR TESTE DE ATIVIDADE
LOCOMOTORA ESPONTÂNEA E *ROTA-ROD* EM CAMUNDONGOS TRATADOS
COM ASSOCIAÇÃO DE *P*-SINEFRINA, EFEDRINA, CAFEÍNA E SALICINA.**

ANDRÉIA LOUISE LORENSI

Porto Alegre, Junho 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

ANDRÉIA LOUISE LORENSI

**AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE POR TESTE DE ATIVIDADE
LOCOMOTORA ESPONTÂNEA E *ROTA-ROD* EM CAMUNDONGOS TRATADOS
COM ASSOCIAÇÃO DE *P-SINEFRINA*, *EFEDRINA*, *CAFEÍNA* E *SALICINA*.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial
para a obtenção do título de Farmacêutica,
pelo Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirna Bainy Leal

Co-orientadora: Msc. Gabriela Cristina Schmitt

PORTO ALEGRE

2010

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho, intitulado “Avaliação da neurotoxicidade por teste de atividade locomotora espontânea e Rota-rod em camundongos tratados com associação de *p*-sinefrina, efedrina, cafeína e salicina.”, refere-se ao trabalho de conclusão de curso em Farmácia (UFRGS) da aluna Andréia Louise Lorensi

Teve como fundamento o uso crescente e indiscriminado de produtos a base de *p*-sinefrina, após a proibição da efedrina pela FDA, associado a outras substâncias, como cafeína, salicina e a própria efedrina objetivando o emagrecimento, somando-se a isso a escassez de dados sobre um possível sinergismo farmacológico e potencialização dos efeitos tóxicos produzidos com a mistura.

Foi orientado pela Prof. Dr^a. Mirna Bainy Leal e co-orientado pela Msc. Gabriela Cristina Schmitt, tendo como colaboradores as Professoras Dr^a. Eliane Dallegrave e Dr^a. Renata Pereira Limberger, bem como do Msc. Marcelo Dutra Arbo e da mestranda Érica Maciel.

Depois de submetido à banca, este trabalho será encaminhado para publicação na Revista Brasileira de Toxicologia.

Avaliação da neurotoxicidade por teste de atividade locomotora espontânea e Rota-rod em camundongos tratados com associação de *p*-sinefrina, efedrina, cafeína e salicina.

LORENSI, A.L¹; SCHMITT GC², LIMBERGER, RP²; LEAL MB¹

¹Departamento de Farmacologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

RESUMO

Suplementos alimentares e compostos emagrecedores à base de extratos vegetais têm seu uso muito difundido e indiscriminado, principalmente pela diversidade de produtos disponíveis e facilidade de acesso aos mesmos. A associação de *p*-sinefrina, efedrina, cafeína e salicina é bastante comum nessas formulações, porém estudos sobre o sinergismo farmacológico e toxicológico dessa associação ainda são praticamente inexistentes. Este trabalho teve por objetivo avaliar a neurotoxicidade induzida em camundongos pela associação de padrões de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína através dos testes de Rota-rod e atividade locomotora espontânea. O teste de Rota-rod mostrou uma diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo 400mg/kg em relação ao controle e o grupo de 300mg/kg. Os resultados obtidos para atividade locomotora espontânea mostram que houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre o grupo *p*-sinefrina 30 mg/kg (148,6±17,5) em relação aos grupos tratados com a mistura de 300mg/kg (68,3±13,3), 350mg/kg (66,4±9,1), 400mg/kg (59,4±10,8) e 500mg/kg (48,9±7,5); todos os grupos foram significativamente ($p < 0,01$) diferentes do controle (241±25,8). Esses dados nos mostram que essa associação produz sinais de neurotoxicidade e alterações na atividade locomotora em camundongos, indicando um possível sinergismo de efeitos

sobre o sistema adrenérgico. Os resultados desse trabalho servem de alerta e estimulam a continuidade das pesquisas sobre os riscos dessa associação.

Palavras chave: *p*-sinefrina, efedrina, cafeína, salicina, rota-rod e atividade locomotora espontânea.

ABSTRACT

Dietary supplements and weight-loss compounds based on plant extracts have their widespread and indiscriminate use, mainly for the diversity of products and the easily access of them. The association of *p*-synephrine, ephedrine, caffeine and salicin is very frequently in these products, but researches about the pharmacological and toxicological synergism of this association is practically absent. The aim of this study was evaluate the neurotoxicity induced in mice by the association of *p*-synephrine, ephedrine, caffeine and salicin by Rota-rod test and spontaneous locomotor activity. The Rota-rod test showed a significative difference ($p < 0,05$) in 400mg/kg compared to control and 300mg/kg groups. The locomotor activity was significantly reduced ($p < 0,01$) after administration of 300mg/kg ($68,3 \pm 13,3$), 350 mg/kg ($66,4 \pm 9,1$), 400 mg/kg ($59,4 \pm 10,8$) and 500 mg/kg ($48,9 \pm 7,5$) in comparison with the group treated with only *p*-synephrine 30 mg/kg ($148,6 \pm 17,5$). All groups were different ($p < 0,01$) from the control ($241 \pm 25,8$). The results showed that the association produces signs of neurotoxicity and changes in locomotor activity in mice, indicating a possible synergistic effect on adrenergic system. The findings serve to alert and indicate the need of further investigations about the risks of this combination.

Key words: *p*-synephrine, ephedrine, caffeine, salicin, rota-rod, spontaneous locomotor activity

INTRODUÇÃO

A obesidade é reconhecida como um problema social e vem se tornando foco da atenção das autoridades públicas e instituições de saúde por estar associada com riscos graves para a saúde, como hipertensão e diabetes, aumento da morbidade e da mortalidade. (1) Estima-se que, no mundo, ocorra um aumento anual de 33% de indivíduos obesos. (2) No Brasil, cerca de 38,8 milhões de indivíduos estão acima do peso, o que corresponde a 40,6% da população adulta do país. (3) Associada a esta realidade, está o culto social a magreza, que leva a população a uma busca desenfreada por fórmulas milagrosas para emagrecer.

Com a idéia de que o “natural não faz mal”, os suplementos alimentares e compostos emagrecedores a base de extratos vegetais são os mais procurados pela população que busca o corpo perfeito. (4) Esses produtos têm seu uso muito difundido e indiscriminado, principalmente pela diversidade disponível e facilidade de acesso aos mesmos. Dentre os produtos que tiveram seu uso mais difundido estão aqueles a base de efedrina (*Ephedra* sp.). (5)

A efedrina, um alcalóide natural de plantas pertencentes ao gênero *Ephedra*, faz parte de um grupo de aminas simpatomiméticas de ação estimulante central e periférica, denominados compostos anfetamínicos. Estes compostos atuam na liberação de noradrenalina (NA) a partir de terminais nervosos, que através da ação nos receptores adrenérgicos provoca estimulação do sistema cardiovascular. (6)

Em abril de 2004, a Food and Drug Administration (FDA) proibiu o uso de alcalóides da *Ephedra* em suplementos emagrecedores nos EUA (7-9) devido à associação do seu uso com problemas cardiovasculares e psiquiátricos. (10-12)

No Brasil, as formulações a base de efedra/efedrina não são proibidas, mas têm sua venda regulamentada pela Portaria 344/1998 – Lista D1 de substâncias

precursoras. (13) A legislação brasileira considera a efedrina, assim como seus sais isômeros, substâncias sujeitas a controle especial.

Para contornar essa proibição, a indústria de suplementos e emagrecedores lançou os produtos chamados “ephedra-free”, que utilizam *p*-sinefrina ou extrato de *Citrus aurantium* L. (Ca), fonte natural de *p*-sinefrina, em sua composição. A *p*-sinefrina é um análogo estrutural da efedrina (Figura 1), que manteria o efeito lipolítico, porém sem os efeitos adversos cardiovasculares (8) e no Sistema Nervoso Central (SNC) já que a *p*-sinefrina é menos lipofílica do que a efedrina, dificultando sua passagem pela barreira hemato-encefálica. (14)

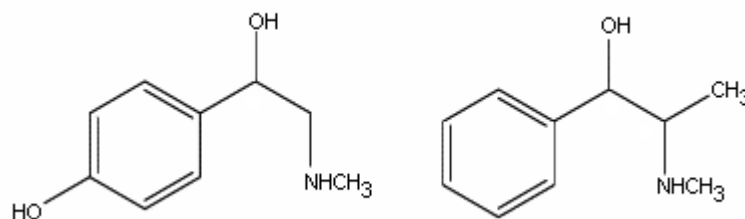


Figura 1: Estruturas químicas da *p*-sinefrina (a) e efedrina (b).

O uso da *p*-sinefrina, ou dos extratos de Ca, como emagrecedor está baseado numa suposta ação termogênica originada pela estimulação específica de receptores β_3 -adrenérgicos, que são encontrados principalmente em adipócitos e no fígado. (15) Esses receptores podem ser responsáveis pelos efeitos lipolíticos e termogênicos (16), o que ocasionaria um aumento na taxa metabólica e na temperatura corporal a nível central, levando à aceleração do gasto calórico (17-18) e influenciando na oxidação de gordura. (19) Contudo, ainda não existem evidências científicas concretas a respeito da eficácia da *p*-sinefrina na perda de peso. (7,12)

Os extratos comerciais de Ca têm sido padronizados com proporções que variam de 4 a 6% de *p*-sinefrina, porém há relatos de casos extremos onde o teor pode chegar a 95%. (20) Estes extratos “enriquecidos” em termos de *p*-sinefrina são muito utilizados em suplementos comerciais (21) e podem estar associados aos possíveis efeitos no aumento da pressão arterial, devido à estimulação adrenérgica, acarretando em alterações no sistema cardiovascular. (12)

A composição dos suplementos alimentares e compostos emagrecedores que contém Ca é bem variável e complexa, podendo estar associada a minerais, vitaminas e extratos de plantas diversas. Dentre os extratos mais encontrados estão aqueles contendo cafeína (por exemplo, *Paullinia cupana*, *Cola acuminata*), alcalóides da efedra (*Ephedra sínica*) e salicina (*Salix alba*). Estes produtos, como por exemplo, Deep Peel[®], Hydroxislin[®], Metabotrol[®] e Superdrine[®] RX-10 (22), são facilmente encontrados no mercado informal, sendo possível adquiri-los em academias, lojas especializadas, farmácias, drogarias e também pela Internet.

É possível encontrar relatos na literatura que associam a utilização de *p*-sinefrina e/ou extratos enriquecidos de Ca com a ocorrência de alterações cardíacas, convulsões, hipertensão, tonturas, insônia, dentre outros. (12,23) Entretanto, são poucos os relatos de reações adversas relacionadas à utilização de produtos contendo exclusivamente extrato de Ca. (11,12) A maioria dos relatos encontrados acerca de incidentes envolvendo suplementos alimentares e compostos emagrecedores com *p*-sinefrina e efedrina traz formulações contendo várias substâncias associadas a elas, incluindo extratos vegetais que contenham salicina e cafeína, podendo haver uma potencialização de efeitos pelo sinergismo de ação das substâncias, tanto em termos de atividade estimulante quanto em termos de toxicidade. (5,24,25)

Assim, a efetividade e, sobretudo a segurança dessa substituição ainda não é conclusiva, especialmente quando da associação de *p*-sinefrina a substâncias como salicina, cafeína (5) e a própria efedrina, pois estudos sobre o sinergismo farmacológico e toxicológico dessa associação ainda são praticamente inexistentes.

Como parte de um estudo toxicológico realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, este trabalho tem por objetivo avaliar a neurotoxicidade induzida em camundongos pela associação de padrões de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína através dos testes de *Rota-rod* e atividade locomotora espontânea.

MATERIAL E METODOS

Padrões

Foram utilizados padrões de *p*-sinefrina (99%) da MP Biomedicals (Estados Unidos), efedrina (99,5%) da Aldrich (Estados Unidos), salicina (99%) da Fluka BioChemika (Suíça) e cafeína da Merck (Alemanha) na proporção 10:4:6:80, respectivamente.

Animais

Foram utilizados camundongos albinos, machos adultos, linhagem CF1, com massa corporal entre 35-45 g (ração e água "ad libitum") provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Os animais foram alojados em caixas de polietileno de 47x34x18cm (5 animais por caixa), mantidos à temperatura de 22°C, com umidade controlada, ciclo de 12h luz/escuro e foram aclimatados no biotério setorial por pelo menos 15 dias.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Protocolo número

2007982) e realizados em conformidade com as diretrizes atuais para o cuidado dos animais de laboratório. (26-28)

Rota Rod

A metodologia utilizada para o teste de Rota Rod foi a descrita por Bristow et al. (1996) e Leal et al. (2000). (29-30)

Vinte e quatro horas antes do teste, grupos de sete animais foram previamente selecionados por sua capacidade de permanecer por um período de 120s no aparelho do *Rota-rod* por no mínimo duas vezes consecutivas em três tentativas.

Os animais selecionados foram tratados por gavagem oral com água destilada ou padrões de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína associados, em doses de 300mg/kg e 400mg/kg e colocados no aparelho *Rota-rod* (1 tentativa de no máximo 60s) 30, 60, 90 e 120min após a administração.

Atividade Locomotora Espontânea

O método para a atividade locomotora espontânea foi adaptado de Creese et al. (1976). (31)

Grupos de sete animais foram tratados por gavagem oral com água destilada, *p*-sinefrina 30mg/kg ou associação de padrões de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína 300mg/kg, 350mg/kg, 400mg/kg e 500 mg/kg. Antes da administração, os animais foram individualmente ambientados por 10 minutos nas caixas de atividade locomotora espontânea (Albarsch Equipamentos Eletrônicos), a qual consiste em uma caixa de 45 x 25 x 20cm com quatro foto-células paralelas que contam automaticamente o número de cruzamentos do animal. Passados 30

minutos da administração, os camundongos foram colocados de volta na caixa de atividade locomotora e o número de cruzamentos foi contado durante 15 minutos. O teste foi realizado em uma sala escura e sem barulho.

Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

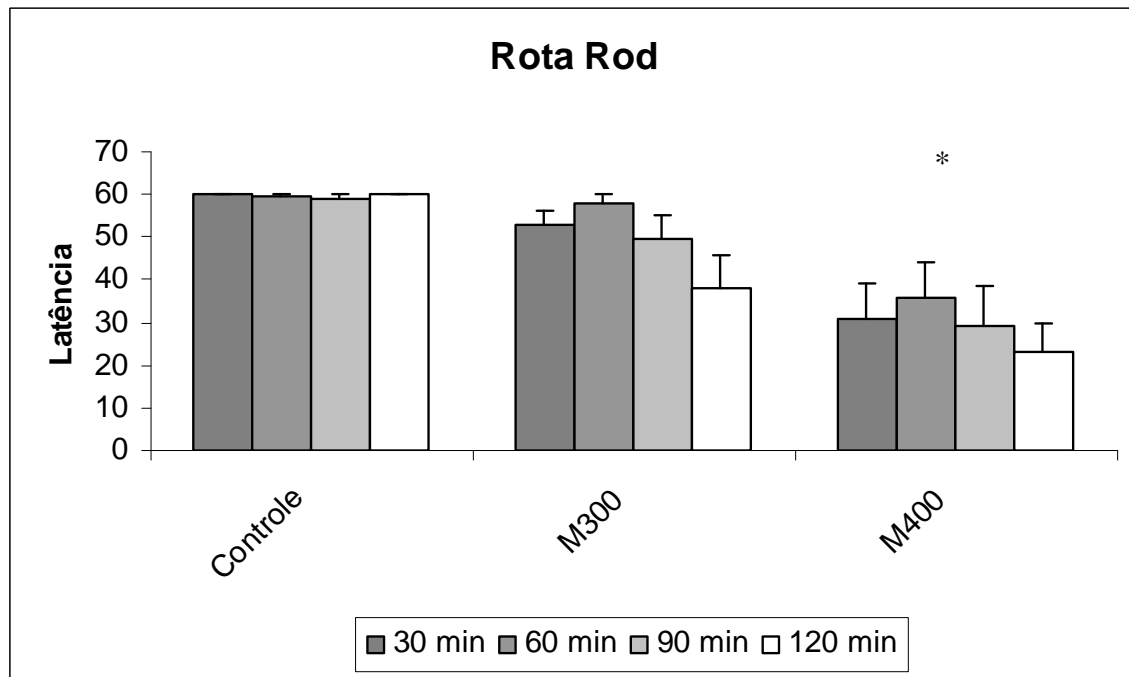
Os dados para o teste de Rota-rod foram analisados por ANOVA de medidas repetidas/ Bonferroni.

Os dados para a atividade locomotora espontânea foram analisados por ANOVA/ Student- Newman- Keuls.

RESULTADOS

No teste de *Rota-rod* (Figura 2) os resultados mostram que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o grupo 400mg/kg, e entre os grupos de 300mg/kg e 400mg/kg da mistura. Não houve diferença entre os tempos em cada tratamento.

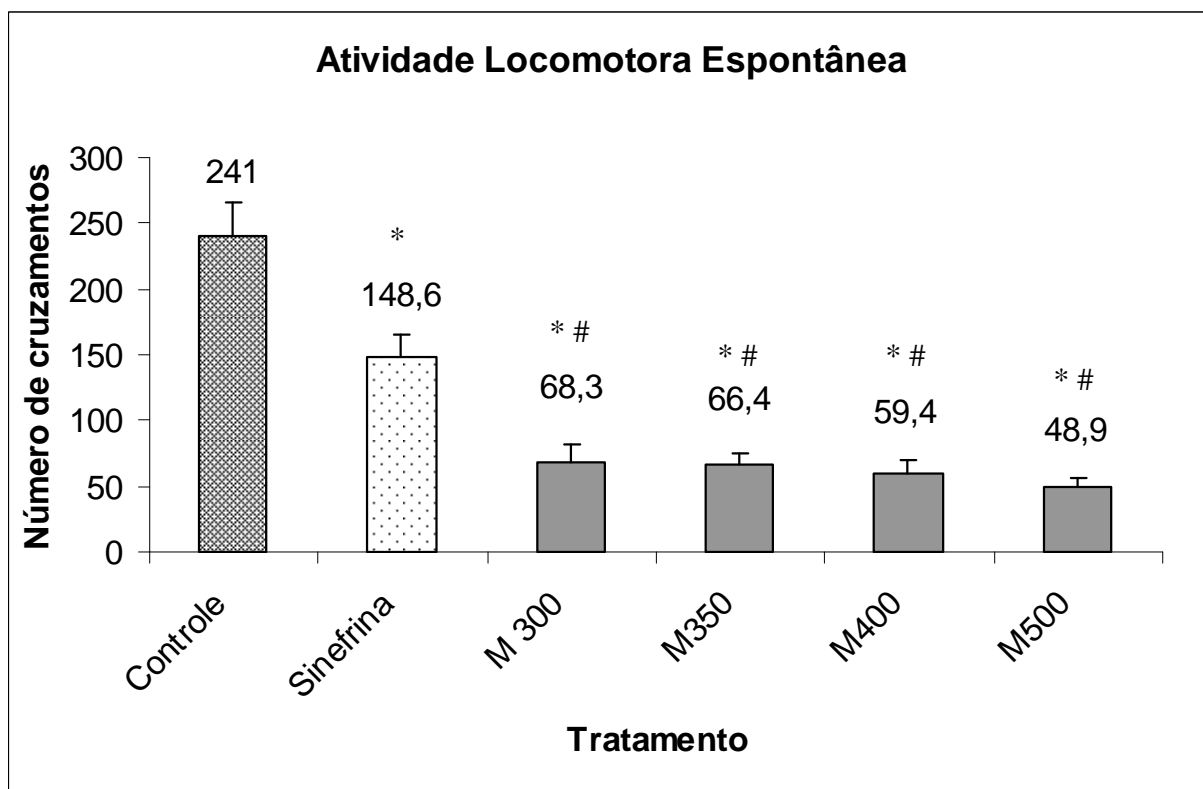
Os resultados obtidos para atividade locomotora espontânea estão apresentados na Figura 3. Como pode ser observado, o número de cruzamentos dos grupos tratados com apenas *p*-sinefrina 30mg/kg ($148,6 \pm 17,5$) e com a mistura de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína 300mg/kg ($68,3 \pm 13,3$), 350mg/kg ($66,4 \pm 9,1$), 400mg/kg ($59,4 \pm 10,8$) e 500mg/kg ($48,9 \pm 7,5$) foi significativamente ($p < 0,01$) menor em relação ao grupo controle ($241 \pm 25,8$). Aproximadamente duas horas após a realização do experimento todos os animais do grupo 500mg/kg morreram após convulsionarem. A necropsia feita nos animais revelou hemorragia cardiopulmonar.



* Significativamente diferente do grupo controle e do grupo tratado com a mistura 300mg/kg

M = mistura *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína (proporção 10:4:6:80)

Figura 2: Efeito da associação *p*-sinefrina, efedrina, cafeína e salicina 300mg/kg (M300) e 400mg/kg (M400), no desempenho em Rota-rod 30, 60, 90 e 120 min após o tratamento. Dados representados por média \pm erro padrão da média (n=7). ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni ($p < 0,05$).



M = mistura *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína (proporção 10:4:6:80)

* significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,01$)

Figura 3: Efeito da *p*-sinefrina e associação de sinefrina, efedrina, cafeína e salicina 300mg/kg, 350mg/kg, 400mg/kg e 500mg/kg na atividade locomotora espontânea. Dados representados por média \pm erro padrão da média ($n=7$). ANOVA/ Student- Newman- Keuls

DISCUSSÃO

A diversidade de produtos e a facilidade de acesso aos mesmos contribuem para o abuso na utilização de suplementos alimentares e complexos emagrecedores a base de extratos vegetais.

A substituição dos alcalóides da efedra por seu análogo estrutural, *p*-sinefrina, após a proibição do seu uso pela FDA, ainda é objeto de estudo sobre a efetividade e a segurança dessa substituição.

Neste trabalho demonstrou-se que no teste de *Rota-rod* o tempo de latência para queda do aparelho do grupo tratado com a mistura de *p*-sinefrina, efedrina, cafeína e salicina na dose de 400mg/kg foi significativamente menor do que o tempo do grupo tratado com a dose de 300mg/kg. Esse resultado corrobora com os resultados encontrados em experimentos de toxicidade oral aguda realizados previamente pelo nosso grupo de pesquisa. Nele foi demonstrado que os sinais de toxicidade produzidos pela mistura na dose de 300mg/kg são menos intensos que os produzidos com a dose de 400mg/kg (dados ainda não publicados). Essa maior toxicidade apresentada pela dose de 400mg/kg poderia justificar um aumento da incoordenação motora apresentado por este grupo no teste de *Rota-rod*.

Também se demonstrou que quando administrada a mistura de *p*-sinefrina, efedrina, cafeína e salicina tem-se uma redução significativa da atividade motora dos animais. Quando compara-se o grupo tratado somente com *p*-sinefrina com os grupos tratados com a mistura, nota-se que há uma redução significativa na atividade locomotora dos animais. Esse efeito já é evidente no grupo tratado com a mistura na dose de 300mg/kg, onde a quantidade de *p*-sinefrina (30mg/kg) é igual a do grupo tratado apenas com *p*-sinefrina. É possível observar, nesse caso, que a redução na atividade locomotora dos animais, indica que a presença de outras substâncias associadas a *p*-sinefrina podem causar um aumento na toxicidade.

Um estudo realizado por Arbo e colaboradores (2008) sobre a toxicidade aguda oral da *p*-sinefrina (300mg/kg) e de extratos de *Ca* em camundongos, indicaram uma baixa toxicidade da *p*-sinefrina. No entanto, alguns efeitos como

redução da atividade locomotora, exoftalmia, piloereção e salivação foram observados. (32) Esses resultados demonstram que a *p*-sinefrina, ao contrário do que se pensava, age em receptores α e β -adrenérgicos, apresentando efeitos adversos semelhantes aos da efedrina, tais como aumento da frequência e débito cardíaco, vasoconstrição, broncodilatação e estimulação do SNC. (12, 33)

Além disso, a efedrina, também presente nessas formulações, exerce sua ação ativando os receptores α - e β -adrenérgicos pela atividade agonista direta e pela ação indireta, através da liberação de NA via mecanismo de troca mediado por transportador. (34) Através de sua ação nos receptores β_1 -adrenérgicos, exerce um efeito estimulante sobre o coração. Além disso, exerce um efeito vasoconstritor pela ação sobre os receptores α_1 . Essa superestimulação dos receptores adrenérgicos é responsável pelos efeitos tóxicos causados pela efedrina no SNC, como cefaléia, ansiedade, insônia, agitação, psicose, e crises convulsivas. (35, 36)

Estudos realizados por Haller e colaboradores (2005) sugerem que os efeitos cardiovasculares observados, após a ingestão de suplementos *efedra-free*, seriam atribuídos à cafeína e outros estimulantes presentes nestas formulações. (11) Isso porque a cafeína age como antagonista dos receptores de adenosina que por sua vez promovem a inibição da liberação de NA. Entre os efeitos autonômicos estimulantes da cafeína como antagonista da adenosina, observa-se a estimulação cardíaca, aumento da pressão arterial por vasoconstrição cerebral e redução da mobilidade intestinal. (37)

A combinação de *p*-sinefrina e cafeína tem sido relacionada aos mesmos efeitos adversos apresentados pela combinação de efedrina e cafeína, tais como indução de arritmias cardíacas, hipertensão, infarto e acidente vascular cerebral. (23)

A ação dos salicilatos, por sua vez, provavelmente seja a de facilitar a chegada da noradrenalina em seus receptores, neste caso os receptores relacionados com a termogênese, através da inibição da síntese de prostaglandinas. (22)

Como referido por Consoli et. al. e Stone et. al., a administração de altas doses de agonistas adrenérgicos provocaria uma superestimulação desses receptores dando origem aos efeitos tóxicos observados, bem como a redução da atividade locomotora. (38, 39)

Efeitos tóxicos produzidos pela mistura puderam ser observados durante a realização do experimento principalmente no grupo de animais tratados com a mistura de 500mg/kg. A morte de todos os animais do referido grupo foi observada após episódios convulsivos. Na necropsia foi observada hemorragia cardiopulmonar o que reforça a hipótese de uma potencialização dos efeitos adrenérgicos sobre o sistema cardiovascular.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível verificar que a mistura de *p*-sinefrina, efedrina, salicina e cafeína, nas doses e proporções testadas, produz sinais de neurotoxicidade e alterações na atividade locomotora em camundongos. Esses achados experimentais podem ser resultantes de um possível sinergismo de efeitos sobre o sistema adrenérgico, uma vez que todas as substâncias em questão podem agir direta ou indiretamente no mesmo.

Considerando o grande número de relatos na literatura acerca de acidentes toxicológicos envolvendo suplementos alimentares e complexos emagrecedores e o crescente incremento de produtos no mercado contendo a associação de *p*-

sinefrina, efedrina, salicina e cafeína, os resultados desse trabalho servem de alerta e estimulam a continuidade das pesquisas que tangem essa problemática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DICKEL, M.L. et al. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **J Ethnopharmacol** 2007; v.109, n.1, p. 60–71.
2. KALMAN, D.S. et al. Effects of a weight-loss aid in healthy overweight adults: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Cur Therap Res** 2000; v. 61, n. 4, p. 199-205.
3. IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil: pesquisa de orçamentos familiares 2005-2006**. Rio de Janeiro, 2007.
4. MORO, C.O., BASILE, G. Obesity and medicinal plants. **Fitoterapia** 2000; v.71, suppl. 1, p. 73-82.
5. PELLATI, F. BENVENUTI, S. Determination of ephedrine alkaloids in *Ephedra* natural products using HPLC on a pentafluorophenylpropyl stationary phase. **J Pharm Biomed Anal** 2008; v. 48, n. 2, p. 254–263.
6. KATZUNG, B.G.; Basic and clinical pharmacology. 9th ed. California. Pg 67-69.
7. BENT, S.; PADULA, A.; NEUHAUS, J. Safety and efficacy of *Citrus aurantium* for weight loss. **Am J Cardiol** 2004; v.94, n.10, p.1359-1361.
8. GROLLMAN, A. P. Academic perspectives on dietary supplements use: the need for new guidelines. **Thromb Res** 2005; v. 117, n.1-2, p. 185-192.
9. HAAZ, S. et al. *Citrus aurantium* and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update. **Obes Rev** 2006; v. 7, n.1, p. 79-88.
10. BOUCHARD, N. C. et al. Ischemic Stroke Associated With Use of an Ephedra-Free Dietary Supplement Containing Synephrine. **Mayo Clin Proc** 2005; v. 80, n. 4, p. 541-545.
11. HALLER, C.A.; BENOWITZ, N.L.; JACOB, P. Hemodynamic effects of ephedra-free weight-loss supplements in humans. **Am J Med** 2005; v. 118, n. 9, p. 998-1003.
12. FUGH-BERMAN, A.; MYERS, A. *Citrus aurantium*, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research. **Exp Biol Med** 2004; v. 229, n.8, p. 698-704.
13. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 344, de 12 de maio de 1998. **Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial**. D.O.U. - Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 de maio de 1998.

14. COLKER, C. M., et al. Effects of Citrus aurantium Extract, Caffeine, and St. John's Wort on Body Fat Loss, Lipid Levels, and Mood States in Overweight Healthy Adults. **Cur Therap Res** 1999; v. 60, n. 3, p.145-153.
15. LEGGIO, G.M. et al. Behavioral effects of SR 58611A, a beta-3 agonist, on experimental models of mild stress. **Eur Neuropsychopharmacol** 2006; v.16, p. S61-S62.
16. PELLATI, F., BENVENUTI, S., MELEGARI, M. Enantioselective LC analysis of synephrine in natural products on a protein-based chiral stationary phase. **J Pharm Biomed Anal** 2005; v. 37, n. 5, p. 839-849.
17. MATTOLI, L. et al. A rapid liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry method for evaluation of synephrine in *Citrus aurantium* L. samples. **J Agric Food Chem** 2005; v. 53, n. 26, p. 9860-9866.
18. BRAY, G.A.; RYAN, D. Drugs used in the treatment of obesity. **Diabetes Reviews** 1997; v. 8. p. 83-100.
19. PUTZBACH, K. et al. Determination of Bitter Orange alkaloids in dietary supplements standard reference materials by liquid chromatography with ultraviolet absorbance and fluorescence detection. **J Chromatog A** 2007; v.1156, n.1-2, p. 304-311.
20. AVULA, B. et al. Simultaneous quantification of adrenergic amines and flavonoids in *C. aurantium*, various Citrus species, and dietary supplements by liquid chromatography. **J AOAC Int** 2005; v. 88, n. 6 , p. 1593-1606.
21. PELLATI, F. et al. Determination of adrenergic agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantium* L. var. amara by LC. **J Pharm Biomed Anal** 2002; v. 29, n. 6, p. 1113-1119.
22. MENDES, C.M. Utilização de salicilatos em suplementos alimentares e compostos emagrecedores. Trabalho de conclusão de curso. Porto Alegre. Faculdade de Farmácia: UFRGS. 2009
23. MARCUS, D. M. e GROLLMAN, A. P. Ephedra-free is not danger-free. **Science** 2003; v. 301, p. 1669-1671.
24. HALLER, A.C.; JACOB, P.; BENOWITZ, N.L. Pharmacology of ephedra alkaloids and caffeine after single-dose dietary supplement use. **Clin Pharmacol Ther** 2002; v. 71, n. 6, p. 421-432.
25. BREUM, L. et al. Comparison of an ephedrine/caffeine combination and dexfenfluramine in the treatment of obesity. A double-blind multi-centre trial in general practice. **Int J Obes Relat Metab Disord** 1994; v. 2, n. 18, p. 99-103.
26. GOLDIM, J. R. **Pesquisa em Saúde e Direitos dos Animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995.

27. OLFERT, E. D.; CROSS, B. M.; McWILLIAM, A. **Manual sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación**. Ontário: Canadian Council on Animal Care, 1998.
28. BRASIL. Ministério Público. **Lei n 11.794, de 8 de outubro de 2008**. Publicada no DOU 9.10.2008.
29. BRISTOW, L. J. et al. The atypical neuroleptic profile of the glycine/N-methyl-d-aspartate receptor antagonist L-701,324 in rodents. **J Pharmacol Exp Ther** 1996; v. 277, n.2, p. 578-585.
30. LEAL, M.B.; SOUZA, D.O; ELISABETSKY, E. Long-lasting ibogaine protection against NMDA-induced convulsions in mice. **Neurochem Res.**, United States 2000; v. 25, n. 8, p. 1083-1087.
31. CREESE, I.; BURT, D. R.; SNYDER, S. H. Dopamine-receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. **Science** 1976; v. 192, p. 481-483.
32. ARBO, M. D. Avaliação toxicológica de *p*-sinefrina em extratos de *Citrus aurantium* (Rutaceae). **Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação. Faculdade de Farmácia, UFRGS, 2008.**
33. D'ANDREA, G. *et al.* Elusive amines and primary headaches: historical background and prospectives. **Neurol Sci** 2003; v. 24, suppl. 2, p. 65-67.
34. HOFFMAN BB, LEFKOWITZ RJ - Catecholamines, Sympathomimetic Drugs, and Adrenergic Receptor Antagonists, in: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB et al - **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th Ed, New York, McGraw- Hill, 1996. p.199-248.
35. PENTEL, P. Toxicity of over-the-counter stimulants. **JAMA** 1984; v. 252, n. 14, p. 1898-1903.
36. ZAHN, K. A.; LI, R. L.; PURSSEL, R. A. Cardiovascular toxicity after ingestion of "herbal ecstasy". **J Emerg Med** 1999; v. 17, n.2, p. 289-291.
37. SILVA NETO, R. P. e SOARES, A. A. O papel da cafeína nas cefaleias: fator agravante ou atenuante? **Migrêneas e cefaléias** 2006; v. 9, n.3, p. 72-77.
38. CONSOLI, D., LEGGIO, G.M., MAZZOLA, C., MICALÉ V., Drago, F., Behavioral effects of the b3 adrenoceptor agonist SR58611A: is it the putative prototype of a new class of antidepressant/anxiolytic drugs? **Eur. J. Pharmacol** 2007; v.573, p. 139-47
39. STONE, E.A., Quartermain, D., Lin, Y., Lehmann, M.L. Central a1-Adrenergic system in behavioral activity and depression. **Biochem. Pharmacol** 2007; v. 73, p. 1063–1075.