

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

CAROLINE GIESELER DIAS

Efeitos do D-limoneno no Metabolismo de Ácidos Biliares em Camundongos C57/B16

Orientador: Prof. Dr. Jarlei Fiamoncini
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental
Dissertação de Mestrado

•
T643.1
D541 e

SÃO PAULO
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

CAROLINE GIESELER DIAS

Efeitos do D-limoneno no Metabolismo de Ácidos Biliares em Camundongos C57/Bl6

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Área: Nutrição Experimental

Orientador: Prof. Dr. Jarlei Fiamoncini

SÃO PAULO
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

**Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562**

D541e Dias, Caroline Gieseler
Efeitos do D-limoneno no Metabolismo de Ácidos Biliares em Camundongos C57/B16 / Caroline Gieseler Dias. - São Paulo, 2021.
66 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Orientador: Fiamoncini, Jarlei

1. Metabolismo. 2. Monoterpenos. 3. Ácidos Biliares. I. T. II. Fiamoncini, Jarlei, orientador.

CAROLINE GIESELER DIAS

Efeitos do D-limoneno no Metabolismo de Ácidos Biliares em Camundongos C57/Bl6

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2021.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Em especial à minha mãe, Dione, e ao meu pai, Felipe, os maiores presentes da minha vida. Obrigada por todo carinho, apoio e compreensão.

À Mônica e Izabelle, minhas amigas especiais que sempre estiveram do meu lado, torcendo por mim, independente da distância. Obrigada por serem as irmãs que a vida me trouxe e por estarem comigo em todos os momentos.

Ao Matheus Leão que abriu as portas para que esse mestrado fosse possível e que sempre acreditou na capacidade.

Minha gratidão especial ao Prof. Dr. Jarlei Fiamoncini, meu orientador e querido “papi soberano”. Obrigada por sua dedicação em me ensinar e principalmente pela confiança sempre depositada em mim. Obrigada por acreditar em mim mais que eu mesma.

Ao meu querido anjo da guarda, José Fernando, que sempre esteve a disposição para me ensinar, me ajudar, e, principalmente, me escutar sempre que precisei de um conselho.

Aos demais colegas de laboratório e alunos de iniciação científica.

À empresa Citroflavor que forneceu a suplementação de D-limoneno utilizada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido através do Auxílio Regular 2018/19189-0,

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de mestrado (processo 133716/2019-8).

RESUMO

DIAS, C.G. Efeitos do D-limoneno no Metabolismo de Ácidos Biliares em Camundongos C57/Bl6. 2021. **Dissertação** (Mestrado em Nutrição Experimental – Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo). São Paulo, 2021.

O D-limoneno (DL) é o principal monoterpreno do óleo essencial da laranja. Trata-se de um composto de baixo peso molecular e alta lipofilicidade, características que lhe conferem atividade antimicrobiana. Em modelos animais, esse composto apresenta efeito anti-inflamatório, antioxidante, hipolipemiante e hipoglicemiante. Os ácidos biliares (AB) podem modular o metabolismo de lipídios, carboidratos e diferentes processos fisiológicos por atuarem como agonistas de receptores nucleares e de membrana. Seu metabolismo envolve a síntese hepática a partir do colesterol e transformações decorrentes da sua interação com a microbiota intestinal. A hipótese do estudo é que o DL possa modular a composição da microbiota intestinal e, conseqüentemente, o metabolismo dos AB. Considerando os efeitos já descritos dos AB em modelos animais, espera-se que a suplementação de camundongos com DL promova o aumento da β -oxidação de ácidos graxos em diferentes tecidos e iniba a gliconeogênese hepática. O principal objetivo desse estudo é avaliar os efeitos do DL no metabolismo de AB em camundongos, bem como seus efeitos sobre o metabolismo intermediário. Para isso, camundongos machos C57/Bl6 foram distribuídos em quatro grupos, sendo um deles tratado com ração normolipídica (NL) e três com uma ração hiperlipídica (HL) (60% do valor energético total proveniente de lipídios). Após uma semana de adaptação, dois grupos alimentados com a ração HL receberam suplementação de DL nas concentrações de 0,1, e 0,8% na dieta. O protocolo experimental foi finalizado após a 6ª semana de tratamento com a eutanásia dos animais para amostragem de biofluidos e tecidos. O grupo HL apresentou consumo energético ~12% maior que o grupo NL ($p < 0,0001$). Entre os grupos que receberam ração HL, a eficiência energética do grupo HL_0,1% foi ~35% menor, contribuindo para que os animais desse grupo apresentassem menor ganho de peso (30%; $p < 0,05$) e menor acúmulo de tecido adiposo branco (~30%; $p < 0,05$) que seus pares não suplementados. Observou-se alta variabilidade interindividual no metabolismo de AB sendo que tanto no fígado quanto nas fezes foram encontrados mais AB primários que secundários, sendo que os primeiros correspondem a aproximadamente 80% da somatória de AB totais. Não houve predominância de nenhum composto em particular em ambas as matrizes analisadas. A suplementação com 0,8% de DL promoveu aumento da concentração de AB nas fezes ($p < 0,005$), ao passo que no fígado houve redução da concentração de AB totais ($p < 0,0001$). A concentração de AB primários, conjugados com a taurina e conjugados totais seguiu o mesmo padrão de comportamento. Nosso estudo demonstrou que o tratamento com DL promove alterações no pool de AB que não são dose-dependentes. O presente estudo fornece base para futuras pesquisas que busquem compreender os mecanismos envolvidos na modulação no perfil de AB promovido pela alteração da composição da dieta e os efeitos do DL sobre o pool de AB e seus efeitos sistêmicos.

Palavras-Chave: Monoterpenos; Ácidos Biliares; Triglicerídeos; Metabolismo.

ABSTRACT

DIAS, C.G. Effects of D-limonene on Bile Acid Metabolism in C57/B16 Mice. 2021.

Dissertation (Master degree in Experimental Nutrition - Department of Food Science and Experimental Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo). São Paulo, 2021.

D-limonene (DL) is the main monoterpene of orange essential oil. It is a compound of low molecular weight and high lipophilicity, characteristics responsible for its antimicrobial activity. In animal models, DL has shown anti-inflammatory, antioxidant, lipid- and glucose-lowering effects. Bile acids (BA) can modulate the metabolism of lipids, carbohydrates and different physiological processes by acting as nuclear and membrane receptor agonist. Their metabolism involves liver synthesis from cholesterol and transformations resulting from its interaction with the intestinal microbiota. The hypothesis of the study is that DL, due to its antimicrobial properties, can modulate the composition of the intestinal microbiota and the metabolism of BA. Considering the already described effects of BA in animal models, it is expected that supplementation of mice with DL promotes increased fatty acid β -oxidation in different tissues and inhibit hepatic gluconeogenesis. The main objective of this study was to evaluate the effects of DL on BA metabolism in mice, as well as its effects on intermediate metabolism. Male mice C57/B16 were distributed in four groups, one of them fed a low-fat diet (NL) and three other groups fed on a high-fat diet (HL) (60% of the total energy from lipids). After one week of adaptation, two groups fed the HL diet received DL supplementation at 0.1 and 0.8% in the feed. The experimental protocol was finalized after the 6th week of treatment with euthanasia for biofluid and tissue sampling. The HL group show energy consumption ~12% higher than the NL group ($p < 0.0001$). Among the HL groups, the energy efficiency of the HL0.1% group was ~35% lower, leading to an equivalent lower weight gain in this group (30%; $p < 0.05$) and lower white adipose tissue accumulation (~30% $p < 0.05$) than its non-supplemented pairs. High interindividual variability was observed in the metabolism of BA and both in the liver and feces were found more primary than secondary BA, the first corresponding to approximately 80% of the total BA sum. There was no predominance of any particular compound in both matrices analyzed. Supplementation with 0.8% DL promoted higher fecal concentration of total BA ($p < 0.005$) while in the liver there was a reduction in the total BA concentration ($p < 0.0001$). The concentration of primary BA, BA conjugated to taurine and total conjugates followed the same pattern. Our study demonstrated that treatment with DL promotes changes in BA pool, an effect that did not show a dose-dependent fashion. The present study provides the basis for future research that seeks to understand the mechanisms involved in modulation in the BA profile promoted by the alteration of diet composition and the effects of DL on the BA pool and its systemic effects.

Keywords: Monoterpenes; Bile Acids; Triglycerides; Metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo de ácidos biliares.....	24
Figura 2- Estrutura química dos ácidos biliares.	25
Figura 3 - Representação da hipótese do estudo.....	29
Figura 4 - Grupos experimentais	31
Figura 5- Desenho experimental.....	32
Figura 6 – Metabolismo energético.	39
Figura 7 – Massa de diferentes depósitos de tecido adiposo e fígado.....	40
Figura 8 - Glicemia durante o OGTT.	40
Figura 9 – Marcadores do metabolismo intermediário no plasma.).	41
Figura 10 – Concentração dos metabólitos de DL na urina	43
Figura 11 9 – Mapa de calor concentração dos metabólitos de DL na urina.....	44
Figura 12 – Concentração de ácidos biliares nas fezes em $\mu\text{mol}/\text{fezes}$ produzidas em 24 h..	45
Figura 13 – Excreção fecal das diferentes classes de ácidos biliares em 24 horas.....	45
Figura 14 – Concentração de ácidos biliares nas fezes.....	46
Figura 15 – Concentração fecal das diferentes classes de AB.....	46
Figura 16 – Composição percentual das diferentes classes de AB nas fezes.	47
Figura 17 – Concentração de ácidos biliares no fígado.....	48
Figura 18 – Concentrações de diferentes classes de AB no fígado.....	48
Figura 19 – Composição percentual das diferentes classes de AB no fígado..	49
Figura 20 – Mapa de calor de correlação de spearman.	50
Figura 21 – Gráficos de correlação.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de macronutrientes das rações normolipídica e hiperlipídica.....	31
Tabela 2 - Composição do suplemento de D-limoneno utilizado.....	37
Tabela 3 – Concentração de D-limoneno nas diferentes formulações de ração (g/100g).	37
Tabela 4 - Ingestão diária de D-Limoneno.....	38
Tabela 5 - Concentração dos metabólitos de D-limoneno na urina normalizada	42
Tabela 7– Abundância relativa (percentual) dos ácidos biliares nas fezes.....	52
Tabela 8 – Abundância relativa (percentual) dos ácidos biliares no fígado.	53

LISTA DE SIGLAS

AB – Ácidos Biliares
ALT – Alanina aminotransferase
ATP – Adenosina trifosfato
COX-2 – Cicloxigenase 2
CYP7A1 - Colesterol 7 alfa-hidroxilase
DL – D-limoneno
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EM - Espectrômetro de massas
FDA – *Food and Drug Administration*
FXR - Receptor farnesoide X
TGF- β - Fator de crescimento transformador beta
GLP1 - Peptídeo semelhante a glucagon 1
GPx - Glutaciona peroxidase
GR - Glutaciona redutase
GSH – Glutaciona
HDL - Lipoproteína de alta densidade
HL – Hiperlipídica
HMG-CoA redutase
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
IL - Interleucina
iNOS - Óxido nítrico sintase
ITT – Teste de tolerância à insulina
LD50 – Dose letal mediada
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
LXR - Receptor X do fígado
MPO - Mieloperoxidase
NF- κ B - Fator nuclear kappa B
NL – Normolipídica
NOAEL – Nível sem efeitos adversos observáveis
OGTT – Teste de tolerância oral à glicose
PBP4 - Proteína 4 de ligação à penicilina

PGC-1 α - Co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma

PGE2 - Prostaglandina E2

PPAR - Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

PRDM16 - Domínio PR contendo 16

PYY - Peptídeo YY

RfD – Dose de referência

SOD - Superóxido dismutase

SREBP-1 - Proteína-1 de ligação ao elemento regulador de esterol

TGR5 - receptor 1 de ácido biliar acoplado à proteína G

TNF - Fator de necrose tumoral

UCP - Proteína de desacoplamento mitocondrial

VET - Valor energético total

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Metabolismo do D-limoneno	13
1.2 Toxicidade e segurança do limoneno.....	14
1.3 Efeitos do D-limoneno no metabolismo	16
1.4 Atividade antimicrobiana do D-limoneno	22
1.5 Metabolismo de ácido biliares	24
1.6 Efeitos dos ácidos biliares no metabolismo	26
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. HIPÓTESE	29
4. OBJETIVO GERAL.....	30
4.1 Objetivos Específicos.....	30
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1 Suplemento de D-limoneno	30
5.2 Aspectos Éticos.....	31
5.3 Delineamento Experimental.....	31
5.4 Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT) e Teste de Tolerância à Insulina (ITT).....	32
5.5 Análises	33
5.5.1 Marcadores do metabolismo intermediário	33
5.5.2 Composição de ácidos biliares	33
5.5.3 Determinação de metabólitos do D-limoneno	35
5.6 Análise dos Dados.....	36
5. RESULTADOS	37
5.1 Análise do perfil de monoterpenos do suplemento de D-limoneno utilizado no estudo	37
5.2 Quantificação de D-limoneno na ração.....	37
5.3 Peso corporal e metabolismo energético.....	38
5.4 Teste de tolerância oral a glicose (OGTT).....	40
5.5 Marcadores do metabolismo intermediário	41
5.6 Metabólitos de D-limoneno na urina	41
5.7 Metabolismo de ácidos biliares.....	44
5.7.1 Fezes	44
5.7.2 Fígado.....	47
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo do D-limoneno

Os monoterpênos são produtos naturais originados do metabolismo secundário de plantas, formados por duas unidades de isoprenos (C_5H_8), pertencentes ao grupo químico dos terpenos. São os principais constituintes dos óleos essenciais de frutas cítricas, ervas, temperos e outros alimentos de origem vegetal e plantas medicinais. Devido a suas diversas propriedades medicinais, podem ser utilizados como coadjuvantes no tratamento de várias doenças, o que vem atraindo a atenção de pesquisadores para essa classe de compostos ^{1,2}. O D-limoneno é o principal monoterpêno do óleo essencial da casca de frutas cítricas. A concentração de D-limoneno no suco de laranja é de, em média, 100 mg/litro. A ingestão diária desse monoterpêno varia muito de acordo com o padrão alimentar, com o consumo de frutas cítricas e de alimentos que levam adição de limoneno como flavorizante. Nos Estados Unidos, estima-se que a ingestão diária de D-limoneno seja de 0,27 mg/kg de peso corporal/dia, podendo chegar a 1 mg/kg de peso corporal/dia quando há aumento do consumo de cítricos ^{3,4}. O D-limoneno pode ser extraído por meio de destilação a vapor de cascas e polpas cítricas provenientes da indústria de suco e de óleos prensados a frio⁵. Com relação a suas propriedades físico-químicas, em temperatura ambiente o limoneno é líquido e incolor. É considerado estável por anos a temperatura ambiente, porém quando manuseado e armazenado em condições instáveis e exposto ao ar, pode sofrer auto-oxidação^{5,6}. Trata-se de um composto de baixo peso molecular e alta solubilidade em óleos, que é rapidamente absorvido, metabolizado pelo organismo e excretado ⁷⁻¹¹.

Quando administrado por via oral, o D-limoneno é absorvido de forma rápida e completa pelo trato gastrointestinal^{5,12}. Por ser rapidamente metabolizado, observa-se pico de concentração dos metabólitos do D-limoneno na corrente sanguínea em média 1 hora após sua administração oral e é muito raro que este se acumule no organismo ⁹. Além disso, seu tempo de meia vida é curto, durando de 12 a 24 horas no organismo humano, sendo que a principal via de excreção de seus metabólitos é a urina. Cerca de 60% dos metabólitos do D-limoneno são excretados pela urina e 30% pelas fezes, sendo que sua excreção se completa entre 24 e 72 horas após sua administração oral ^{7,8,13}.

Os metabólitos do D-limoneno podem ser facilmente detectados no soro, fígado, pulmão, rins e em diversos outros tecidos, principalmente naqueles com altas concentrações de células adiposas ^{7,13}. Um estudo realizado com objetivo de observar o acúmulo de D-limoneno no tecido adiposo verificou que após a administração diária de uma limonada feita com 2 limões

inteiros (com casca) por 4 semanas, houve acúmulo desse monoterpeneo no tecido mamário das voluntárias¹⁴. Os principais metabólitos do limoneno encontrados na circulação são o ácido perílico, ácido dihidroperílico e limoneno-1,8-diol^{12,15}. Quando indivíduos saudáveis receberam em média 100 ml de uma limonada contendo aproximadamente 50,4 mg/ml de D-limoneno, observou-se que 1 hora após a administração da limonada houve um pico de concentração plasmática de ácido perílico, seguido de um rápido declínio, sendo que após 24 horas, não foi possível detectar esse metabólito⁴.

1.2 Toxicidade e segurança do limoneno

Diversos estudos já comprovaram que o D-limoneno apresenta baixa toxicidade e que não induz efeitos mutagênicos, carcinogênicos ou nefrotóxicos, sendo registrado como uma substância geralmente reconhecida como segura no Código de Regulamentação Federal para aromas sintéticos do FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos^{5,16}. Como está presente de forma natural na atmosfera, o contato com o D-limoneno é muito comum e pode se dar tanto por via oral, quanto por inalação⁵.

A segurança da administração do D-limoneno em animais já foi avaliada em vários estudos. A LD50 (Dose Letal Mediana) em administração oral foi de 4400 mg/kg de peso corporal para ratos e 6600 mg/kg de peso corporal para camundongos¹⁷. Com base na classificação de Loomis e Hayes (1996), substâncias com LD50 entre 500 e 5000 mg/kg são levemente tóxicas, enquanto aquelas entre 5000 e 150000 mg/kg são consideradas praticamente não tóxicas¹⁸. Já quando avaliada a toxicidade crônica, o NOAEL (nível sem efeitos adversos observáveis) foi de <75 mg/kg de peso corporal/dia para ratos machos e <300 mg/kg de peso corporal/dia para fêmeas. Para camundongos, a toxicidade crônica NOAEL foi de 250 mg/kg de peso corporal/dia para machos e 500 mg/kg de peso corporal/dia para fêmeas¹⁷. Após a instilação de 10 ml de limoneno no duodeno de ratos, Igimi et al (1992) não observaram anormalidade histológica no duodeno¹⁹. Resultado semelhante foi verificado pelo mesmo grupo de pesquisa alguns anos antes, em um estudo desenvolvida com porcos. Os animais que receberam infusão de 20 ml de D-limoneno na vesícula biliar por 2 dias não apresentaram nenhuma alteração histológica nos tecidos que entraram em contato direto com o D-limoneno²⁰. O Programa Americano de Toxicologia (1990) também investigou a toxicidade do D-limoneno em ratos e camundongos. As doses variaram de 0,4 a 6,6 g/Kg por dia, e a administração foi realizada em 5 dias da semana, durante 3 semanas. Ao final da pesquisa não foi observado sinal de toxicidade do D-limoneno em doses menores do que 1,6 g/Kg/dia²¹. Um estudo mais recente, realizado com ratos, identificou que quando administradas altas doses de

D-limoneno de forma aguda por via intraperitoneal, percebeu-se leve toxicidade. A LD50 do limoneno no estudo foi de 4000 mg/kg, sendo classificado como um composto levemente tóxico. Em doses de até 1g/Kg/dia, o D-limoneno foi seguro para os animais e não apresentou potencial tóxico²². Uma dos maiores alvos de preocupação com relação a toxicidade do limoneno é o fígado, uma vez que esse composto sofre metabolização hepática após a ingestão. Ramos et al. (2015) avaliaram o efeito hepatotóxico do D-limoneno em ratos Wistar. Após serem submetidos a suplementação com D-limoneno via gavagem, os animais tratados com 75 mg/kg/dia por 45 dias apresentaram redução nas concentrações séricas de ALT (alanina aminotransferase) quando comparado aos grupos controle, porém essa alteração não indicou doença hepática. Os pesquisadores verificaram lesões hepatocelulares associadas a processos inflamatórios discretos ou moderados em todos os animais tratados com o monoterpene. Contudo, os autores sugerem que o efeito hepatotóxico do D-limoneno observado em ratos não pode ser extrapolado para humanos, visto que a dose utilizada foi muito elevada e que a exposição humana ao D-limoneno não seria suficiente para gerar esses efeitos²³.

Estudos em células também já foram desenvolvidos a fim de verificar os efeitos citotóxicos do limoneno. De maneira geral, é verificado um declínio da viabilidade celular e da sobrevivência das células tratadas com limoneno de acordo com a dosagem utilizada. Concentrações de até 100 µM não foram capazes de afetar a viabilidade de fibroblastos de pulmão de hamsters. Porém, em dosagem superior a 100 µM, observou-se redução de 50% na viabilidade das células estudadas. Apenas doses elevadas, iguais ou superiores a 10 mM, apresentaram efeito genotóxico²⁴.

Quando submetidos a suplementação em dose única de 20 g de D-limoneno, homens saudáveis não apresentaram anormalidades hepáticas, renais ou pancreáticas, mesmo relatando aumento da motilidade gastrintestinal e tenesmo¹⁹. Em outro estudo realizado com homens adultos que ingeriram 100 mg/Kg/dia de D-limoneno, verificou-se aumento nas eructações, leve saciedade por 10 horas após a ingestão do suplemento e fadiga leve, sendo a suplementação considerada segura e sem potencial toxicológico¹². Corroborando esses dados, observou-se que pacientes com tumores refratários sólidos, ao receberem doses entre 0,5 e 12 g/m²/dia de D-limoneno via oral (1-24 g/dia, considerando uma área média por pessoa de 1,9 m²), apresentaram como únicos efeitos colaterais náuseas, vômito e diarreia, indicando baixa toxicidade¹⁵. A ausência de toxicidade também foi relatada em um estudo no qual voluntários não tiveram manifestação de efeitos colaterais quando suplementados com 10 mg de D-limoneno (quantidade menor comparada aos outros estudos citados). A única alteração

observada pelos voluntários foi uma impressão olfativa característica de cítricos, que iniciou em média 1 hora após a suplementação e desapareceu em 2 a 3 horas ⁹. Da mesma forma, não foi constatada toxicidade em pacientes com câncer de mama após a suplementação com 2 g/dia de limoneno administrada de 2 a 6 semanas. Os únicos efeitos colaterais observados foram relacionados ao trato gastrointestinal, como eructações, diarreia e náuseas que apresentaram leve intensidade ²⁵.

Para determinar a RfD (dose de referência) de ingestão de limoneno por humanos, Kim et al. (2013) compilaram informações referentes a tratamentos com esse monoterpene em animais e analisaram dados de estudos com suplementação crônica de limoneno. A partir do NOAEL definido previamente para camundongos machos B6C3F1 de 250 mg/kg/d, foi realizado o cálculo de determinação da RfD. Os autores utilizaram um fator de incerteza de 10 para diferenças intraespécies em humanos e 10 para diferenças entre espécies entre animais e humanos, resultando em um RfD de 2,5 mg/kg/d para humanos ²⁶.

1.3 Efeitos do D-limoneno no metabolismo

Várias propriedades benéficas já foram atribuídas ao D-limoneno, como atividade anti-inflamatória²⁷⁻³⁰, ação antioxidante^{24,31-33}, potencial redução do risco de carcinogênese ³⁴ e ação na prevenção e controle do diabetes³⁵⁻³⁸, além de promover melhora em úlcera gástrica e colite²⁸.

Uma das propriedades mais exploradas do D-limoneno é sua ação sobre úlceras gástricas e doenças inflamatórias intestinais. Tendo em vista essa atividade potencial do limoneno, Moraes et al. (2009) estudaram os efeitos do óleo essencial de *C. Aurantium* e seu composto majoritário, o limoneno, na mucosa gástrica de animais com lesões gástricas. Tanto o óleo essencial quanto o limoneno apresentaram atividade gastroprotetora eficaz nos modelos de úlcera gástrica induzida por etanol e anti-inflamatórios não esteroidais. Os pesquisadores sugeriram que essa ação se deve a atividade que esse composto exerce sobre a prostaglandina E2, que está relacionada com o aumento da produção de muco gástrico³⁹. Resultados semelhantes foram observados pelo mesmo grupo de pesquisa em 2011, quando estudaram óleo essencial de limão cítrico, conhecido no Brasil como limão siciliano. Observou-se que o óleo essencial e o limoneno apresentaram efeito gastroprotetor, inibindo a formação de úlcera gástrica induzida por etanol e indometacina, sendo que o mecanismo que envolve a manutenção dos níveis de PGE2 também foi observado⁴⁰.

Outro estudo desenvolvido com ratos objetivou investigar a dose mínima efetiva para o efeito gastroprotetor do limoneno e os mecanismos que poderiam estar associados a essa

atividade. Após administração do limoneno via oral 1 hora antes da indução de úlcera com etanol, verificou-se que os animais tratados com 50 e 100 mg/kg de limoneno apresentaram redução de 93% e 100%, respectivamente, da formação de úlceras gástricas. Já aqueles que receberam apenas 25 mg/Kg do monoterpeno tiveram proteção gástrica semelhante ao grupo controle. Ademais, a suplementação com 50 mg/kg preveniu a formação de bandas hemorrágicas, promoveu maior integridade da mucosa, reduziu a hemorragia, a descamação e a necrose epitelial, características de úlceras induzidas por etanol e aumentou a produção de muco gástrico. Verificou-se que o limoneno exerceu atividade imunomoduladora, induzindo redução das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (interleucina 1 beta), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IL-6 (interleucina 6), além de aumentar o nível de IL-10 (interleucina 10), uma citocina anti-inflamatória, na mucosa gástrica. Ressalta-se que o tratamento com limoneno diminuiu significativamente a expressão gênica de NF- κ B, MPO (mieloperoxidase) e IL-1 β , não alterou a expressão de IL-10 e aumentou a expressão do mRNA de glutathione peroxidase, indicando o mecanismo molecular envolvido na atividade gastroprotetora do terpeno em questão ²⁷.

D'Alessio et al. (2013) investigaram a eficácia do D-limoneno no tratamento de colite induzida em ratos. Os tratamentos com 10 e 100 mg/kg de D-limoneno foram administrados via oral três dias antes e cinco dias após a indução da colite. Após a indução da colite, os animais não tratados exibiram aumento na extensão do cólon devido aos processos inflamatórios, sendo essa alteração intestinal controlada nos animais que receberam limoneno. O grupo tratado com 10 mg/kg de D-limoneno apresentou alterações macroscópicas no cólon e inflamação significativamente menores que o grupo sem tratamento. Os animais tratados com D-limoneno na dose de 100 mg/kg não apresentaram melhora nesses marcadores. Outro resultado observado foi o menor aumento da concentração sérica de TNF- α promovido pela indução da colite no grupo tratado com 10 mg/kg D-limoneno. Para explicar os mecanismos envolvidos na atividade do monoterpeno em questão sobre a colite, foi realizado ensaio *in vitro* que demonstrou que a ação do D-limoneno sobre o TNF- α envolve NF- κ B. Para complementar o estudo, foi realizada intervenção em humanos, com idade entre 65 e 85 anos, com óleo essencial de laranja, com objetivo de verificar os mecanismos da ação anti-inflamatória do D-limoneno. Como resultado, os pesquisadores verificaram que a atividade anti-inflamatória do D-limoneno se dá por meio da redução da expressão de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β e aumento da expressão de IL-10²⁸.

Outras pesquisas já foram desenvolvidas visando estudar a atividade anti-inflamatória do limoneno e de óleos essenciais ricos nesse monoterpreno. Os óleos essenciais de limão siciliano (*C. limon*), limão tahiti (*C. latifolia*), limão mirim (*C. aurantifolia*) e limão cravo (*C. limonia*), amplamente consumidos no Brasil e ricos em D-limoneno, demonstraram significativa atividade anti-inflamatória em estudos conduzidos em modelos animais³⁰. O óleo essencial de *C. latifolia* também foi estudado por Kummer et al. (2013), que, da mesma forma, notaram efeitos anti-inflamatórios em modelo murino de peritonite. Os estudos complementares *in vitro* demonstraram que o limoneno ocasionou significativa diminuição na migração de neutrófilos e redução nas concentrações de TNF- α , corroborando os dados anteriormente citados de que a ação anti-inflamatória desse monoterpreno se deve a sua atividade inibitória sobre mediadores pró-inflamatórios²⁹.

Para verificar quais os mecanismos envolvidos na atividade do D-limoneno sobre processos inflamatórios, Yu, Yan e Sun (2017) induziram colite ulcerativa em ratos e os trataram com D-limoneno nas dosagens de 50 ou 100 mg/kg. Quando suplementados com o monoterpreno, a atividade da doença e os danos à mucosa colônica foram significativamente menores do que o grupo não tratado. Os animais com colite apresentaram aumento significativo na expressão de NF- κ B, TNF- α , IL-1 β e IL-6 quando comparado ao grupo controle, porém, aqueles tratados com D-limoneno tiveram redução nesses marcadores quando comparados ao grupo não tratado, explicitando a atividade anti-inflamatória do suplemento. Além da resposta anti-inflamatória a atividade antioxidante do D-limoneno também foi analisada, visto que em indivíduos com colite, a capacidade de eliminação de radicais livres de oxigênio é comprometida. Para isso, a atividade das enzimas antioxidantes SOD (Superóxido Dismutase) e GSH (Glutathione) e da enzima iNOS (Óxido Nítrico Sintase) foram mensuradas. Observou-se que a atividade das enzimas citadas nos animais com colite foi reduzida, mas que os grupos tratados apresentaram aumento da atividade dessas enzimas em comparação ao grupo não tratado. Em contraste, quando avaliada a expressão da proteína COX-2 (Ciclo-oxigenase-2) e do gene TGF- β , os animais doentes apresentaram níveis maiores, que foram controlados quando tratados com D-limoneno. A produção de PGE2 e a expressão da proteína p-ERK1/2, que estavam comprometidas nos doentes, foi reestabelecida nos animais suplementados. Todos esses resultados confirmam as potenciais propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do D-limoneno o tornam uma potencial alternativa para o tratamento de diversas condições clínicas⁴¹.

Corroborando os efeitos antioxidantes, em outro protocolo com suplementação de limoneno em ratos com úlceras gástricas, observou-se aumento da atividade da enzima GPx

(Glutathione Peroxidase) sem que houvessem alterações nas atividades de SOD, GR (Glutathione Redutase) e GSH. Nos animais tratados com D-limoneno, houve inibição da atividade de MPO, uma enzima relacionada com processos oxidativos e inflamatórios, marcadora de infiltração de neutrófilos. Esse resultado sugere que devido à redução da infiltração de neutrófilos, um dos possíveis mecanismos de ação do limoneno seja sua atividade antioxidante²⁷. Além dos estudos em modelos animais, diversos estudos *in vitro* já foram desenvolvidos com a finalidade de investigar as propriedades antioxidantes do D-limoneno. O principal método utilizado para isso é o ensaio de captura ou eliminação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) que permite detectar a eficácia de um antioxidante em potencial na transferência de elétrons e na redução de uma substância³³. Chi et al. (2019) estudaram a atividade antioxidante do óleo essencial de 3 variedades de citrus: *Citrus sinensis*, *Citrus grandis* e *Citrus aurantifolia*, todas ricas em D-limoneno. De acordo com os resultados, o óleo essencial de *C. aurantifolia* apresentou a maior concentração de limoneno dentre os 3 avaliados. Curiosamente, no ensaio de eliminação do DPPH, o óleo essencial com maior atividade de eliminação do radical foi o de *C. aurantifolia*, indicando que, possivelmente, essa atividade antioxidante se deva a presença acentuada do D-limoneno³¹. Os óleos essenciais da folha de *Citrus máxima*, conhecida como pomelo, e da casca de *Citrus sinensis*, a laranja moro, cujo constituinte majoritário é o D-limoneno também foram estudados com relação a seu potencial antioxidante. Ambos os óleos apresentam atividade dose-dependente de eliminação de radicais DPPH⁴². Estudos já foram desenvolvidos com o objetivo de determinar uma dose efetiva para que se possa observar esse efeito antioxidante do D-limoneno. Sabe-se que essa atividade é dose dependente, porém, baixas dosagens já são efetivas para perceber-se efeito antioxidante. De acordo com Bacanlı, Başaran e Başaran (2015) a atividade antioxidante *in vitro* do D-limoneno pode ser observada nas concentrações de 2 a 2000 μM ²⁴. Corroborando, Roberto et al. (2010) observaram que na dose 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$ já foi possível verificar ação desse monoterpene no controle da atividade oxidativa⁴³.

Ao estudarem a atividade do D-limoneno sobre alterações bioquímicas e histológicas hepáticas desencadeadas pelo consumo de dieta rica em gordura em ratos, Santiago et al. (2012) verificaram que a administração de 2% desse monoterpene na dieta dos animais promoveu redução nas concentrações de subprodutos da peroxidação lipídica na circulação, que normalmente encontra-se elevada devido ao aumento do estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio desencadeados pela resistência à insulina. Ainda, foi observado que os níveis dos antioxidantes não enzimáticos vitamina C, vitamina E e GSH, que foram

comprometidos pela dieta gordurosa, foram reestabelecidos nos animais que receberam D-limoneno, evidenciando o potencial antioxidante do D-limoneno³⁸.

Outra potencial ação do D-limoneno de grande interesse é sua atividade como agente quimioterapêutico e quimiopreventivo. Embora os mecanismos de ação ainda sejam incertos, diversas pesquisas vêm sendo realizadas com o propósito de estudar essa atividade. Após o tratamento da linhagem celular humana de câncer de cólon LS174T com diferentes doses de D-limoneno ao longo de 48 horas, observou-se que esse monoterpene induziu a apoptose celular. Verificou-se que o D-limoneno promove regulação positiva da proteína pró-apoptótica BAX, e regulação negativa do BCL 2, uma proteína anti-apoptótica. Além disso, por aumentar o nível do citocromo C no citosol, desencadeia ativação da pró-caspase 9, que mediante a presença de ATP, leva a produção de caspase 3, uma protease mediadora da apoptose celular⁴⁴.

Além das atividades já citadas acima, existem vários estudos que verificaram que o D-limoneno pode atuar sobre o metabolismo da glicose e de lipídios. Em ratos diabéticos (diabetes induzida com solução de estreptozotocina) é natural haver uma elevação na concentração de glicose plasmática e diminuição da insulina. A suplementação com 100 mg/kg de D-limoneno teve efeito semelhante ao fármaco glibenclamida, reduzindo a glicemia e aumentando a insulinemia. De acordo com os pesquisadores, esses resultados podem ser explicados pela ação do D-limoneno sobre o aumento da secreção de insulina pelas células β pancreáticas, que consequentemente melhora a utilização da glicose pelos tecidos³⁵. Em um estudo independente, a suplementação de ratos com 50 mg/kg de D-limoneno demonstrou efeitos semelhantes aos acima citados³⁷. Resultados com camundongos corroboram os dados obtidos em experimentos com ratos. Quando foi adicionado D-limoneno a 0,5% na ração de camundongos que recebiam ração hiperlipídica, houve redução de 29,1% na glicemia em comparação ao grupo que não recebeu o monoterpene, resultando em concentrações de glicose próximas ao grupo alimentado com dieta normolipídica³⁶. Redução na concentração de glicose de jejum, insulina plasmática e no HOMA-IR também foram observadas por Santiago et al. (2012) em animais que receberam 2% de D-limoneno, tratados com ração hiperlipídica³⁸.

Animais diabéticos, que naturalmente apresentam distúrbios no metabolismo de carboidratos, têm menor concentração de glicogênio hepático e aumento da gliconeogênese. Ao analisar os efeitos da suplementação com D-limoneno em ratos diabéticos, Murali et al. (2012) verificaram que o tratamento com o monoterpene induziu redução da atividade de duas enzimas que participam da gliconeogênese: glicose 6-fosfatase e frutose 1,6-bisfosfatase a valores próximos aos de animais saudáveis. Com a diminuição da atividade dessas enzimas, ocorre a

redução da produção endógena de glicose. De acordo com os pesquisadores, uma possível explicação para esses resultados encontra-se na ação do D-limoneno sobre a insulina, que desempenha papel crucial na atividade dessas enzimas. Também foi observado que a suplementação promoveu aumento do armazenamento e utilização de glicogênio hepático que, da mesma forma, é regulada pela insulina³⁵.

As alterações no metabolismo glicídico estão intimamente associadas com modificações no metabolismo de lipídios. Animais diabéticos costumam apresentar aumento nas concentrações séricas de LDL, colesterol total e triglicerídeos e redução de HDL. Porém, já foi demonstrado que o D-limoneno pode atuar sobre esses marcadores, reduzindo a concentração de colesterol LDL e aumentando as de colesterol HDL ^{36-38,45}. Ahmad e Beg (2013) reportaram que a suplementação com D-limoneno induziu redução da atividade da HMG-CoA redutase, podendo explicar a redução no colesterol plasmático promovida pelo D-limoneno em ratos. Os autores também citam que visto sua ação antioxidante, o D-limoneno inibe a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, caracterizando efeito ateroprotetor⁴⁵.

Além da sua atividade sobre os lipídios plasmáticos, também foi verificado que camundongos suplementados com D-limoneno apresentaram redução no tamanho de adipócitos brancos e marrons quando comparado ao grupo não tratado. Em animais alimentados com dieta rica em gorduras, a suplementação dietética com D-limoneno reduziu o acúmulo de lipídeos hepáticos (colesterol total, triglicerídeos e ácidos graxos livres), indicando uma possível aplicação em casos de acúmulo de gordura no fígado, que normalmente estão associados resistência à insulina³⁸. Jing et al. (2013) estudaram a ação do limoneno sobre fatores de transcrição que participam de regulações metabólicas a fim de identificar os mecanismos de ação envolvidos na atividade hipolipemiante do D-limoneno. Esses autores constataram que o D-limoneno pode atuar como agonista de PPAR α , além de demonstrar efeito inibitório leve de PPAR γ e LXR β . Essa ativação de PPAR no tecido adiposo branco de camundongos suplementados com D-limoneno culminou no aumento da expressão gênica da UCP-2 (proteína de desacoplamento mitocondrial 2), uma proteína reguladora da oxidação de ácidos graxos, por aumentar a demanda pela oxidação de substratos energéticos. Por outro lado, a suplementação reduziu a concentração de mRNA de genes que sofrem ativação por LXR, como o SREBP-1 (proteína-1 de ligação ao elemento regulador de esterol), que participa da síntese de triglicerídeos e metabolismo de colesterol. De acordo com os pesquisadores, esses achados demonstram uma possível via por meio da qual o D-limoneno está envolvido na regulação do metabolismo lipídico, especialmente na síntese de triglicerídeos³⁶. O D-limoneno também afeta

o *browning* de adipócitos 3T3-L1. Em células tratadas com diferentes concentrações do monoterpene observou-se aumento da expressão de genes marcadores de adipócitos marrons: PGC-1 α , PRDM16 e UCP1 e aumento da biogênese mitocondrial, uma das principais características do *browning*.

1.4 Atividade antimicrobiana do D-limoneno

Além das diversas ações do D-limoneno sobre o metabolismo intermediário de animais, este apresenta também atividade antimicrobiana^{46,47}. O mecanismo de ação antibacteriano mais conhecido dos monoterpenos está relacionado à sua característica lipofílica e a sua capacidade de desestruturar a membrana celular e promover alterações na função de canais iônicos⁴⁸⁻⁵⁰. Ao interagir com a superfície celular dos microorganismos, o D-limoneno permeia a bicamada lipídica da membrana, comprometendo sua integridade^{48,49,51}. Como ocorre essa alteração na permeabilidade, há extravasamento de eletrólitos e conteúdos intracelulares fundamentais, como proteínas, açúcares, ATP e DNA, induzindo a morte celular⁵²⁻⁵⁵.

A capacidade dos óleos essenciais de permearem as membranas fosfolipídicas depende significativamente de suas características físico-químicas e da composição da membrana bacteriana⁵¹. As bactérias Gram-negativas são consideradas mais resistentes a ação do D-limoneno e de outros componentes dos óleos essenciais, enquanto as Gram-positivas são mais suscetíveis a atividade antimicrobiana^{47,51}. Por possuírem uma membrana externa rígida e complexa, rica em lipopolissacarídeos, as bactérias Gram-negativas dificultam a permeabilidade de compostos hidrofóbicos para o seu interior. Já as Gram-positivas, que tem sua membrana externa menos complexa e formada predominantemente por peptidoglicano favorecem a difusão de pequenas moléculas para o seu interior^{56,57}.

Diversos estudos já foram realizados com o objetivo de explorar o potencial antimicrobiano do limoneno e do óleo essencial de diferentes tipos de laranja e frutas cítricas ricas nesse monoterpene. Chi et al. (2019) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Citrus sinensis*, *Citrus grandis* e *Citrus aurantifolia*, cujo principal constituinte é o limoneno. Todos os óleos apresentaram atividade antimicrobiana significativa contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Salmonella typhi*³¹. Azhdarzadeh e Hojjati (2016) analisaram o óleo essencial de laranja (*Citrus aurantium*) e observaram potente atividade antimicrobiana contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*, indicando que o óleo essencial de laranja pode ser utilizado como um método natural para conservação de alimentos, visto que reduz o crescimento de alguns patógenos⁴⁷. Ao avaliar o óleo essencial de uma variedade de laranja híbrida (*Citrus kharna*), Dar, Lawrence e Khan (2016) também

observaram ampla atividade antimicrobiana contra patógenos humanos como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*⁴⁶. Quando a população de microrganismos intestinais, especialmente os *Staphylococcus aureus*, entra em contato com óleos essenciais cítricos, observa-se aumento na expressão do gene *cwrA*, efeito semelhante ao gerado pelos antibióticos penicilina, imipenem, fosfomicina, oxacilina e vancomicina, que inibem a síntese da parede celular das bactérias⁵⁸⁻⁶⁰. Além disso, a exposição ao óleo cítrico aumenta a atividade da PBP4 (proteína 4 de ligação à penicilina), relacionada com a síntese de peptidoglicano e de genes associados a atividade de autólise de *Staphylococcus aureus*⁶⁰.

Recentemente, Wang et al. (2019) estudaram os efeitos do óleo essencial de laranja na microbiota intestinal de camundongos. Foi observado que a administração intragástrica do limoneno afetou positivamente a microbiota intestinal dos camundongos, aumentando a abundância relativa de *Lactobacillus*. Em comparação a outros monoterpenos estudados, como linalol e citral, a microbiota intestinal dos animais tratados com limoneno foi estruturalmente diferente, indicando atividade mais proeminente⁶¹. Quando suplementados com microcápsulas do óleo de laranja doce (*Citrus sinensis*), ratos alimentados com dieta com alto teor de gordura tiveram uma redução de 70% do ganho de peso e houve alteração na microbiota intestinal. Enquanto os grupos que não receberam a suplementação tinham 7 filos predominantes em sua microbiota, o grupo suplementado com o óleo apresentou 9 filos predominantes. Além disso, a abundância relativa mais alta dos animais não suplementados foi de *Firmicutes*, seguida de *Bacteroidetes*. No grupo tratado a abundância de *Actinobactéria* e de *Bacterioidetes* foi maior quando comparada ao grupo não tratado, e houve redução na abundância relativa de *Firmicutes*. Os animais que receberam dieta com alto teor de lipídios tiveram maior abundância relativa de *Lactobacillus*, *Ruminiclostridium* e *Lachnospirillum*. Porém, quando os animais com dieta hiperlipídica receberam a suplementação com óleo de laranja, as abundâncias relativas predominantes foram de *Allobaculum*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Além disso, a suplementação com microcápsulas de óleo de laranja induziu menor concentração no soro de endotoxinas derivadas de lipopolissacarídeos bacterianos⁶².

Visto a atividade antimicrobiana bem documentada do limoneno e sua seletividade, acreditamos que esse monoterpeno possa modular a composição da microbiota gastrintestinal, envolvida na produção de ácidos biliares secundários⁶³. Se esta alteração for confirmada, o D-limoneno teria potencial para modular indiretamente diversos processos fisiológicos do hospedeiro, como veremos a seguir.

1.5 Metabolismo de ácido biliares

Os ácidos biliares (AB) primários (cólico e quenodesoxicólico) são sintetizados pelos hepatócitos a partir do colesterol, conjugados aos aminoácidos glicina ou taurina, secretados por meio da membrana apical dos hepatócitos e armazenados na vesícula biliar, onde participam da formação da bile, que também é composta por fosfolípidios, colesterol e íons inorgânicos. A presença de alimentos no duodeno induz a secreção do hormônio colecistoquinina que promove a contração da vesícula biliar e a secreção da bile que atua no processo digestivo por meio da emulsificação de gorduras e vitaminas lipossolúveis. No intestino, esses AB interagem com a microbiota intestinal, podendo ser submetidos a desconjugação, desidrogenação e desidroxilação, formando os AB secundários, como o desoxicólico, litocólico e ursodesoxicólico. A desconjugação dos AB primários ocorre por meio de enzimas produzidas pela microbiota intestinal, chamadas de BSH (hidroxilases de AB), que mediam a biotransformação para AB secundários, alterando a composição do *pool* de AB (Figura 1 e 2).

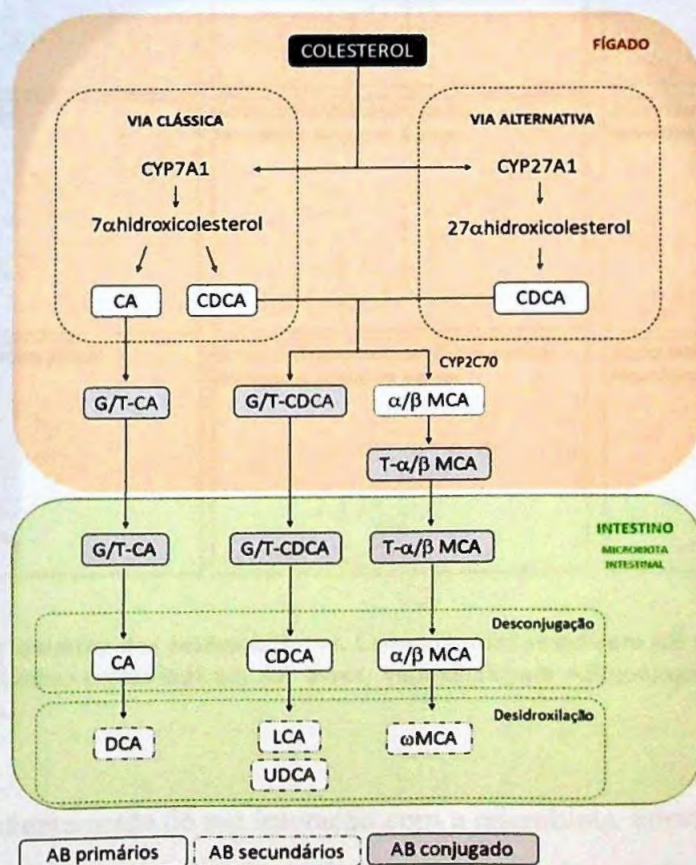


Figura 1 - Metabolismo de ácidos biliares. CA: ácidos cólico; CDCA: ácido quenodesoxicólico; MCA: ácido muricólico (murino); DCA: ácido desoxicólico; LCA: ácido litocólico; UDCA: ácido ursodesoxicólico. Os ácidos biliares (AB) primários são sintetizados no fígado a partir do colesterol, através da via clássica (reação catalisada pela CYP7A1) ou alternativa (reação catalisada pela CYP27A1). Esses AB são então conjugados aos aminoácidos glicina (G) ou taurina (T) e liberados no intestino delgado onde irão participar da emulsificação das gorduras da dieta. Esses AB são então desconjugados pela microbiota intestinal do cólon, e, em seguida, passam pelo processo de desidroxilação, resultando nos AB secundários.

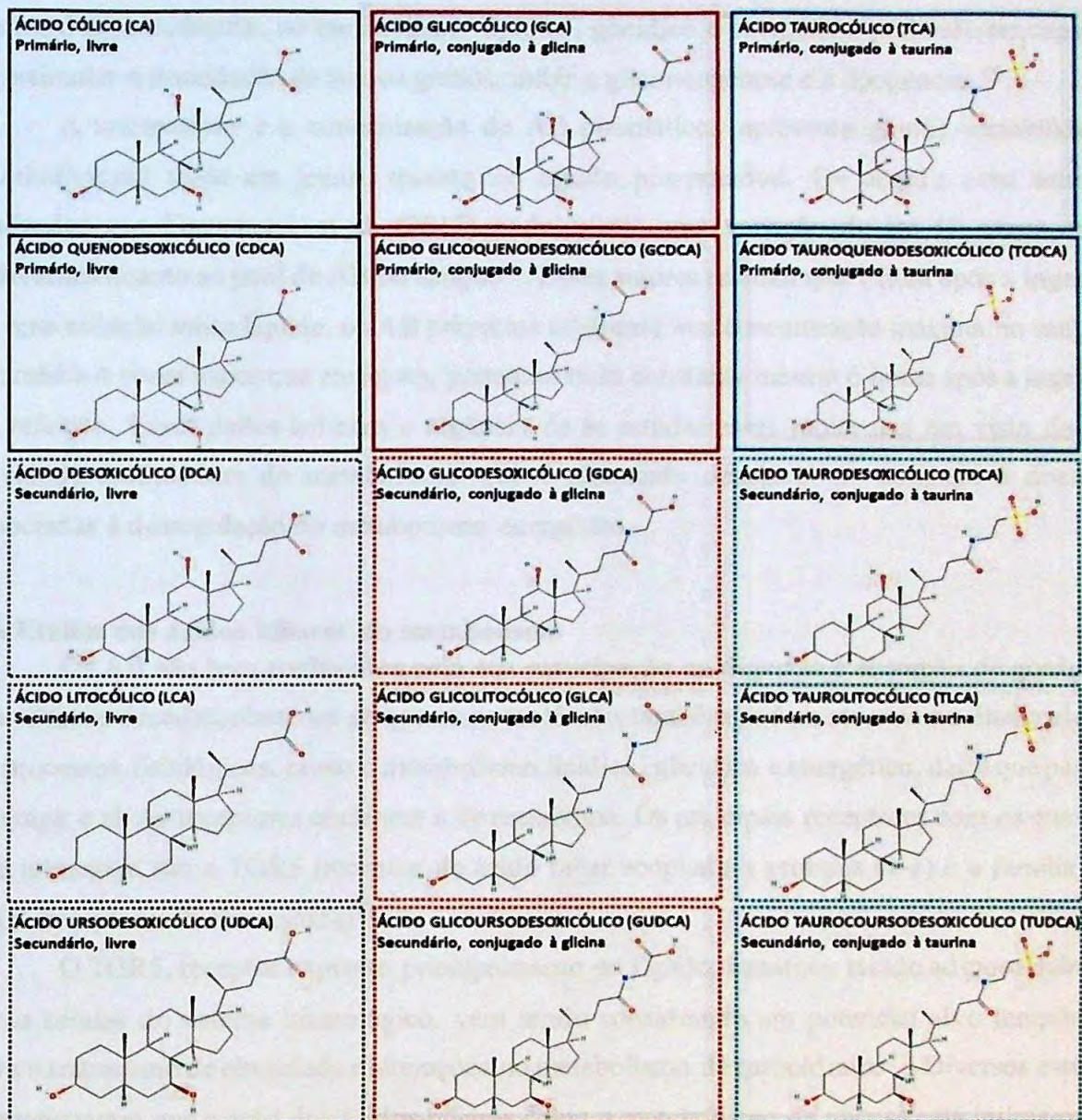


Figura 2- Estrutura química dos ácidos biliares. Linhas contínuas indicam AB primários e linhas pontilhadas os AB secundários. Linhas pretas indicam AB livres, vermelhas para AB conjugados à glicina e azuis para AB conjugados à taurina.

Independentemente de sua interação com a microbiota intestinal, os AB são captados pelo epitélio intestinal e transportados pela corrente sanguínea (veia porta) até o fígado, onde serão novamente conjugados e armazenados na vesícula biliar. Todo esse processo é denominado circulação entero-hepática dos AB⁶⁴⁻⁶⁹. Esse processo costuma ser eficiente e garante que a maior parte dos AB retornem ao fígado. Porém, uma pequena porção dos AB não é captada na sua primeira passagem pelo fígado e atinge a circulação sistêmica. Esse escape

dos AB para a circulação sistêmica tem despertado a atenção visto que diversos estudos indicam efeitos dessas moléculas no metabolismo lipídico, glicídico e energético, podendo ser capazes de estimular a β -oxidação de ácidos graxos, inibir a gliconeogênese e a lipogênese ⁶⁹.

A composição e a concentração de AB plasmáticos apresenta grande variabilidade interindividual tanto em jejum, quanto no estado pós-prandial. De acordo com estudos realizados por Fiamoncini et al. (2017) pode existir uma variação de até 12 vezes entre indivíduos quanto ao pool de AB no sangue⁷⁰. Esses autores relatam que 1 hora após a ingestão de uma refeição mista líquida, os AB primários atingem a sua concentração máxima no sangue, em média 4 vezes maior que em jejum, permanecendo constante mesmo 6 horas após a ingestão da refeição. Esses dados indicam a urgência de se estudar essas moléculas em vista da sua atividade moduladora do metabolismo que é altamente desejável no combate à doenças associadas à desregulação do metabolismo energético.

1.6 Efeitos dos ácidos biliares no metabolismo

Os AB são bem conhecidos pela sua participação na digestão e absorção de gorduras. Nas últimas décadas, observou-se que essas moléculas também podem atuar como sinalizadores de processos fisiológicos, como o metabolismo lipídico, glicídico e energético, dado que podem interagir e ativar receptores nucleares e de membrana. Os principais receptores com os quais os AB interagem são o TGR5 (receptor de ácido biliar acoplado à proteína G-1) e a família dos FXR (receptores X Farnesóide)⁷¹.

O TGR5, receptor expresso principalmente no fígado, intestino, tecido adiposo marrom e nas células do sistema imunológico, vem sendo considerado um potencial alvo terapêutico para o tratamento de obesidade e alterações no metabolismo de carboidratos⁷¹. Diversos estudos demonstraram que a ação dos ácidos biliares sobre o metabolismo da glicose está intimamente relacionada ao TGR5. Uma vez que ele sinaliza a síntese a secreção de GLP1 (glucagon-like peptide 1), que por sua vez estimula a secreção de insulina⁷¹⁻⁷³. Ademais, visto a ação desse receptor sobre o GLP1, ocorre supressão da glicogenólise hepática, contribuindo também com o controle glicêmico⁷⁴. Além da melhora da secreção do GLP1, outra incretina modulada pela ativação do receptor TGR5 é o Peptídeo YY, um hormônio regulador do apetite⁷⁵. Ressalta-se que alterações nas concentrações de GLP1 e Peptídeo YY estão envolvidas na patogênese de doenças como diabetes e obesidade ^{71,76}. Portanto, melhorar a atividade de receptores que ativam a secreção desses hormônios, por meio dos AB, pode ser uma possível estratégia na prevenção e controle dessas condições clínicas. Já foi demonstrado que quando camundongos alimentados com ração hiperlipídica foram tratados com ácido cólico a 0,5% houve prevenção

e reversão do quadro de obesidade induzido pela dieta hiperlipídica e melhora na tolerância a glicose. Quando tratados com o ácido biliar os animais tiveram maior produção de CO₂ e consumo de O₂, demonstrando maior gasto energético e aumento da atividade mitocondrial. Esses efeitos foram comprovadamente derivados da ativação do TGR5 e da consequente ativação da desidase 2, que converte o hormônio tireoidiano em sua forma ativa. Se esses resultados forem confirmados em humanos, a modulação dos ácidos biliares poderia ser uma aliada no tratamento de dislipidemia e obesidade⁷⁷.

Outra via por meio da qual os AB podem exercer efeitos no metabolismo intermediário é a ativação do receptor FXR, expresso principalmente no fígado, intestino, rins e glândulas supra-renais^{71,78}. A principal função do FXR consiste na regulação da homeostase dos ácidos biliares, por meio da redução da expressão de genes codificadores de enzimas responsáveis pela sua biossíntese. Entretanto, sabe-se que o FXR α também participa do controle das concentrações de triglicerídeos plasmáticos e do metabolismo da glicose⁷¹. A modulação das concentrações de triglicerídeos pelos AB já é conhecida há vários anos. Porém, em 2004, Watanabe et al. sugeriram que essa relação se deve ao papel do FXR α , que quando ativado inibe a expressão de SREBP-1C, proteína envolvida na biossíntese de triglicerídeos e ácidos graxos. Os pesquisadores verificaram que animais sem atividade do receptor FXR α demonstraram elevação de triglicerídeos plasmáticos e hepáticos e na VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa)⁷⁹. Esses animais também demonstram maior concentração de ácidos graxos livres na circulação quando comparados aos camundongos selvagens alimentados com dieta hiperlipídica, provavelmente devido a maior atividade da lipase lipoproteica^{80,81}. Visto isso, pode-se concluir que a ativação do FXR pelos AB poderia contribuir com a melhora do perfil lipídico, sendo um possível alvo para o tratamento de dislipidemias⁸².

Outra relação importante do FXR é com o metabolismo da glicose. Trata-se de uma relação bidirecional, na qual, as variações glicêmicas podem impactar na expressão do receptor e, por outro lado, a atividade do FXR α pode controlar o metabolismo de carboidratos^{71,83}. A ativação do FXR α pelos AB também já foi relacionada à melhora da função das células β -pancreáticas de camundongos. Os AB promoveram normalização da hiperglicemia e da sensibilidade a insulina, aumento da atividade da insulina no fígado, no músculo e no tecido adiposo^{83,84}. Outra ação desse receptor sobre o metabolismo glicídico refere-se a sua atividade supressora da gliconeogênese hepática, por meio da regulação da expressão de genes codificadores de enzimas chave para esse processo, como por exemplo a PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase)⁸⁵. Em contrapartida, ratos que tiveram diabetes induzida,

apresentaram menor expressão hepática desse receptor. Assim, a alteração da expressão de FXR α em resposta à homeostase alterada de carboidratos poderia contribuir para o desenvolvimento de hipertrigliceridemia e a desregulação do metabolismo dos ácidos biliares em pacientes com diabetes ou resistência à insulina⁸⁶.

Se esses efeitos demonstrados em animais também forem observados em humanos, a utilização de agonistas desses receptores, como por exemplo os AB, poderia ser considerada para o tratamento de diversas condições metabólicas. A modulação da composição dos AB poderia ser um alvo terapêutico de grande interesse no tratamento de doenças relacionadas ao metabolismo de glicose e lipídios como diabetes e dislipidemias⁸⁷. Uma das possíveis formas de promover essa modulação dos AB seria por meio de sua interação com a microbiota intestinal. Essa relação entre os microrganismos habitantes do trato gastrointestinal, a composição dos ácidos biliares circulantes e o metabolismo do hospedeiro está apenas começando a ser compreendida. Recentemente demonstrou-se que o tratamento com antibiótico promoveu remodelação no perfil de AB, levando a melhora da intolerância a glicose e da esteatose hepática. A alteração da metabolização microbiana dos AB foi fundamental para a regressão da esteatose hepática e intolerância a glicose, apontando um importante alvo de estudo para o tratamento de alterações metabólicas⁸⁸.

Apesar de não termos avaliado a composição da microbiota intestinal nesse estudo, acreditamos que este seja um dos mecanismos de ação por meio do qual o D-limoneno poderia promover alterações no metabolismo. A modulação da composição da microbiota intestinal, que é responsável pela síntese de AB secundários, pode potencialmente alterar a composição dos AB circulantes. Esses últimos afetariam o metabolismo lipídico e de carboidratos, como já foi demonstrado em diversos estudos *in vitro* e em modelos animais, contribuindo de forma significativa com a melhora de marcadores relacionados a dislipidemias e alterações glicídicas.

2. JUSTIFICATIVA

As doenças crônicas não transmissíveis associadas a alterações no metabolismo energético, como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo. Por esse motivo, a regulação do metabolismo é tópico de intensa investigação.

Sabe-se que o consumo de compostos fitoquímicos presentes nos alimentos vegetais está relacionado com a prevenção dessas doenças crônicas não transmissíveis. No Brasil, uma das frutas mais consumidas é a laranja, sendo que anualmente o país produz em média 18 mil toneladas dessa fruta e cerca de 74% da sua produção ocorre no estado de São Paulo⁸⁹. Um dos

subprodutos da produção do suco de laranja é o óleo essencial dessa fruta, composto aproximadamente por 80-90% de D-limoneno.

O D-limoneno apresenta efeito antimicrobiano bem estabelecido, e acreditamos que a suplementação de camundongos C57/B16 com D-limoneno promova modificação na composição da microbiota intestinal desses animais. Devido ao papel dessa população microbiana no metabolismo dos ácidos biliares, a sua modulação pode promover alteração no pool de ácidos biliares que apresentam efeitos pleiotrópicos, levando a alteração do metabolismo de glicose e lipídios.

3. HIPÓTESE

O presente estudo baseia-se no pressuposto de que a atividade antimicrobiana do D-limoneno pode induzir alterações na composição da microbiota intestinal. Devido ao papel dessa população microbiana no metabolismo de ácidos biliares, a modulação da sua composição acarretaria alterações na composição do pool de ácidos biliares. Sendo a composição de ácidos biliares alterada pelo tratamento com D-limoneno, seus efeitos pleiotrópicos seriam afetados de forma correspondente, levando à modulação do metabolismo de glicose e da oxidação de ácidos graxos (Figura 1).

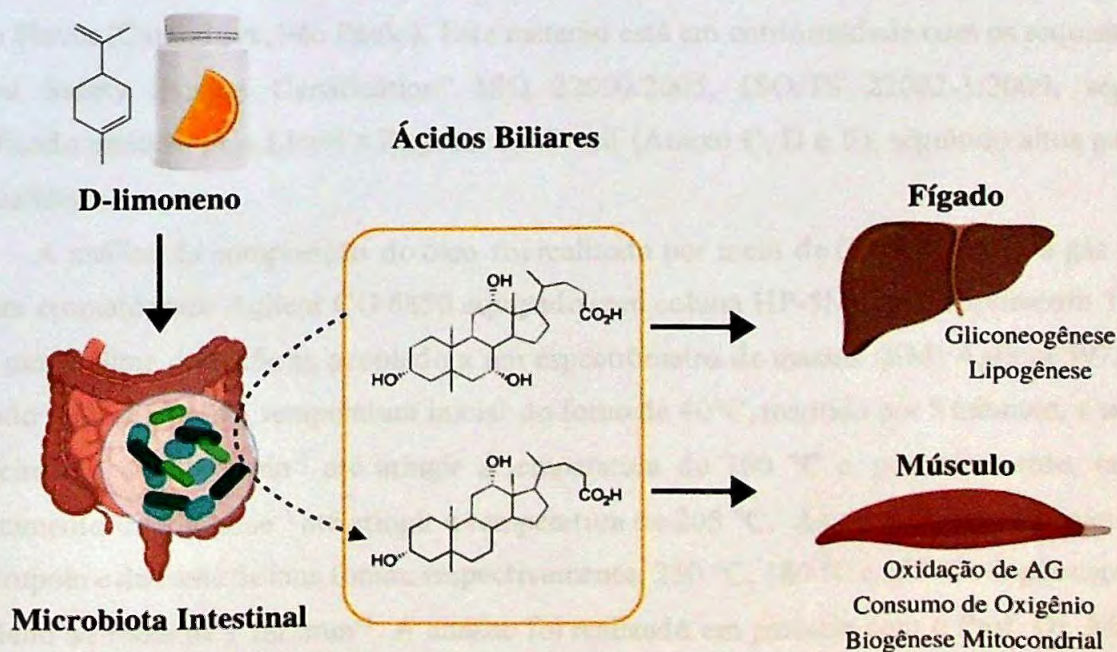


Figura 3 - Representação da hipótese do estudo: A suplementação com D-limoneno alteraria a composição da microbiota intestinal, alterando o metabolismo de ácidos biliares e diferentes processos metabólicos regulados pelos ácidos biliares.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do D-limoneno no metabolismo de ácidos biliares em camundongos machos C57/Bl6, bem como seus efeitos sobre o metabolismo intermediário.

4.1 Objetivos Específicos

- Analisar os efeitos da suplementação com D-limoneno no metabolismo energético dos camundongos;
- Investigar alterações na homeostase glicêmica dos camundongos mediante a suplementação com D-limoneno.
- Avaliar as concentrações de marcadores de bioquímica clínica (triglicerídeos, colesterol total e frações, enzimas hepáticas, ácidos graxos não esterificados) após a suplementação com D-limoneno;
- Estudar o impacto da suplementação com D-limoneno no metabolismo de ácidos biliares.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Suplemento de D-limoneno

O suplemento de D-limoneno utilizado no estudo pesquisa foi produzido pela empresa Citro Flavor (Catanduva, São Paulo). Este material está em conformidade com os requisitos da “Food Safety System Certification” ISO 22000:2005, ISO/TS 22002-1:2009, segundo certificado emitido pela Lloyd’s Register do Brasil (Anexo C, D e E), seguindo altos padrões de qualidade e pureza.

A análise da composição do óleo foi realizada por meio de Cromatografia a gás (CG), em um cromatógrafo Agilent CG 6850 equipado com coluna HP-5MS de comprimento 30 m x 0,25 mm e filme de 0,25 μ m, acoplado a um espectrômetro de massas (EM) Agilent 5975C. O método utilizado possui temperatura inicial do forno de 40°C, mantida por 5 minutos, e taxa de aquecimento de 6 °C.min⁻¹ até atingir a temperatura de 100 °C e, posteriormente, taxa de aquecimento de 3 °C.min⁻¹ até atingir a temperatura de 205 °C. As temperaturas do injetor, do quadrupolo e da fonte de íons foram, respectivamente, 250 °C, 180 °C e 250 °C. O gás carreador foi Hélio ao fluxo de 1 mL.min⁻¹. A análise foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Marcelo Pena Ferreira (IB USP).

5.2 Aspectos Éticos

O estudo foi desenvolvido no biotério de produção e experimentação da FCF/IQ-USP mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF-USP, protocolo nº576 (Anexo F).

5.3 Delineamento Experimental

Camundongos machos (C57/B16) com 11 semanas de idade foram distribuídos em quatro grupos experimentais. Um grupo foi tratado com ração normolipídica (NL), com 10% do valor energético total (VET) proveniente de lipídios e 3,6 Kcal/g e três com ração hiperlipídica (HL) com 60% do VET proveniente de lipídios e 5,1 Kcal/g.

Tabela 1 - Composição de macronutrientes das rações normolipídica e hiperlipídica

Ração	Nutriente	Quantidade
Normolipídica	Proteína	14,79% Kcal
	Carboidrato	75,76% Kcal
	Lipídeo	9,45% Kcal
Hiperlipídica	Proteína	18,4% Kcal
	Carboidrato	21,3% Kcal
	Lipídeo	60,3% Kcal

Após uma semana de adaptação, dois grupos alimentados com a dieta HL e receberam suplementação de D-limoneno nas concentrações de 0,1 e 0,8% na dieta (Figura 3). A dose de D-limoneno utilizada foi definida com base em estudos anteriores.

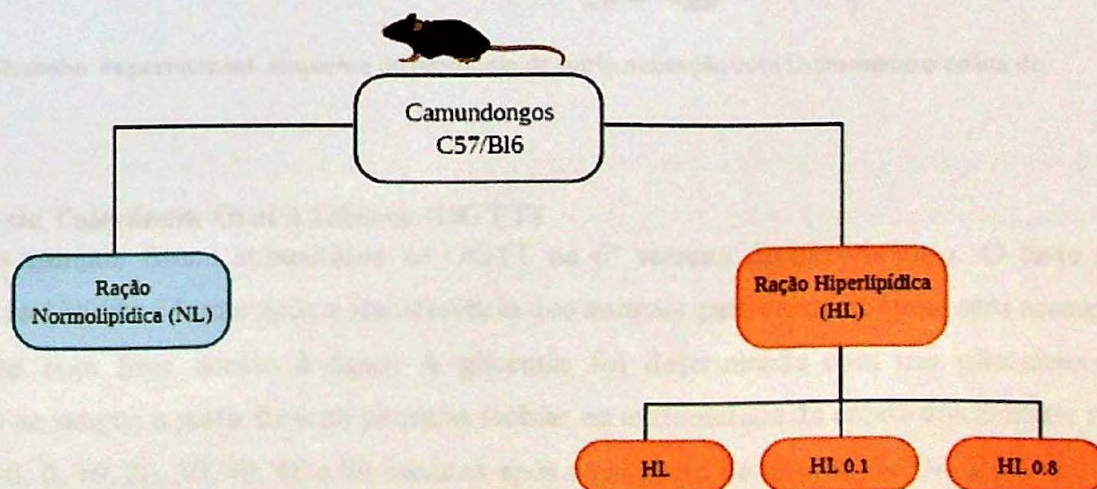


Figura 4 - Distribuição dos camundongos nos grupos experimentais

Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas separadas para permitir determinação acurada da ingestão alimentar (quantificada diariamente) e coleta de fezes de 24 horas, realizada semanalmente. O consumo alimentar e o ganho de peso dos animais foram monitorados ao longo das oito semanas de duração do experimento, permitindo o cálculo da eficiência energética pela fórmula:

$$\text{Eficiência Energética (g/KJ)} = \text{ganho de peso (g)} / \text{ingestão energética (KJoules)}$$

Ao final da 8ª semana, os animais foram submetidos ao teste de tolerância oral à glicose (OGTT) seguido de eutanásia por essanguinação sob anestesia com isoflurano a 1,5% (após indução da anestesia a 4%) para amostragem de sangue e urina e tecidos (fígado, intestino e diferentes depósitos de tecido adiposo).

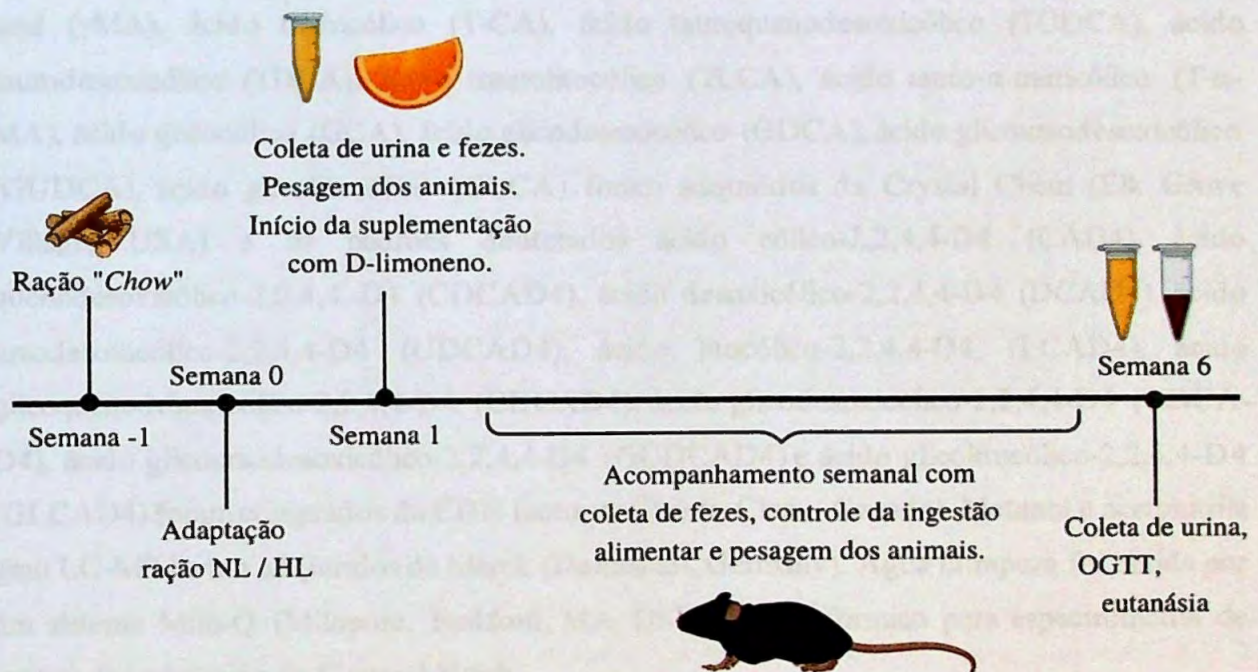


Figura 5- Desenho experimental. Esquema do protocolo de suplementação com D-limoneno e coleta de amostras.

5.4 Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT)

Os animais foram submetidos ao OGTT na 6ª semana do experimento. O teste foi realizado às 13:00h; 6 horas após a transferência dos animais para caixas limpas, sem acesso à ração, mas com livre acesso à água. A glicemia foi determinada com um glicosímetro, coletando-se sangue a partir de uma pequena incisão na extremidade da cauda dos animais nos tempos -10, 0, 10, 20, 30, 40, 60 e 90 minutos após a gavagem da solução de D-glicose a 20% (2g/Kg de peso corpóreo).

5.5 Análises

5.5.1 Marcadores do metabolismo intermediário

As amostras de plasma foram utilizadas para determinação de marcadores do metabolismo intermediário (glicose, insulina, triglicerídeos, colesterol total e frações e ácidos graxos não esterificados (NEFA)) utilizando kits enzimáticos.

5.5.2 Composição de ácidos biliares

5.5.2.1 Reagentes

Os padrões de ácidos biliares que incluem ácido cólico (CA), ácido quenodesoxicólico (CDCA), ácido desoxicólico (DCA), ácido ursodesoxicólico (UDCA), ácido litocólico (LCA), ácido α -muricólico (α -MA), ácido β -muricólico (β MA), ácido hiocólico/ácido γ -muricólico acid (γ MA), ácido taurocólico (T-CA), ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido traurolitocólico (TLCA), ácido tauro- α -muricólico (T- α -MA), ácido glicocólico (GCA), ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido glicoursodesoxicólico (GUDCA), ácido glicolitocólico (GLCA) foram adquiridos da Crystal Chem (Elk Grove Village, USA) e os padrões deuterados ácido cólico-2,2,4,4-D4 (CAD4), ácido quenodesoxicólico-2,2,4,4,-D4 (CDCAD4), ácido desoxicólico-2,2,4,4-D4 (DCAD4), ácido ursodesoxicólico-2,2,4,4-D4 (UDCAD4), ácido litocólico-2,2,4,4-D4 (LCAD4), ácido glicoquenodesoxicólico-2,2,4,4-D4 (CDCAD4), ácido glicodesoxicólico-2,2,4,4-D4 (GDCA-D4), ácido glicoursodesoxicólico-2,2,4,4-D4 (GUDCAD4) e ácido glicolitocólico-2,2,4,4-D4 (GLCAD4) foram comprados da CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada). Metanol e acetonitrila grau LC-MS foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany). Água ultrapura foi obtida por um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Ácido fórmico para espectrometria de massas foi adquirido da Sigma-Aldrich.

5.5.2.2 Preparo do padrão interno e curva de calibração

Soluções estoque dos padrões de AB deuterados foram produzidas em metanol a uma concentração de 10 mM. A partir dessas soluções, foi preparado um pool de padrão interno a 100 μ M (solução mãe) que foi diluída a uma concentração de 2 μ M ou 20 μ M no momento das extrações de acordo com o procedimento para cada tipo de matriz e volume de amostras a serem analisadas. Para realizar a quantificação do conteúdo de AB em amostras de plasma, fígado e fezes, foram também preparados soluções estoques dos padrões de AB em metanol a 10 mM. A partir dessas soluções, foi preparado um pool de padrões a uma concentração de 100 μ M (solução mãe). Foram construídas curvas de calibração em solvente, solubilizadas em

metanol:água (1:1, v/v), no intervalo de concentração de 0.05 a 2 μM contendo pelo menos 7 concentrações distintas. Foram construídas curvas de calibração nas matrizes plasma, com intervalo de concentração de 0.05 a 2 μM , e nas matrizes fígado e fezes, com intervalo de concentração de 0.05 a 5 μM , todas contendo ao menos 7 concentrações distintas. Todas as diferentes concentrações foram fortificadas com o pool de padrão interno para que a concentração final fosse de 0.2 μM equivalente a concentração fortificada nas amostras. A quantificação foi realizada utilizando a técnica do padrão interno com o analito e seu respectivo padrão interno deuterados ou sua forma não conjugada com taurina ou glicina quando não disponível. As curvas de calibração na matriz foram utilizadas para descontar o possível efeito de supressão da matriz nos analitos quando analisados por espectrometria de massas.

5.5.2.3 Extração das amostras

As extrações de AB foram realizadas segundo Fromme et al. (2019) com modificações para cada tipo de amostra. Amostras de plasma (20 μL) foram fortificadas com 10 μL de IS (2 μM) e extraídas com 400 μL de metanol gelado, agitadas por 1 min e centrifugadas a 13.000 rpm, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e realizada a extração novamente nas mesmas condições. Ambos os sobrenadantes foram combinados e evaporados em concentrador a vácuo. As amostras foram reconstituídas em 100 μL metanol:água (1:1, v/v) e transferidas para vial para HPLC.

As amostras de fígado congeladas em nitrogênio líquido foram pulverizadas em moinho de esfera (Tissuelyser, Qiagen). Foram pesados 10 mg de amostra e fortificadas com 20 μL de IS (2 μM) e extraídas com 400 μL de metanol gelado. As amostras foram agitadas a 600 rpm, por 10 min a 4 °C e centrifugadas nas mesmas condições já mencionadas. Foi recolhido o sobrenadante e realizado novamente a extração das amostras. Ambos os sobrenadantes foram combinados e evaporados. As amostras foram reconstituídas em 200 μL metanol:água (1:1, v/v), filtradas com filtros de PTFE de 0.22 μm e transferidas para vials de HPLC com insert de 250 μL .

As amostras de fezes derivadas da amostragem de 24 horas foram liofilizadas e pulverizadas utilizando moinho de esfera. Foram pesados 20 mg de amostra e fortificadas com 20 μL de IS (20 μM). A extração foi realizada com 500 μL de metanol, seguida de agitação a 600 rpm, por 10 minutos a 4 °C e centrifugação nas condições mencionadas acima. Foi recolhido o sobrenadante e realizado novamente a extração com 500 μL de água ultrapura nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram combinados e filtrados utilizando filtro de PTFE de 0.22 μm e transferidos para vials de HPLC de 2 mL.

5.5.2.4 Análise dos ácidos biliares por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução

A separação dos AB foi realizada em cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (UHPLC) modelo UFLC XR (Shimadzu, Japão), equipado com bomba binária e injetor automático com termostato. Para a separação cromatográfica foi empregada uma coluna Kinetex C18 EVO, 2.1 x 100 mm, 1.7 μm (Phenomenex, Califórnia, EUA) mantida a uma temperatura de 40 °C. A fase móvel utilizada foi composta de água ultrapura com 0.1% de ácido fórmico (fase A) e acetonitrilo com 0.1% de ácido fórmico (fase B) usando o seguinte gradiente: 0 min, 5% de fase B e mantido por 1 minuto, aumentando linearmente até 100% de fase B aos 12 min, permanecendo a 100% de fase B até o minuto 13, retomando as condições iniciais de 5% de fase B aos 15 min. Utilizou-se um fluxo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ e foram injetados 10 μL dos extratos.

Os AB foram analisados em espectrômetro de massas de alta resolução, modelo Compact (Bruker, Massachusetts, EUA) acoplado a ionização por eletrospray (ESI) e analisador de tempo de voo (Q-ToF). As amostras foram analisadas em modo de ionização negativo no modo de perfil de alta resolução, com aquisição de dados de massa na faixa de 50 a 1000 m/z. Os parâmetros de análise foram: voltagem do capilar, - 4.5 kV; temperatura do gás secante, 200 °C, fluxo do gás secante, 10 L/min; pressão do gás de nebulização, 28.0 psi; voltagem de placa, 500 V. A identificação das moléculas foi confirmada utilizando o software Data Analysis e a quantificação utilizando o software QuantAnalysis da Bruker.

Para assegurar a qualidade dos dados, injetou-se o formiato de sódio como íon de referência para calibração interna do equipamento em todas as análises. Também foi realizada a aleatorização das amostras para evitar efeito de ordem de injeção e preparado um controle de qualidade, contendo uma mistura equitativa de todas as amostras, que foi injetado em diferentes tempos da análise para verificar deriva do tempo de retenção nos cromatogramas obtidos no LC-ESI-qToF-MS/MS.

5.5.3 Determinação de metabólitos do D-limoneno

As amostras de urina (30 μL) foram diluídas em 70 μL água ultrapura, agitadas por 30 segundos e centrifugadas a 14.000 rpm, por 15 min a 4 °C. O sobrenadante será separado e filtrado com filtros de PTFE de 0.22 μm em vials de 2 mL com insert de 100 μL para análise. As amostras foram armazenadas a -80 °C até o dia da análise.

A separação dos metabólitos foi realizada em cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (CLAE) modelo UFLC XR (Shimadzu, Japão), equipado com bomba binária e injetor automático com

termostato. Para a separação cromatográfica foi realizada em coluna Kinetex C18 EVO, 2.1 x 100 mm, 1.7 μm (Phenomenex, Califórnia, EUA) mantida a uma temperatura de 40 °C. Os possíveis metabólitos foram eluídos utilizando água ultrapura com 0.1% de ácido fórmico (fase A) e acetonitrilo com 0.1% de ácido fórmico (fase B) usando o seguinte gradiente: 0 min, 5% de fase B, aumentando linearmente até 100% de fase B aos 12 min, permanecendo a 100% de fase B até o minuto 13, retomando as condições iniciais de 5% de fase B aos 15 min. Foi empregado um fluxo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ e foram injetados 10 μL dos extratos.

Os metabólitos foram analisados em espectrômetro de massas de alta resolução, modelo Compact (Bruker, Massachusetts, EUA) acoplado a ionização por eletrospray (ESI) e analisador de tempo de voo (Q-ToF). As amostras foram analisadas em modo de ionização positivo e negativo no modo de perfil de alta resolução, com aquisição de dados de massa na faixa de 50 a 1000 m/z . Os parâmetros de análise foram: voltagem do capilar, +/- 4.5 kV; temperatura do gás secante, 200 °C, fluxo do gás secante, 10 L/min; pressão do gás de nebulização, 28.0 psi; voltagem de placa, 500 V. As amostras também foram analisadas no modo de dados dependente, no qual serão selecionados os íons de maior intensidade para a realização da análise do íon produto para a identificação. Para assegurar a qualidade dos dados, foi utilizado o formato de sódio como íon de referência para calibrar o equipamento, assegurando um erro menor que 10 ppm.

O treinamento para a identificação de metabólitos do D-limoneno nas amostras de urina foi realizado para o software Data Analyst (Bruker). Estes metabólitos identificados serão utilizados como biomarcadores do consumo do D-limoneno, possibilitando estabelecer relação com possíveis efeitos na modulação do metabolismo energético.

5.6 Análise dos Dados

Para análise dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism versão 9. Para testar a diferença entre os grupos, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) de 1 via seguida do Teste de Tukey. Para a análise de perfil de AB, optou-se por uma análise de variância de 2 vias sem correção por múltiplas comparações, empregando apenas o teste LSD de Fisher. Apenas diferenças com $p < 0.05$ foram consideradas significativas. Considerando que a concentração dos AB não segue uma distribuição gaussiana, uma análise de correlação de Spearman foi realizada entre a concentração de AB no fígado e fezes e as demais variáveis de interesse no metabolismo intermediário. Para as associações mais relevantes, realizou-se também uma análise de regressão linear. Os dados derivados da análise dos metabólitos de D-limoneno nos grupos HL0.1 e HL0.8 foram convertidos a z-scores e apresentados em um mapa de calor, além de serem também apresentados após normalização nos dois grupos em função da presença no grupo HL0.1.

5. RESULTADOS

5.1 Análise do perfil de monoterpenos do suplemento de D-limoneno utilizado no estudo

A análise do suplemento utilizado no protocolo com os modelos animais pela cromatografia gasosa revelou que a concentração de limoneno no suplemento é de 96% (Tabela 2), estando de acordo com as especificações do fornecedor. Os componentes minoritários são compostos característicos do óleo essencial de laranja e correspondem a menos de 4% do suplemento utilizado.

Tabela 2 - Composição do suplemento de D-limoneno utilizado

Tempo de Retenção	Identificação do componente	Percentual Relativo (%)
9.115	α -pineno	0,56
10.429	β -felandreno	0,75
11.071	β -pineno	1,52
11.420	octanal	0,23
11.564	Δ^3 -careno	0,14
12.031	m-cimeno	0,01
12.260	limoneno	96,45
13.034	γ -terpineno	0,07
14.206	linalol	0,27

5.2 Quantificação de D-limoneno na ração

Levando em consideração que o D-limoneno é um composto volátil e sua concentração nas rações poderia ser influenciada pela exposição ambiental, foi realizada a quantificação do conteúdo desse monoterpeno nas diferentes formulações de ração utilizadas no estudo. Para isso utilizou-se cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID) e a concentração do analito quantificada por meio de curvas de calibração com D-limoneno e mirceno como padrão interno.

Tabela 3 – Concentração de D-limoneno nas diferentes formulações de ração (g/100g).

Formulação	D-limoneno adicionado (%)	Quantificação
NL	-	n.d
HL	-	n.d
HL0.1%	0,1	0,08 \pm 0,007

HL0.8%

0,8

0,81 ± 0,01

Observamos que a concentração teórica e real de D-limoneno nas diferentes formulações de ração é similar, o que indica que os animais realmente receberam a suplementação com o monoterpene nas doses programadas. A partir da quantificação de D-limoneno nas rações foi então calculada a quantidade ingerida diariamente desse monoterpene pelos animais durante todo o experimento (Tabela 4).

Tabela 4 - Ingestão diária de D-Limoneno. Valor médio durante todo o experimento. N = 9. Valores expressos em Média e Desvio Padrão.

Grupo	Ingestão de D-limoneno (mg)
NL	n.d
HL	n.d
HL0.1%	1,99 ± 0,10
HL0.8%	21,07 ± 1,50

5.3 Peso corporal e metabolismo energético

Conforme esperado, os camundongos alimentados com ração hiperlipídica (HL) exibiram maior ganho de peso quando comparados ao grupo alimentado com ração normolipídica (NL) (Figura 6A). Entretanto, os camundongos do grupo HL0.1 apresentaram ganho de peso 35% menor e massa corporal final 11% menor que os demais animais que receberam ração hiperlipídica ($p < 0,05$) (Figura 6B e 6C). Os animais que ingeriram ração hiperlipídica consumiram 16,4% a mais de energia quando comparados ao grupo NL, conforme esperado ($p < 0,0001$). O D-limoneno não induziu alterações na ingestão energética, indicando boa aceitação da suplementação (Figura 6D). Quando comparados aos animais tratados com dieta com conteúdo normal de lipídios, os camundongos do grupo HL demonstraram eficiência energética aproximadamente 5 vezes maior (Figura 6E). O grupo HL0.1 exibiu eficiência energética 39,29% menor que o grupo HL não suplementado ($p = 0,0005$).

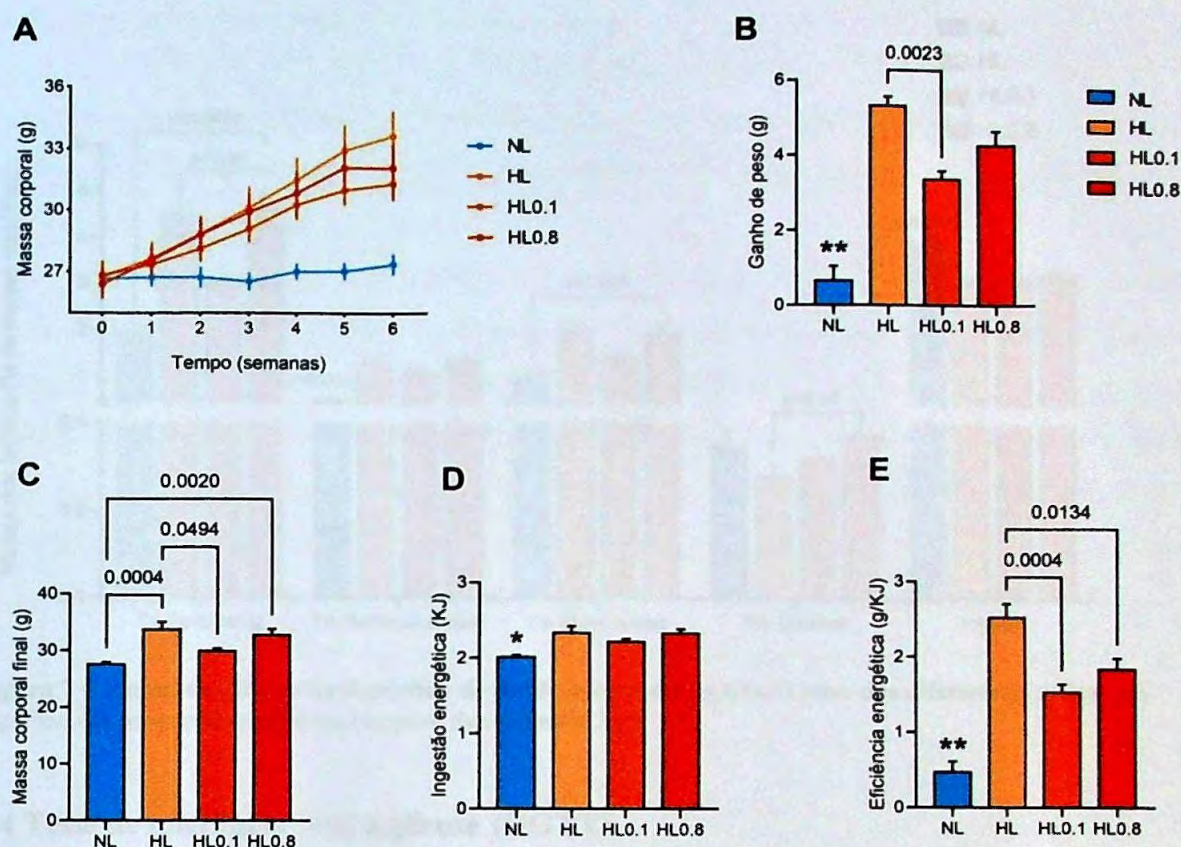


Figura 6 – Metabolismo energético. A: Evolução da massa corporal; B: Ganho de peso durante o período de suplementação; C: Massa corporal final; D: Ingestão energética acumulada; E: Eficiência energética durante o período de suplementação. N=9. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Os animais tratados com ração HL apresentaram maior acúmulo de tecido adiposo (TA) que os camundongos dos grupos NL (Figura 7). Os animais do grupo HL suplementados com 0,1% de D-limoneno exibiram acúmulo de tecido adiposo epididimal 32 % menor que os demais camundongos tratados com ração hiperlipídica ($p=0,03$). Os grupos HL apresentaram maior acúmulo de tecido adiposo subcutâneo ($p < 0,0001$) e de tecido adiposo retroperitoneal ($p < 0,0001$) em comparação ao grupo NL. Entretanto, não foi observada alteração no peso desses depósitos de tecido adiposo promovida pela suplementação com D-limoneno. Não houve diferença significativa no conteúdo de tecido adiposo marrom entre os grupos experimentais.

Não foi verificada diferença no peso do fígado entre os grupos. Entretanto, como o resultado é expresso em percentual do peso corpóreo, os animais do grupo NL demonstram maior percentual devido ao menor peso corporal ($p < 0,0001$).

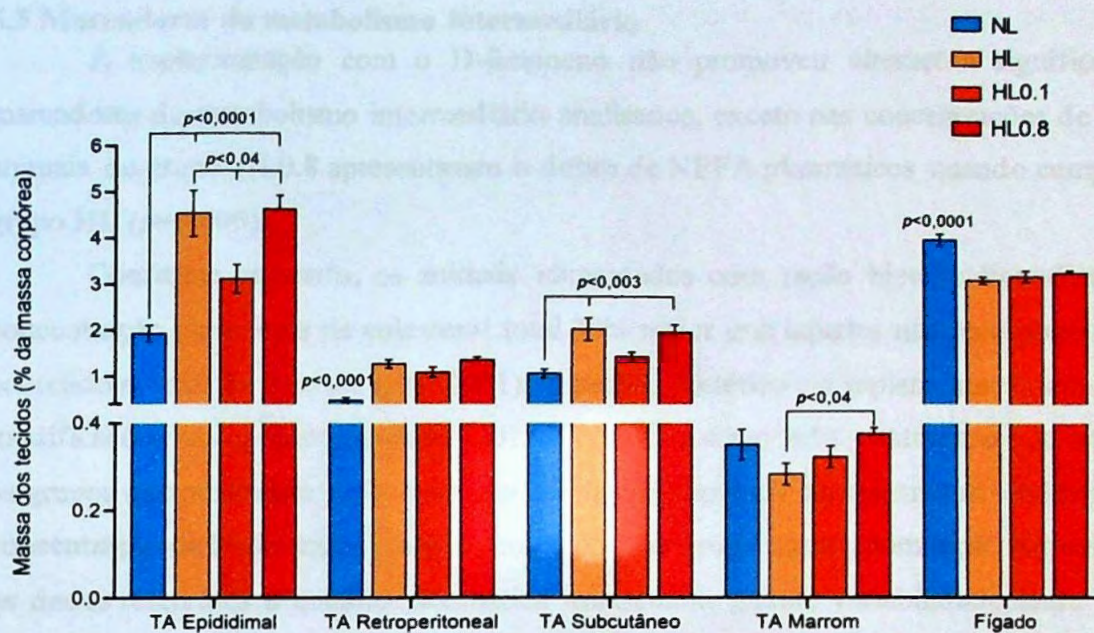


Figura 7 – Massa de diferentes depósitos de tecido adiposo e fígado. O peso dos diferentes tecidos está expresso em proporção percentual ao peso dos animais. N=9.

5.4 Teste de tolerância oral a glicose (OGTT)

Os animais alimentados com ração hiperlipídica apresentaram maior concentração basal de glicose no plasma e maior área sob a curva da glicemia durante o OGTT quando comparados aos do grupo NL ($p < 0,001$) (Figura 8). Não foram observadas alterações significativas nas respostas ao OGTT mediante a suplementação com D-limoneno.

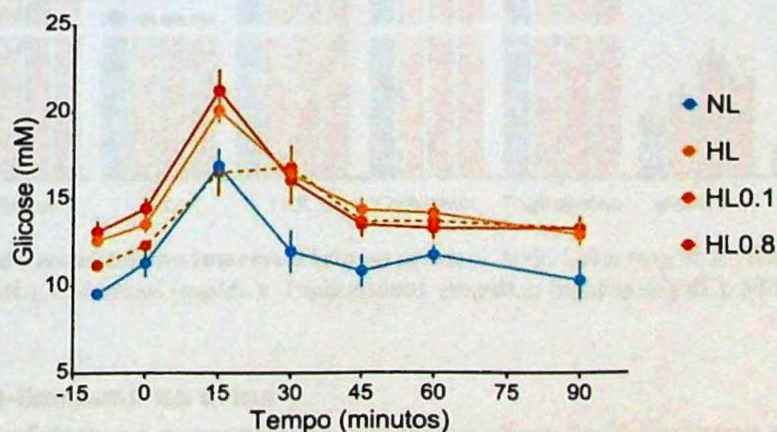


Figura 8 - Glicemia durante o OGTT. N=9.

5.5 Marcadores do metabolismo intermediário

A suplementação com o D-limoneno não promoveu alterações significativas nos marcadores do metabolismo intermediário analisados, exceto nas concentrações de NEFA. Os animais do grupo HL0.8 apresentaram o dobro de NEFA plasmáticos quando comparados ao grupo HL ($p=0,005$).

Conforme esperado, os animais alimentados com ração hiperlipídica demonstraram concentração plasmática de colesterol total 30% maior que aqueles que receberam ração com conteúdo normal de gordura ($p<0.0001$). O padrão dietético e a suplementação não induziram modificações nas concentrações de LDL e HDL. Por outro lado, contrariando as expectativas, os grupos que receberam ração com elevado teor de lipídeos demonstraram tendência a menor concentração de triglicérides quando comparados ao grupo tratado com ração normolipídica. Já os dados referentes à insulina plasmática apresentam grande variabilidade entre os grupos, sendo que aqueles tratados com ração hiperlipídica demonstram maiores concentrações desse hormônio.

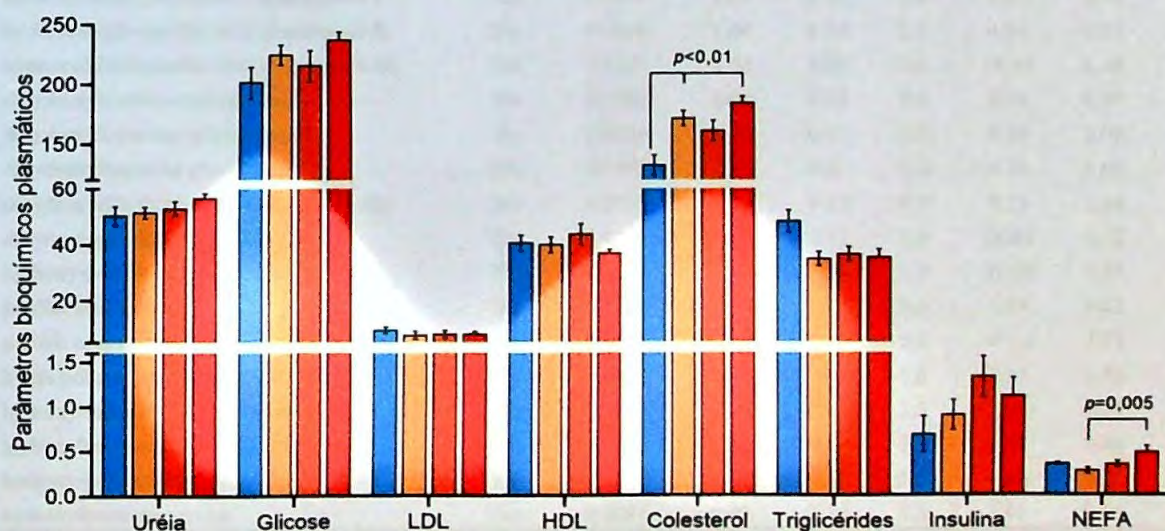


Figura 9 – Marcadores do metabolismo intermediário no plasma. N=9. Uréia (mg/dL); Glicose (mg/dL); LDL (mg/dL); HDL (mg/dL); Colesterol (mg/dL); Triglicérides (mg/dL); Insulina (ng/dL); NEFA (mEq/L).

5.6 Metabólitos de D-limoneno na urina

Os resultados referentes à concentração dos metabólitos de D-limoneno na urina foram normalizados dividindo-se o valor da área de cada pico cromatográfico pela concentração de creatinina da amostra. Essa normalização foi realizada com objetivo de corrigir eventuais alterações na concentração dos metabólitos decorrentes de alterações na concentração da urina.

A Tabela 5 apresenta os dados de concentração dos metabólitos do D-limoneno normalizados pelos valores do grupo HL0.1. Para análise da normalidade da distribuição dos

dados utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk. Quando os dados não seguiram uma distribuição normal as diferenças nas concentrações dos metabólitos entre os grupos HL0.1 e HL0.8 foram testadas através do teste de Mann-Whitney. Em caso de distribuição normal (gaussiana) dos dados, foi utilizado o teste T de Welch, sem informações prévias sobre o desvio padrão das médias.

Tabela 5 - Concentração dos metabólitos de D-limoneno na urina normalizada pelos valores do grupo HL0.1. Observação: nomes dos metabólitos em inglês

Metabólitos	Dist. Normal?	p valor	HL0.1			HL0.8		
			Média	Desv. Pad.	N	Média	Desv. Pad.	N
perillic acid glycine	No	0.0043	1.00	0.17	5.0	3.13	0.82	6.0
perillic acid glucuronide I	No	0.0095	1.00	0.15	4.0	21.70	4.93	6.0
dehydroperillic acid glycine	Yes	0.0027	1.00	0.14	5.0	7.67	1.23	6.0
dehydroperillic acid glucuronide	Yes	0.0023	1.00	0.25	5.0	6.85	1.07	6.0
dehydroperillic acid taurine	No	0.0303	1.00	0.24	5.0	4.37	1.05	6.0
hydroxydihidroperillic acid glycine	Yes	0.0026	1.00	0.14	5.0	9.30	1.50	6.0
hydroxydihidroperillic acid glycine II	No	0.0043	1.00	0.11	5.0	8.77	1.71	6.0
hydroxydihidroperillic acid glucuronide I	Yes	0.0041	1.00	0.22	5.0	5.45	0.92	6.0
hydroxydihidroperillic acid glucuronide II	Yes	0.0048	1.00	0.14	5.0	4.44	0.73	6.0
hydroxydihidroperillic acid glucuronide III	No	0.0095	1.00	0.08	4.0	14.16	3.30	6.0
dihydroxylimonene glucuronide I	No	0.1062	1.00	0.12	5.0	2.32	0.67	6.0
dihydroxylimonene glucuronide II	No	0.0266	1.00	0.21	5.0	4.10	1.00	6.0
dihydroxylimonene glucuronide III	Yes	0.0005	1.00	0.23	5.0	9.10	1.06	6.0
dihydroxydihidroperillic acid glucuronide	No	0.0095	1.00	0.23	4.0	5.73	1.48	6.0
dihydroxyperillic acid glucuronide	No	0.0043	1.00	0.12	5.0	14.99	3.72	6.0
hydroxy-p-menth-8-en-7-oic acid	No	0.0079	1.00	0.20	5.0	27.00	7.07	5.0
perillic acid sulfate	No	0.5368	1.00	0.14	5.0	1.35	0.61	6.0
perillic acid taurine	No	0.0043	1.00	0.17	5.0	17.03	5.71	6.0
hydroxylimonene glucuronide I	Yes	0.0034	1.00	0.24	5.0	8.85	1.53	6.0
hydroxylimonene glucuronide II	Yes	0.0036	1.00	0.25	5.0	7.34	1.26	6.0
hydroxylimonene glucuronide III	Yes	0.0000	1.00	0.19	5.0	4.88	0.40	6.0
hydroxy-p-menthane glucuronide	Yes	0.0005	1.00	0.20	5.0	6.80	0.79	6.0
hydroxylimonene taurine	Yes	0.0084	1.00	0.23	5.0	3.41	0.60	6.0

Conforme esperado, o grupo que recebeu uma dose superior de D-limoneno (0,8%) demonstrou maior concentração de metabólitos desse monoterpene na urina. O metabólito que mais diferiu entre os grupos foi o ácido hidroxi-p-menth-8en-7-oic (Figura 10). Sua concentração foi 27 vezes maior no grupo HL0.8 quando comparada ao grupo HL0.1 ($p=0,0079$). Outros metabólitos que demonstraram comportamento semelhante foram o ácido perílico glucoronídeo I, aproximadamente 22 vezes maior no grupo HL0.8 ($p=0,01$) e o ácido perílico conjugado a taurina, 17 vezes superior no grupo HL0.8 quando comparado ao grupo HL0.1 ($p=0,004$). A concentração de ácido perílico sulfatado demonstrou um padrão diferente

dos outros metabólitos analisados, sendo que a maior ingestão do monoterpene não promoveu aumento significativo da concentração desse metabólito na urina.

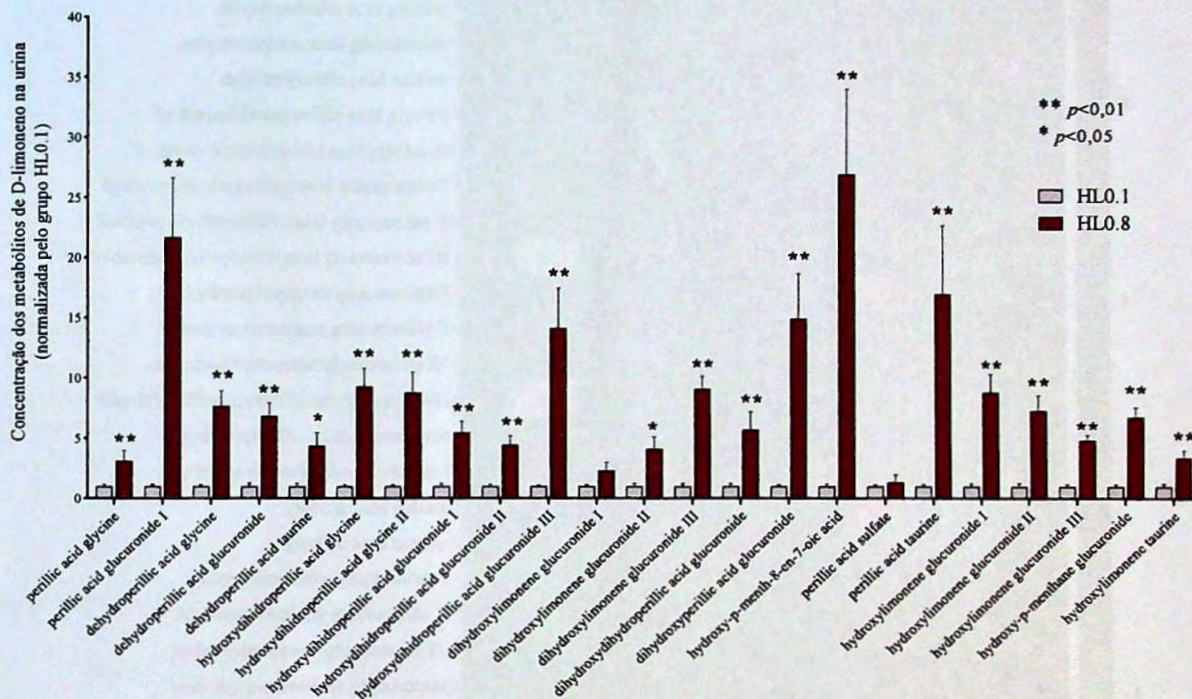


Figura 10 – Concentração dos metabólitos de D-limoneno na urina normalizada pelos valores do grupo HL0.1. N= 5 (HL0.1) ou 6 (HL0.8). Observação: nomes dos metabólitos em inglês

O mapa de calor (Figura 11) ilustra a grande variabilidade interindividual na concentração dos metabólitos do D-limoneno na urina. Observa-se que dois animais pertencentes ao grupo HL0.8 demonstram menor concentração urinária dos metabólitos do monoterpene, fato que não conseguimos explicar visto que a ingestão alimentar do D-limoneno não diferiu de forma significativa entre os animais. Possivelmente essa diferença esteja relacionada ao tempo entre a amostragem de urina e a última refeição do animal antes da coleta da amostra.

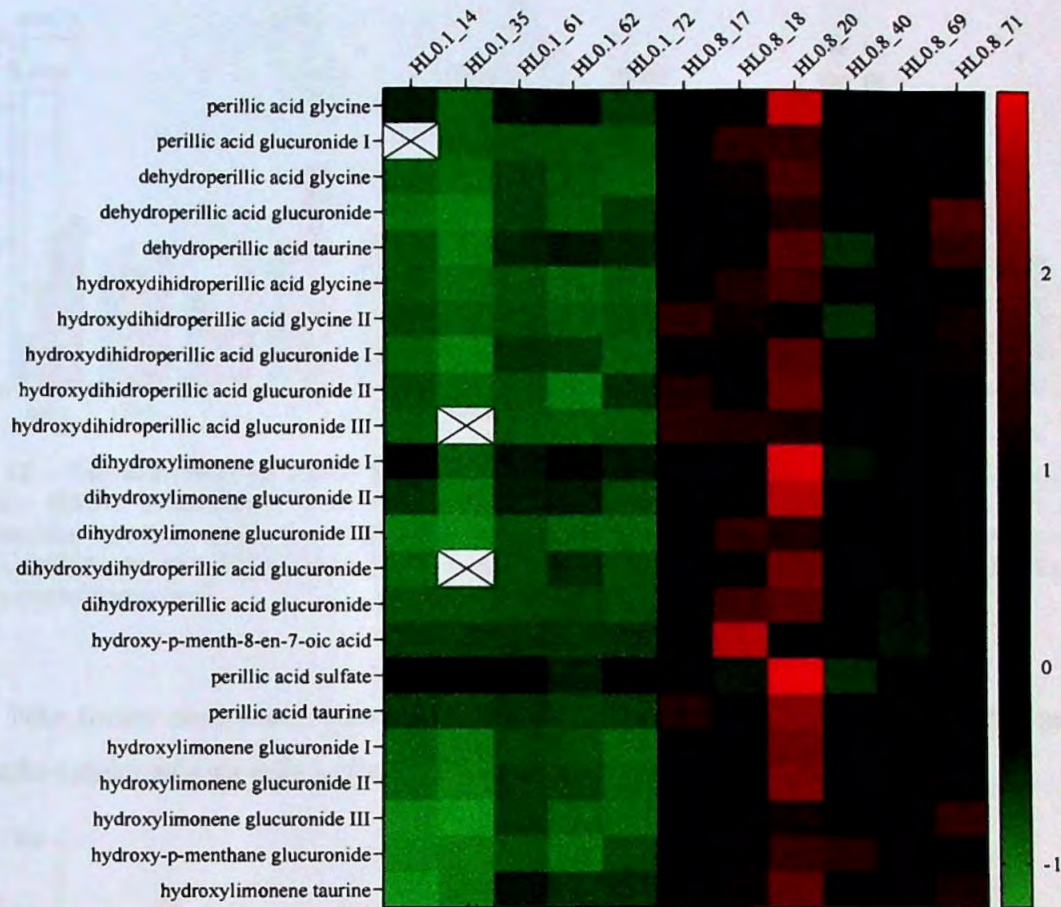


Figura 11 – Mapa de calor referente à concentração dos metabólitos de D-limoneno na urina utilizando z-scores. N= 5 (HL0.1) ou 6 (HL0.8). Observação: nomes dos metabólitos em inglês.

5.7 Metabolismo de ácidos biliares

5.7.1 Fezes

Analisamos a excreção fecal de AB ao longo de 24 horas e a concentração de AB nas fezes coletadas na quinta semana do experimento. A diferença na concentração de cada AB entre os 4 grupos foi testada com uma ANOVA 2 vias sem corrigir por múltiplas comparações (Teste de Fisher LSD). A Figura 10 apresenta a excreção dos AB mais abundantes nas fezes em 24 horas. Observa-se que a excreção de CDCA aumentou no grupo HL0.1 quando comparado ao grupo NL e que a suplementação com 0,8% de D-limoneno promoveu uma redução de 50% na excreção fecal desse AB quando comparado ao grupo HL0.1 ($p=0,0152$) (Figura 12). Um comportamento diferente do acima descrito é observado para o $T\alpha$ MA. Nesse caso, a suplementação com D-limoneno a 0,1% foi responsável pela redução de aproximadamente 60% da excreção fecal desse AB ($p=0,0291$), comportamento que não se repete no grupo que recebeu a dose de 0,8%. A excreção do α MA foi aumentada mediante a suplementação com D-limoneno, independente da dose utilizada (Figura 12).

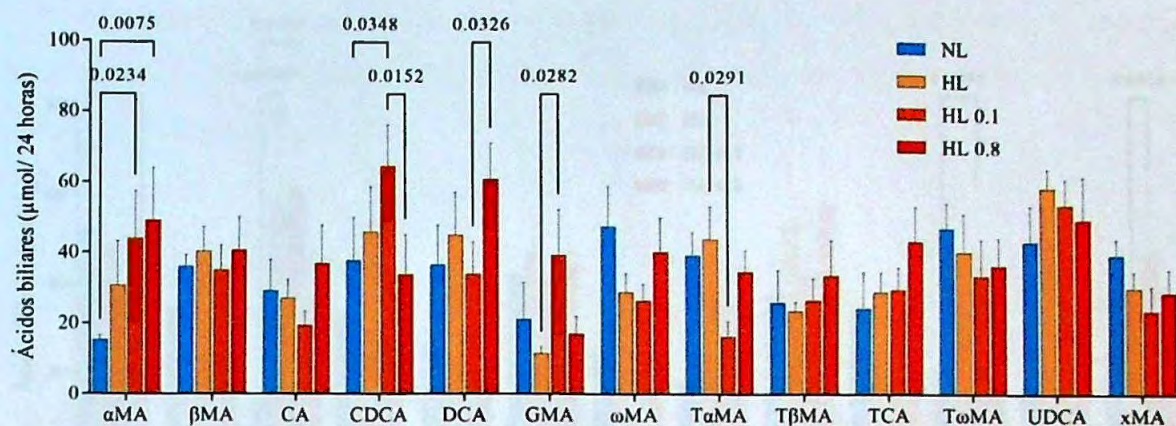


Figura 12 – Excreção fecal de ácidos biliares. N = 7 animais/ grupo. Ácido α -muricólico (α -MA), ácido β -muricólico (β MA), ácido cólico (CA), ácido quenodesoxicólico (CDCA), ácido desoxicólico (DCA), ácido glicomuricólico (GMA), ácido ω -muricólico (ω MA), ácido tauro- α -muricólico (T α MA), tauro- β -muricólico (T β MA), ácido taurocólico (TCA), ácido tauro- ω -muricólico (T ω MA), ácido ursodesoxicólico (UDCA), isômero de ácido muricólico (xMA).

Não foram observadas diferenças na excreção das diferentes classes de AB induzidas pela ração consumida ou pela suplementação com D-limoneno (Figura 13).

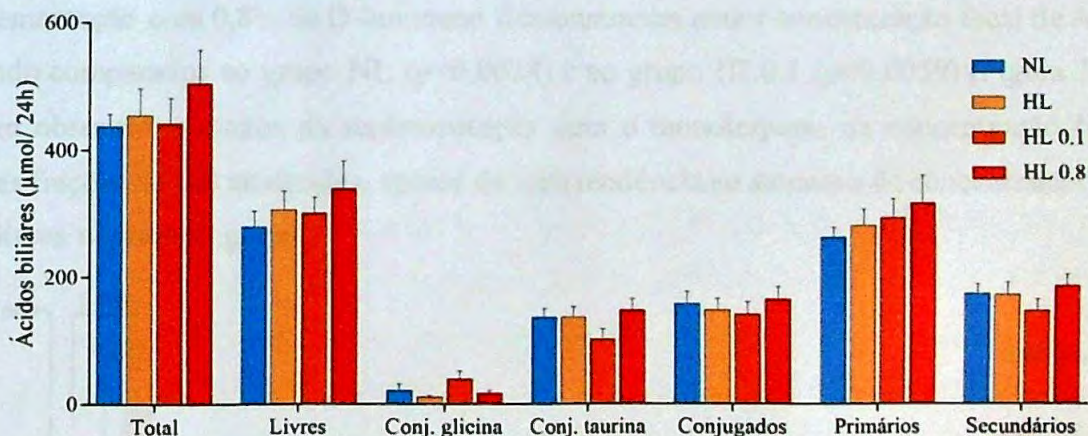


Figura 13 – Excreção fecal das diferentes classes de ácidos biliares em 24 horas. N = 7 animais/ grupo.

De forma oposta à sua excreção, as concentrações de α MA são menores nos grupos tratados com ração hiperlipídica, sendo que o grupo HL0.8 demonstra concentração significativamente menor quando comparado ao grupo NL ($p=0,0348$). A concentração fecal de CA aumenta nos grupos HL e HL0.1 (respectivamente $p=0,0007$ e $p=0,0003$) mas é reduzida mediante o tratamento com 0,8% de D-limoneno (Figura 14).

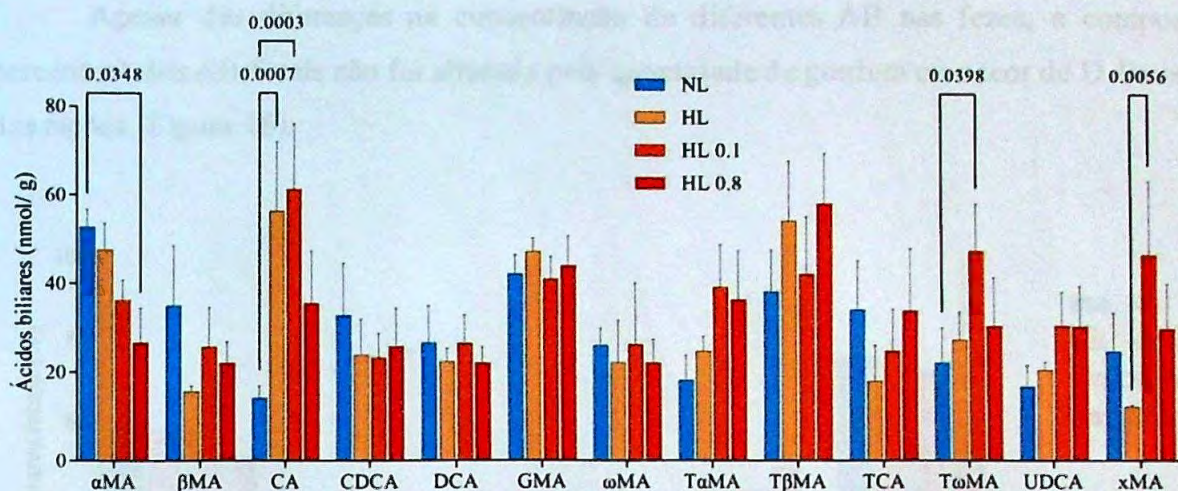


Figura 14 – Concentração de ácidos biliares nas fezes. N = 7 animais/ grupo. Ácido α -muricólico (α -MA), ácido β -muricólico (β MA), ácido cólico (CA), ácido quenodesaxicólico (CDCA), ácido desoxicólico (DCA), ácido glicomuricólico (GMA), ácido ω - muricólico (ω MA), ácido, tauro- α -muricólico (TaMA), tauro- β -muricólico (T β MA), ácido taurocólico (TCA), ácido tauro- ω -muricólico (T ω MA), ácido ursodesoxicólico (UDCA), isômero de ácido muricólico (xMA).

É possível observar que os camundongos pertencentes ao grupo HL que receberam suplementação com 0,8% de D-limoneno demonstraram maior concentração fecal de AB totais quando comparados ao grupo NL ($p=0,0028$) e ao grupo HL0.1 ($p=0,0059$) (Figura 15). Não foram observados efeitos da suplementação com o monoterpreno na concentração fecal das outras frações de AB analisadas, apesar de uma tendência ao aumento da concentração fecal de AB livres no mesmo grupo.

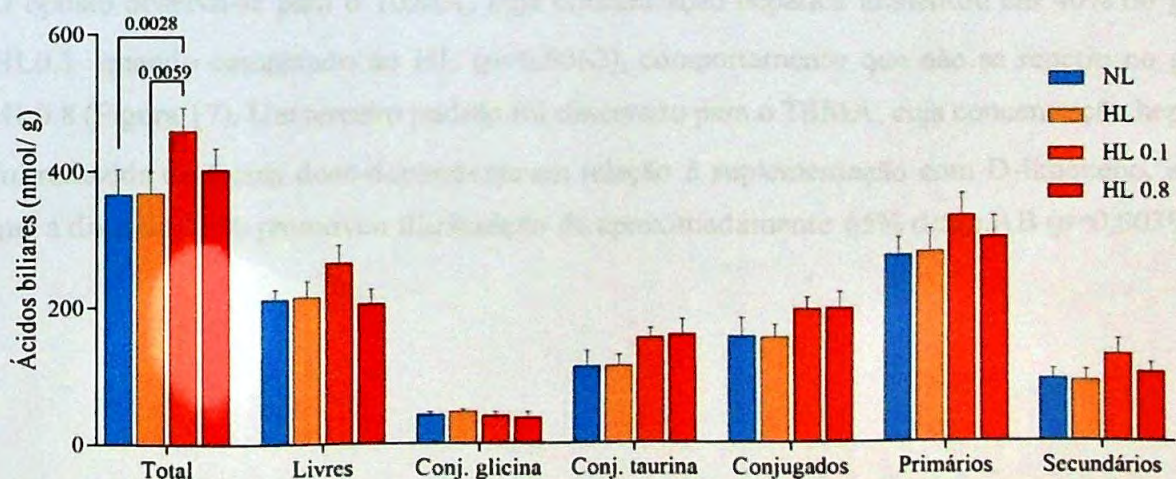


Figura 15 – Concentração fecal das diferentes classes de AB. N = 7 animais/ grupo.

Apesar das diferenças na concentração de diferentes AB nas fezes, a composição percentual dos AB fecais não foi alterada pela quantidade de gordura ou o teor de D-limoneno das rações (Figura 16).

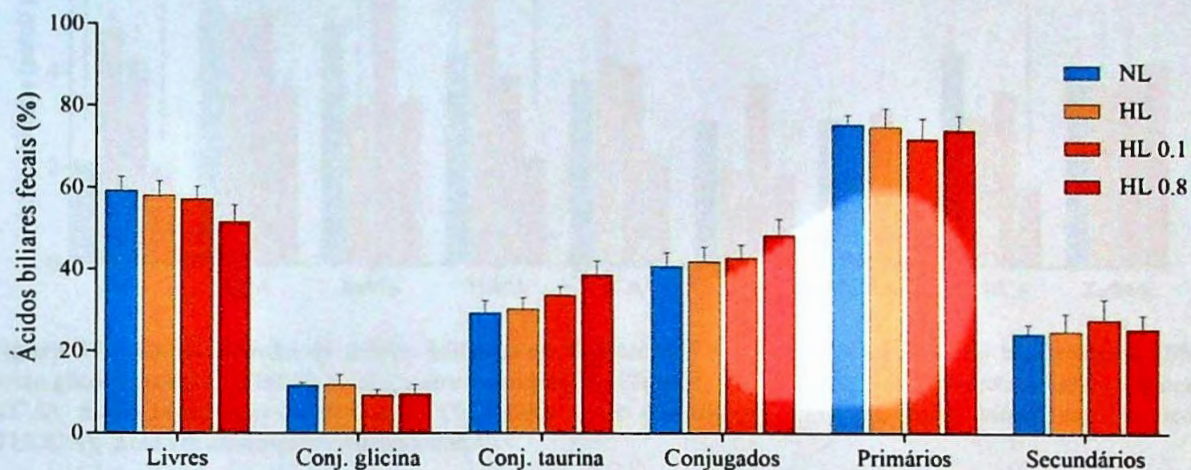


Figura 16 – Composição percentual das diferentes classes de AB nas fezes. N = 7 animais/grupo.

5.7.2 Fígado

No fígado, a dieta rica em gorduras promoveu aumento de aproximadamente 60% na concentração de β MA ($p=0,0327$), enquanto que a suplementação com 0,8% de D-limoneno induziu a redução da concentração desse AB ($p=0,0382$), efeito não observado no grupo HL0.1. O oposto observa-se para o α MA, cuja concentração hepática aumentou em 40% no grupo HL0.1 quando comparado ao HL ($p=0,0462$), comportamento que não se repetiu no grupo HL0.8 (Figura 17). Um terceiro padrão foi observado para o T β MA, cuja concentração hepática foi reduzida de forma dose-dependente em relação à suplementação com D-limoneno, sendo que a dose de 0,8% promoveu diminuição de aproximadamente 65% desse AB ($p=0,0039$).

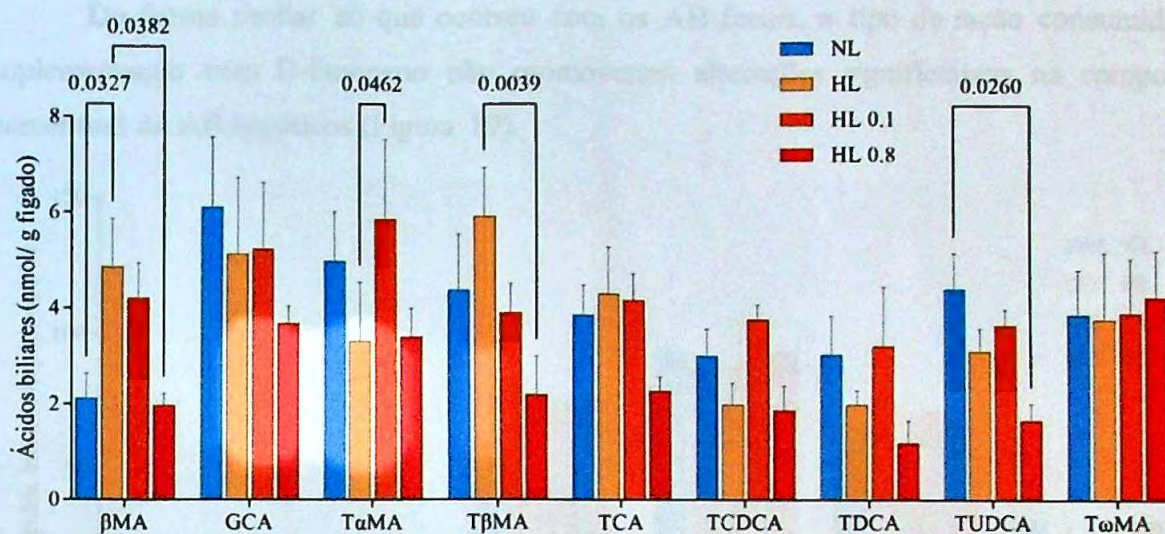


Figura 17 – Concentração de ácidos biliares no fígado. N = 6 animais/ grupo. Ácido β-muricólico (βMA), ácido glicomuricólico (GMA), ácido, tauro-α-muricólico (TαMA), tauro-β-muricólico (TβMA), ácido taurocólico (TCA), ácido tauro quenodesoxicólico (TCDCA), tauro desoxicólico (TDCA), ácido tauro ursodesoxicólico (TUDCA), ácido tauro-ω-muricólico (TωMA).

A suplementação com 0,8% de D-limoneno induziu redução de aproximadamente 30% da concentração de AB totais em relação ao grupo HL ($p < 0,0001$). A concentração de AB primários, conjugados com a taurina e conjugados totais seguiu o mesmo padrão do somatório total de AB, sendo a suplementação com D-limoneno responsável por uma menor concentração dessas frações no fígado (Figura 18).

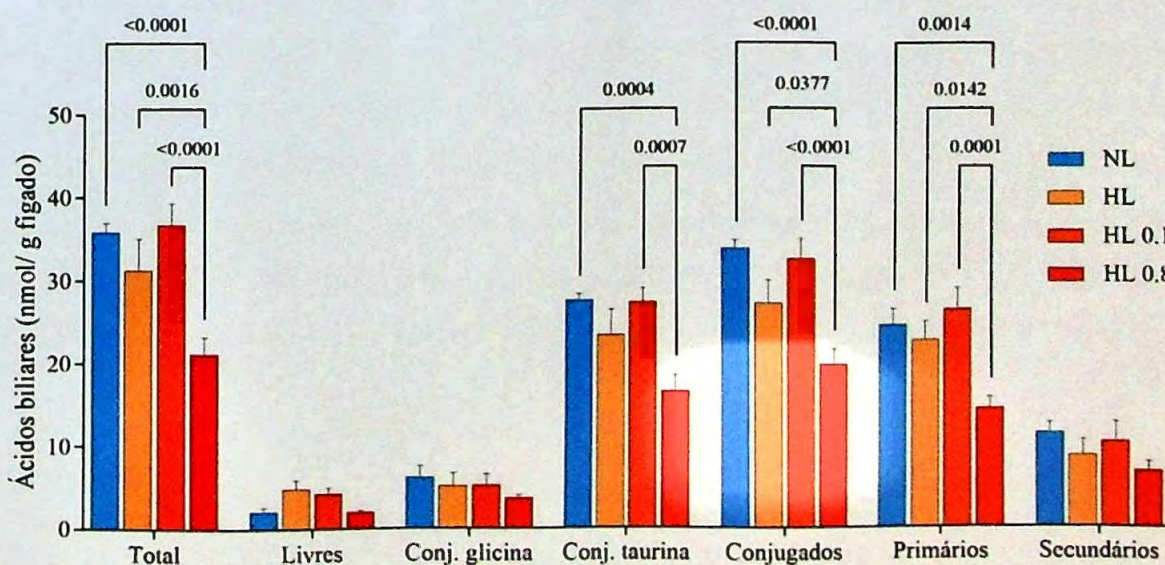


Figura 18 – Concentrações de diferentes classes de ácidos biliares no fígado. N = 6 animais/ grupo.

De forma similar ao que ocorreu com os AB fecais, a tipo de ração consumida e a suplementação com D-limoneno não promoveram alterações significativas na composição percentual de AB hepáticos (Figura 19).

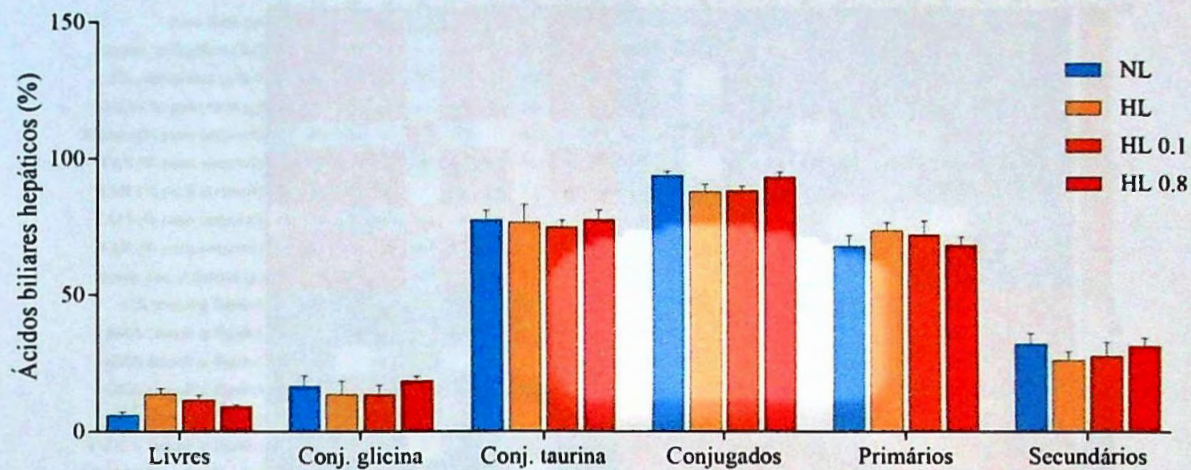


Figura 19 – Composição percentual das diferentes classes de AB no fígado. N = 6 animais/ grupo.

Uma análise de correlações múltiplas de Spearman foi realizada entre os AB hepáticos e os parâmetros do metabolismo energético que se mostraram modulados pelo tratamento com D-limoneno (Figura 18)

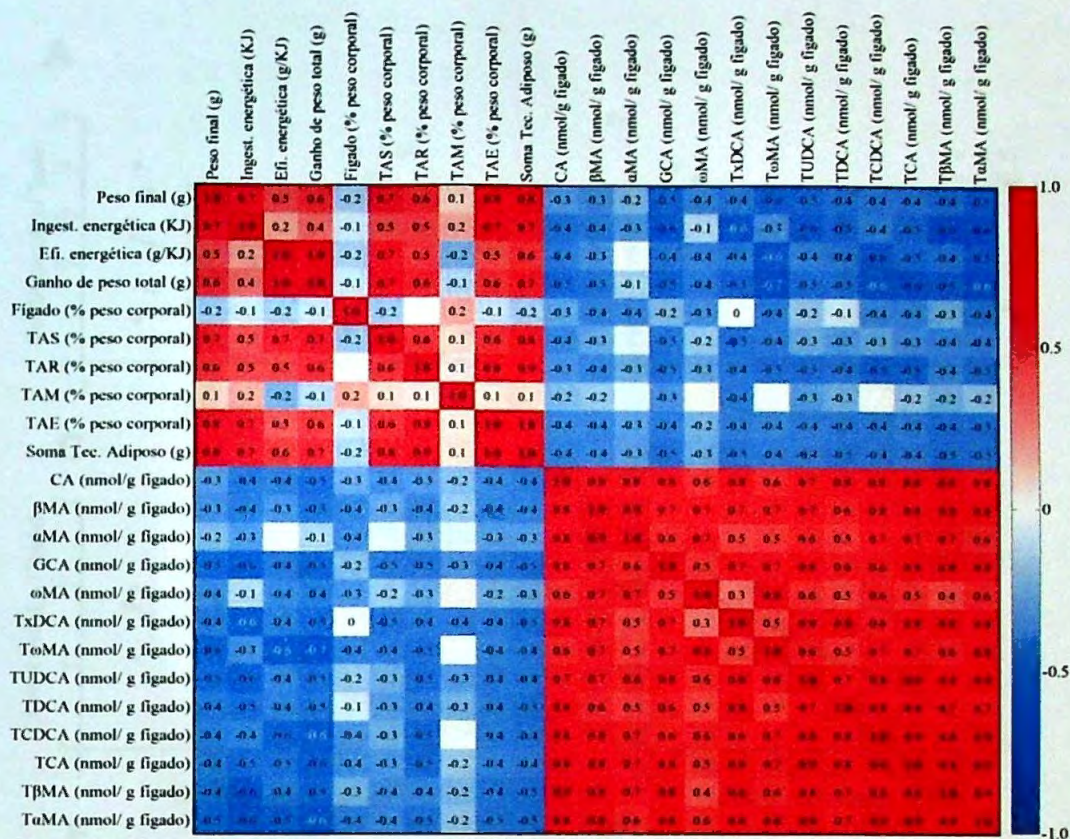


Figura 20 – Matriz de correlações de Spearman. A intersecção de cada linha e coluna apresenta a correlação entre as variáveis indicadas. A cor de cada célula indica o valor da constante r derivada da análise de correlação de Spearman (quando mais vermelha, maior é a correlação positiva; quanto mais intensa a cor azul, maior a intensidade da correlação negativa).

Tendo como base a matriz de correlações de Spearman, selecionamos as correlações mais intensas e realizamos uma análise de regressão linear das variáveis envolvidas (Figura 21). Observamos que as concentrações hepáticas de TωMA, TCDCA e TαMA demonstraram correlação negativa com o ganho de peso total (g). Da mesma forma, o TαMA também apresentou essa correlação negativa com a eficiência energética (g/KJ) e com a ingestão energética dos animais (KJ). Sabemos que a análise de correlação não indica causalidade, entretanto, esses resultados podem indicar uma relação entre esses AB e a eficiência energética.

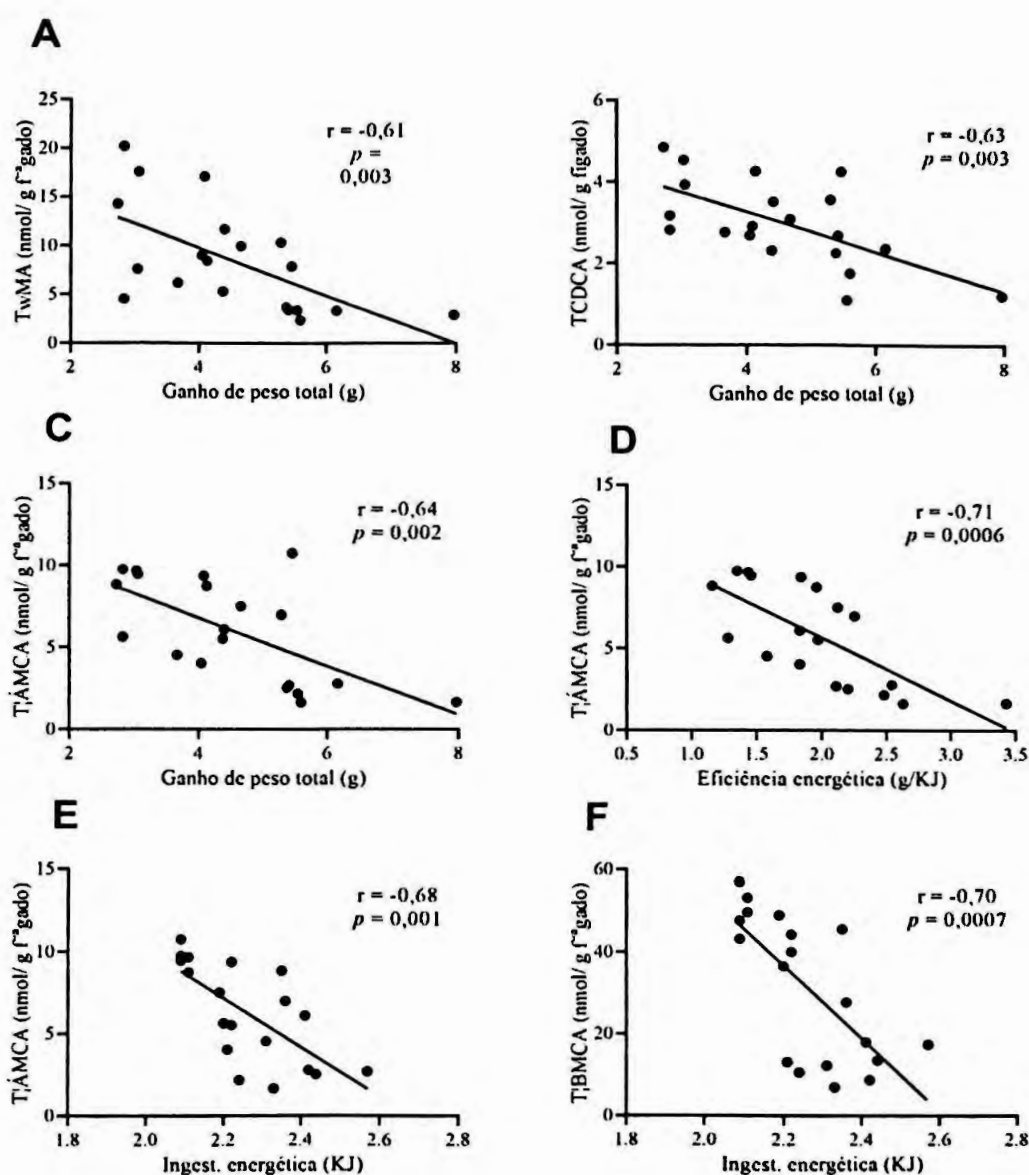


Figura 21 – Análise de correlação entre ácidos biliares e parâmetros de interesse do metabolismo energético. A: correlação entre ganho de peso total (g) e concentração hepática (nmol/g fígado) de ácido tauro- ω -muricólico (T ω MA). B: correlação entre ganho de peso total (g) e concentração hepática (nmol/g fígado) de ácido tauro-quenodesoxicólico (TCDCA). C: correlação entre ganho de peso total (g) e concentração hepática (nmol/g fígado) de ácido tauro- α -muricólico (T α MA). D: correlação entre a eficiência energética (g/KJ) e concentração hepática (nmol/g fígado) de ácido tauro- α -muricólico (T α MA). E: correlação entre a ingestão energética (KJ) e concentração hepática (nmol/g fígado) de ácido tauro- β -muricólico (T β MA).

6. DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo confirmam observações prévias de que o metabolismo de AB apresenta alta variabilidade interindividual ⁷⁰. Essa questão já é conhecida há várias décadas e dificulta a obtenção de conclusões em estudos focados no metabolismo desses compostos. Um

dos fatores que pode estar relacionado com a diferença no perfil de AB é a etnia. Luo et al. (2018) observaram que o grupo étnico asiático demonstra concentração sérica maior que ácido glicocólico, ácido glicocenodeoxicólico, ácido quenodeoxicólico e ácido taurocenoxicólico, quando comparados a outros grupos étnicos⁹⁰. Outros estudos apontam o efeito do gênero, da dieta e de variantes genéticas no perfil de AB⁷⁰.

Outra ressalva que devemos fazer ao iniciar a discussão dos resultados apresentados, é que esse estudo faz parte de um projeto maior, o qual também busca avaliar o efeito do D-limoneno na composição da microbiota intestinal. Essa análise está além dos objetivos dessa dissertação de mestrado, mas acreditamos que os efeitos da suplementação na microbiota intestinal possam justificar, ao menos parcialmente os dados encontrados em relação ao perfil de AB das fezes e do fígado. Também cabe ressaltar que é muito difícil discorrer sobre a causalidade dos efeitos descrito nesse trabalho, haja vista que a interação entre microbiota intestinal e AB se dá de forma bidirecional⁹¹. Ao mesmo tempo em que o D-limoneno pode afetar a composição da microbiota intestinal por suas propriedades antimicrobianas, os próprios AB são também antimicrobianos e participam da seleção ambiental imposta à microbiota intestinal. Além disso, os AB modulam ativamente a expressão das enzimas responsáveis por sua síntese e os transportadores envolvidos na sua secreção e transporte intestinal e hepático.

Entre os AB analisados, não foi observada predominância de nenhum composto em particular tanto nas fezes quanto no fígado. As Tabelas 7 e 8 apresenta os percentuais de concentração de ácidos biliares nas fezes e no fígado, respectivamente.

Tabela 6– Abundância relativa (percentual) dos ácidos biliares nas fezes.

Ácido Biliar	NL			HL			HL0.1			HL0.8		
	Média (%)	EPM	N	Média (%)	EPM	N	Média (%)	EPM	N	Média (%)	EPM	N
AMA	15,01	1,41	7	11,34	1,95	7	8,03	1,03	7	6,79	1,85	7
BMA	11,08	4,83	7	4,46	0,50	7	5,63	1,92	7	5,37	0,82	7
CA	3,76	0,36	7	13,73	3,32	7	11,23	3,26	7	7,33	2,59	7
CDCA	4,38	1,68	7	6,65	2,13	7	5,05	1,34	7	6,21	1,96	7
DCA	7,48	2,49	7	6,52	1,20	7	5,90	1,48	7	5,96	1,25	7
GMA	11,61	0,68	7	11,83	2,47	7	9,25	1,38	7	9,59	2,35	7
WMA	7,32	1,25	7	5,97	2,35	7	5,48	3,26	7	5,36	0,93	7
TAMA	4,60	0,97	7	6,92	0,87	7	9,07	2,58	7	8,95	2,34	7
TBMA	10,80	2,51	7	12,12	3,70	7	8,72	2,37	7	14,42	2,73	7
TCA	8,50	1,95	7	4,48	1,70	7	5,68	2,30	7	7,72	3,09	7
TWMA	5,30	1,26	7	6,64	1,83	7	10,18	2,26	7	7,68	2,64	7
UDCA	4,27	0,99	7	5,82	0,69	7	6,36	1,06	7	6,59	1,78	7

XMA	5,89	2,38	7	3,51	0,38	7	9,40	3,16	7	8,02	3,26	7
-----	------	------	---	------	------	---	------	------	---	------	------	---

Tabela 7 – Abundância relativa (percentual) dos ácidos biliares no fígado.

Acido Biliar	NL			HL			HL0.1			HL0.8		
	Média (%)	EPM	N	Média (%)	EPM	N	Média (%)	EPM	N	Média (%)	EPM	N
BMA	5,86	1,38	7	11,81	2,63	7	11,57	1,68	7	6,45	1,75	7
GCA	16,59	3,80	7	11,59	4,69	7	13,57	3,34	7	15,87	3,05	7
TAMA	14,12	2,88	7	10,17	3,42	7	13,93	4,51	7	15,55	1,40	7
TBMA	12,26	3,37	7	20,10	6,92	7	10,71	1,82	7	11,72	5,00	7
TCA	10,72	1,70	7	13,04	2,11	7	12,11	2,08	7	10,88	0,86	7
TCDCA	8,39	1,64	7	7,01	1,58	7	10,45	0,79	7	8,10	1,98	7
TDCA	8,74	2,45	7	5,04	0,89	7	6,92	2,60	7	3,51	1,51	7
TUDCA	12,23	1,92	7	9,93	0,91	7	10,37	1,24	7	7,55	1,27	7
TWMA	11,10	2,74	7	11,31	3,11	7	10,36	2,55	7	20,37	3,31	7

Tanto no fígado quanto nas fezes foram encontrados mais AB primários do que secundários, sendo que os primeiros correspondem a aproximadamente 80% da somatória de AB totais. Resultado semelhante foi observado por Chen et al. (2019) quando analisadas amostras de soro de humanos. Houve predominância de AB primários no soro, que de acordo com os pesquisadores se deve a maior concentração de ácido quenodesóxicólico⁹². Curiosamente, outro estudo desenvolvido com humanos demonstra que em pacientes com hepatite B crônica, há um aumento nos níveis séricos de AB totais e primários, enquanto a excreção fecal de AB secundários é significativamente menor⁹³.

Apesar dessa semelhança entre as diferentes matrizes, no fígado a maior parte dos AB encontra-se em sua forma conjugada (aproximadamente 90%), principalmente com a taurina (80%), enquanto nas fezes são encontrados predominantemente AB livres (aproximadamente 55%). A atividade de desconjugação exercida pela microbiota intestinal é uma das principais reações catalisadas pelas bactérias residentes no intestino, seguida da desidroxilação, que converte AB primários em secundários^{65,66}. Esses resultados estão de acordo com os dados da literatura e vale ressaltar que em camundongos, cerca de 95% do AB são conjugados a taurina, enquanto que em humanos, a razão de conjugação glicina:taurina é de aproximadamente 3:1^{94,95}.

De acordo com a literatura os AB secundários mais abundantes em camundongos são desoxicólico, litocólico e ω -muricólico⁹⁴. No presente estudo não foram detectadas concentrações significativa de ácido litocólico no fígado e fezes dos animais. Já o ácido desoxicólico e o ω -muricólico foram encontrados em concentrações significativas nas fezes dos animais. É possível que o método analítico utilizado não seja eficiente para a detecção do ácido

litocólico, que devido a sua natureza apolar é o último AB a ser eluído da coluna cromatográfica e sua ionização pode ser prejudicada pela competição com outros lipídios com o mesmo tempo de retenção.

Sabe-se que além de serem encontrados no fígado, plasma/soro, fezes e intestino, os AB também podem ser encontrados em outros tecidos corporais. Isso foi verificado por Gaikwad (2020), que estudou a concentração de AB em diferentes tecidos de ratas Wistar. De forma interessante, o pesquisador encontrou concentrações significativas de AB tauroconjugados no cérebro dos animais⁹⁶. Diversos estudos vêm relacionando mudanças no perfil de ácidos biliares circulantes com aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica, e consequente influxo de AB, isso porque as estruturas das células endoteliais tendem a se flexibilizar quando expostas a altas concentrações de ácidos biliares^{97,98}.

Os principais efeitos da suplementação com D-limoneno no perfil de AB fecais foram o aumento da concentração do ácido tauro- α -muricólico, em relação dose-dependente com a suplementação e, de forma oposta, a redução da concentração do ácido α -muricólico de acordo com o aumento da dose de monoterpene. É possível que devido a sua ação sobre a microbiota intestinal, o D-limoneno possa atuar de forma a dificultar o processo de desconjugação do ácido tauro- α -muricólico. Entretanto, esse resultado não foi observado para outros AB.

No fígado, o efeito mais claro da suplementação com D-limoneno foi a redução em aproximadamente 30% do total de AB, observada apenas no grupo HL0.8 e não no grupo HL0.1. Esse efeito, assim como outros observados no estudo (diminuição do depósito de tecido adiposo epididimal, por exemplo), ilustra o fato de os efeitos do D-limoneno não serem aditivos ou sinérgicos, uma vez que não se observa gradação dos efeitos com doses escalonadas. Diferentes doses do composto bioativo podem afetar a estrutura ecológica da microbiota de maneiras diferentes, influenciando grupos distintos de microrganismos e o desaparecimento (ou enriquecimento) de um determinado grupo pode ser determinante para o sucesso ou a extinção de outro⁶¹.

Além dos efeitos do D-limoneno, a quantidade de lipídios da ração também influenciou o metabolismo dos AB. Os animais tratados com ração hiperlipídica apresentaram maior predominância do ácido cólico livre do que desse mesmo ácido biliar conjugado à taurina (ácido tauro-cólico). Porém, quando observamos os resultados referentes ao grupo tratado com ração com conteúdo normal de gorduras, o comportamento é o oposto, sendo maior a concentração de ácido tauro-cólico que de ácido cólico livre. Esse comportamento não se repete no caso dos ácidos α -muricólico e β -muricólico, indicando que possivelmente os efeitos na microbiota

intestinal dos animais se restrinjam a grupo(s) de microrganismos com seletividade a diferentes espécies de AB. Vale ressaltar que os AB não conjugados atuam com mais afinidade como ligantes de FXR, sendo assim, a quantidade de gordura da dieta pode impactar ativação desse receptor por meio da modulação do pool de AB⁹⁹.

Considerando as informações acima descritas e o fato de que a concentração hepática de ácido β -muricólico encontra-se aumentada nos animais suplementados com D-limoneno a 0,1%, podemos esperar um efeito hepatoprotetor induzido pelo tratamento. Isso porque esse ácido biliar apresenta característica mais hidrofílica que os demais, demonstrando menor afinidade por lipídeos, e assim, apresentando efeito benéfico em doenças hepáticas colestáticas crônicas¹⁰⁰. Ácidos biliares mais hidrofílicos, como o ácido β -muricólico e tauro- β -muricólico, podem atuar de forma a inibir a sinalização de FXR. Assim, ocorre um favorecimento da atividade de LXR e SREBP2, redução da ativação de FGF15, limitando da solubilização de colesterol no lúmen intestinal, resultando em maior excreção fecal de colesterol e AB, e, conseqüentemente, aumento da síntese hepática de AB, podendo controlar do desenvolvimento de hipercolesterolemia^{99,101}.

A hidrofobicidade dos AB não tem impacto apenas sobre sua excreção. Estudos já associaram AB mais hidrofílicos, principalmente o ácido ursodesoxicólico e tauro-ursodesoxicólico com efeito citoprotetor¹⁰². Enquanto os AB mais hidrofóbicos, como ácido litocólico, desoxicólico e quenodesoxicólico podem estar relacionados com atividade citotóxica pró-inflamatória. Isso porque o acúmulo hepático desses AB pode induzir dano mitocondrial, com conseqüente ativação de NF- κ B e aumento de espécies reativas de oxigênio, sinalizando processo inflamatório^{99,103}.

Um resultado importante a ser discutido é referente a correlação negativa encontrada entre a concentração do T α MA e T β MA, os AB primários mais importantes em roedores, com a ingestão energética. Sabe-se que os AB atuam como secretagogos de incretinas, como GLP-1 e PYY, por meio da ativação do receptor de membrana TGR5. Dessa forma, os AB estão envolvidos com a ativação de vias vagais e simpáticas de sinalização de saciedade, podendo participar do controle do apetite e da ingestão energética^{75,104,105}. Alterações nas concentrações desses hormônios podem estar envolvidas com o desenvolvimento de diabetes, obesidade e esteatose hepática não alcoólica e a sua regulação vêm sendo estudada como um importante alvo terapêutico dessas condições clínicas¹⁰⁶.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o tratamento com D-limoneno promove alterações no metabolismo de AB, afetando as concentrações dessas moléculas nas fezes e no fígado, sem seguir um padrão dose-dependente. Acreditamos que isso se deva a atividade antimicrobiana do monoterpene que de acordo com a dosagem exerce um efeito diferente sobre a microbiota intestinal. A alta variabilidade interindividual no perfil de AB dificulta a discussão desses dados e evidencia a necessidade de mais estudos a fim de compreender os fatores determinantes no metabolismo desses compostos.

As alterações no pool de AB não se refletiram em modificações no metabolismo intermediário conforme esperávamos. Um dos fatores que pode ter contribuído de forma negativa foi o alojamento individual dos animais, realizado com objetivo de quantificar a ingestão energética e a produção fecal. É possível que o alojamento individual tenha inibido a ingestão alimentar, impedindo o estabelecimento pleno do fenótipo de obesidade induzida pela dieta. Dessa forma, o efeito da modulação do metabolismo dos AB no metabolismo energético não pôde ser notado.

Apesar das limitações, o presente estudo fornece base para futuras pesquisas que busquem compreender os mecanismos envolvidos na modulação no perfil de ácidos biliares promovido pela alteração da composição da dieta e os efeitos do D-limoneno sobre o pool de ácidos biliares e seus efeitos sistêmicos.

8. REFERÊNCIAS

1. Haque, M. R., Ansari, S. H., Najmi, A. K. & Ahmad, M. A. Monoterpene phenolic compound thymol prevents high fat diet induced obesity in murine model. *Toxicol. Mech. Methods* **24**, 116–123 (2014).
2. Juergens, U. R. Anti-inflammatory Properties of the Monoterpene 1,8-cineole: Current Evidence for Co-medication in Inflammatory Airway Diseases. 638–646.
3. Hakim, I. A., McClure, T. & Liebler, D. Assessing dietary D-limonene intake for epidemiological studies. *J. Food Compos. Anal.* **13**, 329–336 (2000).
4. Chow, H. H. S., Salazar, D. & Hakim, I. A. Pharmacokinetics of perillic acid in humans after a single dose administration of a citrus preparation rich in d-Limonene content. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **11**, 1472–1476 (2002).
5. Ravichandran, C., Badgular, P. C., Gundev, P. & Upadhyay, A. Review of toxicological assessment of d-limonene, a food and cosmetics additive. *Food Chem. Toxicol.* **120**, 668–680 (2018).
6. Karlberg, A. T., Magnusson, K. & Nilsson, U. Influence of an anti-oxidant on the formation of allergenic compounds during auto-oxidation of d-limonene. *Ann. Occup. Hyg.* **38**, 199–207 (1994).
7. Igimi, H., Nishimura, M., Kodama, R. & Ide, H. Studies on the metabolism of d-limonene (p-mentha-1,8-diene): I. The absorption, distribution and excretion of d-

- limonene in rats. *Xenobiotica* **4**, 77–84 (1974).
8. Kodama, R., Yano, T., Noda, K. & Ide, H. Studies on the Metabolism of d-Limonene (p-mentha-1, 8-diene). *6*, 377–389 (1976).
 9. Schmidt, L. & Göen, T. R-Limonene metabolism in humans and metabolite kinetics after oral administration. *Arch. Toxicol.* **91**, 1175–1185 (2017).
 10. Ariyoshi, T. O. S. H. I. H. I. K. O., Arakaki, M. I. T. S. U. O., Ideguchi, K., Ishizuka, Y. & Ide, H. + 104*0"). **5**, 33–38 (1975).
 11. Vieira, A. J., Beserra, F. P., Souza, M. C., Totti, B. M. & Rozza, A. L. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chem. Biol. Interact.* **283**, 97–106 (2018).
 12. Crowell, P. L. *et al.* Human metabolism of the experimental cancer therapeutic agent d-limonene. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **35**, 31–37 (1994).
 13. Crowell, P. L., Lin, S., Vedejs, E. & Gould, M. N. Identification of metabolites of the antitumor agent d-limonene capable of inhibiting protein isoprenylation and cell growth. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **31**, 205–212 (1992).
 14. Miller, J. A. *et al.* Adipose tissue accumulation of d-limonene with the consumption of a lemonade preparation rich in d-limonene content. *Nutr. Cancer* **62**, 783–788 (2010).
 15. Vigushin, D. M. *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **42**, 111–117 (1998).
 16. Sun, J. D-Limonene : D-Limonene. **12**, 259–264 (2007).
 17. Adams, T. B. *et al.* The FEMA GRAS assessment of aliphatic and aromatic terpene hydrocarbons used as flavor ingredients. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 2471–2494 (2011).
 18. Loomis, T. A. & Wallace, H. A. *Loomis's essentials of toxicology*. (Elsevier, 1996).
 19. Igimi, H. *et al.* A useful cholesterol solvent for medical dissolution of gallstones. *Gastroenterol. Jpn.* **27**, 536–545 (1992).
 20. Igimi, H., Hisatsugu, T. & Nishimura, M. The use of d-limonene preparation as a dissolving agent of gallstones. *Am. J. Dig. Dis.* **21**, 926–939 (1976).
 21. Whysner, J. & Williams, G. M. Saccharin mechanistic data and risk assessment: Urine composition, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. *Pharmacol. Ther.* **71**, 225–252 (1996).
 22. De Almeida, A. A. C., Costa, J. P., De Carvalho, R. B. F., De Sousa, D. P. & De Freitas, R. M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. *Brain Res.* **1448**, 56–62 (2012).
 23. Ramos, C. A. F. *et al.* Histopathological and biochemical assessment of d-limonene-induced liver injury in rats. *Toxicol. Reports* **2**, 482–488 (2015).
 24. Bacanlı, M., Başaran, A. A. & Başaran, N. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food Chem. Toxicol.* **81**, 160–170 (2015).
 25. Miller, J. A. *et al.* Human breast tissue disposition and bioactivity of limonene in women with early-stage breast cancer. *Cancer Prev. Res.* **6**, 577–584 (2013).
 26. Kim, Y. W. *et al.* Safety evaluation and risk assessment of D-limonene. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part B Crit. Rev.* **16**, 17–38 (2013).
 27. de Souza, M. C. *et al.* Gastroprotective effect of limonene in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and gene expression. *Phytomedicine* **53**, 37–42 (2019).
 28. D'Alessio, P. A. *et al.* Oral administration of d-Limonene controls inflammation in rat colitis and displays anti-inflammatory properties as diet supplementation in humans. *Life Sci.* **92**, 1151–1156 (2013).
 29. Kummer, R. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory activity of citrus latifolia Tanaka essential oil and limonene in experimental mouse models. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2013**, (2013).
 30. Amorim, J. L. *et al.* Anti-inflammatory properties and chemical characterization of the

- essential oils of four Citrus species. *PLoS One* **11**, 1–18 (2016).
31. Chi, P. T. L., Van Hung, P., Le Thanh, H. & Phi, N. T. L. Valorization of Citrus Leaves: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Essential Oils. *Waste and Biomass Valorization* (2019) doi:10.1007/s12649-019-00815-6.
 32. Murali, R., Karthikeyan, A. & Saravanan, R. Protective Effects of d-Limonene on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **112**, 175–181 (2013).
 33. Ghasemi, K., Ghasemi, Y. & Ebrahimzadeh, M. A. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.* **22**, 277–281 (2009).
 34. Lu, J. X. *et al.* Citronellal prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in rats. *J. Cell. Biochem.* **120**, 3790–3800 (2019).
 35. Murali, R. & Saravanan, R. Antidiabetic effect of d-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed. Prev. Nutr.* **2**, 269–275 (2012).
 36. Jing, L. *et al.* Preventive and ameliorating effects of citrus D-limonene on dyslipidemia and hyperglycemia in mice with high-fat diet-induced obesity. *Eur. J. Pharmacol.* **715**, 46–55 (2013).
 37. Bacanlı, M. *et al.* D-limonene ameliorates diabetes and its complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* **110**, 434–442 (2017).
 38. Santiago, J. V. A., Jayachitra, J., Shenbagam, M. & Nalini, N. Dietary d-limonene alleviates insulin resistance and oxidative stress-induced liver injury in high-fat diet and L-NAME-treated rats. *Eur. J. Nutr.* **51**, 57–68 (2012).
 39. Moraes, T. M. *et al.* Effects of limonene and essential oil from Citrus aurantium on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chem. Biol. Interact.* **180**, 499–505 (2009).
 40. Rozza, A. L. *et al.* Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E. *Chem. Biol. Interact.* **189**, 82–89 (2011).
 41. Yu, L., Yan, J. & Sun, Z. D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways. *Mol. Med. Rep.* **15**, 2339–2346 (2017).
 42. Singh, P. *et al.* Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of Citrus maxima Burm. and Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 1734–1740 (2010).
 43. Roberto, D., Micucci, P., Sebastian, T., Graciela, F. & Anesini, C. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: Relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **106**, 38–44 (2010).
 44. Jia, S. S. *et al.* Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells. *Oncol. Rep.* **29**, 349–354 (2013).
 45. Ahmad, S. & Beg, Z. H. Hypolipidemic and antioxidant activities of thymoquinone and limonene in atherogenic suspension fed rats. *Food Chem.* **138**, 1116–1124 (2013).
 46. Dar, M. S. EVALUATION OF THE CHEMICAL CONSTITUENTS AND THE ANTIBACTERIAL. **7**, 1245–1250 (2016).
 47. Azhdarzadeh, F. & Hojjati, M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Leaf, Ripe and Unripe Peel of Bitter Orange (Citrus aurantium) Essential Oils. *Nutrition and Food Sciences Research* vol. 3 43–50 (2016).
 48. Lv, F., Liang, H., Yuan, Q. & Li, C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Res. Int.* **44**, 3057–3064 (2011).

49. Bajpai, V. K., Sharma, A. & Baek, K. H. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control* **32**, 582–590 (2013).
50. Oz, M., Lozon, Y., Sultan, A., Yang, K. H. S. & Galadari, S. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. *Pharmacol. Ther.* **152**, 83–97 (2015).
51. Trombetta, D. *et al.* Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2474–2478 (2005).
52. Huang, D. F., Xu, J. G., Liu, J. X., Zhang, H. & Hu, Q. P. Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria. *Microbiol. (Russian Fed.)* **83**, 357–365 (2014).
53. Cui, H., Zhang, X., Zhou, H., Zhao, C. & Lin, L. Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil. *Bot. Stud.* **56**, (2015).
54. Büsing, F. *et al.* High intake of orange juice and cola differently affects metabolic risk in healthy subjects. *Clin. Nutr.* **38**, 812–819 (2019).
55. Li, C. M. & Yu, J. P. Chemical composition, antimicrobial activity and mechanism of action of essential oil from the leaves of *macleaya cordata* (Willd.) R. Br. *J. Food Saf.* **35**, 227–236 (2015).
56. Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P. & Biliaderis, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Sci.* **82**, 338–345 (2009).
57. Hyldgaard, M., Mygind, T. & Meyer, R. L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* **3**, 1–24 (2012).
58. Balibar, C. J. *et al.* *cwrA*, a gene that specifically responds to cell wall damage in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **156**, 1372–1383 (2010).
59. Mcaleese, F. *et al.* Overexpression of Genes of the Cell Wall Stimulon in Clinical Isolates of *J. Bacteriol.* **188**, 1120–1133 (2006).
60. Muthaiyan, A. *et al.* Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* **112**, 1020–1033 (2012).
61. Wang, L. *et al.* Effects of orange essential oil on intestinal microflora in mice. *J. Sci. Food Agric.* **99**, 4019–4028 (2019).
62. Li, D., Wu, H., Dou, H., Guo, L. & Huang, W. Microcapsule of sweet orange essential oil changes gut microbiota in diet-induced obese rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **505**, 991–995 (2018).
63. Fotschki, B. *et al.* Raspberry pomace alters cecal microbial activity and reduces secondary bile acids in rats fed a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* **46**, 13–20 (2017).
64. Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F. & Staels, B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.* **89**, 147–191 (2009).
65. Ridlon, J. M., Kang, D. J. & Hylemon, P. B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* **47**, 241–259 (2006).
66. Ridlon, J. M., Kang, D. J., Hylemon, P. B. & Bajaj, J. S. Bile acids and the gut microbiome. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **30**, 332–338 (2014).
67. Ussar, S. *et al.* Interactions between gut microbiota, host genetics and diet modulate the predisposition to obesity and metabolic syndrome. *Cell Metab.* **22**, 516–530 (2015).
68. Fiamoncini, J., Curi, R. & Daniel, H. Metabolism of bile acids in the post-prandial state. *Essays Biochem.* **60**, 409–418 (2016).
69. Li, T. & Chiang, J. Y. L. Bile acids as metabolic regulators. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **31**, 159–165 (2015).

70. Fiamoncini, J. *et al.* Determinants of postprandial plasma bile acid kinetics in human volunteers. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **313**, G300–G312 (2017).
71. Martinot, E. *et al.* Bile acids and their receptors. *Mol. Aspects Med.* **56**, 2–9 (2017).
72. Wu, T. *et al.* Effects of rectal administration of taurocholic acid on glucagon-like peptide-1 and peptide YY secretion in healthy humans. *Diabetes, Obes. Metab.* **15**, 474–477 (2013).
73. Meyer-Gerspach, A. C. *et al.* Effects of chenodeoxycholic acid on the secretion of gut peptides and fibroblast growth factors in healthy humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 3351–3358 (2013).
74. Potthoff, M. J. *et al.* Colesevelam suppresses hepatic glycogenolysis by TGR5-mediated induction of GLP-1 action in DIO mice. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **304**, 371–380 (2013).
75. Bala, V. *et al.* Release of GLP-1 and PYY in response to the activation of G protein-coupled bile acid receptor TGR5 is mediated by Epac/PLC- ϵ pathway and modulated by endogenous H₂S. *Front. Physiol.* **5**, 1–11 (2014).
76. Rosano, G. M. C., Vitale, C., Marazzi, G. & Volterrani, M. Menopause and cardiovascular disease: The evidence. *Climacteric* **10**, 19–24 (2007).
77. Watanabe, M. *et al.* Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* **439**, 484–489 (2006).
78. Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L. C. & Forman, B. M. Wang, m 1999. **3**, 543–553 (1999).
79. Watanabe, M. *et al.* Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J. Clin. Invest.* **113**, 1408–1418 (2004).
80. Ma, K. *et al.* Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis Find the latest version : Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. **116**, 1102–1109 (2006).
81. Lambert, G. *et al.* The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278**, 2563–2570 (2003).
82. Teodoro, J. S., Rolo, A. P. & Palmeira, C. M. Hepatic FXR: Key regulator of whole-body energy metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **22**, 458–466 (2011).
83. Düfer, M., Hörth, K., Krippeit-Drews, P. & Drews, G. The significance of the nuclear farnesoid X receptor (FXR) in β cell function. *Islets* **4**, 333–338 (2012).
84. Düfer, M. *et al.* Bile acids acutely stimulate insulin secretion of mouse β -cells via farnesoid X receptor activation and K ATP channel inhibition. *Diabetes* **61**, 1479–1489 (2012).
85. Stayrook, K. R. *et al.* Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology* **146**, 984–991 (2005).
86. Duran-Sandoval, D. *et al.* Glucose Regulates the Expression of the Farnesoid X Receptor in Liver. *Diabetes* **53**, 890–898 (2004).
87. Han, C. Y. Update on FXR biology: Promising therapeutic target? *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
88. Sun, L. *et al.* Ablation of gut microbiota alleviates obesity-induced hepatic steatosis and glucose intolerance by modulating bile acid metabolism in hamsters. *Acta Pharm. Sin. B* **9**, 702–710 (2019).
89. IBGE. Produção brasileira de laranja em 2012. 1–4 (2013).
90. Luo, L. *et al.* Assessment of serum bile acid profiles as biomarkers of liver injury and liver disease in humans. *PLoS ONE* vol. 13 (2018).
91. Shao, J. W. *et al.* Role of bile acids in liver diseases mediated by the gut microbiome. *World J. Gastroenterol.* **27**, 3010–3021 (2021).
92. Chen, J. *et al.* Ratio of Conjugated Chenodeoxycholic to Muricholic Acids is

- Associated with Severity of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Obesity* **27**, 2055–2066 (2019).
93. Wang, X., Chen, L., Wang, H., Cai, W. & Xie, Q. Modulation of bile acid profile by gut microbiota in chronic hepatitis B. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 2573–2581 (2020).
 94. Evangelakos, I., Heeren, J., Verkade, E. & Kuipers, F. Role of bile acids in inflammatory liver diseases. *Semin. Immunopathol.* **43**, 577–590 (2021).
 95. Li, T. & Chiang, J. Y. L. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacol. Rev.* **66**, 948–983 (2014).
 96. Gaikwad, N. W. Bileome: The bile acid metabolome of rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **533**, 458–466 (2020).
 97. Greenwood, J., Adu, J., Davey, A. J., Abbott, N. J. & Bradbury, M. W. B. The effect of bile salts on the permeability and ultrastructure of the perfused, energy-depleted, rat blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **11**, 644–654 (1991).
 98. Quinn, M. *et al.* Bile acids permeabilize the blood brain barrier after bile duct ligation in rats via Rac1-dependent mechanisms. *Dig. Liver Dis.* **46**, 527–534 (2014).
 99. Jia, W., Xie, G. & Jia, W. Bile acid–microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 111–128 (2018).
 100. Zhao, X. M., Montet, A. M. & Montet, J. C. B Muricholic Acid: a New Hepatoprotective Agent. *J. Nutr. Biochem.* **4**, 105–112 (1993).
 101. Gaillard, D. *et al.* Muricholic acids promote resistance to hypercholesterolemia in cholesterol-fed mice. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
 102. Amaral, J. D., Viana, R. J. S., Ramalho, R. M., Steer, C. J. & Rodrigues, C. M. P. Bile acids: Regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J. Lipid Res.* **50**, 1721–1734 (2009).
 103. Péan, N., Doignon, I. & Tordjmann, T. Bile acids and liver carcinogenesis: TGR5 as a novel piece in the puzzle? *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **37**, 226–229 (2013).
 104. Katsuma, S., Hirasawa, A. & Tsujimoto, G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. **329**, 386–390 (2005).
 105. Kim, H. & Fang, S. Crosstalk between FXR and TGR5 controls glucagon-like peptide 1 secretion to maintain glycemic homeostasis. **6055**, 140–146 (2019).
 106. Valassi, E., Scacchi, M. & Cavagnini, F. Neuroendocrine control of food intake. 158–168 (2008) doi:10.1016/j.numecd.2007.06.004.

ANEXO A – CERTIFICADO DE QUALIDADE E AUTENTICIDADE



Óleos Essenciais, Matérias Primas para Indústria Alimentícia, Perfumaria e Aromas.

Certificado de Qualidade e Autenticidade

Nós certificamos que Óleo Essencial Laranja, Óleo Essencial Limão, Óleo Essencial Tangerina, Óleo Essencial Mandarina, Oil Phase de Laranja, D'limoneno, Óleos Concentrados e Terpenos fornecidos pela Citroflavor, são extraídos a partir de frutas selecionadas, são produtos de grau alimentício e usados para a produção de alimentos.

Os produtos são 100% naturais e obtidos de matéria-prima de origem vegetal, do Brasil, selecionada e colhida em período adequado durante a safra, por meio de processo físico, sem adição de aditivos, solventes, preservantes e agentes colorantes. Nenhum dos produtos, instalações, matéria-prima ou embalagem são submetidos a irradiação.

Os produtos não contêm qualquer ingrediente ou são fabricados com matéria-prima geneticamente modificada de acordo com a legislação CE 1830/2003/EC sobre rotulagem e rastreabilidade e 1829/2003/EC sobre alimentos geneticamente modificados.

Nossos produtos são "convencionais", não sujeitos a rotulagem de alergênico de acordo com a legislação CE 1169/2011 e RDC 26/2015.

Os produtos estão dentro dos limites de resíduos de pesticidas e metais pesados conforme estabelecido pela FAO / OMS sobre Normas Alimentares, através da Comissão do Codex Alimentarius e Padrões Regulatórios da Comunidade Europeia.

O produto é livre de: Cereais contendo *glúten* (Trigo, centeio, cevada, aveia e suas estirpes hibridizadas), *Crustáceos*, *Ovos*, *Peixe*, *Amendoim*, *Soja*, *Leite*, *Amêndoa* (*Prunus dulcis*, sin.: *Prunus amygdalus*, *Amygdalus communis* L.), *Avelãs* (*Corylus* spp.), *Castanha-de-caju* (*Anacardium occidentale*), *Castanha-do-brasil* ou *castanha-do-pará* (*Bertholletia excelsa*), *Macadâmias* (*Macadamia* spp.), *Nozes* (*Juglans* spp.), *Pecãs* (*Carya* spp.), *Pistaches* (*Pistacia* spp.), *Pinoli* (*Pinus* spp.), *Castanhas* (*Castanea* spp.), *Sulfitos > 10 ppm*, *Aipo*, *Mostarda*, *Tremoços*, *Gergelim*, *Moluscos*, *Semente de Sésamo*, *Produtos Animais* (*Carne bovina*, *suína* e *frango*), *Amido*, *Levedura* e *Látex natural*.

O shelf life do produto é de 18 meses a partir da data de fabricação se mantido em temperatura ambiente (25°C).

Wesley Diego Pavini
Analista de Controle de Qualidade
Citraflavor Óleos Essenciais

Catanduva, 26 de junho de 2018.

CITROFLAVOR INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EIRELI

Rua Taubaté, 2059 - Jardim Primavera - Catanduva/SP - CEP: 13810-175

Email: citraflavor@citraflavor.com.br - Site: www.citraflavor.com.br

Fone/Fax: +55 (17) 3331-4242

ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



Certificado de Aprovação

Certifica-se que o Sistema de Gestão de Segurança de Alimentos da:

Citroflavor Indústria e Comércio de Óleos Essenciais – EIRELI

Rua Taubaté 2059 - Jardim Primavera, Catanduva, SP, 15810-175, Brasil

foi avaliado pelo LRQA e está em conformidade com os requisitos de:
Food Safety System Certification (FSSC) 22000 (Version 4.1)

Esquema de certificação para Sistemas de Segurança de Alimentos incluindo:
ISO 22000:2005, ISO/TS 22002-1:2009
e requisitos adicionais da FSSC 22000

Categoria de cadeia Alimentar: K

Chris Koci - President, LRQA Americas

Emitido por: Lloyd's Register do Brasil Ltda

Por e em nome de: Lloyd's Register Quality Assurance Limited

Número de identidade do Certificado: 10115330
Data da Decisão de Certificação: 07 de Agosto de 2018
Data de Certificação inicial: 22 de Junho de 2017
Data de Emissão Atual: 07 de Agosto de 2018
Data de Validade: 21 de Junho de 2020

Números de Aprovação: FSSC 22000 – 00010111

O certificado é aplicável a:
Produção de Óleos Essenciais Cítricos, Terpenos e Frações Especiais, desde o Recebimento da
Matéria-Prima Até a Expedição dos Produtos.



001



A este documento certificado pode ser conferido no site de busca FSSC 22000 de organizações certificadas, disponível em www.fssc22000.com.
Lloyd's Register Quality Assurance Limited, its officers and subsidiaries, including Lloyd's Register Quality Assurance Limited (LRQA), and their respective officers, employees or agents are individually and collectively referred to in this notice as 'Lloyd's Register'. Lloyd's Register assumes no responsibility and shall not be liable to any person for any loss, damage or expense caused by reliance on the information or advice in this document or for any other cause, unless that person has agreed a contract with the relevant Lloyd's Register entity for the provision of the information or advice and it has been agreed in writing that the information or advice is to be provided on the terms and conditions set out in that contract.
Emitido por Lloyd's Register do Brasil Ltda, Rua Helena, 238 - 4º andar, Via Urbana, São Paulo/SP 04032-010, Brasil. Por e em nome de Lloyd's Register Quality Assurance Limited, 1 Trinity Place, Borehamwood, Hertfordshire SG8 1TB, British Kingdom.

ANEXO C – CERTIFICADO DE ANÁLISE



Óleos Essenciais, Matérias Primas para Indústrias Alimentícia, Perfumaria e Aromas

CERTIFICADO DE ANÁLISE

CERTIFICAMOS QUE O PRODUTO MENCIONADO É PURO, AUTÊNTICO E DE ORIGEM BRASILEIRA.


Cliente:	UNIVERSIDADE DE SAO PAULO	Emissão:	22/07/2019
Nota Fiscal:	7781	Code:	DOOT
Produto:	TERPENO DE LARANJA	CAS:	8028-48-8
Denominação Estrangeira:	ORANGE TERPENE	Quantidade (Kgs):	10,00
No. do Lote:	DOOT-031/19	Validade:	16/12/2020
Data de Fabricação:	25/08/2019		

ORGANOLÉPTICAS	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO
ASPECTO	LIQUIDO LIMPIDO	APROVADO
COR	INCOLOR	APROVADO
ODOR	CARACTERISTICO	APROVADO
FISICO-QUÍMICAS	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO
ALDEIDO EM DECANAL (%)	MIN. 0,30	0,76
DENSIDADE (20° C) + / - 0,005	0,838 - 0,845	0,842
INDICE DE REFRAÇÃO 20° C	1,4680 - 1,4770	1,4709
DLIMONEIO (% GLC)	MIN 95	96,02

Atenção: Prazo de reclamação é de 7 dias após o recebimento do produto. Qualquer irregularidade, contatar o nosso controle de qualidade.

Estocagem: Armazenar em cima de paletes, em temperatura ambiente, protegido da luz solar, em embalagens bem cheias e devidamente fechadas. É recomendável que se avate as condições internas da embalagem a partir de 6 meses de estocagem.

Controle de Qualidade


Wesley Diego Pavini
CRQ-04164156 4ª Região

CITROFLAVOR INDUSTRIA E COMERCIO DE OLEOS ESSENCIAIS EIRELI
RUA TAUBATE, 2059 - JARDIM PRIMAVERA - CATANDUVA/SP - CEP: 15810175

E-mail: qualidade@citroflavor.com.br | www.citroflavor.com.br

Fone/Fax: 55 (17) 3531-4242

ANEXO D – PARECER COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS FCF-USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CEUA/FCF 111.2018-P576

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação dos efeitos do d-limoneno no metabolismo energético de camundongos - modulação da composição da microbiota intestinal e do metabolismo de ácidos biliares.**, registrada com o nº 576, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Prof. Dr. Jarlei Fiamoncini** – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **06 de novembro de 2018**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/11/2018 a 31/01/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo – C57/Bl6
Número de animais	80
Sexo	Macho
Peso/Idade	prox. 28g – 11 semanas
Origem	Biotério FCF-IQ/USP

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo relatório final.

São Paulo, 09 de novembro de 2018.


Prof. Dra. Sabrina Epiphany
Vice-Coordenadora CEUA/FCF/USP