

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO D-LIMONENO NO METABOLISMO DE**  
**ÁCIDOS BILIARES HEPÁTICOS EM CAMUNDONGOS C57/BI6**

**Brunna Genaro**

Trabalho de Conclusão do Curso de  
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo.

Orientador:

Dr. José Fernando Rinaldi Alvarenga

São Paulo

2021

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMO .....	3
INTRODUÇÃO .....	4
OBJETIVOS.....	7
MATERIAIS E MÉTODOS .....	8
RESULTADOS.....	12
DISCUSSÃO.....	20
CONCLUSÃO .....	22
BIBLIOGRAFIA.....	23
ANEXO.....	28

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>Sigla</b>	<b>Significado</b>
<b><math>\alpha</math>-MA</b>	Ácido $\alpha$ -muricólico
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>BHS</b>	Hidrolase de sais biliares
<b><math>\beta</math>-MA</b>	Ácido $\beta$ -muricólico
<b>C57/BI6</b>	Camundongo 57 / Black6
<b>CA</b>	Ácido cólico
<b>CCK</b>	Colecistoquinina
<b>CDCA</b>	Ácido quenodesoxicólico
<b>CEUA/FCF/USP</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
<b>CG</b>	Cromatografia gasosa
<b>CYP7a1</b>	Enzima 7 alfa-hidrolase de colesterol
<b>D2</b>	Iodotironina desidase do tipo 2
<b>DCA</b>	Ácido deoxicólico
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>ERK</b>	Quinase regulada por sinal extracelular
<b>Fgf15</b>	Fator de crescimento de fibroblasto 15
<b>FXR</b>	Nucleares como o farnesoide
<b>GCA</b>	Ácido glicólico
<b>GDCA</b>	Ácido glicodeoxicólico
<b>GLCA</b>	Ácido glicolitocólico
<b>GLP-1</b>	Glucagon-like peptide-1
<b>GUDCA</b>	Ácido glicoursodeoxicólico
<b>HL</b>	Hiperlipídica
<b>ITT</b>	Teste oral de intolerância à insulina
<b>LCA</b>	Ácido litocólico

<b>LC-ESI-qToF-MS/MS</b>	Cromatografia Líquida acoplada a ionização por eletrospray com analisador de tempo de voo e detector de espectrometria de massa de alta resolução
<b>NAFLD</b>	Esteatose hepática não-alcóolica
<b>NL</b>	Normolipídica
<b>OGTT</b>	Teste oral de intolerância à glicose
<b><math>\omega</math>-MA</b>	Ácido $\omega$ -muricólico
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>SHP</b>	Parceiro heterodimérico
<b>T3</b>	Triiodotironina
<b>T4</b>	Tiroxina
<b>TAE</b>	Tecido adiposo epididimal
<b>T<math>\alpha</math>MA</b>	Ácido tauro $\alpha$ -muricólico
<b>T<math>\beta</math>MA</b>	Ácido tauro $\beta$ -muricólico
<b>T<math>\omega</math>MA</b>	Ácido tauro $\omega$ -muricólico
<b>TAR</b>	Tecido adiposo retroperitoneal
<b>TAS</b>	Tecido adiposo subcutâneo
<b>TCA</b>	Ácido taurocólico
<b>TCDCA</b>	Ácido tauroquenodeoxicólico
<b>TDCA</b>	Ácido taurodeoxicólico
<b>TG</b>	Triglicerídeos
<b>TGR5</b>	Takeda G-protein receptor 5
<b>TICE</b>	Excreção de colesterol a nível intestinal
<b>TLCA</b>	Ácido taurolitocólico
<b>UDCA</b>	Ácido ursodeoxicólico
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muita baixa densidade

## RESUMO

GENARO, B. **Avaliação dos efeitos do D-limoneno no metabolismo de ácidos biliares hepáticos em camundongos C57/BI6**. 2021 no. f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Palavras-chave: ácidos biliares, D-limoneno, suplementação, dieta hiperlipídica

**INTRODUÇÃO:** Os ácidos biliares (AB), moléculas sintetizadas a partir de colesterol, são liberados pela bile para facilitar a digestão de lipídios da dieta e de vitaminas lipossolúveis no trato intestinal. Em contato com a microbiota intestinal, os AB podem ser desconjugados de taurina e glicina e sofrer reações de oxidação, epimerização e desidroxilação, transformando-os em AB secundários, antes de serem absorvidos pelo epitélio intestinal para retornar ao fígado via circulação entero-hepática. Uma parte desse *pool* de AB reabsorvidos escapa para a circulação sistêmica, no qual vão desempenhar um papel importante ativando receptores presentes em diferentes tecidos, atuando como hipoglicemiantes e regulando o metabolismo energético. Portanto, a microbiota intestinal é fundamental para a modulação do perfil de AB que pode gerar impacto no metabolismo energético. Uma maneira de modular o perfil de AB seria alterar a composição da microbiota intestinal, sendo o D-limoneno um possível composto capaz de exercer essa função por sua atividade antimicrobiana. **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos da suplementação de D-limoneno no metabolismo de AB em camundongos C57/BI6 submetidos à dieta hiperlipídica. **MATERIAIS E MÉTODOS** Camundongos machos C57/BI6 foram distribuídos em 4 grupos, que receberam a dieta normolipídica (NL) ou a dieta hiperlipídica (HL). Após uma semana de aclimatização, os camundongos foram divididos em subgrupos e receberam a dieta suplementada com D-limoneno com 0, 0.1 e 0.8% por 6 semanas. Os AB presentes no fígado e plasma foram quantificados por espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-qToF-MS/MS). **RESULTADOS:** O grupo de camundongos que recebeu a dieta hiperlipídica (HL) apresentou um aumento de 60% da concentração do ácido biliar  $\beta$ -murocólico ( $\beta$ -MA) quando comparado ao grupo normolipídico (NL). Com a suplementação de D-Limoneno (DL) houve uma redução da concentração de todos os AB no fígado para o grupo HL 0.8%. O grupo HL que recebeu a dieta com 0.1% teve um aumento de 45% de ácido  $\omega$ -murocólico ( $\omega$ -MA) hepático quando comparado com outros grupos que receberam a dieta hiperlipídica. O grupo HL 0.1% também apresentou redução do ganho de peso, o que possivelmente, poderia ter alguma relação com a mudança da concentração de  $\omega$ -MA. Outro resultado relevante é o aumento expressivo do  $\omega$ -MA conjugado a taurina (T $\omega$ MA), mesmo não apresentando diferença significativa. Um resultado semelhante foi observado para o ácido deoxicólico (DCA). O DCA,  $\omega$ -MA e o T $\omega$ MA são oriundos da metabolização dos AB primários pela microbiota intestinal. Portanto, o limoneno poderia estar modulando a microbiota intestinal e, indiretamente, aumentando o conteúdo desses compostos. **CONCLUSÃO:** A alteração no perfil dos AB pode estar relacionada com a suplementação de D-Limoneno na dieta dos camundongos. O DCA,  $\omega$ -MA e o

T $\omega$ MA são oriundos da metabolização dos AB primários pela microbiota intestinal. Portanto, indiretamente, o limoneno modelou o perfil desses AB.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Metabolismo de ácidos biliares

Os AB são sintetizados no fígado pela degradação do colesterol em AB primários, que possuem uma estrutura esteroideal com a presença de hidroxilas em diferentes posições, dando às moléculas um caráter anfifílico. Esta característica anfifílica reflete-se na função detergente dos AB, permitindo a formação de micelas e facilitando a digestão de lipídios da dieta e de vitaminas lipossolúveis no trato intestinal (DE AGUIAR VALLIM; TARLING; EDWARDS, 2013). A *CYP7a1* é a principal enzima responsável pela hidroxilação do colesterol, dando início à via majoritária de síntese de AB (PERINO *et al.*, 2021).

Os ácidos cólico (CA) e quenodesoxicólico (CDCA), classificados como AB primários, são conjugados à glicina e à taurina nos hepatócitos e, junto com colesterol, fosfolipídios e bilirrubina, formam a bile. Essa é armazenada na vesícula biliar até ser liberada no duodeno, processo sinalizado pela colecistoquinina (CCK) secretada em resposta à presença de alimentos no estômago e proporcionalmente à presença de lipídios na dieta (DE AGUIAR VALLIM; TARLING; EDWARDS, 2013).

Aproximadamente 90% da bile secretada será reabsorvida pelo epitélio intestinal e, via circulação entero-hepática, retornará ao fígado. Entretanto, parte dos AB podem ser desconjugados pela microbiota intestinal antes de serem absorvidos. A microbiota também pode oxidar, epimerizar e desidroxilar os AB primários e transformá-los em AB secundários como o litocólico (LCA), ursodeoxicólico (UDCA) e deoxicólico, (DCA) que também serão majoritariamente reabsorvidos pelo epitélio intestinal ou, em menores proporções, eliminados pelas fezes (WAHLSTRÖM *et al.*, 2016).

Uma parte dos AB que retornam ao fígado escapam para a circulação sistêmica, onde desempenham papel importante ativando receptores presentes em diferentes tecidos. Essas funções ainda não foram totalmente elucidadas, mas sabe-se que os AB são agonistas de receptores nucleares como o farnesoide

(FXR) e receptor de membrana acoplado à proteína G (TGR5), que alteram a expressão gênica e podem levar a mudanças no metabolismo lipídico (DE AGUIAR VALLIM; TARLING; EDWARDS, 2013).

As diferentes posições e o número de hidroxilas nas moléculas dos AB secundários conferem a essas moléculas propriedades físico-químicas distintas dos AB primários, impactando a seletividade da ativação dos seus receptores. Por exemplo, a presença do CDCA ativa o FXR hepático aumentando a depuração de triglicérides plasmáticos e diminuindo a síntese hepática de lipídios (CLAUDEL; STAELS; KUIPERS, 2005). O FXR tem papel importante no metabolismo lipídico ao regular a síntese de AB (WAHLSTRÖM *et al.*, 2016). Induzido por AB, o FXR inibe a síntese de *de novo* AB ao inibir a expressão do gene que sintetiza a *CYP7a1* (PERINO *et al.*, 2021).

Por outro lado, o TGR5 tem o LCA como mais importante agonista, que ao ativar células endócrinas do epitélio intestinal melhoram a secreção da incretina *glucagon-like peptide-1* (GLP-1). Esse aumento de incretinas estimula a síntese de insulina e aumenta a sensibilidade dos tecidos a esse hormônio. Já nos músculos e no tecido adiposo marrom, o TGR5 regula a homeostase energética ao ativar a iotironina desiodase do tipo 2 (D2) elevando a conversão da tiroxina T4 (baixa atividade biológica) para o hormônio tireoidiano mais ativo, T3 (SCHAAP; TRAUNER; JANSEN, 2014). O aumento de T3, devido aos AB, induz a atividade traducional do D2 *mRNA* promovendo maior atividade mitocondrial. Essa atividade gera um maior gasto energético pelo alto consumo de oxigênio para a oxidação de ácidos graxos (WATANABE *et al.*, 2006) (Figura 1).

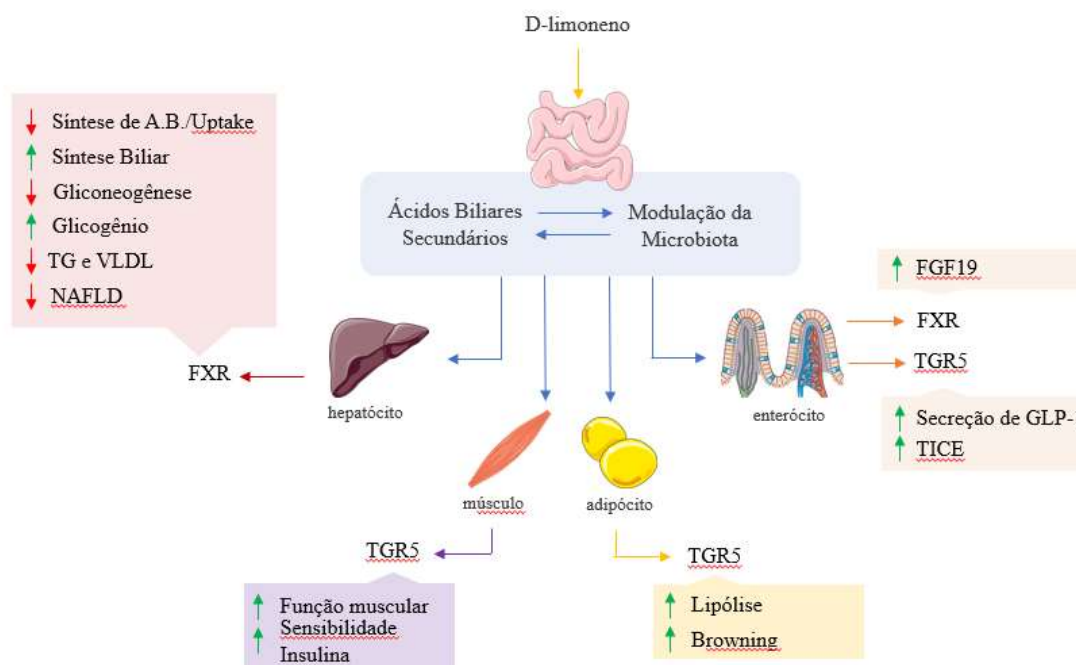
Portanto, a microbiota intestinal é fundamental no metabolismo dos AB, modificando o perfil de AB e seu impacto no metabolismo.

## **1.2 D-limoneno na microbiota intestinal**

Uma maneira de modular o perfil de AB é alterar a composição da microbiota intestinal, sendo o D-limoneno um possível composto capaz de exercer essa função. O D-limoneno é o principal monoterpene encontrado na casca da laranja, e é produto do metabolismo secundários das plantas. Além disso, é muito

utilizado nas indústrias alimentícia e cosmética, pois possui forte odor característico, além de ter função antimicrobiana (VIEIRA *et al.*, 2018). O D-limoneno, assim como outros terpenos, são empregados na prevenção e tratamentos de doenças devido a seus diversos efeitos como antiinflamatório (HIROTA *et al.*, 2010; KUMMER *et al.*, 2013) e antioxidante (MURALI; KARTHIKEYAN; SARAVANAN, 2013; VIEIRA *et al.*, 2018).

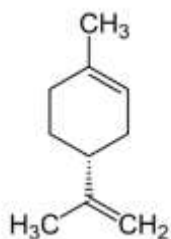
**Figura 1** - Possíveis vias de ativação do D-limoneno na regulação do metabolismo energético.



O limoneno ( $C_{10}H_{16}$ ) (Figura 2) possui baixo peso molecular (136,2 g/mol) e alto coeficiente de partição ( $\log P = 4,57$ ), que confere alta lipofilicidade, e possui dois isômeros; D-limoneno e L-limoneno, sendo o D-limoneno mais abundante na casca da laranja (SCHMIDT; GÖEN, 2017).

Este monoterpene tem rápida absorção epitelial intestinal e rápida metabolização, pois seus metabólitos no plasma alcançam concentração máxima entre 1 a 2 horas após administração e possuem acelerada eliminação, com tempo de meia-vida entre 0,7-2,5 horas (SCHMIDT; GÖEN, 2017).

**Figura 2** - Estrutura molecular do D-limoneno (PubChem, CID 440917).



Os óleos essenciais, ricos em monoterpenoides, atuam como antibacterianos por sua capacidade de atravessar a membrana bacteriana, devido a sua hidrofobicidade, sendo este seu principal mecanismo de ação (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994). Os monoterpenos desestruturam a bicamada lipídica das membranas dos microrganismos e das mitocôndrias, levando ao aumento da permeabilidade, desequilibrando a concentração intracelular de prótons e permitindo que compostos citoplasmáticos escapem para o meio extracelular (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994; TROMBETTA *et al.*, 2005). Assim, o D-limoneno poderia modular a microbiota intestinal por sua ação antimicrobiana, selecionando determinadas bactérias, e possivelmente impactar o metabolismo de AB.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da suplementação com D-limoneno no metabolismo de AB em camundongos C57/Bl6.

### 2.2. Objetivos específicos

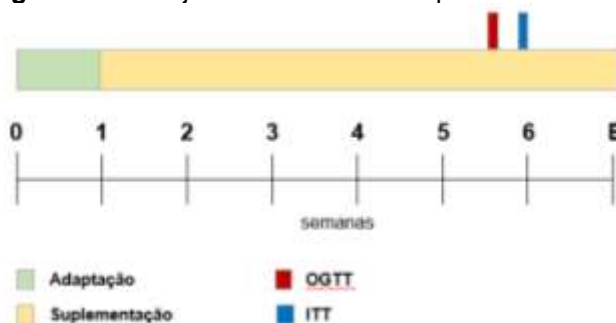
- Identificar e quantificar os AB no fígado dos camundongos suplementados com D-limoneno.
- Avaliar o efeito do D-limoneno no metabolismo de AB pela microbiota intestinal.
- Avaliar se a modulação da composição dos AB, após suplementação com D-limoneno, impacta o metabolismo energético.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Estudo *in vivo*

O início da suplementação do primeiro dos três lotes de camundongos machos (C57/Bl6) foi em setembro de 2019. O experimento aprovado pela CEUA da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (protocolo n. 576) (Anexo I), com camundongos com 11 semanas de idade foram submetidos a rações normolipídicas e hiperlipídicas, às quais foram adicionados D-limoneno nas concentrações de 0,1, e 0,8%, além de um controle sem D-limoneno. O ganho de peso e o consumo alimentar foram monitorados ao longo do experimento, além da coleta semanal de fezes durante as 6 semanas do experimento (Figura 3). Na 6ª e última semana da suplementação, os animais foram submetidos à eutanásia sob anestesia por isoflurano para amostragem de plasma e tecidos (fígado e tecido adiposo) e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Figura 3** - Planejamento do ensaio experimental *in vivo*.



#### 3.2. Teste oral de intolerância à glicose (OGTT) e à insulina (ITT)

Os animais foram submetidos ao OGTT na 5ª semana do experimento. O teste foi realizado às 13:00, 6 horas após a transferência dos animais para caixas limpas e sem acesso a ração. A glicemia foi determinada com um glicosímetro, coletando-se sangue da extremidade da cauda dos animais nos tempos -10, 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a gavagem de uma solução de D-glicose (2g/2Kg de peso corpóreo). Na 5ª semana do experimento, os camundongos foram submetidos ao teste de ITT, para avaliar a sensibilidade a esse hormônio. O

procedimento foi realizado de forma semelhante ao OGTT, substituindo-se a gavagem de glicose por uma injeção intraperitoneal de insulina a 0,75 U/Kg, sendo que a glicemia foi determinada nos tempos -7, 0, 14, 21, 28 e 35 minutos após a injeção de insulina

### **3.3. Análise dos AB**

#### **3.3.1. Reagentes**

Os padrões de AB que incluem cholic acid (CA), chenodeoxycholic acid (CDCA), deoxycholic acid (DCA), ursodeoxycholic acid (UDCA), lithocholic acid (LCA),  $\alpha$ -murocholic acid ( $\alpha$ -MA),  $\beta$ -murocholic acid ( $\beta$ -MA), hyocholic acid/ $\gamma$ -murocholic acid ( $\gamma$ MA), taurocholic acid (T-CA), taurochenodeoxycholic acid (T-CDCA), taurodeoxycholic acid (T-DCA), taurolithocholic acid (T-LCA), tauro- $\alpha$ -murocholic acid (T- $\alpha$ -MA), glycocholic acid (G-CA), glycodeoxycholic acid (G-DCA), glyoursodeoxycholic acid (G-UDCA), glycolithocholic acid (G-LCA) foram adquiridos da Crystal Chem (Elk Grove Village, USA) e os padrões deuterados cholic acid -2,2,4,4-D4 (CA-D4), chenodeoxycholic acid-2,2,4,4,-D4 (CDCA-D4), deoxycholic acid-2,2,4,4-D4 (DCA-D4), ursodeoxycholic acid-2,2,4,4-D4 (UDCA-D4), lithocholic acid-2,2,4,4-D4 (LCA-D4), glycochenodeoxycholic acid-2,2,4,4-D4 (CDCA-D4), glycodeoxycholic acid-2,2,4,4-D4 (G-DCA-D4), glyoursodeoxycholic acid-2,2,4,4-D4 (G-UDCA-D4) and glycolithocholic acid-2,2,4,4-D4 (G-LCA-D4) 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.

#### **3.3.2. Preparo do padrão interno e curva de calibração**

Soluções estoque dos padrões deuterados foram produzidas pela dissolução dos padrões em metanol a uma concentração de 10 mM. A partir dessas soluções, foi preparado um *pool* de padrão interno a uma concentração de 100  $\mu$ M (solução mãe) que foi diluída a uma concentração de 2  $\mu$ M no momento

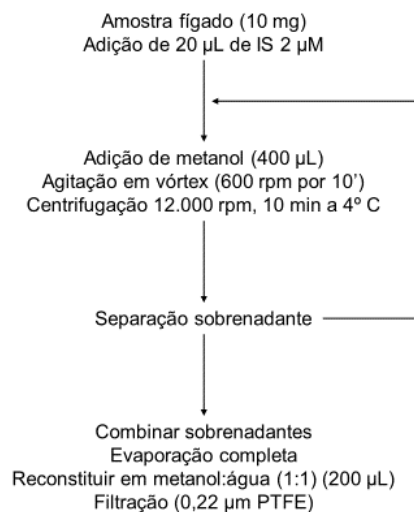
das extrações de acordo com o procedimento para cada tipo de matriz a serem analisadas.

Para realizar a quantificação do conteúdo de AB em amostras de fígado foram também preparados estoques dos padrões de AB em metanol a uma concentração de 10 mM. A partir dessas soluções, foi preparado um *pool* de padrões a uma concentração de 100  $\mu$ 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  $\mu$ M contendo pelo menos 7 concentrações distintas. Foram construídas curvas de calibração na matriz fígado, com intervalo de concentração de 0.05 a 5  $\mu$ M, 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  $\mu$ M 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.

### **3.3.3. Extração das amostras**

As extrações de AB foram realizadas segundo Fromme et al. (2019) (Figura 4). As amostras de fígado foram pulverizadas a frio, assistidas de nitrogênio líquido, usando moinho de bolas. Foram pesados 10 mg de amostra e fortificadas com 20  $\mu$ L de IS (2  $\mu$ M) e extraídas com 400  $\mu$ L de metanol gelado. As amostras foram agitadas a 600 rpm, por 10 min a 4 °C e seguida de centrifugação 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  $\mu$ L metanol:água (1:1, v/v), filtradas com filtros de PTFE de 0.22  $\mu$ m e transferidas para *vials* de cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (CLAE) com *insert* de 250  $\mu$ L.

**Figura 4 - Metodologia de extração dos AB em amostra de fígado.**

### 3.3.4. Análise dos AB por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução

A separação dos AB foi realizada em CLAE modelo UFLC XR (Shimadzu, Japão), equipado com bomba binária e injetor automático com termostato. Para a separação cromatográfica será empregada uma coluna Kinetex C<sub>18</sub> EVO, 2.1 x 100 mm, 1.7 µm (Phenomenex, Califórnia, EUA) que será mantida a uma temperatura de 40 °C. Os AB foram eluídos utilizando água ultrapura com 0.1% de ácido fórmico (fase A) e acetonitrila 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. Foi empregado um fluxo de 400 µL/min e 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 da molécula foi confirmada utilizando o software Data Analysis e comparação com padrões e a quantificação utilizando o software QuantAnalysis da Bruker.

Para assegurar a qualidade dos dados, foi injetado o formato 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 será injetado em diferentes tempos da análise para verificar possíveis deslocamentos nos cromatogramas obtidos no LC-ESI-qToF-MS/MS.

### **3.4. Análise estatística**

A normalidade dos dados obtidos nos experimentos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, no qual determinou a utilização de estatística paramétrica e não-paramétrica. As diferenças dos grupos foram avaliadas por análise de variância simples (ANOVA) com múltiplas comparações pelo método de Tukey ou pelo método de Kruskal Wallis, sendo a distribuição normal ou não, respectivamente. Foram consideradas diferenças significativas com valor de  $p$  inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

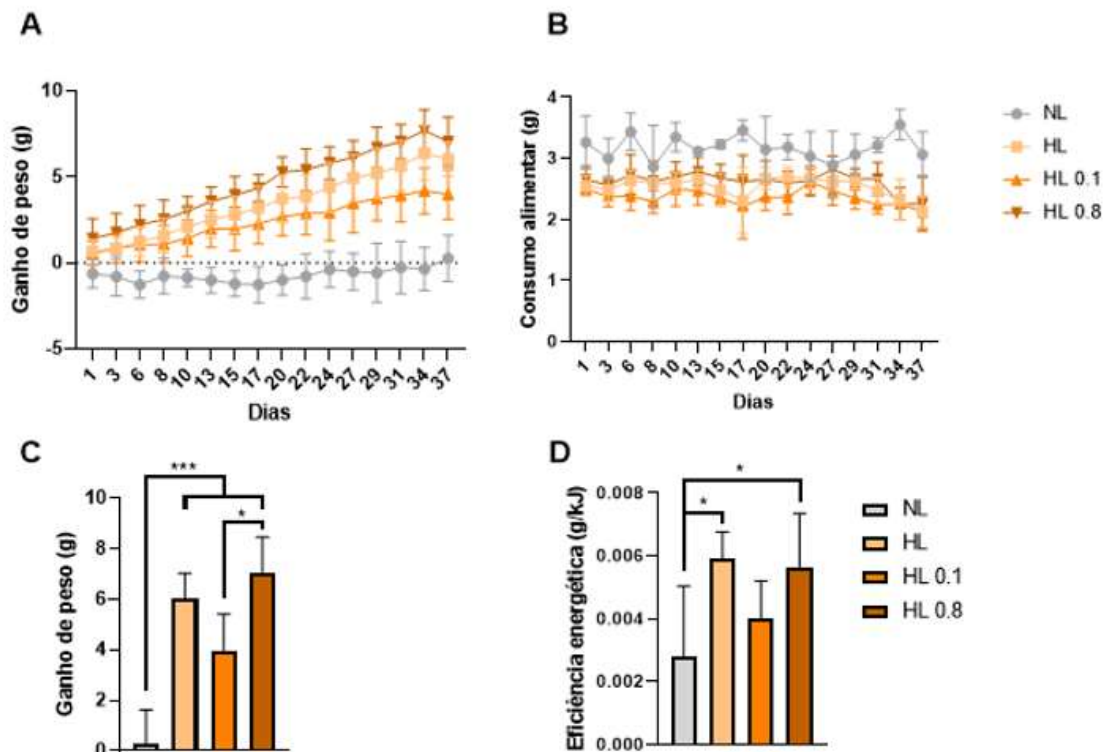
## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Ganho de peso, consumo alimentar e eficiência energética pelos camundongos**

O ganho de peso entre os animais que receberam a ração hiperlipídica, comparado com os animais que receberam a ração normolipídica, foi maior e apresentou diferença significativa ( $p < 0,001$ ), indicando a indução a obesidade pela dieta hiperlipídica. O grupo HL0.8, com média de peso de  $7,05 \pm 1,42$  g, apresentou o maior ganho de peso entre os grupos hiperlipídicos e quando comparado ao grupo HL0.1, com média de  $3,98 \pm 1,44$  g, apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 5-C). O grupo HL0.1 mostrou uma tendência de menor ganho de peso, mas não diferiu quando comparado com o

grupo HL, com média de  $6,05 \pm 0,90$  ( $p \geq 0,05$ ). Esta mesma tendência foi observada durante todo o período de evolução do experimento em relação ao ganho de peso dos animais (Figura 5-A).

**Figura 5** - Ganho de peso dos camundongos, consumo e eficiência energética dos camundongos. A- Ganho de peso (g) durante os 37 dias de experimento. B- Consumo alimentar (g) durante os 37 dias de experimento. C- Ganho de peso (g) ao final do experimento. D- Eficiência energética (g/kJ). (N=8-9 animais/ grupo). Teste de Tukey para comparações múltiplas.



Dentre os grupos de camundongos que receberam a dieta hiperlipídica, o consumo alimentar da ração apresentou o mesmo perfil e não teve diferença entre os grupos ( $p \geq 0,05$ ). O grupo NL apresentou maior consumo alimentar quando comparado aos grupos que receberam a dieta hiperlipídica e devido a variação no consumo, tampouco houve diferenças (Figura 5-B).

O grupo NL apresentou menor eficiência energética,  $0,003 \pm 0,002$  g/g, quando comparado com os outros grupos analisados, com diferença estatística apenas para os grupos HL e HL0.8 ( $p < 0,05$ ),  $0,006 \pm 0,001$  e  $0,006 \pm 0,002$  g/g, respectivamente (Figura 5-D). Os animais do grupo HL0.1 apresentaram uma

tendência para uma menor eficiência energética,  $0.004 \pm 0.001$  g/g mas não diferiu estatisticamente dos outros grupos hiperlipídicos e tampouco do grupo NL ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 5-D). Portanto, os animais que ingeriram a dieta hiperlipídica com 0,1% de D-limoneno tiveram o mesmo consumo que os demais grupos hiperlipídicos, porém essas calorias não foram convertidas em ganho de peso, indicado pela menor eficiência energética.

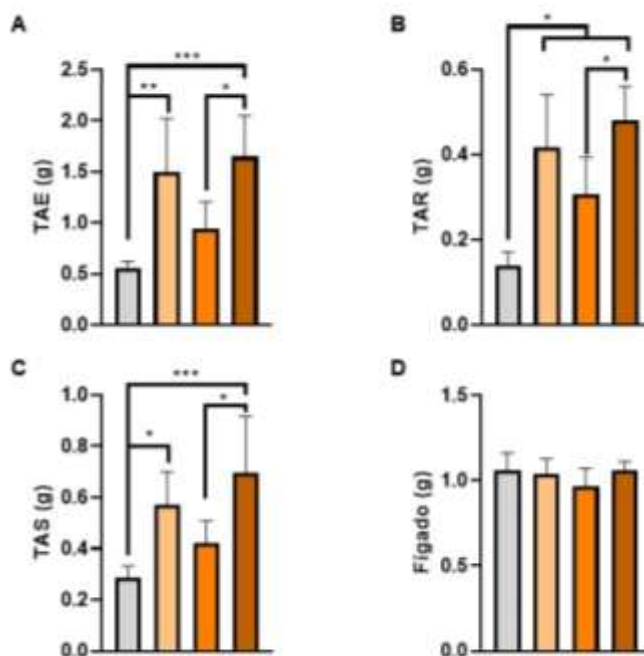
#### **4.2. Peso dos depósitos de gordura e fígado.**

Todos os animais que foram tratados com a ração hiperlipídica, no geral, apresentaram maior conteúdo de tecido adiposo branco em relação à massa corpórea, comparado aos camundongos que receberam a ração normolipídica (Figura 6-A,B,C).

O grupo HL0.1 apresentou redução do depósito de tecido adiposo epididimal (TAE), com massa de  $0.94 \pm 0.24$  g, quando comparado ao grupo HL0.8, com massa de  $1.65 \pm 0.37$  g, apresentando diferença estatística ( $p < 0.05$ ). Entretanto, quando comparado ao grupo HL, com  $1.50 \pm 0.48$  g de TAE, não houve diferença estatística ( $p \geq 0,05$ ). O grupo NL, com média de  $0.56 \pm 0.06$  g de TAE, apresentou menor acúmulo de gordura com diferença significativa em relação ao grupo HL ( $p < 0.01$ ) e ao grupo HL0.8 ( $p < 0.001$ ) (Figura 6-A).

Em relação ao tecido adiposo retroperitoneal (TAR), o grupo NL, com  $0.14 \pm 0.03$  g de TAR, apresentou menor acúmulo dessa reserva lipídica quando comparado aos grupos alimentados com dieta hiperlipídica ( $p < 0.05$ ). O grupo HL0.1, com  $0.31 \pm 0.08$  g de TAR, também apresentou menor peso do TAR ao ser comparado ao grupo HL0.8, com  $0.48 \pm 0.07$  g ( $p < 0.05$ ). Houve uma tendência de menor acúmulo de gordura do TAR no grupo HL0.1 em relação ao grupo HL, com  $0.42 \pm 0.11$  g, mas não foi observada diferença estatística significativa ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 6-B).

**Figura 6** - Análise dos pesos do tecido adiposo e do fígado após eutanásia (g). A- Tecido adiposo epididimal. B- Tecido adiposo retroperitoneal. C- Tecido adiposo subcutâneo. D- Fígado. (N=8-9 animais/ grupo). Teste de Tukey para comparações múltiplas.

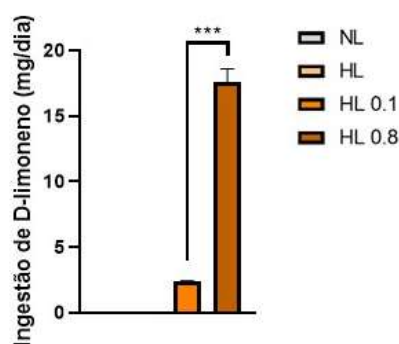


O grupo HL0.1 apresentou menor ganho do depósito de tecido adiposo subcutâneo (TAS), com  $0.42 \pm 0.08$  g de TAS, quando comparado ao grupo HL0.8, com  $0.70 \pm 0.20$  g de TAS ( $p < 0.05$ ). Entretanto, quando comparado ao grupo HL, com  $0.57 \pm 0.12$  g de TAS, não houve diferença estatística ( $p \geq 0,05$ ). O grupo NL, com  $0.29 \pm 0.04$  g de TAS apresentou menor conteúdo de depósito de gordura em relação ao grupo HL ( $p < 0.05$ ) e ao grupo HL0.8 ( $p < 0.001$ ) (Figura 6-C).

Apesar do maior consumo calórico dentre os grupos que receberam a dieta hiperlipídica, não houve diferença de peso no fígado entre os grupos após a eutanásia ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 6-D).

Dentre os camundongos que receberam a dieta hiperlipídica suplementada com D-limoneno, a ingestão, por mg/dia, do monoterpeno foi significativamente maior no grupo HL0.8,  $17,55 \pm 1,04$  mg de D-limoneno/dia, quando comparada com grupo HL0.1, com  $2,37 \pm 0.13$  mg de D-limoneno/dia (Figura 7).

**Figura 7** - Ingestão de D-limoneno (mg/dia) pelos camundongos. (N=8-9 animais/ grupo). Teste de Tukey para comparações múltiplas.



A ração utilizada no experimento foi avaliada para determinar a concentração de D-limoneno. Além disso, foi investigada possíveis perdas do monoterpeno durante o processo de fabricação da ração e durante o período em que os camundongos foram alimentados. A ração hiperlipídica, em que a concentração teórica deveria ser de 0.1% de D-limoneno, apresentou uma concentração real de 0.10g/100g de ração, portanto, não ocorrendo perdas. Já a ração hiperlipídica com concentração teórica de 0.8% de D-limoneno obteve, de concentração real, 0.67g/100g de ração, mostrando uma perda de 16.25% do monoterpeno. Para analisar a estabilidade do D-limoneno durante o experimento realizado, foi simulando as condições ambientais do biotério para verificar a perda dessa molécula quando exposta em uma temperatura de 30°C em 24h. Em relação à concentração inicial, a perda máxima foi de 33%. Com isso, foi estabelecido no protocolo, a troca da ração das gaiolas a cada 2 ou, no máximo, 3 dias, mantendo assim uma ingestão de D-limoneno o mais constante possível durante o experimento (Tabela 1).

#### 4.3. Concentração de ácido biliar hepático

Dentre os AB quantificados no tecido hepático, além dos ácidos primários, conjugados ou não com os aminoácidos taurina ou glicina, também foram detectados os AB secundários. No geral, após a suplementação com D-limoneno,

ocorreu uma redução da concentração dos AB nos grupos hiperlipídicos, principalmente, no grupo HL0.8 (Figura 8).

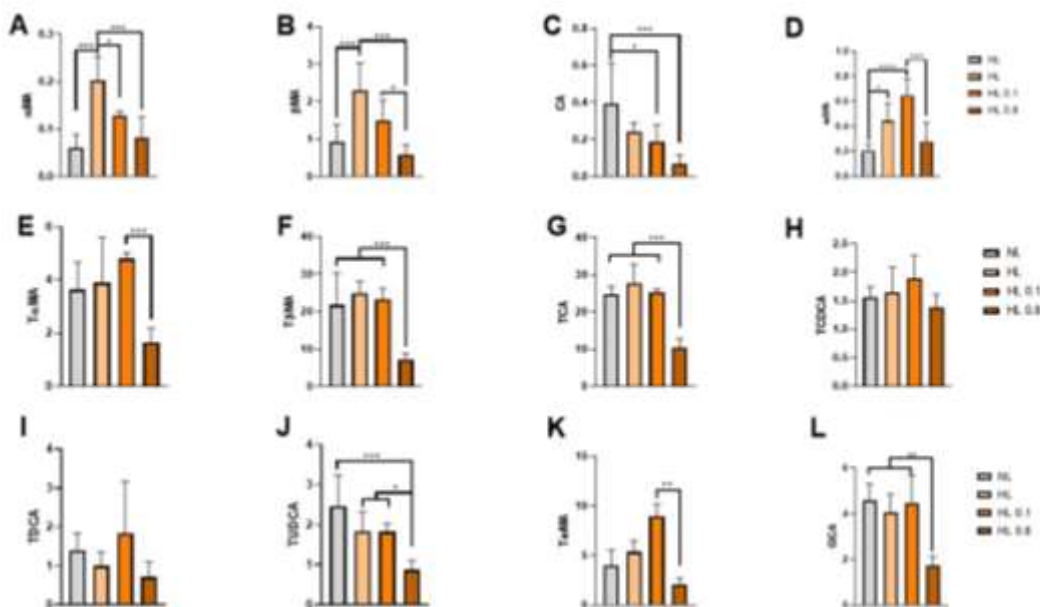
**Tabela 1** - Concentrações de D-limoneno por grupo de camundongo.

Formulação	Concentração teórica (g/100g)	Concentração real (g/100g)
NL 0	-	n.d.
HL 0	-	n.d.
HL 0.1%	0.1	0.10 ± 0.02
HL 0.8%	0.8	0.67 ± 0.02

Os compostos  $\alpha$ MA (Figura 8-A) e  $\beta$ MA (Figura 8-B), principais AB primários em roedores, apresentaram maiores concentrações no grupo HL quando comparado aos grupos hiperlipídicos suplementados com o monoterpene. O grupo NL apresentou menor concentração de  $\alpha$ MA,  $0,06 \pm 0,03 \mu\text{mol/g}$  de fígado, em relação ao grupo HL, com valores de  $0,20 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$  de fígado ( $p < 0.001$ ). Além disso, dentre os grupos alimentados com ração hiperlipídica, o grupo HL apresentou maior concentração do  $\alpha$ MA quando comparado com o grupo HL0.1, com  $0.13 \pm 0.01 \mu\text{mol/g}$  de fígado ( $p < 0.05$ ) e com o grupo HL0.8, com  $0.08 \pm 0.04 \mu\text{mol/g}$  de fígado ( $p < 0.001$ ).

O  $\beta$ MA mostrou resultados semelhantes. Entre os grupos NL,  $0.92 \pm 0.47 \mu\text{mol/g}$  de fígado, e HL,  $2.30 \pm 0.74 \mu\text{mol/g}$  de fígado, houve um aumento na concentração de  $\beta$ MA com a dieta hiperlipídica ( $p < 0.001$ ). O tratamento com D-limoneno também diminuiu a concentração de  $\beta$ MA no grupo HL0.8,  $0.59 \pm 0.25 \mu\text{mol/g}$  de fígado, com diferença significativa em relação ao grupo HL ( $p < 0.001$ ). Foi verificada uma menor quantidade desse ácido biliar no grupo HL0.8 quando comparado ao grupo HL0.1,  $1.49 \pm 0.55 \mu\text{mol/g}$  de fígado, com diferença significativa ( $p < 0.05$ ), porém o grupo HL0.1 não apresentou diferenças em relação ao grupo HL.

**Figura 8 - Análise da concentração de AB hepáticos ( $\mu\text{mol/g}$ ).** A- ácido  $\alpha$ -murocólico. B- ácido  $\beta$ -murocólico. C- ácido cólico. D- ácido  $\omega$ -murocólico. E- ácido  $\alpha$ -taumurocólico. F- ácido  $\beta$ -taumurocólico. G- ácido taurocólico. H- ácido tauroquenodeoxicólico. I- ácido taurodeoxicólico. J- ácido tauroursodeoxicólico. K- ácido  $\omega$ -taumurocólico. L- ácido glicocólico (N=8-9 animais/grupo). Teste de Tukey para comparações múltiplas.



Ao analisar os resultados para os AB primários conjugados com taurina, foi verificado que o T $\alpha$ MA (Figura 8-E) não apresentou concentrações estatisticamente diferentes ( $p \geq 0,05$ ) para os grupos NL,  $3,63 \pm 1.03 \mu\text{mol/g}$  de fígado e HL,  $3,89 \pm 1.70 \mu\text{mol/g}$  de fígado. Já o grupo HL0.1 apresentou maior concentração de T $\alpha$ MA,  $4,80 \pm 0.22 \mu\text{mol/g}$  de fígado, diferindo apenas em relação ao grupo HL0.8 ( $p < 0.001$ ), com concentrações de  $1,65 \pm 0,53 \mu\text{mol/g}$  de fígado.

Em relação ao T $\beta$ MA (Figura 8-F), o grupo HL0.8 apresentou menor concentração do AB,  $7,29 \pm 1,52 \mu\text{mol/g}$  de fígado, em relação aos outros grupos analisados no estudo ( $p < 0.001$ ). Entre as concentrações dos grupos NL, com  $21,81 \pm 8,65 \mu\text{mol/g}$  de fígado, HL, com  $24,95 \pm 3,25 \mu\text{mol/g}$  de fígado, e HL0.1, com  $23,28 \pm 2,96 \mu\text{mol/g}$  de fígado, não foram encontradas diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ).

O CA (Figura 8-C) apresentou um perfil diferente dos outros AB primários não conjugados. A maior concentração do AB foi encontrada no grupo NL,  $0.39 \pm 0.22 \mu\text{mol/g}$  de fígado, com diferença significativa quando comparado com os grupos HL0.1,  $0.019 \pm 0.09 \mu\text{mol/g}$  de fígado, e HL0.8,  $0.07 \pm 0.05 \mu\text{mol/g}$  de fígado, com valores de  $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ , respectivamente. Não houve diferença significativa do conteúdo de CA entre o grupo NL e o HL ( $0.24 \pm 0.05 \mu\text{mol/g}$  de fígado) ( $p \geq 0.05$ ).

O grupo HL0.8 apresentou menor concentração de TCA ( $10.49 \pm 2.36$ ) (Figura 8-G) quando comparados com os outros grupos analisado ( $p < 0.001$ ). Entre as concentrações dos grupos NL ( $24.67 \pm 2.26$ ), HL ( $27.64 \pm 5.24$ ) e HL0.1 ( $25.39 \pm 0.85$ ), não se apresentaram estatisticamente diferentes ( $p \geq 0,05$ ). O CA conjugado a glicina (GCA) (Figura 8-L) apresentou menor concentração no grupo HL0.8, com teor de  $1.71 \pm 0.42 \mu\text{mol/g}$  de fígado, quando comparados com os outros grupos analisado ( $p < 0.01$ ). Entre as concentrações dos grupos NL,  $4.57 \pm 0.74 \mu\text{mol/g}$  de fígado, HL,  $4.05 \pm 0.80 \mu\text{mol/g}$  de fígado e HL0.1  $4.46 \pm 1.22 \mu\text{mol/g}$  de fígado, não foram encontradas diferenças estatísticas ( $p \geq 0,05$ ). As concentrações de TCDCA (Figura 8-H) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos estudados ( $p \geq 0,05$ ).

Ao analisar dos resultados dos AB secundários, AB que já passaram pelo lúmen intestinal, no geral, o grupo HL0.8 apresentou menores concentrações entre os ácidos analisados (Figura 8).

O grupo HL0.1 apresentou maior concentração de  $\omega$ MA, com teor de  $0.65 \pm 0.13 \mu\text{mol/g}$  de fígado, em relação ao grupo HL0.8, com teor de  $0.28 \pm 0.15 \mu\text{mol/g}$  de fígado ( $p < 0.01$ ) e aos grupos NL e HL, com teor de  $0.21 \pm 0.05 \mu\text{mol/g}$  de fígado ( $p < 0.01$ ) e  $0.44 \pm 0.14$  ( $p < 0.01$ ), respectivamente. O grupo NL foi o que apresentou menor concentração e diferiu significativamente em relação ao grupo HL ( $p < 0.05$ ) (Figura 8-D). Em relação ao  $\omega$ MA conjugado a taurina (Figura 8-K), o grupo HL0.1 apresentou maior concentração,  $8.92 \pm 1.25 \mu\text{mol/g}$  de fígado, em relação ao grupo HL0.8, com  $2.03 \pm 0.66 \mu\text{mol/g}$  de fígado ( $p < 0.01$ ). Os grupos NL e HL, com concentrações de  $3.99 \pm 1.55$  e  $X \mu\text{mol/g}$  de fígado não apresentaram estatisticamente diferentes em relação aos outros grupos ( $p \geq 0,05$ ).

O teor de TUDCA (Figura 8-J) apresentou maior concentração no grupo NL, com valores de  $2.47 \pm 0.77 \mu\text{mol/g}$  de fígado, quando comparado com o grupo HL0.8 ( $p > 0.001$ ). Já o grupo HL0.8 apresentou menor concentração de TUDCA,  $0.87 \pm 0.23 \mu\text{mol/g}$  de fígado, em relação aos outros grupos alimentados com ração hiperlipídica, grupo HL e HL0.1 ( $p < 0.05$ ). Entre os grupos HL e HL0.1, com teor de  $1.84 \pm 0.48$  e  $1.83 \pm 0.20 \mu\text{mol/g}$  de fígado, respectivamente, não foram encontradas diferenças estatísticas ( $p \geq 0.05$ ). As concentrações de TDCA (Figura 8-I) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos estudados ( $p \geq 0.05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

A modulação da microbiota intestinal através ação antimicrobiana do D-limoneno é provável devido à alta lipofilicidade da molécula, levando a inibição do crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas da microbiota intestinal (HAN; SUN; CHEN, 2019). O *pool* bacteriano no lúmen intestinal tem ação tanto na regulação da síntese de AB, quanto mudança na lipofilicidade desses ácidos, alterando a absorção destes compostos pelos enterócitos. Parte destes AB são desconjugados pela enzima bacteriana BSH (do inglês *bile salt hydrolase*), que remove os aminoácidos taurina e glicina conjugados ao AB (WAHLSTRÖM *et al.*, 2016).

Os AB secundários, que são originados das reações de desidroxilação e da epimerização dos AB primários, são substratos na regulação do metabolismo lipídico (DE AGUIAR VALLIM; TARLING; EDWARDS, 2013; PERINO *et al.*, 2021). A metabolização destes ácidos pela microbiota permite uma maior variedade de AB, que ao atingirem os enterócitos, hepatócitos ou, através da circulação sistêmica, alcançam os adipócitos, podendo atuar em distintos receptores, levando a sinalizações com impacto no metabolismo energético (WAHLSTRÖM *et al.*, 2016).

Os compostos  $\alpha\text{MA}$  e  $\beta\text{MA}$ , principais AB primários em roedores, apresentaram maiores concentrações no grupo HL, no tecido hepático. Em contrapartida, ocorreu uma redução do  $\alpha\text{MA}$  em relação ao grupo HL e um aumento da concentração do mesmo ácido conjugado com a taurina  $\text{T}\alpha\text{MA}$  no

grupo HL0.1. Em relação ao T $\beta$ MA, o grupo HL0.8 apresentou menor concentração do AB.

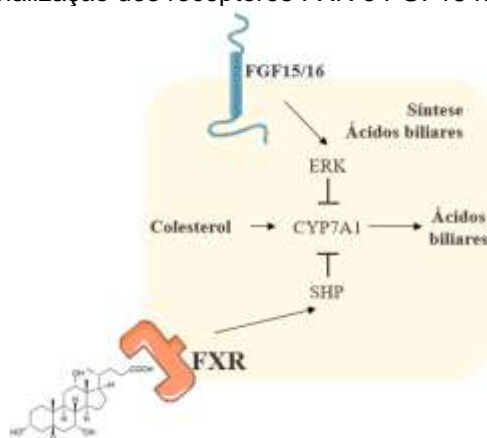
Embora em menor concentração em roedores, o CA, também AB primário, apresentou uma redução na concentração no grupo HL0.1 quando comparado com os grupos NL e HL. Assim, é possível observar uma tendência na diminuição dos AB primários após suplementação do camundongo com D-limoneno. Após metabolização pela microbiota, os AB secundários hepáticos apresentaram-se em concentrações mais elevadas no grupo HL0.1 quando comparado com o grupo HL, com destaque para  $\omega$ MA e T $\omega$ MA. Além disso, nos camundongos do grupo HL0.8 teve uma redução da concentração de AB. O aumento de AB secundários do fígado poderia indicar uma redução da síntese *de novo* AB e um maior *reuptake* destes compostos pelo epitélio intestinal.

Essa alteração no perfil de AB hepáticos pode ter influenciado a repressão da síntese *de novo* através da ligação com o receptor nuclear FXR (Figura 9). O FXR, que tem como agonistas  $\beta$ MA e T $\beta$ MA, regula a síntese da enzima *CYP7a1*, responsável pela síntese de AB, inibindo-a e, conseqüentemente, reduz os depósitos lipídicos (LI, Fei *et al.*, 2013). Camundongos alimentados com uma ração hiperlipídica e *knockout* para o gene responsável pela expressão do receptor nuclear FXR hepático tiveram uma melhor resposta no metabolismo de ácidos graxos através do aumento da oxidação lipídica e redução da gliconeogênese (J.G. MARIN *et al.*, 2015; LEHMANN-HORN *et al.*, 2014). Os resultados encontrados de menor acúmulo de gordura nos animais do grupo HL0.1 poderia estar relacionado com a ativação desse gene devido à mudança do perfil de AB.

Os AB secundários são agonistas do receptor TGR5 (Figura 2) e, em camundongos obesos induzidos pela dieta, a ativação do TGR5 está atrelada a redução do ganho de peso (J.G. MARIN *et al.*, 2015). Apesar da ação entérica do TGR5 nos enterócitos promovendo a secreção da incretina GLP-1, que é promovido por AB que se ligam à proteína G, quando esses ácidos se ligam ao receptor FXR ocorre a inversão da secreção desta incretina. A redução da expressão de GLP-1 diminui a síntese de insulina, diminui a síntese de ácidos

graxos hepáticos e aumenta, portanto, a lipólise (HOLST, 2007). O grupo HL0.1 apresentou maiores concentrações de AB secundários e um menor ganho de peso dentre os grupos hiperlipídicos, indicando um segundo possível mecanismo da modulação dos AB.

**Figura 9** - Sinalização dos receptores FXR e FGF15 nos hepatócitos.



Já são conhecidos os efeitos do D-limoneno no metabolismo energético e na microbiota intestinal (LI, Dahu *et al.*, 2018). Um estudo que analisou o efeito do D-limoneno em camundongos obesos induzidos pela dieta mostrou que o monoterpene ativou vias de sinalização na expressão de genes associados à síntese e à oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo branco, prevenindo o acúmulo de depósitos lipídicos nos adipócitos e à dislipidemia (JING *et al.*, 2013).

## 6. CONCLUSÃO

A alteração no perfil dos AB pode estar relacionada com a suplementação de D-Limoneno na dieta dos camundongos. O DCA,  $\omega$ -MA e o T $\omega$ MA são oriundos da metabolização dos AB primários pela microbiota intestinal e tiveram suas concentrações alteradas após suplementação com D-limoneno. Além disso, a mudança no perfil desses ácidos, que são agonistas de receptores de membrana e nucleares, pode ter influenciado no metabolismo energético. Portanto, indiretamente, sugere-se que o limoneno pode modular o perfil de AB no fígado.

## 7. BIBLIOGRAFIA

CLAUDEL, Thierry; STAELS, Bart; KUIPERS, Folkert. The Farnesoid X receptor: A molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, vol. 25, no. 10, p. 2020–2031, 2005. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000178994.21828.a7>.

DE AGUIAR VALLIM, Thomas Q.; TARLING, Elizabeth J.; EDWARDS, Peter A. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. **Cell Metabolism**, vol. 17, no. 5, p. 657–669, 2013. DOI 10.1016/j.cmet.2013.03.013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.013>.

FROMME, Tobias; HÜTTINGER, Kristina; MAURER, Stefanie; LI, Yongguo; GANTERT, Thomas; FIAMONCINI, Jarlej; DANIEL, Hannelore; WESTPHAL, Sören; KLINGENSPOR, Martin. Bile acid supplementation decreases body mass gain in C57BL/6J but not 129S6/SvEvTac mice without increasing energy expenditure. *Scientific Reports*, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 131, 2019. DOI: 10.1038/s41598-018-37464-z.

HAN, Yingjie; SUN, Zhichang; CHEN, Wenxue. Antimicrobial Susceptibility and Antibacterial Mechanism of Limonene against *Listeria monocytogenes*. **Molecules**, vol. 25, no. 1, p. 33, 20 Dec. 2019. DOI 10.3390/molecules25010033. Available at: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/1/33>.

HIROTA, Ryoji; ROGER, Ngatu Nlandu; NAKAMURA, Hiroyuki; SONG, Hee Sun; SAWAMURA, Masayoshi; SUGANUMA, Narufumi. Anti-inflammatory effects of limonene from yuzu (*Citrus junos tanaka*) essential oil on eosinophils. **Journal of Food Science**, vol. 75, no. 3, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01541.x>.

HOLST, Jens Juul. The physiology of glucagon-like peptide 1. **Physiological Reviews**, vol. 87, no. 4, p. 1409–1439, 2007. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2006>.

J.G. MARIN, Jose; I.R. MACIAS, Rocio; BRIZ, Oscar; M. BANALES, Jesus; J.

MONTE, Maria. Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. **Current Drug Metabolism**, vol. 17, no. 1, p. 4–29, 2015. <https://doi.org/10.2174/1389200216666151103115454>.

JING, Li; ZHANG, Yu; FAN, Shengjie; GU, Ming; GUAN, Yu; LU, Xiong; HUANG, Cheng; ZHOU, Zhiqin. Preventive and ameliorating effects of citrus D-limonene on dyslipidemia and hyperglycemia in mice with high-fat diet-induced obesity. **European Journal of Pharmacology**, vol. 715, no. 1–3, p. 46–55, 2013. DOI 10.1016/j.ejphar.2013.06.022. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.06.022>.

KUMMER, Raquel; FACHINI-QUEIROZ, Fernanda Carolina; ESTEVÃO-SILVA, Camila Fernanda; GRESPAN, Renata; SILVA, Expedito Leite; BERSANI-AMADO, Ciomar Aparecida; CUMAN, Roberto Kenji Nakamura. Evaluation of anti-inflammatory activity of citrus latifolia Tanaka essential oil and limonene in experimental mouse models. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2013, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/859083>.

LEHMANN-HORN, Klaus; SAGAN, Sharon A; BERNARD, Claude C A; SOBEL, A; ZAMVIL, Scott S; WANNA, Authors George B; NOBLE, Jack H; CARLSON, Matthew L; GIFFORD, H; DIETRICH, Mary S; HAYNES, David S; DAWANT, Benoit M; CONSIDERATIONS, Safety; TARGET, Mammalian; INHIBITORS, Rapamycin; COMPLEX, Tuberous Sclerosis; TRANSPLANTATION, Renal; SOMERS, Michael J G; PAUL, Elahna; ... DAWANT, Benoit M. This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please c. **The Laryngoscope**, no. August, p. 2–31, 2014. .

LI, Dahu; WU, Houjiu; DOU, Huating; GUO, Li; HUANG, Wei. Microcapsule of sweet orange essential oil changes gut microbiota in diet-induced obese rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 505, no. 4, p. 991–995, 2018. DOI 10.1016/j.bbrc.2018.10.035. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.035>.

LI, Fei; JIANG, Changtao; KRAUSZ, Kristopher W.; LI, Yunfei; ALBERT, Istvan; HAO, Haiping; FABRE, Kristin M.; MITCHELL, James B.; PATTERSON, Andrew D.; GONZALEZ, Frank J. Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. **Nature Communications**, vol. 4, no. May, 2013. <https://doi.org/10.1038/ncomms3384>.

MURALI, Ramakrishnan; KARTHIKEYAN, Arumugam; SARAVANAN, Ramalingam. Protective Effects of d-Limonene on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, vol. 112, no. 3, p. 175–181, 2013. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12010>.

PERINO, Alessia; DEMAGNY, Hadrien; VELAZQUEZ-VILLEGAS, Laura; SCHOONJANS, Kristina. Molecular physiology of bile acid signaling in health, disease, and aging. **Physiological Reviews**, vol. 101, no. 2, p. 683–731, 2021. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2019>.

PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 440917, D-Limonene; [cited 2021 Nov. 4]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Limonene>.

SCHAAP, Frank G.; TRAUNER, Michael; JANSEN, Peter L.M. Bile acid receptors as targets for drug development. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, vol. 11, no. 1, p. 55–67, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.151>.

SCHMIDT, Lukas; GÖEN, Thomas. R-Limonene metabolism in humans and metabolite kinetics after oral administration. **Archives of Toxicology**, vol. 91, no. 3, p. 1175–1185, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1751-6>.

SIKKEMA, Jan; DE BONT, Jan A.M.; POOLMAN, Bert. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 269, no. 11, p. 8022–8028, 1994. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)37154-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)37154-5).

TROMBETTA, Domenico; CASTELLI, Francesco; SARPIETRO, Maria Grazia;

VENUTI, Vincenza; CRISTANI, Mariateresa; DANIELE, Claudia; SAIJA, Antonella; MAZZANTI, Gabriela; BISIGNANO, Giuseppe. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 49, no. 6, p. 2474–2478, 2005. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>.

VIEIRA, A. J.; BESERRA, F. P.; SOUZA, M. C.; TOTTI, B. M.; ROZZA, A. L. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 283, no. February, p. 97–106, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.007>.

WAHLSTRÖM, Annika; SAYIN, Sama I.; MARSCHALL, Hanns Ulrich; BÄCKHED, Fredrik. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. **Cell Metabolism**, vol. 24, no. 1, p. 41–50, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.005>.

WATANABE, Mitsuhiro; HOUTEN, Sander M.; MATAKI, Chikage; CHRISTOFFOLETE, Marcelo A.; KIM, Brian W.; SATO, Hiroyuki; MESSADDEQ, Nadia; HARNEY, John W.; EZAKI, Osamu; KODAMA, Tatsuhiko; SCHOONJANS, Kristina; BIANCO, Antonio C.; AUWERX, Johan. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. **Nature**, vol. 439, no. 7075, p. 484–489, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature04330>.

## 8. ANEXOS

### Anexo A - Aprovação do protocolo experimental pela CEUA FCF/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
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**.

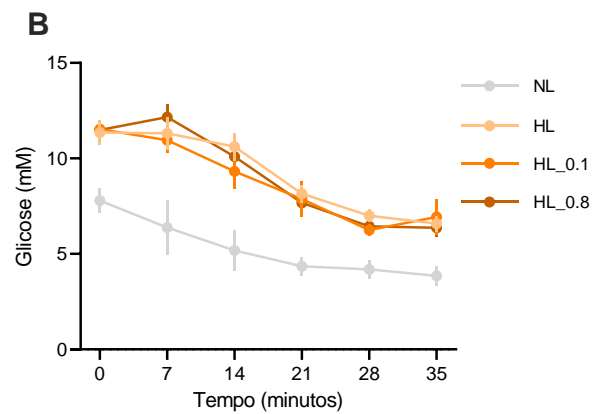
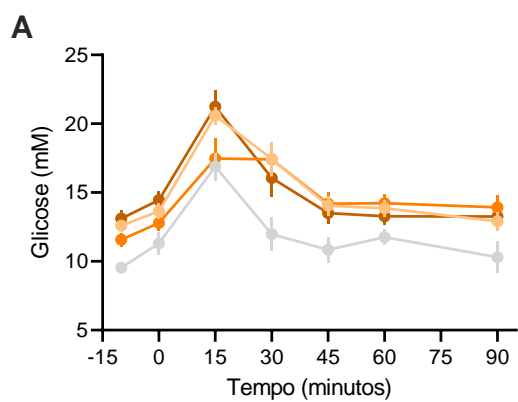
Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/11/2018 a 31/01/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo – C57/Bl6
Número de animais	80
Sexo	Macho
Peso/Idade	prox. 28g – 11 semanas
Origem	Biotério FCF-IQ/USP

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 Epiphânio**  
Vice-Coordenadora CEUA/FCF/USP

**Anexo B** – Resposta ao desafio a glicose (OGTT) (A), e a insulina (ITT) (B) dos animais utilizados no protocolo experimental.



## Anexo C - Artigo de revisão publicado durante o período de iniciação científica.

CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1963945>



Check for updates

REVIEW

### Monoterpenes: current knowledge on food source, metabolism, and health effects

José Fernando Rinaldi de Alvarenga<sup>a,b</sup>, Brunna Genaro<sup>a</sup>, Bruna Lamesa Costa<sup>a</sup>, Eduardo Purgatto<sup>a,b</sup>, Claudine Manach<sup>c</sup>, and Jarlei Fiamoncini<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>b</sup>Food Research Center (FoRC), University of São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>c</sup>Université Clermont Auvergne, INRAE, UNH, Clermont-Ferrand, France

#### ABSTRACT

Monoterpenes, volatile metabolites produced by plants, are involved in the taste and aroma perception of fruits and vegetables and have been used for centuries in gastronomy, as food preservatives and for therapeutic purposes. Biological activities such as antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory are well-established for some of these molecules. More recently, the ability of monoterpenes to regulate energy metabolism, and exert antidiabetic, anti-obesity and gut microbiota modulation activities have been described. Despite their promising health effects, the lack of reliable quantification of monoterpenes in food, hindered the investigation of their role as dietary bioactive compounds in epidemiological studies. Moreover, only few studies have documented the biotransformation of these compounds and identified the monoterpene metabolites with biological activity. This review presents up-to-date knowledge about the occurrence of monoterpenes in food, their bioavailability and potential role in the modulation of intermediate metabolism and inflammation, focusing on novel findings of molecular mechanisms, underlining research gaps and new avenues to be explored.

#### KEYWORDS

Dietary monoterpenes;  
 energy metabolism;  
 metabolic syndrome;  
 monoterpene  
 biotransformation

#### Introduction

Plants synthesize tens to hundreds of thousands chemical compounds and metabolites with diverse functions and biological properties. Part of these metabolites, with low molecular weight (mostly below 400 Da), are known as volatile compounds, being largely responsible for flavor perception, and more than 7000 of those have been identified in food and beverages (Goff and Klee 2006; Wüst 2017). The perception of flavor, with preferences and aversions, has been linked to the nutritional and health value attributed to the food (Goff and Klee 2006) and a high intake of fruits and vegetables is associated with better health (Rodríguez-Monforte et al. 2017; Y. Zhang and Zhang 2018; Godos et al. 2017; Hong et al. 2012; Tian et al. 2018; Esmailzadeh et al. 2006). Nevertheless, we still do not know the exact role played by volatile compounds in health promotion. The intake of these compounds, their bioavailability, metabolism and bioactivity must be properly studied in order to assess their actual health effects.

Monoterpenes are a class of volatile compounds formed of diverse 10-carbon skeleton molecules and a wide range of oxygenated derivatives (monoterpenoids), which include alcohols, aldehydes, ketones and carboxylic acids. A low molecular weight and high lipophilicity confer them high absorption and membrane penetration capacities (Oz et al.

2015; Schwab, Davidovich-Rikanati, and Lewinsohn 2008; Habtemariam 2017; Davis 2010; Wüst 2017; Nazzaro et al. 2013). Monoterpenes have been used for centuries in different therapeutic purposes as a major part of essential oils, but also as cooking ingredients, as flavoring compounds and for food preservation (Oz et al. 2015; Nazzaro et al. 2013; R. L. Smith et al. 2018). A large number of studies have demonstrated with various levels of evidence their biological activities as antioxidants, anti-microbial, anti-viral, anti-cancer, analgesic and anti-inflammatory compounds (Amarati, Foti, and Valgimigli 2013; Astani, Reichling, and Schnitzler 2010; Bhalla, Kumar Gupta, and Jaitak 2013; De Cássia Da Silveira et al. 2013; Guimarães, Quintans, and Quintans-Júnior 2013; Miguel 2010; Nazzaro et al. 2013; Oz et al. 2015; De Sousa 2011). Recent studies describe monoterpenes as signaling molecules capable of regulating energy metabolism, having anti-diabetic and anti-obesity effects (Habtemariam 2017). However, despite their promising potential, reliable information about their real significance in our diet is largely missing. In addition, their bioavailability and the biotransformation in humans are poorly documented although this knowledge is crucially needed (Iman A Hakim et al. 2002; Rychlik 2017; R. L. Smith et al. 2018).

This review presents the current knowledge on potential health effects of the most abundant dietary monoterpenes. Their presence in food, absorption and

CONTACT Jarlei Fiamoncini [jarlei@usp.br](mailto:jarlei@usp.br)

Supplemental data for this article is available online at <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1963945>

© 2021 Taylor & Francis Group, LLC

*Brunna Genaro*

---

Brunna Genaro

04 de novembro de 2021

*José Fernando Rinaldi de Alvarenga*

---

José Fernando Rinaldi de Alvarenga

04 de novembro de 2021