

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

Efeitos do D-limoneno no metabolismo energético de camundongos C57/Bl6 com  
obesidade induzida pela dieta

Lara dos Santos Martins da Silva

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Jarlei Fiamoncini

São Paulo  
2022

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

Efeitos do D-limoneno no metabolismo energético de camundongos C57/Bl6 com  
obesidade induzida pela dieta

Lara dos Santos Martins da Silva

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Jarlei Fiamoncini

São Paulo

2022  
Lara dos Santos Martins da Silva

Efeitos do D-limoneno no metabolismo energético de camundongos C57/Bl6 com  
obesidade induzida pela dieta

Comissão Julgadora da dissertação para obtenção do título de Mestre  
Banca Examinadora

Prof. Dr.  
orientador/presidente

---

1o Examinador

---

2o Examinador

---

3o Examinador

---

4o Examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2022.

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

SILVA, LARA  
S586e Efeitos Do D-limoneno No Metabolismo Energético  
De Camundongos C57/B16 Com Obesidade Induzida Pela  
Dieta / LARA SILVA. - São Paulo, 2022.  
52 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.  
Orientador: FIAMONCINI, JARLEI

1. nutrição. 2. MONOTERPENOS. 3. limoneno. 4.  
OBESIDADE. 5. INFLAMAÇÃO. I. T. II. FIAMONCINI,  
JARLEI, orientador.

*Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, meu amigo fiel consolador em tempos de aflições. E a **minha mãe Cinara**, que é a pessoa mais importante na minha vida, nunca desistiu de mim, sempre apoiou meus estudos e incentivou-me a ir além da média. Obrigada por permanecer ao meu lado!*

*Eu te amo mais que tudo!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por dar-me a vida, saúde e força para seguir em frente. Nele encontrei alento quando estava desanimada, e esperança, quando pensei em desistir.

Agradeço à **minha mãe Cinara** que mesmo sem ensino superior, me mostrou como é importante fazer faculdade e ir além da graduação. Me mostrou que é com educação que podemos ter um futuro promissor e que é através da educação que mudamos o mundo. Obrigada mãe por todo carinho, apoio, por me ouvir quando eu precisei desabafar, por secar minhas lágrimas quando chorei, por me abraçar quando eu pedi colo e por me repreender quando errei. Eu te amo muito, obrigada por tudo!

Agradeço também ao **Gregório** que sempre se orgulhou de mim, me exaltou quando me senti triste e me fez ver o quão incrível eu sou. Você foi o meu melhor amigo e amor.

Agradeço à **minha amiga Camille**, que me incentivou a iniciar no programa de pós-graduação aqui no departamento de nutrição experimental e foi ela que me apresentou o prof. Jarlei. Sou grata também por ter a Camis do meu lado quando precisei desabafar, ela é amiga de todas as horas, um verdadeiro presente de Deus em minha vida. Me ajudou a tomar decisões importantes sobre minha carreira e esteve comigo em todas as aventuras. Eu te amo amiga!

Agradeço ao meu professor **orientador Jarlei**, que acreditou em mim e me deu a chance de superar minhas expectativas e aprender tanto. Nesses dois anos e meio, ele foi além de chefe, foi parceiro, amigo e realmente esteve envolvido em todo processo de aprendizagem. Obrigada por ser tão dedicado aos seus alunos.

Sou muito grata aos meus amigos que fizeram parte da iniciação científica, meus parceiros de bancada, **Guilherme e Caroline**. Eles estiveram comigo desde o primeiro dia de biotério e até a última análise, e além de participarem ativamente do meu projeto, nós rimos, comemos, bebemos e nos divertimos muito juntos, obrigada por esses momentos.

Agradeço também aos meus queridos pós-docs, **José**, que me ajudou demais durante o início do programa, quando tudo era novo e desconhecido, me auxiliou durante todo processo de biotério e também nas análises de dados. A **Graziela**, que me ouviu quando precisei, me ajudou nas interpretações de dados e durante todo o meu processo de aprendizagem. E um agradecimento especial, ao pós-doc **Carlos**,

que junto com os demais, foi meu professor e meu amigo, me corrigiu quando precisei e me mostrou como levantar após um dia de luta. Juntos, eles me fizeram ver que faz parte da ciência errar e que toda resposta é resposta, por mais que não seja o resultado esperado. Obrigada queridos amigos por toda orientação e acolhimento. Vocês são parte disso tudo, e agradeço a Deus pela vida de vocês!

Agradeço também meus demais amigos do laboratório como **Larissa** que me ajudou nas análises, a **Amanda** que esteve comigo em todo processo, e a **Stephany** também amiga. Também sou grata, a Brunna Genaro e Bruna Lamesa que fizeram iniciação científica e auxiliaram no início do protocolo experimental.

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

Agradeço à FAPESP pelo Auxílio Regular 2018/19189-0 e a CAPES pela concessão da bolsa de estudo 88887.486139/2020-0.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Nós não somos o que gostaríamos de ser. Nós não somos o que ainda iremos ser.  
Mas, graças a Deus, não somos mais quem nós éramos.”*

Martin Luther King Jr. (1929-1968)

## RESUMO

SILVA, L.M.S, Efeitos Do D-limoneno No Metabolismo Energético De Camundongos C57/Bl6 Com Obesidade Induzida Pela Dieta. 2022. 52f. Dissertação- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A obesidade está associada ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis como hipertensão, resistência insulínica, dislipidemia e esteatose hepática. O consumo de compostos bioativos impacta na manutenção da saúde e na prevenção de risco de desenvolvimento dessas doenças. Entre os compostos bioativos, os monoterpenos são pouco investigados, apesar da literatura demonstrar efeitos promissores desses compostos sobre o metabolismo. O D-limoneno, o principal monoterpeno encontrado na laranja, é caracterizado por possuir efeitos hipolipemiantes, anti-inflamatórios e anti-obesogênicos. Estudos *in vitro* e *in vivo* descrevem sua capacidade de promover a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos em adipócitos e redução da inflamação. Este estudo teve como objetivo investigar o efeito do D-limoneno no metabolismo e inflamação em um modelo de obesidade induzida por dieta. Para isso, quarenta camundongos machos (C57/Bl6) de 11 semanas de idade, foram distribuídos em 4 grupos, sendo que um dos grupos recebeu ração normolipídica e os demais, ração hiperlipídica. O D-limoneno foi suplementado na ração de dois grupos que receberam dieta hiperlipídica nas concentrações de 0,1%, e 0,8%. Considerando-se a ingestão alimentar dos animais, a ração suplementada com 0,1% D-limoneno correspondeu à ingestão de 0,15 g/kg/dia e ração com 0,8% de D-limoneno correspondeu a 1,3 g/kg/dia. Os animais tiveram o peso e a ingestão alimentar monitorados ao longo da intervenção com duração de 7 semanas. Os camundongos que receberam D-limoneno a 0,1% apresentaram menor ganho de peso e de acúmulo de tecido adiposo, comparado com os animais sem suplementação alimentados com a dieta hiperlipídica. Além disso, o D-limoneno promoveu a diminuição da concentração plasmática de marcadores inflamatórios incluindo TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-6 nos animais dos grupos que foram suplementados com D-limoneno. Entretanto, não houve diferença nos marcadores bioquímicos e metabólicos. Uma limitação do estudo foi o fato das complicações metabólicas associadas ao modelo de obesidade não terem sido plenamente estabelecidas, dados o alojamento individual, à curta duração da exposição à ração hiperlipídica e idade dos animais no início da suplementação. Esse fato pode ter dificultado a observação dos efeitos do D-limoneno na reversão dos parâmetros que seriam normalmente deteriorados pelo desenvolvimento da obesidade. Concluímos que o D-limoneno pode interferir no metabolismo energético, com possível efeito anti-obesogênico e anti-inflamatório. Devido às limitações do modelo, são necessários mais estudos para confirmar esses resultados.

**Palavras-chave:** limoneno, monoterpenos, beta-oxidação, obesidade, inflamação.

## ABSTRACT

SILVA, L.M.S, Effects of D-limonene on the Energy Metabolism of C57/Bl6 Mice With Diet-Induced Obesity. 2022. 52f. Dissertation – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

Obesity is associated with the development of chronic non-communicable diseases such as hypertension, insulin resistance, dyslipidemia, and hepatic steatosis. The intake of dietary bioactive compounds is associated with the maintenance of health and the prevention of chronic diseases. Among the group of bioactive compounds, monoterpenes are poorly investigated, in spite of several reports of their promising effects on metabolism. D-limonene is the main monoterpene found in oranges, known for its hypolipemic, anti-inflammatory, and anti-obesogenic effects. *In vitro* and *in vivo* studies associate D-limonene to increased  $\beta$ -oxidation of fatty acids in adipocytes and reduced inflammation. This study aimed at investigating the effects of D-limonene on metabolism and inflammation in a diet-induced obesity model. For this purpose, forty male mice (C57/Bl6) were distributed in 4 groups, with one group receiving a normolipidic diet and the others, a high-fat diet. D-limonene was supplemented in the diets of two groups that received high-fat diet at the concentrations of 0.1% and 0.8%. Considering the feed intake, mice receiving D-limonene supplementation at 0.1% ingested in average 0.15 g/kg/day, while the mice receiving the supplementation at 0.8%, ingested approximately 1.3 g of D-limonene /kg/day. The animals had their weight and food intake monitored throughout the intervention. Mice that received D-limonene supplementation at 0.1% showed reduced weight gain and accumulation of adipose tissue compared to the non-supplemented mice fed the high-fat diet. In addition, D-limonene promoted a decrease in hepatic inflammatory markers including TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , and IL-6. However, there was no difference in biochemical and metabolic markers. A limitation of the study was that the metabolic complications associated with the obesity model were not fully established, probably due to the age at the start of the protocol (11 weeks), individual housing and short duration of the exposure to the high-fat feed. This fact may have prevented the observation of the positive effects of D-limonene in reversing parameters that would normally be impaired by the development of obesity. We conclude that D-limonene may interfere in energy metabolism, with a possible anti-obesogenic and anti-inflammatory effect. Due to the limitations of the model, further studies are needed to confirm these findings.

**Keywords:** limonene, monoterpenes, beta-oxidation, obesity, inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Consequências da obesidade em diferentes órgãos e sistemas e sua relação com doenças crônicas .....	20
Figura 2 - Estrutura da molécula de D-limoneno. ....	21
Figura 3 - Desenho experimental do estudo.....	27
Figura 4 - Características fenotípicas dos animais.....	33
Figura 5 - Indicadores de adiposidade .....	34
Figura 6 - Indicadores de sensibilidade à insulina e tolerância à glicose .....	37
Figura 7 - Marcadores plasmáticos do metabolismo lipídico.....	38
Figura 8 - Marcadores de esteatose hepática .....	40
Figura 9 - Marcadores de inflamação hepática dosagem proteica .....	41
Figura 10 - Marcadores de inflamação hepática expressão gênica .....	42
Figura 11 - Marcadores de inflamação no tecido adiposo epididimal.....	43
Figura 12 - Marcadores de atividade termogênica no tecido adiposo marrom .....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição em micronutrientes das rações utilizadas no estudo .....	26
Tabela 2 – Genes cuja expressão foi avaliada e a sequência dos <i>primers</i> .....	30

## LISTA DE SIGLAS

ACC	Acetil-coa carboxilase
ACO	Acil-coa oxidase
AMPK	Proteína quinase ativada
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina transferase
AST	Aspartato aminotransferase
APOE2	ApolipoproteínaE2
ATP	Adenosina Trifosfato
CAPES	Coordenação De Aperfeiçoamento De Pessoal De Nível Superior
CT	Colesterol total
CPT1	Carnitina-palmitoiltransferase I
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
ANOVA	Análise de variância
CDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EE	Eficiência energética
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimático
EROS	Espécie reativa de oxigênio
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo
FASN	Ácido graxo sintase
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FORC	Food Research Center
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HBA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HL	Hiperlipídica
iAUC	Área sob a curva incremental
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal

INF- $\gamma$	Interferon-gama
iNOS2	Oxido nítrico sintase induzível
IQ	Instituto de química
ITT	Teste de tolerância a insulina
JNK	c-Jun N-terminal quinase
KCAL	Caloria
KCI	Cloreto de potássio
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
MCP1	Proteína quimiotática de monócitos-1
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NL	Normolipídica
OGTT	Teste de tolerância oral a insulina
OMS	Organização mundial da saúde
OPAS	Organização mundial da saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
SREBP-1C	Elemento regulador de esterol-1c
TA	Tecido adiposo
TAE	Tecido adiposo epididimal
TAM	Tecido adiposo marrom
TG	Triglicerídeos
TLR	Receptores Toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
UCP1	Proteína desacopladora 1
USP	Universidade de São Paulo
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
1.1 OBESIDADE .....	16
1.2 DISLIPIDEMIA E ATEROSCLEROSE.....	17
1.3 ESTEATOSE HEPÁTICA.....	18
1.4 INFLAMAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO.....	19
1.5 D-LIMONENO .....	20
1.6 EFEITOS DO D-LIMONENO NO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO.....	21
2 HIPÓTESE .....	24
3 OBJETIVOS .....	25
3.1 OBJETIVO GERAL .....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 ESTUDO <i>IN VIVO</i> .....	26
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO METABÓLICO.....	28
4.2.1 Indicadores do metabolismo intermediário .....	28
4.2.2 Determinação de lipídeos hepáticos .....	28
4.3 EXPRESSÃO GÊNICA.....	29
4.4 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA PARA DOSAGEM DE CITOCINAS NO FÍGADO.....	30
4.5 ANÁLISE DE DADOS.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO MODELO.....	32
5.2 HOMEOSTASE GLICÊMICA E METABOLISMO DE LIPÍDIOS.....	35
5.3 ESTEATOSE HEPÁTICA.....	39
Fonte: dados da pesquisa.....	40
5.4 INFLAMAÇÃO HEPÁTICA E NO TECIDO ADIPOSEO.....	40
5.5 TERMOGÊNESE NO TECIDO ADIPOSEO MARROM .....	43
6 CONCLUSÃO.....	44
7 APOIO FINANCEIRO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
ANEXO 1 – ROTULAGEM DA RAÇÃO NORMOLIPIDICA USADA DURANTE O ESTUDO. DESCRIÇÃO DA COMPOSIÇÃO DIETÉTICA.....	51
ANEXO 2 - ROTULAGEM DA RAÇÃO HIPERLIPIDICA USADA DURANTE O ESTUDO. DESCRIÇÃO DA COMPOSIÇÃO DIETÉTICA.....	52

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 OBESIDADE E SOBREPESO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece sobrepeso e obesidade utilizando os pontos de corte do índice de massa corporal (IMC) de 25 e 30 kg/m<sup>2</sup>, respectivamente (OMS, 2000). Esses pontos de corte foram recomendados por especialistas da Associação Nacional Norte-Americana do Coração, Pulmão e Sangue para o Estudo da Obesidade em 2000, que também recomenda o uso de pontos de corte da circunferência da cintura de 40 polegadas (102 cm) para homens e 35 polegadas (88 cm) para mulheres para definir “obesidade central”. Cada vez mais, estudos mostram que a obesidade central é um melhor preditor de doenças relacionadas à obesidade ao invés da obesidade geral avaliada pelo IMC. A circunferência da cintura pode ser igualmente ou mais útil do que o IMC devido ao seu maior prognóstico para riscos à saúde (WANG; BEYDOUN, 2007).

A OMS constatou que a prevalência de obesidade tem triplicado desde 1975, com uma estimativa em 2016 de aproximadamente 2 bilhões de adultos acima do peso recomendado e dentre eles, meio bilhão já eram obesos. A OMS projeta que em 2025 mais de 700 milhões de adultos estarão obesos e cerca de 2,3 bilhões estarão com sobrepeso. Em 2020, mais de 39 milhões de crianças menores de cinco anos eram obesas ou estavam acima do peso. No Brasil, metade da população já está com sobrepeso (WHO, 2021).

A obesidade é gerada por inúmeros fatores como hábitos alimentares, sedentarismo e desequilíbrio crônico entre consumo alimentar e o gasto energético. Ela é relacionada com o desenvolvimento de outras doenças (HEINDEL *et al.*, 2017), entre elas: doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, diabetes, hipertensão, hiperglicemia e dislipidemias (KLEPAC *et al.*, 2019). Além disso, pessoas obesas ou com sobrepeso são mais suscetíveis a doenças como osteoartrite, câncer de mama, ovário, testículo, fígado, rim, vesícula biliar e cólon (WHO, 2021), conforme ilustrado na Figura 1, disposta na seção 1.4.

Por conta de todas as complicações citadas, causadas pela obesidade, a comunidade científica e órgãos públicos se esforçam para achar respostas para a prevenção e o tratamento dessa patologia. A indústria farmacêutica tenta encontrar

medicamentos ou até mesmo polifármacos com ação via sistema nervoso central por exemplo, com o objetivo de modular o comportamento alimentar e a homeostase energética (JACKSON *et al.*,2015). Uma alternativa contra a obesidade e suas doenças associadas, que cresce cada vez mais, é a cirurgia bariátrica, que com passar dos anos vem ganhando outros nomes e técnicas bastante avançadas. Porém, os problemas pós-cirúrgicos continuam, como reganho de peso, desnutrição, vícios associados e depressão (TAVARES *et al.*,2011).

Desde antes de 1990, a OMS vem alertando sobre a importância de uma alimentação de qualidade e a prática de atividade física para o controle da obesidade. Foram lançadas pela própria OMS chamadas e consultas *online* com especialistas, a fim de ajudar a população a ter mais qualidade de vida (OMS, 2021). Também foram adotadas medidas públicas por diversos países, incluindo o Brasil, por exemplo com o surgimento em 2006 do guia alimentar, submetido a diversas atualizações com o passar dos anos (DIAS *et al.*, 2017).

## 1.2 DISLIPIDEMIA E ATEROSCLEROSE

A dislipidemia apresenta-se pelo um aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicerídeos, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e diminuição das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (HUNTER, HEGELE, 2017). O aumento da concentração de LDL no plasma é um fator que predispõe ao desenvolvimento da aterosclerose (STEINBERG, 2008).

As partículas de LDL podem ser fagocitadas por macrófagos localizados no espaço subendotelial das artérias, e, em condições propícias (excesso de LDL, desequilíbrio do balanço reduz, ativação de vias inflamatórias), essas células passam a fagocitar quantidades muito altas de LDL. Esse comportamento causa acúmulo intracelular de colesterol e compromete o funcionamento dos macrófagos que passam a ser denominados de “células espumosas”. O acúmulo de células espumosas no espaço subendotelial é a origem da placa de ateroma que, ao evoluir, reduz o calibre dos vasos sanguíneos. Ao atingir estágios avançados devido ao estado pró-inflamatório da lesão, essas se tornam particularmente perigosas devido ao risco de rompimento da capa fibrosa, que funciona como uma estrutura que estabiliza a placa

(BROPHY *et al.*, 2017). Nesse momento, há a formação de um coágulo na circulação que pode causar o entupimento de artérias de calibre menor.

A sequência de eventos descritos acima pode levar a desfechos como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e embolia pulmonar (FRANCO, 2016). Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), a cardiopatia isquêmica e o acidente vascular cerebral são as duas doenças mais letais na atualidade, com aproximadamente 15,2 milhões de mortes em 2016 e permanece em primeiro e segundo lugar em causas de morte há mais de 15 anos (OPAS/OMS, 2018).

### 1.3. ESTEATOSE HEPÁTICA

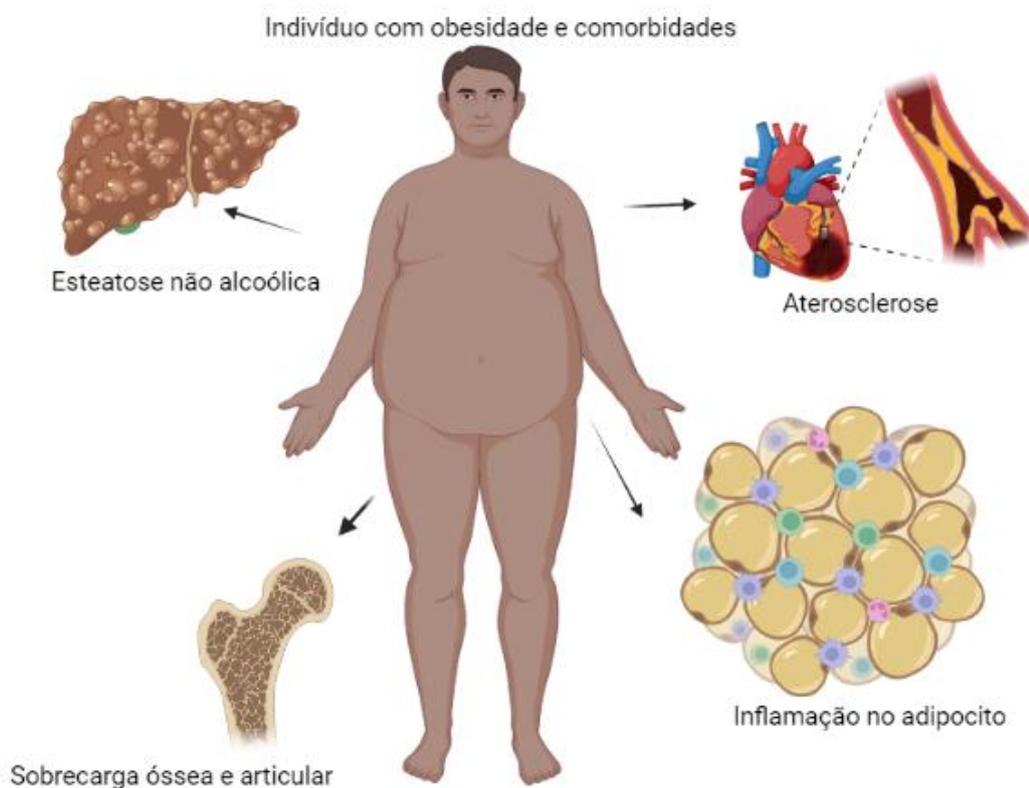
Outra doença associada ao desequilíbrio do metabolismo de lipídios é a esteatose não alcoólica ou doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), causada pelo acúmulo excessivo de gordura nos hepatócitos, resultando em uma inflamação no fígado, que com o passar do tempo pode evoluir para esteatohepatite e cirrose, e até mesmo carcinoma hepatocelular (BREA *et al.*, 2017). A DHGNA é a causa mais comum de doença hepática crônica: 20 a 30% dos adultos nos países ocidentais têm esteatose não alcoólica e a prevalência aumenta para 70 a 90% entre pessoas obesas ou com diabetes (TARGHER *et al.*, 2010). Por ser uma doença silenciosa, muitos pacientes só a descobrem em estágios avançados (COTRIM, 2016). Entre outros fatores, a esteatose está fortemente relacionada com a resistência insulínica. Uma vez que a insulina sinaliza a inibição da lipólise no tecido adiposo, a resistência a esse hormônio causa aumento da concentração de ácidos graxos livres na circulação, que são captados pelo fígado e utilizados para a síntese de triglicérides, criando um ciclo vicioso que favorece o desenvolvimento da DHGNA (TOLMAN; DALPIAZ, 2007). O acúmulo de gordura intra-hepática também gera inflamação, aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS) e fibrose, que pode culminar em cirrose e falência do fígado (FARZANEGI *et al.*, 2019). Em um prévio estudo por Saltiel e Olefsky (2017) foi observado que a condição de obesidade induz um aumento da infiltração de macrófagos hepáticos (*Kupffer cells*), simultaneamente à produção de citocinas inflamatórias que podem gerar um quadro de resistência à insulina nos hepatócitos.

Atualmente, não há terapias farmacológicas validadas para o tratamento de DHGNA, porém é relatado que compostos bioativos antioxidantes e/ou anti-inflamatórios como carotenoides e vitamina E podem minimizar assim como prevenir os danos causados pelo acúmulo de gordura nos hepatócitos (NI *et al.*,2016).

#### 1.4 INFLAMAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo (TA) é considerado um órgão endócrino por ser capaz de secretar hormônios e citocinas, denominadas adipocinas (FANG; JUDD, 2018). Na obesidade, o acúmulo excessivo de triglicerídeos pode gerar adipócitos hiperplásicos e hipertróficos que são resistentes à insulina, com potencial de diferenciação prejudicada. Essas células adiposas estarão condicionadas à produção de adipocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e interleucina-6 (IL-6). A expansão do tecido adiposo é acompanhada de maior taxa de morte celular por apoptose e o extravasamento de lipídios, que se tornam estressores metabólicos e estimulam a migração de macrófagos para o tecido adiposo. Esses macrófagos produzem mais citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e ativam fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), proteína de ligação ao elemento regulador de esterol-1c (SREBP-1c) e receptor ativado por proliferadores de peroxissomos  $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ ), acentuando o quadro inflamatório(KIRWAN *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2021; SALTIEL; OLEFSKY, 2017). Os ácidos graxos livres e as citocinas presentes no tecido adiposo inflamado ativam vias de sinalização como as dos receptores Toll-like (TLR) e da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e induzem a produção de EROS. Essa sinalização inflamatória altera as vias de sinalização metabólica, a função da mitocôndria e do retículo endoplasmático. O TNF- $\alpha$  promove o processo de lipólise, liberando ácidos graxos livres na circulação e induzindo inflamação em outros tecidos (NASCIMENTO *et al.*, 2021).

Figura 1 - Consequências da obesidade em diferentes órgãos e sistemas e sua relação com doenças crônicas.



Created in BioRender.com **bio**

Fonte: BioRender.com.

### 1.5 D-LIMONENO

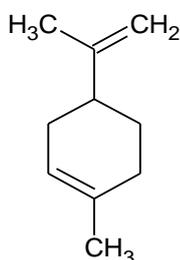
Os monoterpenos são compostos lipídicos, voláteis e com forte aroma. Nos vegetais, esses compostos participam das interações químicas com outras plantas, animais e como mecanismo de proteção a estressores bióticos e abióticos (THOLL, 2015). Tradicionalmente, os terpenoides têm sido usados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e química e, mais recentemente, têm sido explorados no desenvolvimento de biocombustíveis. Ainda há poucos estudos sobre o metabolismo de monoterpenos e seus efeitos biológicos (ALVARENGA, 2021).

O D-limoneno (Figura 2) faz parte da família dos terpenos, pertencendo à classe dos monoterpenos. Está presente nos óleos essenciais de tangerina, toranja, laranja, limão e cidra, correspondendo de 45 – 90% dos terpenos nesses óleos (SAINI *et al.*, 2022). Além da sua presença natural em alimentos altamente consumidos pela

população, o D-limoneno também é utilizado pela indústria alimentícia e de produtos de higiene como aromatizante em confeitos, refrigerantes, dentifrícios e enxaguantes bucais (FERRONATTO; ROSSI, 2017).

Quando ingerido, o D-limoneno apresenta uma rápida absorção e metabolização pelo organismo, sendo que os metabólitos derivados atingem uma concentração máxima no plasma entre a primeira segunda hora após o consumo do composto. A maior parte de seus metabólitos é eliminada pela urina em até 24 horas depois da sua ingestão (SCHMIDT; GÖEN, 2016; IGIMI *et al.*, 1974). Diversos estudos têm demonstrado que o D-limoneno apresenta baixa toxicidade em humanos e animais, sem promover mutagenicidade e/ou nefrotoxicidade (JIDONG,2007). O programa Americano de Toxicologia avaliou a toxicidade do D-limoneno em ratos e camundongos, testando doses diárias entre 0,4 e 6,6 g/Kg/dia, administrados em um período de cinco dias consecutivos durante três semanas e determinou doses inferiores a 1,6 g/Kg/dia como sendo seguras (JIDONG,2007).

Figura 2 - Estrutura da molécula do D-limoneno. Desenhada utilizando Chem Sketch



Fonte: Chem Sketch.

## 1.6 EFEITOS DO D-LIMONENO NO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO

Em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e em ratos diabéticos (diabetes induzido por estreptozotocina), o D-limoneno foi capaz de diminuir a intolerância à glicose e as concentrações plasmáticas de triglicerídeos e colesterol LDL e aumentar a do colesterol HDL (SANTIAGO *et al.*, 2012; BARTELT; HEEREN, 2013). Ainda em modelo murino de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, o D-limoneno apresentou efeito hepatoprotetor normalizando a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina transferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) (LIN *et al.*, 2019). Outro estudo realizado com ratos apresentou efeito

hepatoprotetor do D-limoneno e, neste caso, os animais inalaram óleo essencial de laranja e obtiveram redução plasmática de triglicerídeos, colesterol e menor expressão gênica de acetil-CoA carboxilase (ACC) e Citocromo P450 2E1 (CYP2E1) (WANG, *et al.*, 2021). A suplementação com D-limoneno aumentou a concentração de antioxidantes como a vitamina C e E, ao mesmo tempo em que diminuiu a concentração de lipídios oxidados na circulação. O D-limoneno também diminuiu o acúmulo de lipídios no fígado, a hipertrofia de adipócitos e a pressão arterial em animais tratados com uma dieta hiperlipídica (SANTIAGO *et al.*, 2012). Um estudo realizado com ratos Wistar com *diabetes mellitus* tipo I induzido por estreptozotocina que receberam D-limoneno oralmente relatou a prevenção da perda de peso induzida pelo diabetes, do aumento da glicemia e da concentração de HbA1c. Os animais tratados também apresentaram diminuição da atividade de enzimas gliconeogênicas, da concentração plasmática de insulina e aumento das atividades das enzimas antioxidantes, mostrando que o D-limoneno pode atuar como hipolipemiante, antidiabético e antioxidante (BACANLI *et al.*, 2017). Segundo Lin *et al.* (2019), o óleo essencial de lima, rico em monoterpenos como o D-limoneno,  $\gamma$ -terpineno e  $\beta$ -pipeno, apresentou efeitos hipolipemiantes em ratos após oito semanas de intervenção, com redução dos níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos e LDL. O ácido perílico é um monoterpeno encontrado em diversos óleos essenciais como o de hortelã, cereja e lavanda, além de ser um dos principais metabólitos de D-limoneno gerado em mamíferos, e é um exemplo de monoterpeno com potencial bioativo (MUKHTAR; ADU-FRIMPONG; XU; YU, 2018). Ao ácido perílico, se atribuem a redução da concentração plasmática de colesterol LDL, VLDL e aumento de colesterol HDL em ratos com suplementação desse composto na ração (KHAN *et al.*, 2019).

O D-limoneno, assim como outros compostos da classe dos monoterpenos, pode desempenhar um papel na regulação do metabolismo de lipídios e glicose, apesar de seus mecanismos de ação ainda não serem completamente elucidados. Evidências sugerem que o D-limoneno estimula a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e contribui para a diminuição das concentrações plasmáticas de lipídios, ao reduzir a disponibilidade do substrato para a síntese de triglicerídeos. O D-limoneno foi capaz de promover o processo de *browning* em adipócitos 3T3-L1, fazendo com que estes apresentassem metabolismo semelhante aos adipócitos marrons. Esse tipo de células apresenta alta densidade mitocondrial e altas taxas de beta-oxidação de ácidos

graxos devido à presença da *Uncoupling Protein-1* (UCP-1), uma proteína presente na membrana mitocondrial interna, capaz de desacoplar o gradiente eletroquímico gerado na cadeia transportadora de elétrons, de forma a produzir calor e não ATP (LONE; YUN, 2016; TAN *et al.*, 2016). Nessas células, o D-limoneno ativou receptores adrenérgicos  $\beta_3$  ( $\beta_3$ -AR), estimulando a lipólise de triglicerídeos e o aumento do consumo de oxigênio, que são marcadores da ativação do tecido adiposo marrom (LONE; YUN, 2016). A ativação destes receptores estimula a função das proteínas PPAR $\gamma$  e C/EBP $\beta$ , que por sua vez ativam a expressão dos genes *Pgc-1 $\alpha$* , *Ucp1* e *Fgf21*, modulando o processo de *browning* (SANTIAGO *et al.*, 2012; BARTELT, HEEREN, 2013). O D-limoneno foi capaz de aumentar a expressão do gene da UCP1 de forma dose-dependente, levando ao aumento da biogênese mitocondrial e oxidação de ácidos graxos pela produção de enzimas peroxissomais e mitocondriais envolvidas na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos como a Acil-CoA oxidase (ACO) e carnitina-palmitoiltransferase I (CPT1) (LONE; YUN, 2016).

A indução de *browning* pelo D-limoneno em células em cultura e o estímulo da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos são resultados promissores que encorajam a investigação por efeitos similares em modelos *in vivo*. Se confirmado em modelos animais, o estímulo da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos pode ser um dos mecanismos pelos quais o D-limoneno atua na redução de lipídios plasmáticos, fortemente associados ao desenvolvimento da aterosclerose. Nesse contexto, buscou-se investigar um possível efeito do D-limoneno em relação ao metabolismo energético.

## 2 HIPÓTESE

Duas hipóteses foram testadas nesse estudo:

1) O D-limoneno promove melhora da dislipidemia em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, por estimular a oxidação de ácidos graxos em diferentes tecidos.

2) O D-limoneno apresenta efeitos anti-inflamatórios que poderiam proteger o organismo contra a inflamação associada à obesidade, particularmente no fígado, um órgão bastante sensível ao acúmulo ectópico de lipídios.

Se as hipóteses fossem confirmadas, o D-limoneno preveniria os efeitos da obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica, promovendo a redução da inflamação, decorrente da obesidade.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o efeito do D-limoneno em marcadores da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos em diferentes tecidos e avaliar a relação entre essa via e os efeitos hipolipemiantes e anti-inflamatórios do D-limoneno em camundongos C57/Bl6.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Testar o papel protetor do D-limoneno contra a obesidade e o acúmulo de lipídios no fígado;
- 2) Avaliar o efeito hipolipemiante do D-limoneno em um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- 3) Investigar o efeito anti-inflamatório do D-limoneno no tecido adiposo branco e fígado;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ESTUDO *IN VIVO*

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF-USP (protocolo n°576) e foi conduzido no biotério de produção e experimentação da FCF/IQ-USP.

Camundongos machos (C57Bl/6) com 11 semanas de idade foram distribuídos em quatro grupos experimentais com 10 animais por grupo, sendo que um grupo foi alimentado com uma dieta normolipídica de composição definida (AIN-93M) contendo 10% das calorias em lipídios e os outros três grupos uma dieta hiperlipídica (60% das calorias em lipídios) (Tabela 1). Após uma semana de adaptação às dietas de composição definida (semana 0), um grupo continuou recebendo a dieta normolipídica e 3 grupos receberam a dieta hiperlipídica suplementada com 0, 0,1% ou 0,8% de D-limoneno por sete semanas (semanas 1 – 7) (Figura 3). As quantidades de D-limoneno foram determinadas considerando o limiar de toxicidade (1,6 g/dia/kg) e as dosagens utilizadas em outros estudos. Considerando-se a ingestão alimentar, dose de 0,1% D-limoneno corresponde à suplementação de 0,15 g/kg/dia e a dose de 0,8% à 1,3 g/kg/dia. A ficha técnica das rações administradas encontra-se nos Anexos 1 e 2. A ração normolipídica apresenta como principais nutrientes: amido de milho, caseína láctea, amido dextrinizado, sacarose e óleo de soja. A ração hiperlipídica apresenta como principais ingredientes da composição: caseína láctea, amido dextrinizado, gordura animal, sacarose e óleo de soja.

Tabela 1 - Composição em macronutrientes das rações utilizadas no estudo.

	Ração normolipídica		Ração hiperlipídica	
	g/ 100g	Kcal%	g/ 100g	Kcal%
Proteínas	13,4	14,7	23,5	18,4
Carboidratos (exceto fibras)	68,9	75,7	27,3	21,3
Lipídios	3,8	9,4	34,3	60,3

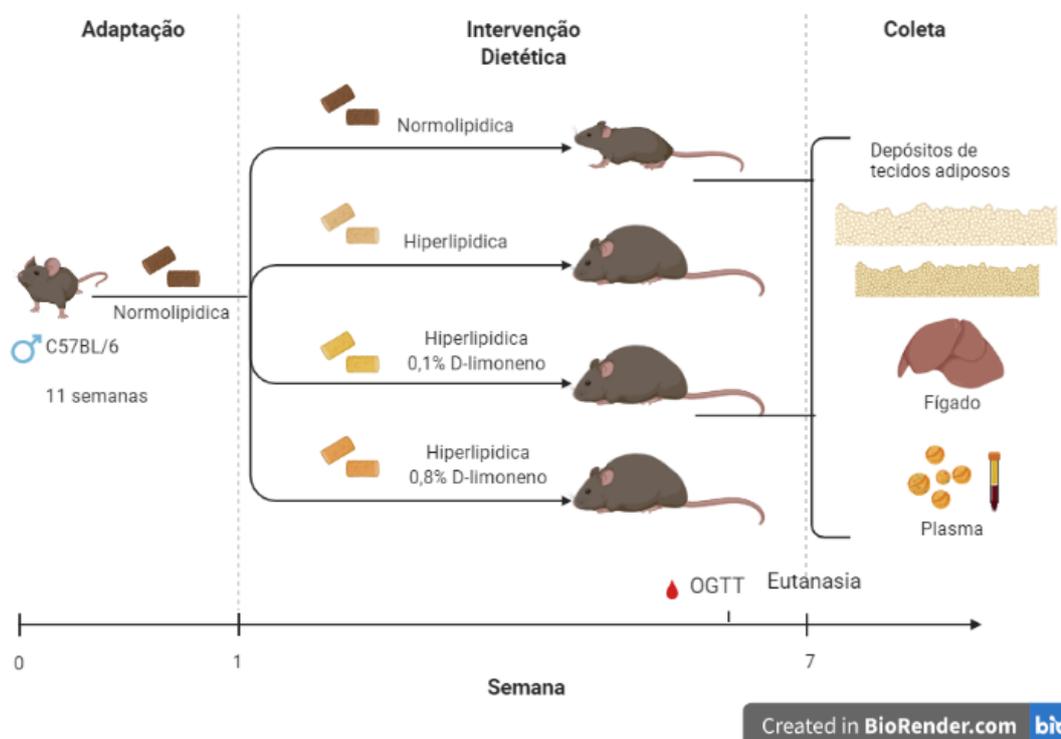
Fonte: Dados da pesquisa.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com enriquecimento ambiental, de forma a permitir o monitoramento acurado da ingestão alimentar ao longo de todo o protocolo experimental. O peso dos camundongos foi monitorado duas vezes por semana e a ração e água foram trocadas a cada dois dias. A eficiência energética (EE) foi calculada pela fórmula:  $EE = \text{ganho de peso (g)} / \text{ingestão energética (Kcal)}$ . Na sexta semana de tratamento, às 13:00 horas, foi realizado o Teste de Tolerância Oral a Glicose (OGTT). Seis horas antes do teste, os animais foram transferidos para caixas limpas, sem acesso à ração, mas com livre acesso à água. Amostras de sangue capilar para dosagem de glicemia foram coletadas por uma pequena incisão na extremidade da cauda dos animais e a glicemia foi aferida por glicosímetro portátil, 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).

O Teste de Tolerância a Insulina (ITT) foi realizado dois dias depois do OGTT na sexta semana do experimento. Assim como no OGTT, os animais foram transferidos para caixas limpas, sem acesso à ração, mas com livre acesso à água. Foi aplicado nos animais uma injeção intraperitoneal de insulina a 0,75 U/Kg. Nesse teste, a glicemia foi determinada nos tempos -10, 0, 7, 14, 21, 28 e 35 minutos após a injeção de insulina.

Na sétima semana, realizou-se a eutanásia. A ração foi removida as 7:00 horas e a eutanásia ocorreu a partir das 13:00 horas, e foi realizada por exsanguinação (punção cardíaca) realizada sob anestesia por isoflurano para amostragem de plasma e tecidos (fígado, diferentes depósitos de tecido adiposo (epididimal, retroperitoneal, inguinal e marrom), que foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

Figura 3 - Desenho experimental do estudo.



Fonte: BioRender.com

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO METABÓLICO

### 4.2.1 Indicadores do metabolismo intermediário

Amostras de plasma foram analisadas para a determinação de marcadores do metabolismo intermediário incluindo, triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e frações LDL e HDL, utilizando-se kits enzimáticos-colorimétricos e seguindo-se o protocolo preconizado pelo fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). A concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados (NEFA) também foi determinada através de ensaio enzimático com kit colorimétrico (FUJIFILM WakoChemicals (Richmond VA, EUA).

### 4.2.2 Determinação de lipídeos hepáticos

As amostras de fígado foram congeladas em nitrogênio líquido e pulverizadas em moinho de esfera (Tissuelyser MM400, Retsch). Para quantificação de TG, CT e

NEFA no fígado, foram pesados ~150 mg da amostra pulverizada. Após adição de 900 µL de uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1) e homogeneização em vórtex por 30 segundos, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 segundos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo, no qual se repetiu o processo de extração. As fases inferiores de ambas as extrações foram combinadas e adicionou-se 250 µL de KCl 0,88%. Após centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos e descarte da fase superior, adicionou-se ao tubo 250 µL de metanol:água (1:1) e realizou-se uma centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. A fase inferior contida no tubo foi evaporada sob fluxo de N<sub>2</sub> e os resíduos (extrato lipídico) ressuspensos com isopropanol no volume final de 500 µL. Esse protocolo foi adaptado de Hara e Radin (1978) e Zaret *et al.* (2010). O conteúdo de TG, CT e NEFA do fígado foram determinados por métodos enzimáticos após extração dos analitos de interesse, utilizando-se os mesmos kits empregados para quantificação da concentração dos analitos no plasma, seguindo a metodologia descrita em Geillinger *et al.* (2014).

#### 4.3 EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão gênica de enzimas envolvidas na lipólise, β-oxidação, lipogênese, inflamação e atividade mitocondrial foi avaliada no fígado, tecido adiposo marrom (TAM), fígado e tecido adiposo epididimal (TAE) pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

Para a extração do RNAm, pesou-se aproximadamente 160mg de amostras de TAE, 30-50mg do TAM e 50mg de fígado, que foram homogeneizadas em reagente Trizol<sup>®</sup> (*Thermo Fisher-Life technologies*) (500µL) usando um homogeneizador Turrax, IKA por 2 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1.2000g por 5 min a 4°C e o sobrenadante coletado cuidadosamente. Foi adicionado 100 µL de clorofórmio em cada amostra e foi feita homogeneização em vórtex. A centrifugação foi repetida e o sobrenadante transferido para novos tubos. Adicionou-se 700 µL de etanol 70% e as amostras foram levadas ao vórtex. As amostras foram transferidas para novos tubos de purificação de RNA (Pure Link RNA Spin Cartridges kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações feitas pelo fabricante. A concentração de RNA obtido foi determinada usando o equipamento NanoDrop200 Spectrophotometer (Thermo FisherScientific, Massachusetts EUA).

Após essa etapa, foi realizada a conversão de RNAm em DNAc com a utilização do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts EUA) e do termociclador (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts EUA). A partir do DNAc, foi feita a determinação da expressão gênica utilizando os alvos de interesse. Para isso, utilizou-se *primers* apropriados para cada gene (Tabela 2) e SYBR® Green Jump Start™ TaqReady Mix™ (Sigma Aldrich) no termociclador *Step One Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts EUA).

#### 4.4 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA PARA DOSAGEM DE CITOCINAS NO FÍGADO

Proteínas foram extraídas de 30-50 mg de tecido hepático pulverizado usando um tampão lise (400 µL) (50 mM HEPES, NaCl 40 mM, NaF 50 mM, EDTA 2 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, glicerofosfato de sódio 10 mM, ortovanadato de sódio 1,5 mM, β-glicerofosfato de sódio 10 mM e um coquetel inibidor de protease (complete Mini, Roche)), e vortex de 15 segundos, sonificação por 5 minutos e vortex por 30 segundos. Em seguida, foi feita centrifugação 15000 *g* por 20 min e foi coletado o sobrenadante. A concentração proteica dos extratos foi realizada usando o Kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, EUA). Posteriormente, a concentração de citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-6, TNF-α e MCP-1 foi determinada por kits comerciais (DuoSet ELISA®, R&D Systems), de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 2 - Genes cuja expressão foi avaliada e a sequência dos *primers* utilizados.

<b>GENE</b>	<b>TECIDO</b>	<b>SEQUÊNCIA FORWARD</b>	<b>SEQUÊNCIA REVERSE</b>
<b>PPAR-A</b>	TAM e fígado	AGAGCCCCATCTGTCCTCTC	ACTGGTAGTCTGCAAAACCAA
<b>UCP1</b>	TAM	AGGCTTCCAGTACCATTAGGT	CTGAGTGAGGCAAAGCTGATTT
<b>CPT1-A</b>	TAM	CTCCGCCTGAGCCATGAAG	CACCAGTGATGATGCCATTCT
<b>IL-6</b>	TAE e fígado	AGACGCATCTCAGCTGGTAAAG	TGGGGGAGGATGTTTGGATG
<b>TNF-A</b>	TAE e fígado	GGGCAGTTAGGCATGGGATG	TACCTACGACGTGGGCTACAG
<b>F4/80</b>	TAE e fígado	GCCACGGGGCTATGGGATGC	TCCCGTACCTGACGGTTGAGCA
<b>INF-Y</b>	Fígado	TGCTGCTGATGGGAGGAGATG	CACATTCGAGTGCTGTCTGGC
<b>JNK</b>	Fígado	TCAGAAGCAGAAGCCCCACC	ACGGCTGCCCTCTTATGACTC
<b>INOS2</b>	Fígado	TTCTCAGCCACCTTGGTGAAG	ACTCCGTGGAGTGAACAAGACC
<b>FASN</b>	Fígado	GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT	TGGGTAATCCATAGAGCCCAG
<b>GAPDH</b>	Fíg, TAE, TAM	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGCT CA
<b>SREBP-1C</b>	Fígado	GTGGAGACGCTTACCCCTC	CCAAAGGATTGCAGGTCAGAC

Fonte: dados da pesquisa.

#### 4.5 ANÁLISE DE DADOS

A normalidade dos dados resultados da análise de expressão gênica e de marcadores plasmáticos do metabolismo foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, com o pós-teste de Tukey para verificar diferenças entre os grupos. Valores de  $p < 0,05$  foram aceitos para caracterizar diferenças entre os grupos. A análise de dados foi realizada pelo *software GraphPadPrism* versão 9.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO MODELO

O modelo de obesidade induzida pela dieta produziu apenas parcialmente a resposta esperada em termos de adiposidade e ganho de massa corporal. Ao optarmos por alojar os animais de forma individual para controlar de forma mais acurada a ingestão alimentar e conseqüentemente, o consumo de D-limoneno, induzimos um viés no estudo, uma vez que a ingestão alimentar foi menor do que se os camundongos estivessem alojados em grupos, devido ao comportamento social da espécie que influencia seus hábitos alimentares. Essa foi uma decisão consciente que, entretanto, teve um impacto no desenvolvimento do fenótipo obeso.

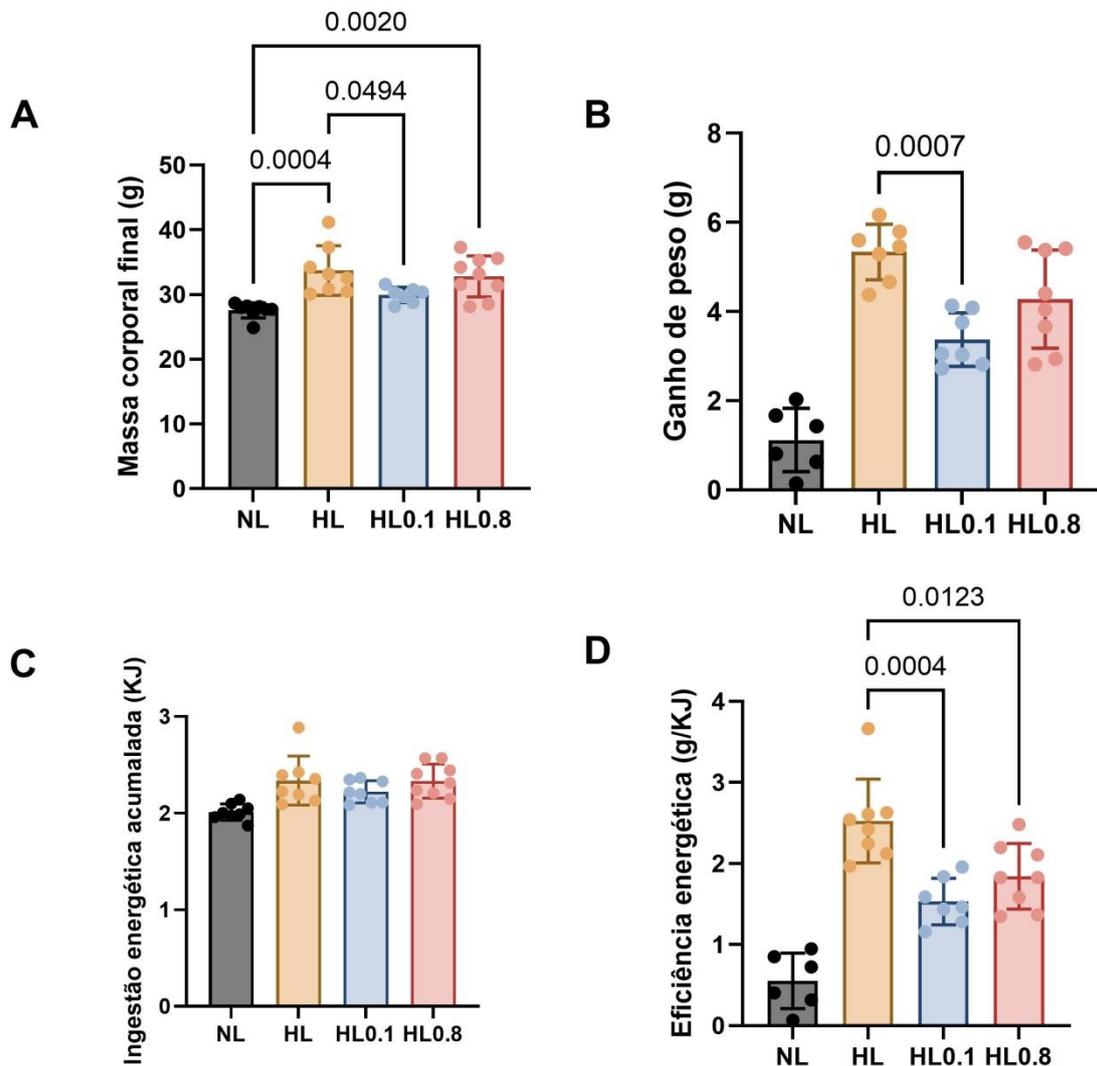
Apesar das limitações expostas acima, os animais do grupo HL apresentaram ganho de peso cerca de 3 vezes maior que os animais do grupo NL e a suplementação com D-limoneno induziu um efeito preventivo do ganho de peso (Figura 4). Os animais do grupo HL0.1% apresentaram ganho de peso e massa corporal final menor quando comparados com os animais do grupo HL ( $p=0,0007$  e  $0,049$ , respectivamente). Nos animais do grupo HL0.8%, a alta variabilidade interindividual da resposta impediu que o efeito da suplementação fosse observado, de forma que o ganho de peso apresentou um valor intermediário entre o grupo HL0.1% e o grupo HL e não houve diferença em comparação a este último grupo (Figura 4A e B). Em concordância com essas observações, VALERII *et al.* (2021) observaram diminuição do peso corporal em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com fibras enriquecidas de D-limoneno com dosagens de 30 e 60 mg/kg de peso corporal durante 12 semanas. No entanto, discrepâncias sobre a efetividade do D-limoneno no controle do peso corporal em obesidade têm sido relatadas. Um estudo com camundongos C57BL/6 com obesidade induzida por dieta hiperlipídica suplementada com 0,5% D-limoneno durante quatro semanas não observou diferenças significativas no peso corporal dos animais (JING *et al.*, 2013).

A diferença no ganho de peso induzida pela suplementação com D-limoneno foi devido à redução da eficiência energética observada nos grupos HL0.1% e HL0.8%, eliminando assim a hipótese que de o tratamento tenha reduzido a ingestão energética dos animais. Os animais do grupo HL apresentaram eficiência energética

5 vezes maior em comparação ao grupo NL e cerca de 35% maior em comparação aos grupos HL0.1% e HL0.8% ( $p < 0,02$ ) (Figura 4D). Os animais recebendo a ração hiperlipídica com ou sem suplementação de D-limoneno apresentaram uma ingestão energética similar durante o experimento, cerca de 12% maior que a ingestão dos animais do grupo NL (Figura 4C). O grupo alimentado com ração normolipídica apresentou menor ingestão energética comparado com os demais grupos

Figura 4 -Características fenotípicas dos animais.

A - Massa corporal final. B - Ganho de peso. C - Ingestão energética durante todo o período de tratamento (6 semanas). D - Eficiência energética. Dados apresentados como média e erro padrão da média. N = 8 – 10 animais/ grupo.

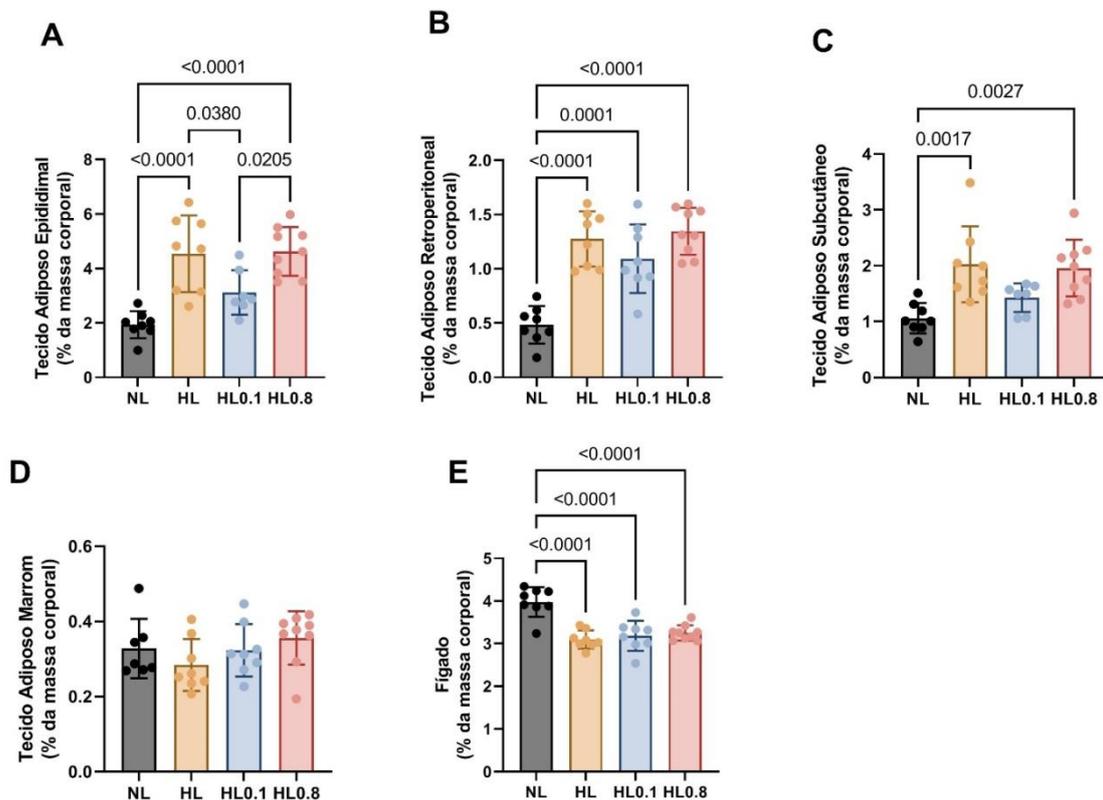


Fonte: dados da pesquisa.

Os animais alimentados com ração hiperlipídica apresentaram maior percentual de tecido adiposo branco (epididimal, retroperitoneal e subcutâneo) em relação ao grupo NL. Os animais que receberam suplementação com D-limoneno a 0,1% apresentaram menor acúmulo de tecido adiposo epididimal em comparação ao grupo HL, indicando um possível efeito anti-obesogênico do composto. Esse depósito de tecido adiposo apresentou massa 29% menor nos animais do grupo HL0.1% em comparação aos do grupo HL ( $p=0.038$ ). Os depósitos de tecido adiposo retroperitoneal e subcutâneo tendem a apresentar menor massa no grupo HL0.1% em comparação ao grupo HL, porém sem significância estatística (Figura 5).

Figura 5 - Indicadores de adiposidade.

A – Massa do tecido adiposo epididimal. B – Massa do tecido adiposo retroperitoneal. C – Massa do tecido adiposo subcutâneo. D – Massa do tecido adiposo epididimal. E – Massa do fígado. A massa dos depósitos de tecido adiposo e fígado está apresentada em relação percentual à massa do animal. Dados apresentados como média e erro padrão da média. N = 8 – 10 animais/ grupo.



Fonte: dados da pesquisa.

Ao contrário do observado nos depósitos de tecido adiposo branco, a massa de tecido adiposo marrom não foi modulada pelo conteúdo de lipídios da dieta e nem pela suplementação com D-limoneno (Figura 5D).

Essa observação contraria a hipótese original do estudo, que pressupunha estímulo à atividade do tecido adiposo marrom, de acordo com os dados reportados por estudos independentes que reportaram indução de *browning* em células 3T3-L1 tratadas com D-limoneno e aumento da atividade mitocondrial no tecido adiposo branco de camundongos tratados com D-limoneno (LONE; YUN, 2016). É possível que o tempo de tratamento adotado nesse estudo não tenha sido suficiente para induzir esse efeito. A suplementação com D-limoneno não induziu alteração da massa do fígado em relação ao peso corporal.

## 5.2 HOMEOSTASE GLICÊMICA E METABOLISMO DE LIPÍDIOS

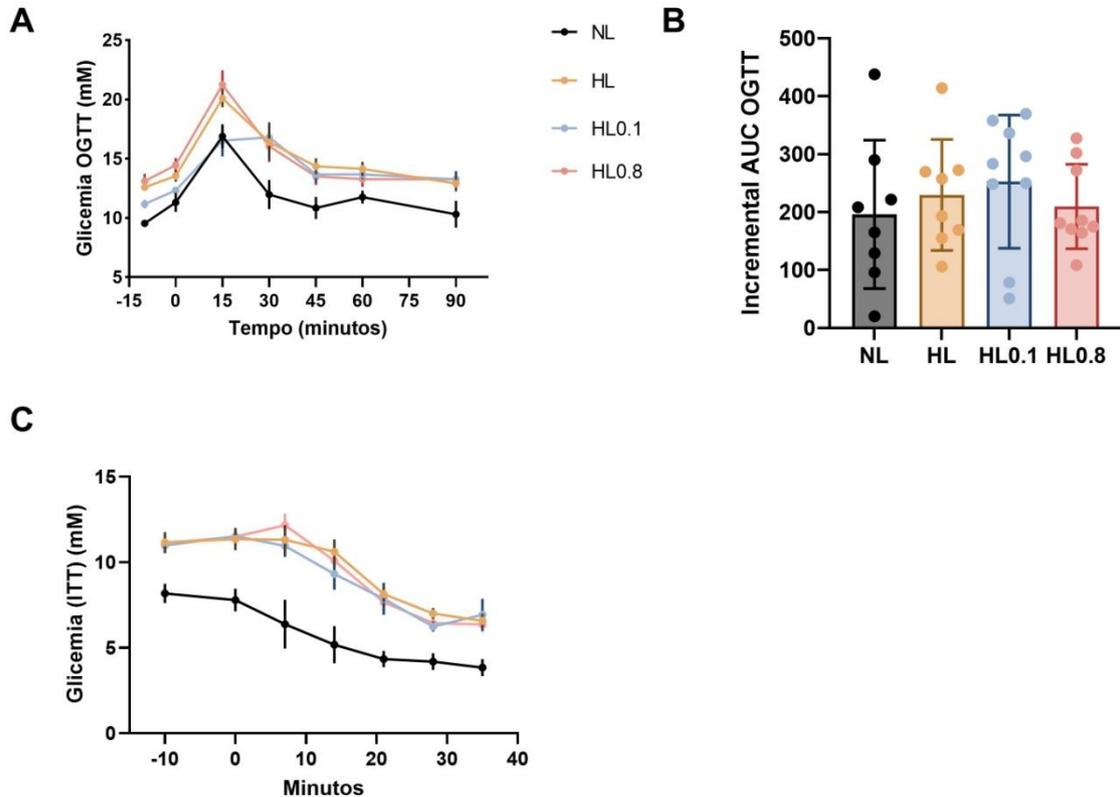
O modelo de obesidade induzida pela dieta produziu o efeito esperado nos valores de glicemia de jejum. Observa-se que a concentração de glicose no início (t = -10 e 0 minutos) do OGTT e ITT é de 28% maior nos animais do grupo HL em comparação aos do grupo NL ( $p < 0,0001$ ). Apesar disso, o efeito da ração hiperlipídica na resposta glicêmica durante o OGTT e ITT foi bastante modesto. Não há diferenças na área incremental sob a curva (iAUC) da glicemia durante o OGTT entre os animais que receberam dietas hiperlipídica e os do grupo NL e tampouco se observam diferenças entre os grupos no decaimento da glicemia durante o ITT (Figura 6). Essas observações reforçam a hipótese de que é possível que o tempo de exposição à dieta hiperlipídica tenha sido muito curto para induzir as alterações metabólicas esperadas em função da obesidade induzida pela dieta.

A administração de D-limoneno não afetou a tolerância à glicose (OGTT) nem a sensibilidade à insulina induzida (ITT). Essa observação é contrária aos achados de Jinget *et al.* (2013) que descrevem efeitos hipoglicemiantes e estimulantes da sensibilidade à insulina em camundongos que receberam suplementação de 0,5% D-limoneno com duração de 14 semanas. Outro estudo que avaliou o efeito antidiabético de um terpeno, foi o de Santos *et al.* (2022), que comparou a administração oral de  $\beta$ -pipeno, um monoterpene presente em diversas plantas medicinais e glibenclamida, um medicamento comumente utilizado para tratamento de diabetes mellitus. Nesse

caso, os autores observaram redução de glicemia em ratos machos Wistar. Acredita-se que no presente estudo a falha do modelo dietético em induzir intolerância à glicose e insensibilidade à insulina possa ter mascarado os efeitos do D-limoneno. A suplementação com o monoterpene não melhorou as respostas aos testes metabólicos uma vez que a ração hiperlipídica não induziu a deterioração da resposta metabólica. Apesar da ausência de resposta à suplementação com D-limoneno, durante o OGTT foi observado que no grupo HL0.1% houve uma tendência a menor valor máximo da concentração de glicose no sangue e um claro retardo na redução da glicemia após atingir o valor máximo em relação aos demais grupos. Observa-se que no grupo HL0.1%, a concentração máxima da glicose é mantida nos tempos 15 e 30 minutos, ao contrário dos demais grupos, onde a glicemia passa a apresentar concentrações menores após o pico observado aos 15 minutos (Figura 6A).

Figura 6 - Indicadores de sensibilidade à insulina e tolerância à glicose.

A – Glicemia durante o teste oral de tolerância a glicose (OGTT). B - Área sob a curva incremental da glicemia durante o OGTT. C – Glicemia durante o teste de tolerância a insulina (ITT). Dados apresentados como média e erro padrão da média. N = 8 – 10 animais/ grupo.



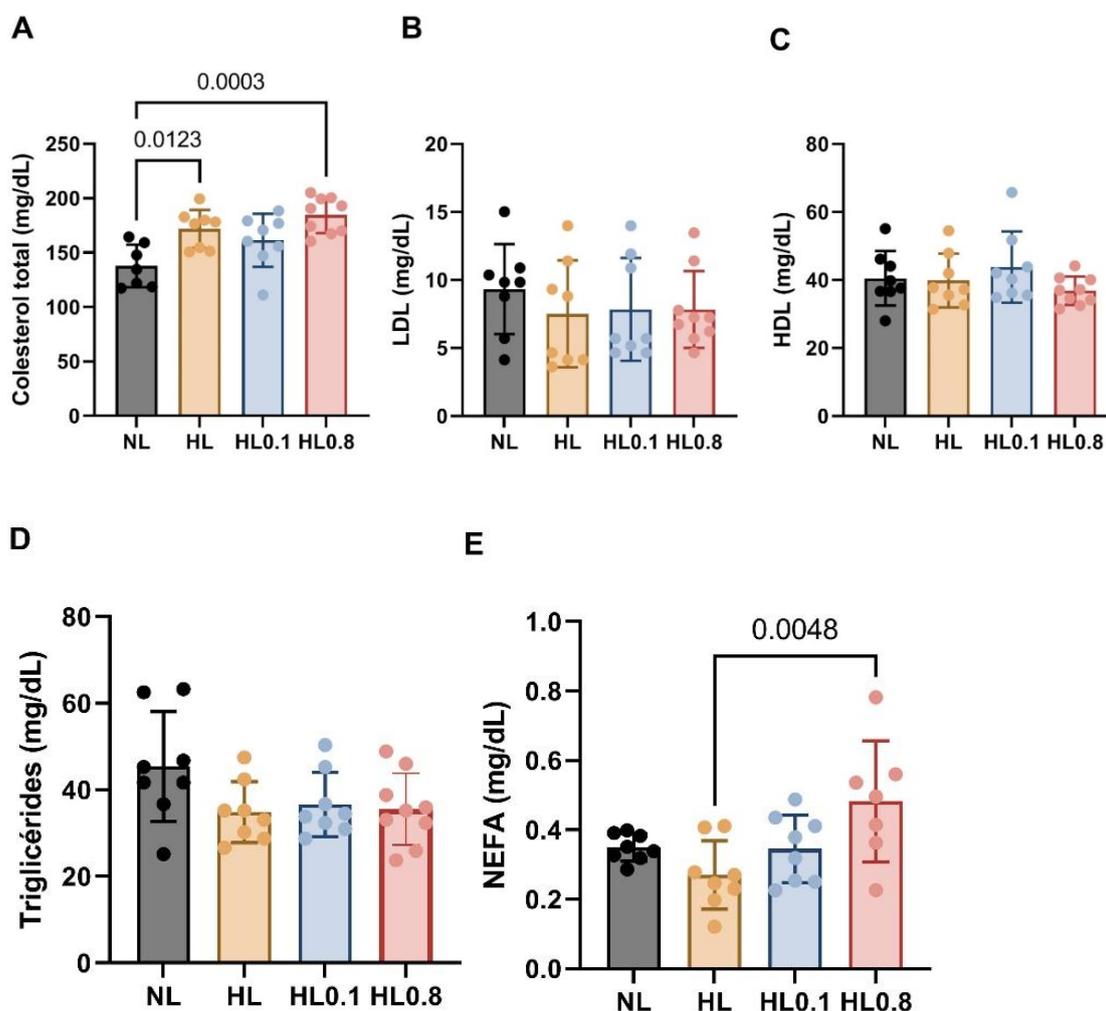
Fonte: dados da pesquisa.

Considerando-se os marcadores plasmáticos de metabolismo lipídico, o modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica produziu respostas pouco coerentes com resultados de outros estudos com o mesmo modelo, tornando difícil a sua interpretação. A revisão de Hegheset *al.* (2020) mostrou uma redução de LDL, triglicérides, colesterol total e aumento de HDL em sete estudos usando óleos essenciais, ricos em terpenos como tratamento. Também nesse caso temos a impressão de que não houve o estabelecimento de prejuízos ao metabolismo de lipídios induzidos pela dieta hiperlipídica. Talvez o tempo de exposição à dieta ou o alojamento dos camundongos individualmente tenham causado o desfecho observado. Os grupos HL e HL0.8% apresentaram valores de colesterolemia cerca de 8 - 10% maiores em relação aos animais do grupo NL ( $p < 0,02$ ). Essa diferença não foi observada entre o grupo HL 0.1% e NL, sugerindo um efeito hipocolesteremiante da suplementação nessa dosagem (Figura 7A). Não houve influência do teor de

lipídios da ração nas concentrações plasmáticas de colesterol nas LDL ou HDL e nas concentrações plasmáticas de triglicérides. Os animais HL0.8% apresentaram concentrações de NEFA cerca de 50% maiores em relação ao grupo HL, sendo esse um dado de difícil interpretação, podendo indicar aumento de lipólise no tecido adiposo (lipase hormônio sensível) ou a partir de lipoproteínas plasmáticas (lipase lipoproteica), ou menor captação de NEFA pelos tecidos.

Figura 7 - Marcadores plasmáticos do metabolismo lipídico.

A - Concentração plasmática de colesterol total. B - Concentração plasmática de colesterol em lipoproteínas de baixa densidade (LDL). C - Concentração plasmática de colesterol em lipoproteínas de alta densidade (HDL). D - Concentração plasmática de triglicérides. E - Concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados (NEFA). Dados apresentados como média e erro padrão da média. N = 7- 8 animais/ grupo.



Fonte: dados da pesquisa.

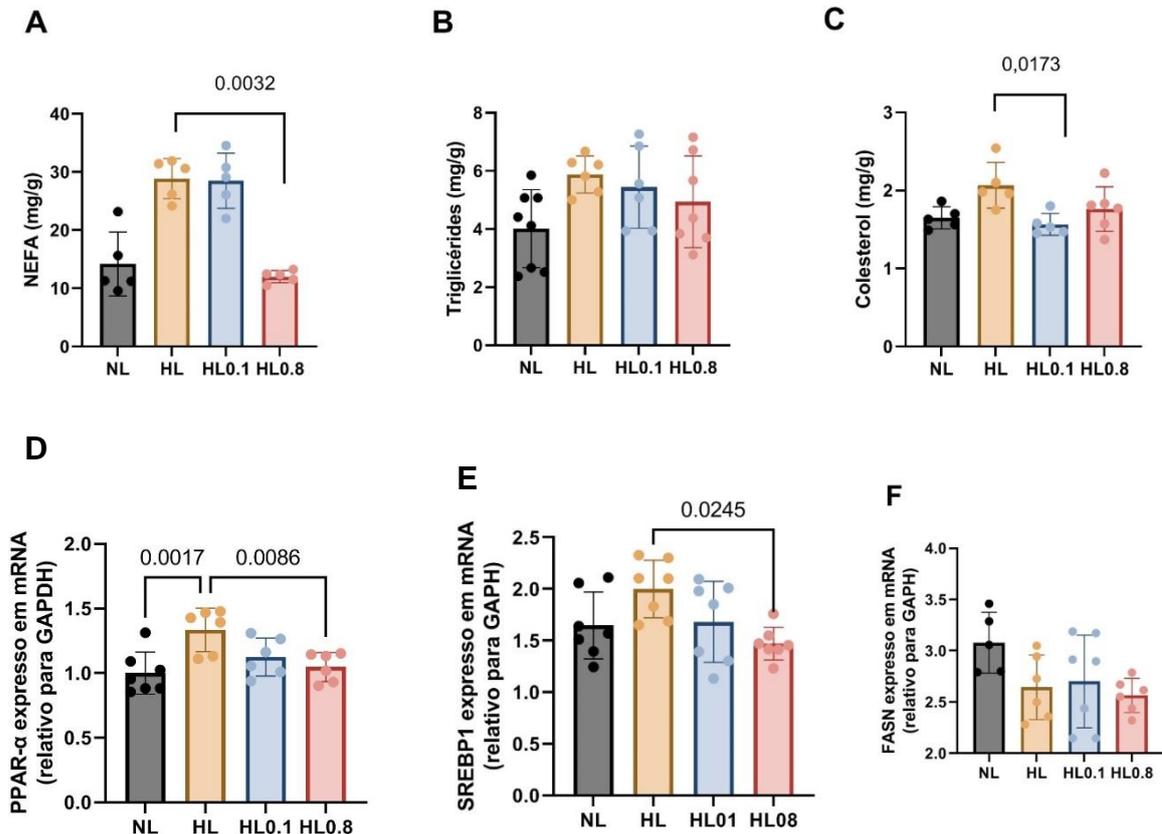
### 5.3 ESTEATOSE HEPÁTICA

Os animais do grupo HL não apresentaram maior conteúdo hepático de NEFA, triglicérides e colesterol em relação aos animais do grupo NL, apesar de uma tendência para essas diferenças. O contrário era esperado no modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica utilizado no estudo. Nesses parâmetros, novamente se vê que o modelo não induziu plenamente o fenótipo esperado. Os animais do grupo HL0.8% apresentaram conteúdo hepático de NEFA cerca de 60% menor em relação ao grupo HL ( $p=0,0032$ ), o que chama a atenção devido ao aumento de NEFA no plasma dos animais do grupo HL0.8% (Figuras 7E e 8A). Já os animais do grupo HL0.1% apresentaram 20% menos colesterol no fígado em relação ao grupo HL (Figura 8C). O conteúdo de triglicérides não apresentou diferenças induzidas pelo teor de lipídios da ração ou pela suplementação com D-limoneno, apesar da tendência para maior acúmulo hepático de triglicérides no grupo HL em relação ao NL e de um efeito do D-limoneno na redução do conteúdo hepático de triglicérides – efeitos não confirmados pela análise estatística (Figura 8B).

A expressão gênica dos fatores de transcrição PPAR- $\alpha$  e SREBP-1 foi aumentada no fígado dos animais do grupo HL em relação aos do grupo NL, sendo que a suplementação com D-limoneno reverteu esse aumento (Figura 8D e E). Como esperado, a expressão da enzima ácido graxo sintase (FASN) foi inibida no fígado dos animais que receberam ração hiperlipídica, mas a suplementação com D-limoneno não induziu efeitos adicionais (Figura 8F). Um estudo realizado com camundongos transgênicos na apolipoproteína E2 (APOE2) investigou os efeitos hipolipemiantes do óleo essencial de *Melissa officinalis*, naturalmente rico nos terpenos  $\beta$ -pineno e D-limoneno, relatando redução dos triglicérides plasmáticos, por redução na translocação de SREBP-1 ao núcleo e da expressão gênica da FASN, o que gerou a diminuição da síntese de ácidos graxos hepáticos (JUN *et al.*, 2012).

Figura 8 - Marcadores de esteatose hepática.

A – Conteúdo de ácidos graxos não esterificados (NEFA) no fígado. B – Conteúdo de triglicérides no fígado. C – Conteúdo de colesterol no fígado. D – Expressão de PPAR- $\alpha$  no fígado. E – Expressão de SREBP-1 no fígado. F – Expressão da ácido graxo sintase (FASN) no fígado. Dados apresentados como média e erro padrão da média. N = 5 - 7. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão de *gapdh* e normalizados pela sua conversão a logaritmo animais/ grupo.



Fonte: dados da pesquisa.

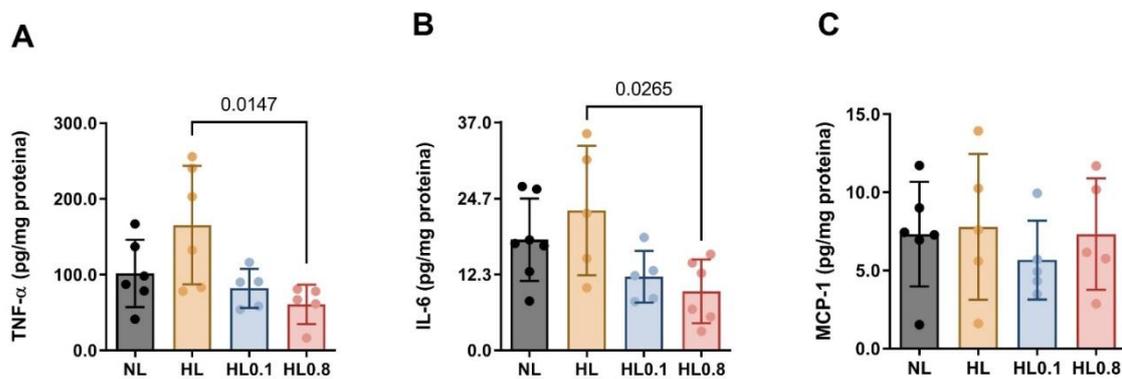
## 5.4 INFLAMAÇÃO HEPÁTICA E NO TECIDO ADIPOSEO

Um dos efeitos clássicos descrito em diversos estudos e revisões, atribuídos ao D-limoneno e outros monoterpênicos é a atenuação da inflamação (VIEIRA *et al.*, 2018; ANANDAKUMAR; KAMARAJ; VANITHA, 2021). No presente estudo, a ração hiperlipídica induziu um aumento no conteúdo hepático das citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  e IL-6 (tendência não confirmada pelo teste estatístico), conforme é esperado nesse modelo. Foi observado que a suplementação com D-limoneno em ambas as doses avaliadas inibiu esse aumento sem alterar o conteúdo hepático da citocina MCP-1 (Figura 9). No estudo realizado por Amini, Asle-Rousta e Aghazadeh (2020),

o limoneno impediu o aumento de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e NF-kB no parênquima hepático de ratos machos expostos a imobilização crônica. Rufino *et al.* (2015) avaliaram o efeito do limoneno na osteoartrite e demonstraram que o limoneno inibe o aumento de óxido nítrico induzido por IL-1 $\beta$ , caracterizando o efeito anti-inflamatório. No presente estudo, quando analisamos a expressão gênica das citocinas TNF $\alpha$  e INF $\gamma$ , observa-se que os animais do grupo HL0.1% apresentam menores valores em comparação ao grupo HL ( $p < 0,05$ ), sem que a expressão de JNK e iNOS fosse alterada pela suplementação (Figura 10). Destacamos que o teor de lipídios da dieta não alterou a expressão gênica dos marcadores inflamatórios avaliados.

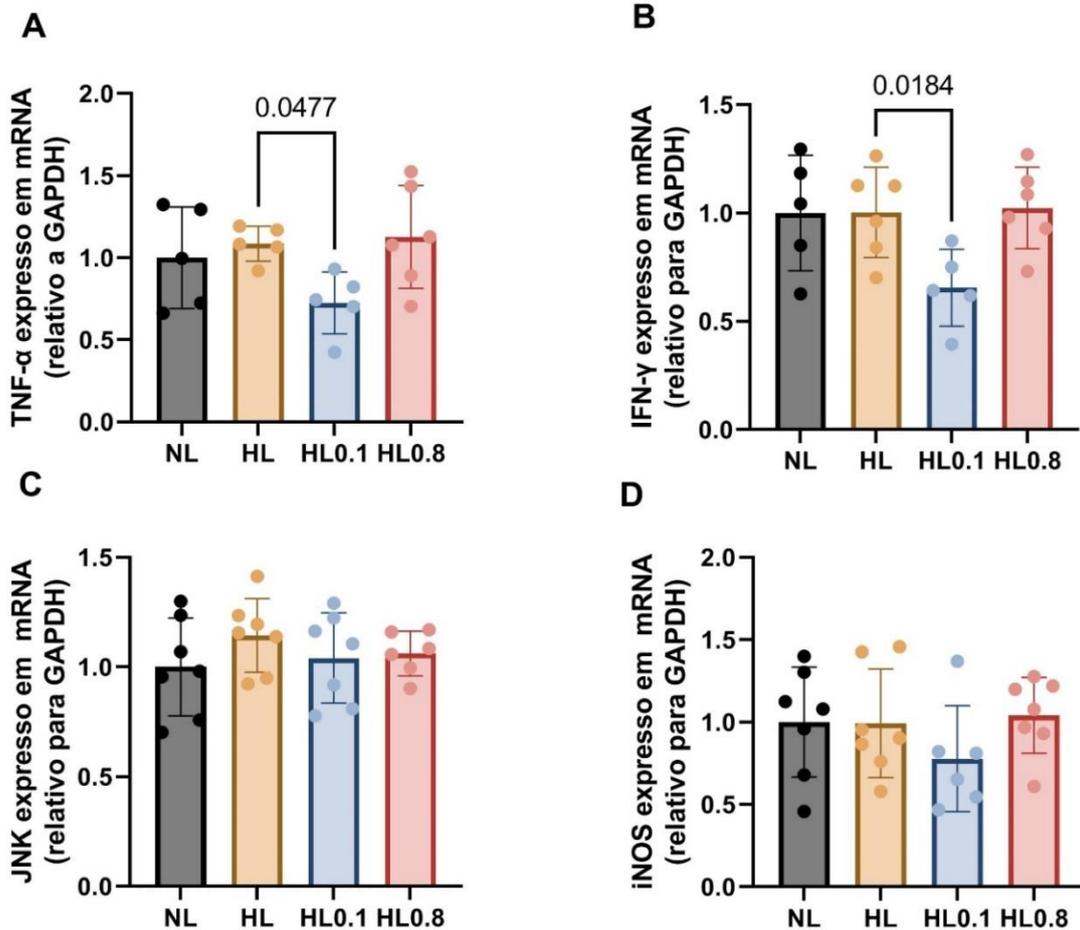
Figura 9 - Marcadores de inflamação hepática dosagem proteica.

A – Conteúdo de TNF- $\alpha$ . B – Conteúdo de IL-6. C – Conteúdo de MCP-1. Dados apresentados como média e erro padrão da média. N = 5 - 7 animais/ grupo, análise realizada por ensaio de imunoabsorção enzimática.



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 10 - Marcadores de inflamação hepática expressão gênica. A – Expressão gênica de TNF- $\alpha$ . B – Expressão gênica de INF- $\gamma$ . C – Expressão gênica de JNK. D – Expressão gênica de iNOS. Dados apresentados como média e erro padrão da média. N = 5 animais/grupo. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão de *gapdh* e normalizados pela sua conversão a logaritmo.

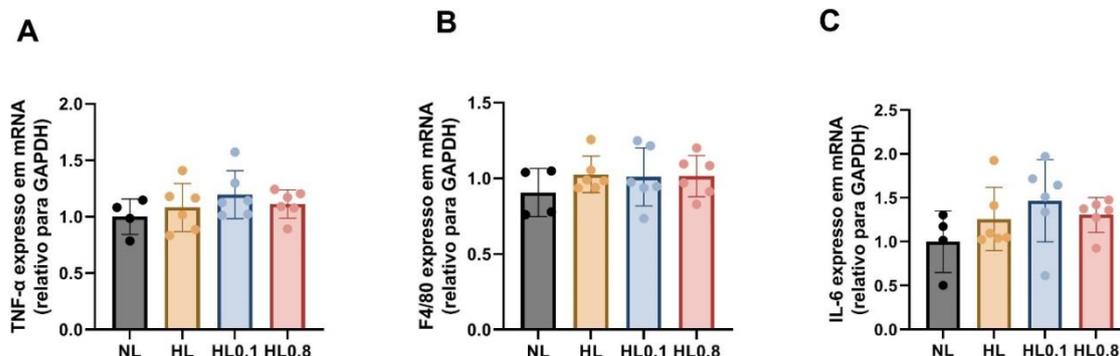


Fonte: dados da pesquisa.

Os indícios de atividade anti-inflamatória do D-limoneno observados no fígado não foram encontrados no tecido adiposo epididimal. A expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 não foram alteradas no tecido adiposo pela suplementação com D-limoneno (Figura 11). Tampouco foi observado alteração na expressão gênica de F4/80 no tecido adiposo, que é utilizada como marcador de infiltração macrófaga no tecido. À semelhança de outros marcadores, também no caso desses genes não foram observados efeitos do teor de lipídios da ração, indicando que o modelo de obesidade induzida pela dieta não se manifestou plenamente.

Figura 11 - Marcadores de inflamação no tecido adiposo epididimal.

A – Expressão gênica de TNF- $\alpha$ . B – Expressão gênica de F4/80. C – Expressão gênica de IL-6. Dados apresentados como média e erro padrão da média. N = 4 - 6 animais/ grupo. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão de *gapdh* e normalizados pela sua conversão a logaritmo.



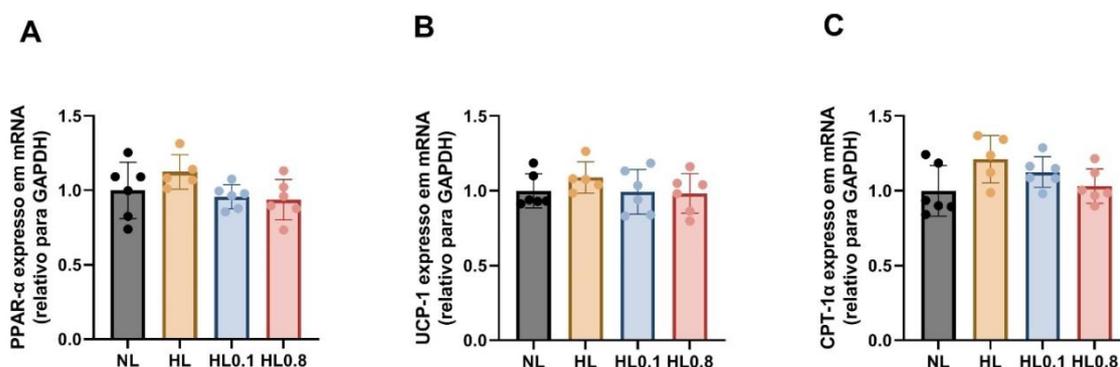
Fonte: dados da pesquisa.

## 5.5 MARCADORES DE TERMOGÊNESE NO TECIDO ADIPOSITO MARROM

Contrariando uma das hipóteses que motivou esse estudo, não foram observadas diferenças na expressão gênica de marcadores de termogênese no tecido adiposo marrom em nenhum dos grupos. Nem o teor de lipídios da ração e tampouco a suplementação com D-limoneno induziram alterações na expressão de PPAR $\alpha$ , UCP1 e CPT1 (Figura 11).

Figura 12 - Marcadores de atividade termogênica no tecido adiposo marrom.

A – Expressão gênica de PPAR- $\alpha$ . B – Expressão gênica de UCP-1. C – Expressão gênica de CPT-1 $\alpha$ . Dados apresentados como média e erro padrão da média. N = 6 animais/ grupo. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão de *gapdh* e normalizados pela sua conversão a logaritmo.



Fonte: dados da pesquisa.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nessa dissertação indicam que o D-limoneno pode ter um efeito modulatório do metabolismo energético, sem que haja um efeito dose-dependente. Essa conclusão está baseada no menor ganho de peso, eficiência energética e acúmulo de tecido adiposo branco nos animais do grupo HL0.1% em relação aos que receberam ração hiperlipídica sem suplementação. Também foram observados claros indícios da atividade anti-inflamatória do monoterpeneo, particularmente ao observar o conteúdo e a expressão gênica de marcadores inflamatórios no fígado dos animais que receberam a suplementação com D-limoneno, sem que houvesse efeito anti-inflamatório no tecido adiposo branco.

Os resultados descritos acima foram apesar dos problemas associados ao modelo experimental que impactaram o pleno desenvolvimento do fenótipo associado à obesidade induzida pela dieta hiperlipídica. A decisão de alojar os animais individualmente - para controlar com precisão a ingestão de D-limoneno - certamente diminuiu a ingestão alimentar e o ganho de peso, uma vez que os animais aumentam a ingestão energética quando alojados em grupo. É possível que a idade dos animais no início do protocolo (11 semanas), tenha atrapalhado o desenvolvimento da obesidade, uma vez que animais mais jovens, seriam mais suscetíveis à obesidade nesse modelo. Também é possível que o tempo de exposição à ração hiperlipídica tenha sido muito curto, não permitindo que marcadores clássicos do modelo de obesidade como esteatose hepática, inflamação e dislipidemia se estabelecessem, deixando pouca margem para que os efeitos do D-limoneno fossem observados.

Apesar dos problemas, o trabalho trouxe novos conhecimentos e os dados obtidos reforçam a necessidade de mais estudos com o D-limoneno e outros monoterpeneos, dado o potencial desse composto para a modulação do metabolismo energético e inflamação.

## **7 APOIO FINANCEIRO**

Esse projeto de Mestrado está vinculado ao projeto Regular FAPESP 2018/19189-0. As pesquisadoras são gratas também pelo apoio do FoodResearch Center (FoRC) e à CAPES pela bolsa de mestrado concedida à estudante Lara dos Santos Martins da Silva, Programa de Demanda Social, número de processo: 88887.486139/2020-0.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, José Fernando Rinaldi de *et al.* Monoterpenes: current knowledge on food source, metabolism, and health effects. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.], p. 1-38, 2021.

AMINI, Rahim; ASLE-ROUSTA, Masoumeh; AGHAZADEH, Safieh. Hepatoprotective effect of limonene against chronic immobilization induced liver damage in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Of Pharmacology**, [s.l.], v. 393, n. 11, p. 2053-2059, 2020.

ANANDAKUMAR P.; KAMARAJ S.; VANITHA M. K. D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects. **J Food Biochem**, [s.l.], v. 45, n. 1, e13566, 2021.

BACANLI, Merve *et al.* D-limonene ameliorates diabetes and its complications in streptozotocin-induced diabetic rats. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 110, p. 434-442, 2017.

BARTELT, Alexander; HEEREN, Joerg. Adipose tissue browning and metabolic health. **Nature Reviews Endocrinology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 24-36, 2013.

BREA, Ángele *et al.* Enfermedad del hígado graso no alcohólico, asociación con la enfermedad cardiovascular y tratamiento (II). Tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico. **Clínica e Investigación En Arteriosclerosis**, [s.l.], v. 29, n. 4, p. 185-200, jul. 2017.

BROPHY, Megan L. *et al.* Eating the dead to keep arteriosclerosis at bay. **Frontiers In Cardiovascular Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 1-13, 2017.

COTRIM, Helma. Esteatose Hepática (São Paulo). **Sociedade Brasileira de Hepatologia**, 2016.

DIAS, Patricia Camacho *et al.* Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 33, n. 7, p. 1-12, dez. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00006016>. Acesso em: 21 nov. 2022.

FANG, H.; JUDD, R. L. Adiponectin Regulation and Function. **ComprPhysiol**, [s.l.], v. 18, n. 3, p. 1031-1063, 2018.

FARZANEGI, Parvin *et al.* Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): roles of oxidative stress and inflammation. **European Journal Of Sport Science**, [s.l.], v. 19, n. 7, p. 994-1003, 2019.

FRANCO, Bruna. SBACV Aterosclerose e Doença Obstrutiva (Rio de Janeiro). **Sociedade Brasileira de Angiologia e de Cirurgia Vasculiar**, 2016.

FERRONATTO, Andressa Neuhaus; ROSSI, RocheleCassanta. Extração e aplicação do óleo essencial da casca da laranja como um ingrediente natural. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 79-80, 2018.

GEILLINGER, Kerstin E. et al. Hepatic metabolite profiles in mice with a suboptimal selenium status. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [s.l.], v. 25, n. 9, p. 914-922, 2014.

HARA, Atsushi; RADIN, Norman S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 90, n. 1, p. 420-426, out. 1978. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90046-5](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(78)90046-5).

HEGHES, SimonaCodrutaet al. Essential Oil-Bearing Plants From Balkan Peninsula: promising sources for new drug candidates for the prevention and treatment of diabetes mellitus and dyslipidemia. **Frontiers In Pharmacology**, [s.l.], v. 11, n. 989, p. 1-11, 2020.

HEINDEL, Jerrold J. et al. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. **Reproductive Toxicology**, [s.l.], v. 68, p. 3-33, 2017.

HU, Huiminget al. Effects of an Enriched Extract of Paeoniflorin, a Monoterpene Glycoside used in Chinese Herbal Medicine, on Cholesterol Metabolism in a Hyperlipidemic Rat Model. **Medical Science Monitor**, [s.l.], v. 23, p. 3412-3427, 2017.

Hunter PM, Hegele RA. Functional foods and dietary supplements for the management of dyslipidaemia. **Nat Rev Endocrinol.**,[s.l.], v. 13, n. 5, p. 278-288, 2017.

IGIMI, Hirotsume et al. Studies on the Metabolism of d-Limonene (p-Mentha-1,8-diene): I. The Absorption, Distribution and Excretion of d-Limonene in Rats. **Xenobiotica**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 77-84, 1974.

JIDONG, Sun. D-limonene. Safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, [s.l.], v. 12, n. 3, p. 259-64, 2007.

JING, Liet al. Preventive and ameliorating effects of citrus d-limonene on dyslipidemia and hyperglycemia in mice with high-fat diet-induced obesity. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 715, n. 1-3, p. 46-55, set. 2013.

JUN, Hee-Jinet al. Melissa officinalis Essential Oil Reduces Plasma Triglycerides in Human Apolipoprotein E2 Transgenic Mice by Inhibiting Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c-Dependent Fatty Acid Synthesis. **The Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 142, n. 3, p. 432-440, 2012.

KHAN, Mehmood et al. BIOSYNTHESIS OF C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> (LIMONENE) BY MEVALONATE PATHWAYS AND ITS PHARMACOLOGICAL APPLICATIONS. **International Journal Of Biology And Biotechnology**, Pakistan, v. 1, n. 16, p. 9-21, jan. 2019.

KLEPAC, Katarina *et al.* The role of brown and beige adipose tissue in glycaemic control. **Molecular Aspects Of Medicine**, [s.l.], v. 68, p. 90-100, 2019.

KIRWAN, A. *et al.* Nutritional modulation of metabolic inflammation. **Biochemical Society Transactions**, [s.l.], v. 45, n. 4, p. 979-985, 14 jul. 2017.

LIN, Li-Yunet *al.* Lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) essential oils: volatile compounds, antioxidant capacity, and hypolipidemic effect. **Foods** **8**, [s.l.], n. 9, 2019.

LONE, Jameel; YUN, Jong Won. Monoterpene limonene induces brown fat-like phenotype in 3T3-L1 white adipocytes. **Life Sciences**, [s.l.], v. 153, n. 1, p. 198-206, 2016.

MUKHTAR, Yusif M. *et al.* Biochemical significance of limonene and its metabolites: future prospects for designing and developing highly potent anticancer drugs. **Bioscience Reports**, [s.l.], v. 38, n. 6, p. 13-19, 14 nov. 2018.

MURALI, R.; KARTHIKEYAN, A.; SARAVANAN, R. Protective Effects of D-Limonene on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [s.l.], v. 112, n. 3, 2013.

NASCIMENTO, Sara Sayonara da Cruz *et al.* What are the mechanisms of action of anti-inflammatory agents in adipose tissue? **Medicine**, [s.l.], v. 100, n. 8, p. 1-5, 2021.

NI, Yinhua *et al.* Novel Action of Carotenoids on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Macrophage Polarization and Liver Homeostasis. **Mdpi: Nutrients**, Ishikawa, Japão, v. 7, n. 8, p. 2-16, 2016.

OPAS/OMS Brasil. 10 principais causas de morte no mundo. OPAS/OMS Brasil, 2018. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5638:10-principais-causas-de-morte-no-mundo&Itemid=0](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5638:10-principais-causas-de-morte-no-mundo&Itemid=0). Acesso em: 04 out. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Controlando a epidemia global de obesidade**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/activities/controlling-the-global-obesity-epidemic>. Acesso em: 26 set. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Diretriz da OMS: Gestão de adolescentes de 10 a 19 anos de idade com obesidade para melhorar a saúde, funcionalidade e redução da incapacidade: uma abordagem de atenção primária à saúde**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/events/detail/2021/10/28/default-calendar/3rd-GDG-meeting-management-of-adolescents-10-19-years-of-age-with-obesity-for-improved-health-functioning-and-reduced-disability-a-primary-health-care-approach>. Acesso em: 26 jun. 2022.

RUFINO, Ana Teresa *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of E-caryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 750, p. 141-150, mar. 2015.

- SALTIEL, Alan R.; OLEFSKY, Jerrold M.. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 127, n. 1, p. 1-4, 3 jan. 2017.
- SAINI, R. *Ket al.* Bioactive Compounds of Citrus Fruits: A Review of Composition and Health Benefits of Carotenoids, Flavonoids, Limonoids, and Terpenes. **Antioxidants (Basel)**. [s.l.], v. 26; 11, n. 2, p. 239, 2022.
- SANTIAGO,Victoret *al.* Dietary d-limonene alleviates insulin resistance and oxidative stress–induced liver injury in high-fat diet and L-NAME-treated rats. **European Journal of Nutrition**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 57–68, 2012.
- SANTOS, EnaideSoareset *al.* Hypoglycemic, Hypolipidemic, and Anti-Inflammatory Effects of Beta-Pinene in Diabetic Rats. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2022, p. 1-8, 2022.
- SCHMIDT, Lukas; GÖEN, Thomas. R-Limonene metabolism in humans and metabolite kinetics after oral administration. **Archives Of Toxicology**, [s.l.], v. 91, n. 3, p. 1175-1185, 2016.
- STEINBERG, Daniel. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. **Journal Of Lipid Research**, [s.l.], v. 50, n. 1, p. 376-381, 2008.
- TAN, X.c. *et al.* Monoterpenes: Novel insights into their biological effects and roles on glucose uptake and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 196, p. 242-250, 2016.
- TARGHER, Giovanni *et al.* Risk of Cardiovascular Disease in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **The New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 363, 2010.
- TAVARES, A *et al.* Cirurgia bariátrica: do passado ao século XXI [Bariatricsurgery: epidemicofthe XXI century]. **Acta Med Port**. [s.l.], v. 24, n. 1, p. 111-116, 2011.
- TOLMAN, Keith G; DALPIAZ, Anthony S. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Therapeutics And Clinical Risk Management**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 1-9, 2007.
- THOLL, D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *In*: SCHRADER, J.;BOHLMANN, J. (ed.). **Biotechnology of Isoprenoids: advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. [s.n.]: [s.l.], 2015.
- VALERII, Maria Chiara *et al.* Effect of a Fiber D-Limonene-Enriched Food Supplement on Intestinal Microbiota and Metabolic Parameters of Mice on a High-Fat Diet. **Pharmaceutics**, Italy, v. 11, n. 13, p. 1-13, nov. 2021.
- VIEIRA, A.J. *et al.* Limonene: aroma of innovation in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, [s.l.], v. 283, p. 97-106, mar. 2018.

JACKSON, M. *et al.* Latest approaches for the treatment of obesity. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [s.l.], v. 10, n. 8, p. 825-839, 2015.

ZARE, A. *et al.* A highly efficient protocol for the synthesis of N-aryl nucleobases using zinc oxide in ionic liquids. **Journal Of The Iranian Chemical Society**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 461-469, jun. 2010.

WANG, Qing-Shan *et al.* Protective effect of orange essential oil on the formation of non-alcoholic fatty liver disease caused by high-fat diet. **Food & Function**, [s.l.], v. 13, n. 2, p. 933-943, 2022.

## ANEXO 1 – ROTULAGEM DA RAÇÃO NORMOLIPÍDICA USADA DURANTE O ESTUDO. DESCRIÇÃO DA COMPOSIÇÃO DIETÉTICA

# RHOSTER



DIETA PADRÃO AIN-93M para manutenção

RH19521

### INGREDIENTES

Amido de Milho, Caseína Láctea, Amido Dextrinizado (90-94% tetrassacarídeos), Sacarose, Óleo de Soja, Celulose (Fibra), Mix Mineral AIN-93M (RH9502), Mix Vitaminico AIN-93 (RH9503), L-Cistina, Bitartarato de Colina (41,1% Colina), Tert-Butilidroquinona (TBHQ).

### PERFIL NUTRICIONAL

Proteína	13,45%	14,79 kcal%
Carboidrato	68,92%	75,76 kcal%
Lípidios	3,82 %	9,45 kcal%
Dieta	3,6 kcal/g	

Referência Bibliográfica: J. Nutr. 123: 1939-1951, 1993

### Nível de Garantia por Quilograma do Produto

Umidade (Máx.)	97g	9,72%
Proteína Bruta (Mín.)	135g	13,45%
Extrato Etéreo (Máx.)	38g	3,82%
Fibra Bruta (Máx.)	14g	1,36%
Matéria Mineral (Mín.)	27g	2,73%
Cálcio (Mín./Máx.)	5,2g	0,52%
Fósforo (Mín.)	3,5g	0,35%



### AMINOÁCIDOS

Proteína Bruta	13,45%
Alanina	g/kg 3,3
Arginina	g/kg 4,5
Ác. Aspártico	g/kg 8,0
Glicina	g/kg 2,3
Isoleucina	g/kg 6,0
Leucina	g/kg 11,0
Ác. Glutâmico	g/kg 25,5
Lisina	g/kg 9,2
Cistina	g/kg 2,4
Metionina	g/kg 3,5
Fenilalanina	g/kg 6,1
Tirosina	g/kg 6,5
Treonina	g/kg 4,7
Prolina	g/kg 14,5
Valina	g/kg 7,0
Histidina	g/kg 3,3
Serina	g/kg 6,8
Triptofano	g/kg 1,8

Produto sob encomenda

Pedido mínimo de 3kg em pacotes de 1kg

Manter em temperatura de 4°C ou inferior

Validade de 3 meses após data de fabricação ou 5 meses em freezer

Fórmulas especiais para autodavagem e irradiação

Av. Ministro Antonino Vieira do Amaral, 1556 - Cx.P.46 - Jd. Salete

Araçoiaba da Serra - SP - CEP: 18190-000

(15) 3281.4748 / Fax (15) 3281.3037 / e-mail: rhoster@rhoster.com.br

## ANEXO 2 - ROTULAGEM DA RAÇÃO HIPERLIPIDICA USADA DURANTE O ESTUDO. DESCRIÇÃO DA COMPOSIÇÃO DIETÉTICA.

# RHOSTER



DIETA HIPERLIPÍDICA 60% kcal lipídios

RH19531M

Perfil Calórico	%	% kcal
Proteína	23,5	18,4
Carboidrato	27,3	21,3
Gordura	34,3	60,3
Dieta 5,1 kcal/g	***	***

\*Dieta Purificada para Indução de Obesidade

\*Produzida em PASTA - pacotes de 500g

\*Quantidade mínima 3kg

\*Prazo de Entrega: até 15 dias

#### Ingredientes

Caseína Láctea, Amido Dextrinizado, Gordura Animal, Sacarose, Óleo de Soja, Celulose, Mix Mineral RH9502\*, Mix Vitamínico RH9503\*\*, Fosfato de Cálcio bivalente, L-Cistina, Bitartrato de Colina, Tert-Butilhidroquinona (TBHQ) Sigma-Aldrich.

#### Mais Informações

\*Mix Mineral AIN-93M

\*\*Mix Vitamínico AIN-93

\*\*\*Resultados calculados a partir da análise de um determinado lote fabricado.

60% das kcal totais são provenientes dos ingredientes lipídicos.

Perfil aproximado de ácidos graxos: 37% saturados, 47% monoinsaturados, 16% poliinsaturados.

RHOSTER INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA.

Av. Ministro Antônio Vieira do Amaral, 1556 - Cx.P.46 - Jd.Saleta - Araçolaba da Serra/SP - CEP: 18190-000

Fones: (15) 3281-3037 / (15) 3281-4748 - CNPJ 00.984.204/0001-04 - Inscr.Estadual 178.070.220.114

Acesse o site para cadastro e orçamento: [www.rhoster.com.br](http://www.rhoster.com.br)