

IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DO D-LIMONENO E SEU EFEITO NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CAMUNDONGOS

Caroline Lei Preti

Lara dos Santos Martins da Silva

José Fernando Rinaldi de Alvarenga

Jarlei Fiamoncini

Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Universidade de São Paulo

carolineleip@usp.br; jarlei@usp.br

Objetivos

Estudos recentes mostram o potencial do D-limoneno na regulação do metabolismo energético, embora os mecanismos de ação pelos ainda não estejam completamente esclarecidos (2-3). Como ocorre com outros compostos bioativos, é possível que metabólitos oriundos da biotransformação do D-limoneno sejam responsáveis pela sua bioatividade. Estudos em modelos animais utilizam doses altas e, portanto, deve considerar o *metabolic switching* ou dose-dependência, uma vez que concentrações diferentes podem resultar na saturação de determinadas vias metabólicas, levando a metabólitos distintos, que podem ter diferentes efeitos no organismo (4). O objetivo desse projeto foi avaliar o efeito do D-limoneno e seus metabólitos no metabolismo energético de camundongos C57/Bl6 de acordo com o consumo a partir da identificação pela urina.

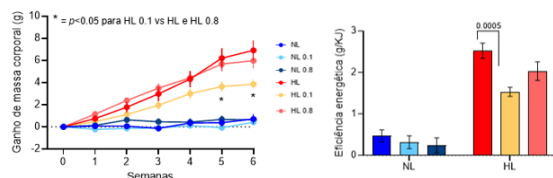
Métodos e Procedimentos

O protocolo experimental foi aprovado pela CEUA FCF – Protocolo 576. Camundongos machos (C57/Bl6) com 11 semanas de idade foram distribuídos em 6 grupos experimentais.

Após uma semana de adaptação, 3 grupos receberam ração normolipídica e 3 hiperlipídica, suplementadas com diferentes concentrações de D-limoneno (0; 0,1 e 0,8%). Foram monitorados o consumo alimentar e o ganho de peso durante as 6 semanas do experimento. Amostras de urina foram coletadas antes da suplementação e na semana 6, na qual se realizou também o OGTT. Ao fim da semana 6 coletou-se o plasma e tecidos dos animais após a eutanásia dos animais. As amostras de urina foram submetidas à análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-qToF-MS/MS) para identificação dos metabólitos do D-limoneno.

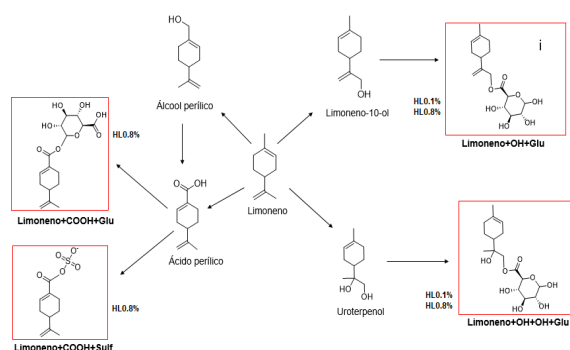
Resultados

Não houve diferença induzida pela suplementação com D-limoneno no OGTT. O grupo HL 0.1% apresentou menor eficiência energética, menor ganho de peso e menor acúmulo de tecido adiposo branco (cerca de 30%), mesmo mantendo uma ingestão energética equiparada aos demais grupos alimentados com ração hiperlipídica.



A: Evolução da massa corporal; B: Eficiência energética durante o período de suplementação.

A partir de uma busca na literatura dos metabólitos de fase I produzidos a partir do D-limoneno, foram identificados os metabólitos de fase II em destaque: limoneno+COOH+Glu (m/z 341.1243; [-0,3 ppm]; $C_{16}H_{21}O_8$) e limoneno+COOH+Sulf (m/z 245.0490; [-2,8 ppm]; $C_{10}H_{13}O_5S$) que foram conjugados com glicuronídeo e sulfato, respectivamente, possivelmente a partir do ácido perílico, o qual sofreu reação de biotransformação de fase I diretamente a partir do precursor ou a partir do álcool perílico. O limoneno+OH+OH+Glu (m/z 341.1555; [0,9 ppm]; $C_{16}H_{25}O_8$) pode ter se originado do metabólito de fase I já descrito como uroterpenol, que sofreu uma glicuronidação. Por fim, para o limoneno+OH+Glu foram identificados 3 isômeros de posição com m/z 327.1450 e fórmula molecular $C_{16}H_{23}O_7$: Limoneno+OH+glu I [0,2 ppm], limoneno+OH+glu II [0,4 ppm] e limoneno+OH+glu III [0,8 ppm]. Um desses isômeros pode ser atribuído ao metabólito de fase I limoneno-10-ol, sofrendo posteriormente conjugação com o ácido glicurônico. Importante ressaltar que apenas os metabólitos hidroxilados foram encontrados no grupo HL 0.1%.



Mapa metabólico destacando os metabólitos de fase II identificados. A estrutura contendo "i" indica que foram encontrados isômeros de posição na identificação.

Conclusões

A diferença em relação a presença de metabólitos entre os grupos pode estar relacionada com os resultados observados no grupo HL 0.1%, indicando a ocorrência de *metabolic switching*. No entanto, ainda existem outros metabólitos possíveis de serem encontrados na urina que não foram identificados. Um projeto subsequente já em andamento irá explorar quantitativamente e qualitativamente a presença desse e de outros metabólitos e investigar possíveis correlações entre a presença dos metabólitos e os efeitos da suplementação com D-limoneno no metabolismo. *Esse estudo foi financiado pela FAPESP e pelo CNPq (AR 2018-19189-0 e bolsa IC 2021/02855-0; 124054/2020-0).*

Referências Bibliográficas

- Kalaki R, Milan P, Neves MF, Lopes FF, Trombin VG. The orange juice business. The orange juice business. 2012.
- Bacanli M, Anlar HG, Aydın S, Çal T, Ari N, Ündeğer Bucurgat Ü, et al. d - limonene ameliorates diabetes and its complications in streptozotocin-induced diabetic rats. Food Chem Toxicol [Internet]. 2017 Dec;110:434–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691517305392>
- Victor Antony Santiago J, Jayachitra J, Shenbagam M, Nalini N. Dietary d-limonene alleviates insulin resistance and oxidative stress-induced liver injury in high-fat diet and L-NAME-treated rats. Eur J Nutr [Internet]. 2012 Feb 29;51(1):57–68. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00394-011-0182-7>
- Smith RL, Cohen SM, Fukushima S, Gooderham NJ, Hecht SS, Guengerich FP, et al. The safety evaluation of food flavouring substances: the role of metabolic studies. Toxicol Res (Camb) [Internet]. 2018;7(4):618–46. Available from: <https://academic.oup.com/toxres/article/7/4/618-646/5555798>