

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 31/10/2017.



Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”



**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Isolamento e identificação de metabólitos de  
polimetoxiflavonas na urina de ratos e sua avaliação sobre  
a proteína transferidora de triglicerídeo microssomal**

**Danielle Raquel Gonçalves**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências Nutricionais

Orientador: Profa. Dra. Thais Borges César

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Araraquara

2016

**Isolamento e identificação de metabólitos de  
polimetoxiflavonas na urina de ratos e sua avaliação sobre  
a proteína transferidora de triglicerídeo microssomal**

**Danielle Raquel Gonçalves**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências Nutricionais

Orientador: Profa. Dra. Thais Borges César

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Araraquara

2016

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**G635i**

Gonçalves, Danielle Raquel

Isolamento e identificação de metabólitos de polimetoxiflavonas na urina de ratos e sua avaliação sobre a proteína transferidora de triglicerídeo microsomal / Danielle Raquel Gonçalves. – Araraquara, 2016  
116 f. :

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Thais Borges César

Coorientador: Paulo Inácio da Costa

1. Plimetoxiflavonas. 2. Metabólitos das PMF. 3. Cromatografia líquida. 4. Atividade da MTP. 5. Dislipidemias. I. César, Thais Borges, orient. II. Costa, Paulo Inácio da, coorient. III. Título.

**CAPES: 50700006**

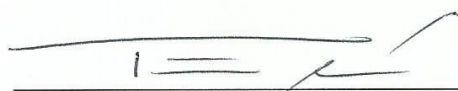
DANIELLE RAQUEL GONÇALVES

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DE POLIMETOXIFLAVONAS NA URINA DE RATOS E SUA AVALIAÇÃO SOBRE A PROTEÍNA TRANSFERIDORA DE TRIGLICERÍDEO MICROSSOMAL

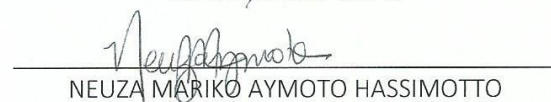
Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutora em Alimentos e Nutrição

Araraquara, 31 de outubro de 2016

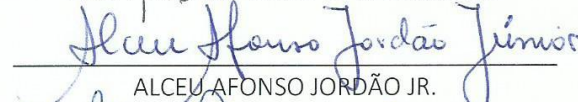
BANCA EXAMINADORA



THAIS BORGES CÉSAR



NEUZA MÁRIKO AYMOTO HASSIMOTTO



ALCEU AFONSO JORDÃO JR.



AMANDA MARTINS BAVIERA



CÉLIA MARIA DE SYLOS

## AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Agradeço a **Deus**, pela fé que nunca falhou, e pelo conforto que sempre encontrei em sua palavra. “Até aqui nos ajudou o Senhor” (1 Samuel 7.12).

Aos meus queridos pais, **José Humberto e Aparecida**, pelo amor e apoio incondicional que sempre me deram. Eles são meu exemplo e força para sempre seguir em frente.

Ao **João Paulo**, pelo amor, companheirismo e compreensão durante este período do doutorado. Pelo incentivo para que eu sempre corresse atrás dos meus sonhos, e pelo exemplo de bondade que é!

Agradeço à família do **Paulo** e da **Raquel**, pelo acolhimento, orações e todo cuidado. Obrigada por me fazerem sentir parte da família!

Ao **Wanderson**, meu grande amigo desde a graduação. Obrigada pela presença, conselhos, e por toda ajuda, principalmente, quando me preparava para o intercâmbio.

Agradeço à **Malu (Maria Luiza)**, pelo carinho, receptividade e grande amizade que recebi desde o meu primeiro dia no USDA.

Às amigas do **Laboratório de Nutrição**, pelo apoio e companheirismo que sempre recebi.

Aos colegas do **Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular**, pela ajuda e apoio.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora profa. **Dra. Thais B. Cesar**, pela orientação deste trabalho, e ensinamentos transmitidos, mas agradeço, principalmente, pelas oportunidades oferecidas, pela confiança e incentivo de sempre.

Ao meu co-orientador prof. **Dr. Paulo Inácio da Costa**, pela orientação do trabalho, pelos ensinamentos, paciência e imprescindível ajuda no laboratório, os quais contribuíram para a execução dos ensaios *in vitro* deste trabalho.

Ao **Dr. John A. Manthey**, por ter me recebido em seu laboratório no U.S. Horticultural Research Laboratory/USDA, por toda paciência, ensinamentos na área de química, e todo suporte, mantido até a conclusão deste trabalho. Mas agradeço, principalmente, por ter me recebido como membro de sua família durante o período que estive nos Estados Unidos.

À **Veronica Cook**, técnica do laboratório no U.S. Horticultural Research Laboratory/USDA, por todo suporte técnico e preciosos ensinamentos transmitidos. Obrigada pela amizade e confiança a mim depositadas. A Veronica foi e é um exemplo de profissional e ser humano.

À **Dra. Ana Lúcia Martiniano Nasser**, técnica do laboratório de Nutrição do Departamento de Alimentos e Nutrição – UNESP, pela ajuda na interpretação e discussão dos resultados obtidos neste trabalho. Obrigada pelo incentivo e exemplo de alegria no trabalho.

À **Marilia Caroline Martini Rodrigues**, por todo apoio e suporte na execução inicial deste trabalho. Pelo trabalho exemplar com os animais aqui utilizados, o qual foi imprescindível para a obtenção do material de estudo.

Aos colegas da pós-graduação, pela ajuda e apoio na execução de várias etapas do projeto. Agradeço em especial à **Thais Falkoski**, pela ajuda com a cultura de células, ao **Carlos Alberto Arcaro Filho**, no manuseio dos animais, e à **Thais Moreira**, pelo compartilhamento de técnicas de laboratório.

A todos do **Laboratório de Bioquímica do Departamento de Análises Clínicas** – UNESP (prof. Iguatemy e profa. Amanda), pela concessão do uso do biotério, mas principalmente, por compartilharem toda experiência de trabalho com animais, alegria e receptividade de sempre.

Ao **Conselho da Pós-graduação**, em especial à profa. **Dra. Juliana Álvares Duarte Bonini Campos**, pela dedicação e confiança em nosso programa de pós-graduação. Agradeço, principalmente, por todo suporte oferecido durante meu processo de intercâmbio.

À **secretaria da pós-graduação da UNESP/Campus Araraquara**, pela competência e suporte durante meu período na pós-graduação. Todas as colaboradoras da seção são preparadas e eficientes para ajudarem os alunos.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP** e o **Departamento de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição** por toda infraestrutura, material e pessoal de qualidade, os quais contribuíram para meu crescimento profissional.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo consentimento da bolsa de estudo Regular no País e a bolsa PDSE (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior), as quais viabilizaram minha formação como pesquisadora e aprimoramento profissional no exterior.

À **CitrusBR** pelo financiamento da pesquisa.



*"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original."*

*Albert Einstein*

## RESUMO

As polimetoxiflavonas (PMF) são uma subclasse do grupo dos flavonoides cítricos, as quais são conhecidas devido à ação antioxidante, anti-inflamatória, hipolipidêmica e anticâncer; além de elevada biodisponibilidade. Estudos recentes demonstram que os metabólitos gerados a partir das PMF são biologicamente ativos, e possuem efeitos benéficos superiores aos compostos originais. **Objetivo:** Este trabalho teve por objetivo, isolar e identificar metabólitos das PMF a partir da urina de ratos, e avaliar sua atividade biológica sobre a proteína transferidora de triglicerídeo microsomal (MTP) em células Huh7.5. **Métodos:** Trinta ratos Wistar adultos foram separados em 3 grupos (n = 10) e administrados com 200 mg/kg/dia de tangeretina (TAN), nobiletina (NOB) ou heptametoxiflavona (HMF), durante 15 dias. Os metabólitos foram extraídos da urina, isolados por cromatografia líquida preparativa, e identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-ESI-MS) acoplada ao detector de UV (PDA). A ação dos metabólitos sobre a atividade da MTP foi avaliada por método fluorométrico. **Resultados:** Foram isolados metabólitos glucuronídeos com m/z  $[M+H]^+$  565 amu (unidade de massa atômica), 551 amu, 535 amu, 521 amu, 505 amu; além de metabólitos hidroxilados com m/z  $[M+H]^+$  419 amu, 405 amu, 389 amu, 375 amu, 359 amu, 329 amu, 315 amu. Os metabólitos TAN-4'-glucuronídeo (TAN-G1), TAN-dihidroxi-glucuronídeo (TAN-G2), TAN-4'-monohidroxilada (TAN-OH1), TAN-monohidroxilada (TAN-OH2), NOB-glucuronídeo (NOB-G), NOB-monohidroxilada (NOB-OH), HMF- monohidroxilada (HMF-OH) foram identificados e avaliados *in vitro*. TAN-OH1 e NOB-OH reduziram a atividade da MTP, e o HMF-OH apresentou efeito superior quando comparado ao seu composto de origem. As PMF obtidas de extrato seco da caca de laranjas, administradas nos ratos, não apresentaram efeito sobre a MTP. **Conclusão:** Estes dados mostram métodos viáveis para o isolamento dos metabólitos da urina após administração oral das PMF; reforçam a hipótese de que são estes os responsáveis pelos benefícios biológicos observados à saúde a partir do consumo dietético das PMF, podendo contribuir, portanto, para a prevenção e tratamento de dislipidemias, uma vez que foram capazes de reduzir a atividade da MTP.

**Palavras-chave:** polimetoxiflavonas, metabólitos das PMF, cromatografia líquida, atividade da MTP, dislipidemias.

## ABSTRACT

The polymethoxylated flavones (PMF) are a subclass of flavonoids citrus, which are known because of their antioxidant, anti-inflammatory, hypolipidemic and anticancer properties; besides the high bioavailability that they present. Recent studies show that the metabolites generated from the PMF are biologically active and have beneficial effects greater than the original compounds. **Objective:** This study aimed to isolate and identify metabolites of PMF from the urine of rats, and evaluate its biological activity upon microsomal triglyceride transfer protein (MTP) in Huh7.5 cells. **Methods:** Thirty adult male Wistar rats were separated into 3 groups (n = 10) and fed with 200 mg / kg / day with tangeretin (TAN), nobiletina (NOB) or heptametroxiflavona (HMF) for 15 days. The metabolites were extracted from urine, isolated by preparative liquid chromatography and identified by high-performance liquid chromatography (HPLC-ESI-MS) coupled with UV detector (PDA). The action of the metabolites on the MTP activity was evaluated by fluorometric method. **Results:** We isolated glucuronide metabolites with m / z [M + H] + 565 amu (atomic mass unit), 551 amu, 535 amu, 521 amu, 505 amu; addition to the hydroxylated metabolites with m / z [M + H] + 419 amu, 405 amu, 389 amu, 375 amu, 359 amu, 329 amu, 315 amu. The TAN-4'-glucuronide metabolites (TAN-G1), TAN-dihydroxy-glucuronide (TAN-G2), TAN-4'-monohydroxylada (TAN-OH1), TAN-monohydroxylada (TAN-OH2), NOB-glucuronide (NOB-G) NOB-monohydroxylada (NOB-OH), HMF-monohydroxylada (HMF-OH) have been identified and evaluated in in vitro assay. TAN-OH1 and NOB-OH reduced the MTP activity, and HMF-OH showed higher effect compared to its parent compound. PMF obtained from dry extract of orange peel, administered in rats, showed no effect on the MTP. **Conclusion:** These data show viable methods for isolation of the metabolites from urine after oral administration of PMF; they also reinforce the hypothesis that the metabolites are responsible for the biological benefits observed from dietary intake of PMF and thus, they can contribute to the prevention and treatment of dyslipidemias, since they were able to reduce the MTP activity.

**Keywords:** polymethoxylated flavones, PMF metabolites, liquid chromatography, MTP activity, dyslipidemias.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACAT	Acil-CoA:colesteril aciltransferase
<i>amu</i>	Unidade de massa atômica
apoA	Apolipoproteína A
apoB	Apolipoproteína B
apoC	Apolipoproteínas C
apoE	Apolipoproteína E
CETP	Proteína de transferência do éster de colesterol
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DCV	Doenças cardiovasculares
Erk	Quinase regulada por sinal extracelular
FIU	Unidade de intensidade de fluorescência
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMF	Heptametoxiflavona
HXF	Hexametoxiflavona
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
<sup>1</sup> H-NMR	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear protônica de hidrogênio-1
hsCRP	Proteína C reativa ultrasensível
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
$\text{NOS}$	Óxido nítrico sintetase induzível
LCAT	Lecitina-colesterolaciltransferase
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada a detector de massas
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-R	Receptores de LDL
LPL	Lipoproteína lipase

MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio
MIP-1 $\alpha$	Proteína inflamatória de macrófago-1 alfa
MM	Massa molar
MTP	Proteína transferidora de triglicerídeos microsomal
NOB	Nobiletina
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PMFs	Polimetoxiflavonas
proMMP-9	Metalopeptidase de matriz 9
RE	Retículo endoplasmático
SIN	Sinensetina
SR-A	Receptor <i>scavenger A</i>
SR-B1	Receptores <i>scavengers</i> classe B-1
TAN	Tangeretina
TG	Triglicerídeos
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TMS	Tetrametilescutelareina
TR	Tempo de retenção
UGTs	Glucuronosiltransferases
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1.</b>	Metabólitos utilizados nos ensaios <i>in vitro</i> com as células Huh7.5.....	77
<b>Tabela 2.</b>	Espectro de fluorescência dos metabólitos utilizados nos ensaios <i>in vitro</i> com as células Huh7.5.....	77
<b>Tabela 3.</b>	Metabólitos glucuronídeos na urina dos ratos administrados com nobiletina.....	78
<b>Tabela 4.</b>	Metabólitos hidroxilados das PMFs na urina dos ratos administrados com nobiletina .....	78

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estrutura molecular dos flavonoides.....	20
<b>Figura 2.</b>	Estrutura molecular dos flavonoides cítricos.....	21
<b>Figura 3.</b>	Estrutura molecular das polimetoxiflavonas.....	23
<b>Figura 4.</b>	Estrutura molecular da nobiletina.....	24
<b>Figura 5.</b>	Estrutura molecular da tangeretina.....	27
<b>Figura 6.</b>	Estrutura molecular da heptametoxiflavona.....	29
<b>Figura 7.</b>	Fases do metabolismo dos flavonoides.....	32
<b>Figura 8.</b>	Metabolismo das lipoproteínas.....	37
<b>Figura 9.</b>	Desenho experimental.....	42
<b>Figura 10.</b>	Espectro de absorção de fluorescência das PMFs purificadas....	66
<b>Figura 11.</b>	Espectro de emissão de fluorescência das PMFs purificadas.....	67
<b>Figura 12.</b>	Curva padrão utilizada para análise da atividade da MTP após 24h de incubação com as PMFs e os metabólitos.....	69
<b>Figura 13.</b>	Curva padrão de albumina utilizada para quantificação das proteínas totais das células Huh7.5 após 24h de incubação com as PMFs e os metabólitos.....	70
<b>Figura 14.</b>	Cromatograma (MS e UV) da TAN purificada a partir do extrato seco do óleo da casca da laranja. HPLC-MS, $[372+H]^+$ .....	71
<b>Figura 15.</b>	Cromatograma (MS e UV) da HMF purificada a partir do extrato seco do óleo da casca da laranja. HPLC-MS, $[432+H]^+$ .....	72
<b>Figura 16.</b>	Cromatograma (UV) da NOB purificada a partir do extrato seco do óleo da casca da laranja $[402+H]^+$ .....	72
<b>Figura 17.</b>	Fração orgânica da extração da urina de TAN com acetato de etilo. HPLC-MS, $[M+H]^+$ .....	73
<b>Figura 18.</b>	Fração orgânica da extração da urina de NOB com acetato de etilo. HPLC-MS, $[M+H]^+$ .....	74
<b>Figura 19.</b>	Fração orgânica da extração da urina de HMF com acetato de etilo. HPLC-MS, $[M+H]^+$ .....	75
<b>Figura 20.</b>	Viabilidade celular das células Huh7.5 após 24 de tratamento com as PMFs purificadas nas concentrações de 5, 10, 25, 50; 100 e 500 $\mu$ M.....	80
<b>Figura 21.</b>	Viabilidade celular das células Huh7.5 após 24 de tratamento com os metabólitos nas concentrações de 5, 10, 25, 50; 100 e 500 $\mu$ M.....	81
<b>Figura 22.</b>	Viabilidade celular das células Huh7.5 tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.001 M após 10, 20 ou 30 minutos de incubação.....	81
<b>Figura 23.</b>	Viabilidade celular das células Huh7.5 após 24 de tratamento com as PMFs e os metabólitos TAN; TAN-G1; TAN-G2; TAN-OH1; TAN-OH2; NOB; NOB-G; NOB-OH; HMF; HMF-G.....	83
<b>Figura 24.</b>	Imagens em microscopia confocal das células Huh7.5 após 24h de incubação com TAN, TAN-G1, TAN-G2, TAN-OH1 e TAN-OH2.....	84
<b>Figura 25.</b>	Imagens em microscopia confocal das células Huh7.5 após 24h de incubação com NOB, NOB-G1, NOB-OH.....	85
<b>Figura 26.</b>	Imagens em microscopia confocal das células Huh7.5 após 24h de incubação com HMF, HMF-G.....	86

<b>Figura 27.</b>	Imagens em microscopia confocal das células Huh7.5 após 24h de incubação com meio de cultura DMEM-C.....	86
<b>Figura 28.</b>	Espetros de fluorescência das PMFs e dos metabólitos incorporados pelas células Huh7.5 após 24h de tratamento.....	87
<b>Figura 29.</b>	Imagens em microscopia confocal dos espectros de fluorescência das PMFs e dos metabólitos incorporados pelas células Huh7.5 após 24h de tratamento.....	88
<b>Figura 30.</b>	Atividade da MTP após 24h de tratamento das células Huh7.5 com as PMFs purificadas nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{M}$ .....	88
<b>Figura 31.</b>	Atividade da MTP após 24 de tratamento das células Huh7.5 com as PMFs purificadas nas concentrações de 5, 10 e 25 $\mu\text{M}$ ..	89
<b>Figura 32.</b>	Atividade da MTP após 24 de tratamento das células Huh7.5 com os metabólitos versus as PMFs dos quais eles originaram..	90



## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b>	Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	116
-----------------	---	-----

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Resumo.....	VIII
Abstract.....	IX
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	X
Lista de Tabelas e Quadros.....	XII
Lista de Figuras.....	XIII
Lista de Anexos.....	XV
INTRODUÇÃO.....	18
REVISÃO DA LITERATURA.....	20
Flavonoides Cítricos.....	20
Polimetoxiflavonas.....	22
<i>Nobiletina e seus metabólitos</i> .....	24
<i>Tangeretina e seus metabólitos</i> .....	26
<i>Heptametoxiflavona e seus metabólitos</i> .....	28
Metabolismo dos flavonoides/polimetoxiflavonas.....	30
Dislipidemias.....	33
Síntese hepática de lipoproteínas e a participação da MTP.....	35
Ação dos flavonoides cítricos/polimetoxiflavonas nas dislipidemias.....	38
OBJETIVOS.....	41
Objetivo geral.....	41
Objetivos específicos.....	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	42
Delineamento da pesquisa.....	42
Desenho experimental.....	42
Isolamento e purificação das polimetoxiflavonas.....	43
<i>Cromatografia líquida de baixa pressão de fase normal</i> .....	43
<i>Cromatografia líquida de baixa pressão de fase reversa</i> .....	45
<i>Cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC</i> .....	46
<i>Remoção de interferentes indesejáveis</i> .....	47
<i>Remoção do odor de solventes</i> .....	48
Animais.....	48
Preparo das polimetoxiflavonas.....	49
Coleta da urina.....	49
Isolamento dos metabólitos das polimetoxiflavonas.....	50
<i>Extração dos metabólitos na urina de rato</i> .....	50
<i>Primeira etapa para isolamento dos metabólitos</i> .....	51
<i>Purificação dos metabólitos</i> .....	53
Purificação dos metabólitos glucuronídeos de TAN.....	54
Purificação dos metabólitos glucuronídeos de NOB.....	55
Purificação dos metabólitos glucuronídeos de HMF.....	56
Purificação dos metabólitos hidroxilados das PMF.....	57
Identificação dos metabólitos das PMF.....	59

<i>Espectro de UV-Vis das PMF e dos metabólitos.....</i>	59
<i>Análise ESI-MS dos íons fragmentados dos metabólitos das PMF.....</i>	60
Espectro de fluorescência das PMF e seus metabólitos.....	61
Avaliação das PMF e seus metabólitos sobre a atividade da MTP.....	61
<i>Cultura de células.....</i>	61
<i>Análise da viabilidade celular.....</i>	62
<i>Grupos experimentais.....</i>	63
<i>Incorporação celular das PMF e seus metabólitos.....</i>	64
<i>Determinação do comprimento de onda para as análises em</i> <i>microscopia confocal.....</i>	65
<i>Atividade da proteína transferidora de triglicerídeos microssomal</i> <i>(MTP).....</i>	68
<i>Quantificação das proteínas totais.....</i>	69
Forma de análise dos resultados.....	70
RESULTADOS.....	71
DISCUSSÃO.....	91
CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
ANEXO.....	116

## INTRODUÇÃO

Os flavonoides cítricos têm sido associados à proteção cardiovascular devido à capacidade de reduzir fatores de risco intermediários, como o colesterol de LDL elevado, hipertensão arterial, e a disfunção endotelial (HOOPER et al, 2008). Modelos experimentais sugerem que as flavanonas inibem a atividade da proteína transferidora de triglicerídeos microsomal (MTP) e da enzima acil-CoA:colesteril aciltransferase (ACAT), que por sua vez reduzem a secreção hepática das VLDL e, conseqüentemente, os níveis de LDL na corrente sanguínea. Estas alterações levam ao aumento da expressão de receptores hepáticos que captam mais partículas circulantes de LDL (BORRADAILE et al, 1999; WILCOX et al, 2001). No entanto, outro grupo de flavonoides cítricos, conhecidos como polimetoxiflavonas (PMF), encontradas quase que exclusivamente na casca das frutas cítricas, vem chamando bastante atenção devido aos significativos efeitos biológicos que apresentam à saúde humana (EVANS et al, 2012).

Estudos recentes das propriedades biológicas das PMFs apontam para a importância da atividade farmacológica destes compostos e de seus metabólitos, principalmente, sobre a prevenção e tratamento do câncer; além da redução dos fatores de risco aterogênicos e trombóticos (LI et al, 2007; LO et al, 2010). Os resultados destes estudos evidenciam que os metabólitos, em sua maioria, apresentam efeitos superiores a de seus compostos precursores (CHENG et al, 2011; OSHITARA et al, 2011; WU et al, 2015). A cinética de metabolização dos flavonoides, de modo geral, passa pelos processos de fase I e II com produção de compostos biologicamente ativos apresentando atividades antioxidantes e anti-inflamatórias no organismo (WALLE et al, 2004).

Embora seja reconhecido que a atividade biológica dos metabólitos conjugados ou na forma hidroxilada são responsáveis pelos efeitos benéficos associados às PMF, são raros os estudos sobre a ação específica de cada um destes metabólitos no que se refere ao metabolismo lipídico e ao efeito hipolipidêmico em humanos e em modelos experimentais. Desta forma, no presente trabalho, pretendeu-se estudar a ação de metabólitos glucuronídeos e também na forma hidroxilada das PMF tangeretina, nobiletina e heptametoxiflavona, isolados a partir da urina de ratos, sobre o metabolismo hepático, por meio da proteína transferidora de triglicerídeo microssomal (MTP).

## CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que as PMF são amplamente metabolizadas após seu consumo por via oral e, o maior número de metabólitos na forma hidroxilada em relação aos conjugados, indica que esta é a principal via de metabolização destes compostos. Apresentamos aqui a viabilidade de isolamento de alguns metabólitos de PMF a partir da urina de roedores; foi demonstrado também que eles apresentam atividade biológica ativa, uma vez que foram capazes de reduzir a atividade da MTP, atuando assim, como possíveis agentes hipolipidêmicos. Portanto, esses dados reforçam a hipótese de que são os metabólitos, os responsáveis pelos benefícios à saúde observados a partir do consumo dietético das polimetoxiflavonas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL RAHIM, M.; NAKAJIMA, A.; SAIGUSA, D. et al. 4'-Demethylnobiletin, a bioactive metabolite of nobiletin enhancing PKA/ERK/CREB signaling, rescues learning impairment associated with NMDA receptor antagonism via stimulation of the ERK cascade. **Biochemistry**, v. 48, p. 7713-21; 2009

APTEKMANN, N.P.; CESAR, T.B. Long-term orange juice consumption is associated with low LDL-cholesterol and apolipoprotein B in normal and moderately hypercholesterolemic subjects. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, p. 1-10; 2013.

ARAFI, E.-S.A.; ZHU, Q.; BARAKAT B.M. et al. Tangeretin sensitizes cisplatin-resistant human ovarian cancer cells through downregulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. **Cancer Res.**, v. 69, p. 8910-7; 2009.

ARTS, M.J.T.J.; HAENEN, G.R.M.M.; WILMS, L.C.; BEETSTRA, S.A.J.N. et al. Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 1184-7; 2002.

ASSINI (a), J.M.; MULVIHILLA, E.E.; HUFFA, M.W. et al. Citrus flavonoids and lipid metabolism. **Curr Opin Lipidol**, v. 23, p. 34-40; 2013.

ASSINI (b), J.M.; MULVIHILLA, E.E.; Sutherland, B.G. et al. Naringenin prevents cholesterol-induced systemic inflammation, metabolic dysregulation, and atherosclerosis in *Ldlr<sup>-/-</sup>* mice. **J. Lipid Res.**, v. 54, p. 711-24; 2013.

AZIK, M. Flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) and juice. *In: Phytochemicals in citrus*. Florida Department of Citrus Scientific Research Department, p. 1-59. Disponível em: <http://www.indabook.org/d/Citrus-sinensis-Sweet-Orange.pdf>. Acesso em: 22 Jun. 2015.

BARROWS, B.R.; PARKS, E.J. Contributions of different fatty acid sources to very low-density lipoprotein-triacylglycerol in the fasted and fed states. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, p. 1446-52; 2006.

BLASIOLE, D.A.; DAVIS, R.A.; ATTIE, A.D. The physiological and molecular regulation of lipoprotein assembly and secretion. **Mol. BioSyst.**, v. 3, p. 608-19; 2007.

BORRADAILE, N.M.; CARROLL, K.K.; KUROWSKA, E.M. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. **Lipids**, v. 34, p. 591-98; 1999.

BRAND, W.; VAN DER WEL, P.A.I.; REIN, M.J. et al. Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in caco-2 cell monolayers. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, p. 1794-1802; 2008.

BRAND, W.; BOERSMA, M.G.; BIK, H. et al. Phase II metabolism of hesperetin by individual UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases and rat and human tissue samples. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, p. 617-625; 2010.

BROWN, N.M.; SETCHELL, K.D.R. Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. **Laboratory Investigation**, v. 81, p. 735-47; 2001.

CHANDLER, C.E.; WILDER, D.E.; PETTINI, J.L. et al. CP-346086: an MTP inhibitor that lowers plasma cholesterol and triglycerides in experimental animals and in humans. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 1887-1901; 2003.



CHANET, A.; MILENKOVIC, D.; CLAUDE, S. et al. Flavanone metabolites decrease monocytes adhesion to TNF- $\alpha$ -activated endothelial cells by modulating expression of atherosclerosis-related genes. **British Journal of Nutrition**, v. 110, p. 587-98; 2013.

CHENG, Z.; SURICHAN, S.; RUPARELIA, K. et al. Tangeretin and its metabolite 4-hydroxytetramethoxyflavone attenuate EGF-stimulated cell cycle progression in hepatocytes; role of inhibition at the level of mTOR/p70S6K. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, p. 1781-1791; 2011.

CRESPY, V.; MORAND, C.; BESSON, C. et al. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 284, p. 980-988; 2003.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; BENEDETTO, R.D. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanità**, v. 43, p. 348-361; 2007.

EVANS, M.; SHARMA P.; GUTHRIE N. Bioavailability of Citrus Polymethoxylated Flavones and Their Biological Role. In: Metabolic Syndrome and Hyperlipidemia, Readings in Advanced Pharmacokinetics - Theory, Methods and Applications, Dr. Ayman Noreddin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0533-6, InTech. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/readings-in-advanced-pharmacokinetics-theory-methods-andapplications/the-bioavailability-of-citrus-polymethoxylated-flavones>, 2012.

FISCHER, H.; ILLEK, B. United States Patents: US8138158 B2. Compositions and methods for therapy for diseases characterized by defective chloride transport. Data da publicação: 20 Mar 2012.

GATTUSO, G.; BARRECA, D.; GARGIULLI, C. et al. Flavonoid composition of citrus juices. **Molecules**, v. 12, p. 1641-1673; 2007.

GAYDOU, E.M.; BIANCHINI, J.-P.; RANDRIAMIHARISOA, R.P. Orange and mandarin peel oils differentiation using polymethoxylated flavone composition. **J. Agric. Food Chem.**, v. 35, p. 525-529; 1987.

GIBBONS, G.F.; WIGGINS, D.; BROWN, A.-M.; HEBBACHI, A.-M. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. 44th International Conference on the Bioscience of Lipid. **Biochemical Society Transactions**, v. 32, part 1; 2004.

GOLDWASSER, J.; COHEN, P.Y.; YANG, E. et al. Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: role of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  and LXR $\alpha$ . **PLoS ONE**, v. 5, p. 1-9; 2010.

KANAKIS, C.D.; TARANTILIS, P.A.; POLISSIOU, M.G.; DIAMANTOGLOU, S.; TAJMIR-RIahi, H.A. Antioxidant flavonoids bind human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 798, p. 69-74; 2006.

KUREK-GÓRECKA, A.; RZEPECKA-STOJKO, A.; MICHAŁ GÓRECKI, M. et al. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. **Molecules**, v. 19, p. 78-101; 2014. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/1/78/htm>.

HIGASHI, Y.; ITABE, H.; FUKASE, H. et al. Distribution of microsomal triglyceride transfer protein within sub-endoplasmic reticulum regions in human hepatoma cells. **Biochimica et Biophysica**, v. 1581, p. 127-36; 2002.

HIRANO, T.; ABE, K.; GOTOH, M.; OKA K. Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. **British Journal of Cancer**, v. 72, p. 1380-8; 1995.

HOF, van het K.H.; KIVITS, G.A.A.; WESTSTRATE, J.A.; TIJBURG, .L.B.M.  
Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, p. 356-9; 1998.

HOLLMAN, P.C.H; HOF, van het K.H.; TIJBURG, .L.B.M.; KATAN, M.B. Addition of milk does not affect the absorption of flavonols from tea in man. **Free Rad. Res.**, v. 34, p. 297-300; 2001.

HOLLMAN, P.C.H. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p. 74–83; 2004.

HOOPER, L.; KROON, P.A.; RIMM, E.B. et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Am J Clin Nutr**, v. 88, p. 38-50; 2008.

IHARA, H.; YAMAMOTO, H.; IDA, T. et al. Inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression by a polymethoxyflavone from young fruits of Citrus unshiu in rat primary astrocytes. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 7, p. 1843-8; 2012.

IWASE, Y.; TAKEMURAA, Y.; JU-ICHI, M. et al. Cancer chemopreventive activity of 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone from the peel of citrus plants. **Cancer Letters**, v. 163, p. 7-9; 2001.

KAWAI, Y.; NISHIKAWA, T.; SHIBA, Y. et al. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: Implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 9424-34; 2008.

JURD, L. Spectral properties of flavonoids compounds. In: GEISSMAN T.A. The chemistry of flavonoid compounds. Pergamon Press: Oxford, London, New York, Paris, p. 107-131; 1962.

KOU, M.-C.; FU, S.-H.; YEN, J.-H. et al. Effects of citrus flavonoids, 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone and 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone, on the activities of macrophage scavenger receptors and the hepatic LDL receptor. **Food Funct.**, v. 4, p. 602-609; 2013.

KUNIMASA, K.; IKEKITA, M.; SATO, M. et al. Nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and angiogenesis in vivo. **Cancer Sci.**, v. 101, p. 2462-2469; 2010.

KUROWSKA, E.M.; MANTHEY, J.A. Hypolipidemic Effects and Absorption of Citrus Polymethoxylated Flavones in Hamsters with Diet-Induced Hypercholesterolemia. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 2879-2886; 2004.

KUROWSKA, E.M.; MANTHEY, J.A.; CASASCHI, A.; THERIAULT, A.G. Modulation of HepG2 cell net Apolipoprotein B secretion by the citrus polymethoxyflavone, tangeretin. **Lipids**, v. 39, p. 143-151; 2004.

LAI, C.-S.; LI, S.; CHAI, C.-Y. et al. Anti-inflammatory and antitumor promotional effects of a novel urinary metabolite, 3',4'-didemethylnobiletin, derived from nobiletina. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 2415- 2424; 2008.

LEPANTO, P.; LECUMBERRY, F.; ROSSELLO, J.; KIERBEL, A. A confocal microscopy image analysis method to measure adhesion and internalization of *Pseudomonas aeruginosa* multicellular structures into epithelial cells. **Molecular and Cellular Probes**, v. 28, p. 1-5; 2014.

LI (a), S.; LO, C.-Y.; HO, C.-T. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 4176-4185; 2006.

LI (b), S.; WANG, Z.; SANG, S.; HUANG, M.-T.; HO, C.-T. Identification of nobiletina metabolites in mouse urine. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 50, p. 291-9; 2006.

LI, S.; SANG, S.; PAN, M.-H. et al. Anti-inflammatory property of the urinary metabolites of nobiletin in mouse. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 17, p. 5177-81; 2007.

LI, S.; WANG, H.; GUOD, L. et al. Chemistry and bioactivity of nobiletin and its metabolites. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 2-10; 2014.

LIN, Y.; VERMEER, M.A.; BOS, W. et al. Molecular structures of citrus flavonoids determine their effects on lipid metabolism in HepG2 cells by primarily suppressing apoB secretion. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 4496-503; 2011.

LO, Y.-H.; Pan, M.-H.; LI, S. et al. Nobiletin metabolite, 3',4'-dihydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone, inhibits LDL oxidation and down-regulates scavenger receptor expression and activity in THP-1 cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1801, p. 114–126. In *Molecular and Cell Biology of Lipids*; 2010.

LOTITO, S.B.; ZHANG, W.-J.; YANG, C.S.; CROZIER, A.; FREI, B. Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties. **Free Radic Biol Med.**, v. 15, p. 454-63; 2011.

LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S. Flavonoides: Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, p.18-22; 2000.

MANACH, C.; MORAND, C.; GIL-IZQUIERDO, A. et al. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice.

**European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 235-242; 2003.

MANACH, C.; SCALBERT, A. MORAND, C. ET AL. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr**, v. 79, p. 727-47; 2004.

MANTHEY, J.A.; GROHMANN, K.; MONTANARI, A. et al. Polymethoxylated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor- $\alpha$  expression by human monocytes.

**J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 441-444; 1999.

MANTHEY, J.A.; BENDELE, P. Anti-inflammatory activity of an orange peel polymethoxylated flavone, 3',4',3,5,6,7,8-heptamethoxyflavone, in the rat carrageenan/paw edema and mouse lipopolysaccharide-challenge assays. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 9399-9403; 2008.

MANTHEY, J.A; CESAR, T.B.; JACKSON, E.; MERTENS-TALCOTT, S. Pharmacokinetic study of nobiletin and tangeretin in rat serum by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 145-151; 2011.

MEEEX, S.J.R.; ANDREO, U.; SPARKS, J.D.; FISHER, E.A. Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion? **J. Lipid Res.**, v. 52, p. 152-58; 2011.

MIWA, Y.; MITSUZUMI, H.; SUNAYAMA, T. et al. Glucosyl hesperidin lowers serum triglyceride level in hypertriglyceridemic subjects through the improvement of very low-density lipoprotein metabolic abnormality. **J Nutr Sci Vitaminol.**, v. 51, p. 460-70; 2005.

MIYATA, Y.; TANAKA, H.; SHIMADA, A. Regulation of adipocytokine secretion and adipocyte hypertrophy by polymethoxyflavonoids, nobiletin and tangeretin. **Life Sciences**, v. 88, p. 613–618; 2011.

MONAGO-MARAÑA, O.; DURÁN-MERÁS, I.; GALEANO-DÍAZ, T.; PEÑA, A.M. Fluorescence properties of flavonoid compounds. Quantification in paprika samples using spectrofluorimetry coupled to second order chemometric tools. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1058-65; 2016.

MORAND, C.; DUBRAY, C.; MILENKOVIC, D. et al. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. **Am J Clin Nutr.**, v. 93,p. 73-80; 2011.

MULLEN, W.; ARCHEVEQUE, M-A.; EDWARDS, C.A.; MATSUMOTO, H.; CROZIER, A. Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: impact of a full-fat yogurt. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 11157-64; 2008.

MULVIHILL, E.E.; ASSINI, J.M.; LEE, J.K. et al. Nobiletin Attenuates VLDL overproduction, dyslipidemia, and atherosclerosis in mice with diet-induced insulin resistance. **Diabetes**, v. 60, p. 1446-57; 2011.

MULVIHILL, E.E.; BURKE, A.C.; HUFF, M.W. Citrus flavonoids as regulators of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 36, p. 1-25; 2016.

MURAKAMI, A.; NAKAMURA, Y.; TORIKAI, K. et al. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. **Cancer Research**, v. 60, p. 5059-5066; 2000.

NAHMIAS, Y.; GOLDWASSER, J.; CASALI, M. et al. Apolipoprotein B–dependent hepatitis c virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin.

**Hepatology**, v. 47, p. 1437-45; 2008.

NIELSEN, S.E.; BREINHOLT, V.; CORNETT, C.; DRAGSTED, L.O. Biotransformation of the citrus flavone tangeretin in rats. Identification of metabolites with intact flavane nucleus. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 739-746; 2000.

NORATA, G.D.; GRIGORE, L.; RASELLI, S.; REDAELLI, L. et al. Post-prandial endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic subjects: molecular mechanisms and gene expression studies. **Atherosclerosis**, v. 193, p. 321-27; 2007.

OLIVEIRA, E.A.S. Meia-vida das drogas biodisponibilidade – biotransformação excreção dos fármacos. Apostila N<sup>o</sup>. 03, Disciplina de Farmacologia; 2008.

OKUYAMA, S.; SHIMADA, N.; KAJI, M. et al. Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, enhances brain-derived neurotrophic factor production and neurogenesis in the hippocampus following cerebral global ischemia in mice. **Neuroscience Letters**, v. 528, p. 190-195; 2012.

OKUYAMA, S.; MORITA, M.; MIYOSHI, K. et al. 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, on protection against memory impairment and neuronal cell death in a global cerebral ischemia mouse model. **Neurochemistry International**, v. 70, p. 30-38; 2014.

OKUYAMA, S.; MIYOSHI, K.; TSUMURA, Y. et al. 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone, a citrus polymethoxylated flavone, attenuates inflammation in the mouse hippocampus. **Brain Sci.**, v. 5, p. 118-129; 2015.



OSHITARI, T.; OKUYAMA, Y.; MIYATA, Y. et al. Nobiletin metabolites: Synthesis and inhibitory activity against matrix metalloproteinase-9 production. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 21, p. 4540-544; 2011.

PAN, M.-H; CHEN, W.-J; LIN-SHIAU, S.-Y. Tangeretin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 23, p.1677-84; 2002.

PARK, H.-R.; DAUN, Y.; PARK, J.K.; BARK, K.-M. Spectroscopic properties of flavonoids in various aqueous-organic solvent mixtures. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 34, p. 211-20; 2013.

PISCHON, T.; GIRMAN, C.J.; SACKS, F.M. et al. Non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary heart disease in men. **Circulation**, v. 112, p. 3375-83; 2005.

RAMASAMY, I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 52, p. 1695-727; 2014.

REYES-SOFFER, G.; MOON, B., HERNANDEZ-ONO, A. et al. Complex effects of inhibiting hepatic apolipoprotein B100 synthesis in humans. **Sci Transl Med.**, v. 8, p. 1-22; 2016.

RIZZA, S.; MUNIYAPPA, R.; IANTORNO, M. et al. Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial function and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 96, p. 782-92; 2011.

ROZA, J.M.; XIAN-LIU, Z.; GUTHRIE, N. Effect of citrus flavonoids and tocotrienols on serum cholesterol levels in hypercholesterolemic subjects. **Altern Ther Health Med.**, v. 13, p. 44-48; 2007.

SAIGUSA, D.; SHIBUYA, M.; JINNO, D. et al. High-performance liquid chromatography with photodiode array detection for determination of nobiletin content in the brain and serum of mice administrated the natural compound. **Anal Bioanal Chem.**; v. 400, p. 3635-41; 2011.

SARWAR, N.; DANESH, J.; EIRIKSDOTTIR, G.; SIGURDSSON, G. et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10.158 incident cases among 262.525 participants in 29 western prospective studies. **Circulation.**, v. 115, p. 450-8; 2007.

SILBERBERG, M.; MORAND, C.; MATHEVON, T. et al. The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. **Eur J Nutr**, v. 45, p. 88-96; 2006.

SILVEIRA, J.Q.; CESAR, T.B; MANTHEY, J.A. et al. Pharmacokinetics of flavanone glycosides after ingestion of single doses of fresh-squeezed orange juice versus commercially processed orange juice in healthy humans. **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, p. 12576–12584; 2014.

SPENCER, J.P.E.; EL MOHSEN, M.M.A.; RICE-EVANS, C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 423, p. 148-161; 2004.

SU, J.-D.; YEN, J.-H.; LI, S. et al. 3',4'-Didemethylnobiletin induces phase II detoxification gene expression and modulates PI3K/Akt signaling in PC12 cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, p. 126-141; 2012.

TALAYERO, B.G.; SACKS, F.M. The role of triglycerides in atherosclerosis. **Curr. Cardiol.**, v. 13, p. 544-52; 2011.

TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, F.P. Metabolismo dos fármacos, capítulo 4.

Disponível em:

<http://www.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Metabolismo%20dos%20farmacos.pdf>. Acesso em: 30 Nov. 2015.

TAZZANI, N. Flavonoids: definition, structure and classification. Disponível em:

<http://www.tuscany-diet.net/2014/01/22/flavonoids-definition-structure-classification/>.

Acesso em: 28 de Out. de 2015.

TRIPOLI, E.; GUARDIA, M.L.; GIAMMANCO, S. et al. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, v. 104, p. 466-479; 2007.

UCKOO, R.M.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B.S. Chromatographic techniques for the separation of polymethoxyflavones from citrus. In *Emerging Trends in Dietary Components for Preventing and Combating Disease*. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC; 2012.

VAIYAPURI, S.; ALI, M.S.; MORAES, L.A ET AL. Tangeretin regulates platelet function through inhibition of phosphoinositide 3-kinase and cyclic nucleotide signaling.

**Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 33, p. 2740-2749; 2013.

VAIYAPURI, S.; ROWETH, H.; ALI, M.S. et al. Pharmacological actions of nobiletin in the modulation of platelet function. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, p. 4133-4145; 2015.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M.H. et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, p. 1377-1382; 2004.

WALLE, T. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? **Semin Cancer Biol.**, v. 17, p. 354-362; 2007.

WANG, L.; WANG, J.; FANG, L. et al. Anticancer activities of citrus peel polymethoxyflavones related to angiogenesis and others. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-10; 2014.

WEN, X.; WALLE, T. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, p. 1786-1792; 2006.

WHITMAN, S.C.; KUROWSKA, E.M.; MANTHEY, J.A.; DAUGHERTYD, A. Nobiletin, a citrus flavonoid isolated from tangerines, selectively inhibits class A scavenger receptor-mediated metabolism of acetylated LDL by mouse macrophages. **Atherosclerosis**, v. 178, p. 25-32; 2005.

WILCOX, L.J.; BORRADAILE, N.M.; DREU, L.E.; HUFF, M.W. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. **J. Lipid Res**, v. 42, p. 725-34; 2001.

WU, X.; SONG, M.; Wang, M. et al. Chemopreventive effects of nobiletin and its colonic metabolites on colon carcinogenesis. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 00, p. 1-12; 2015.

XAVIER, H.T.; IZAR, M.C.; FARIA NETO J.R. et al. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol.**, v. 101 (4Supl.1), p. 1-22; 2013.

XIAO, C.; HSIEH, J.; ADELI, K.; LEWIS, G.F. Gut-liver interaction in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 301, p. 429-46; 2011.

XIE, M.-X.; XU, X.-Y.; WANG, Y.-D. Interaction between hesperetin and human serum albumin revealed by spectroscopic methods. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 215-24; 2005.

YASUDA, T.; YOSHIMURA, Y.; YABUKI, H. et al. Urinary metabolites of nobiletin orally administered to rats. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 51, p. 1426-1428; 2003.

ZHENG, C.; KHOO, C.; FURTADO, J.; SACKS, F.M. Apolipoprotein C-III and the metabolic basis for hypertriglyceridemia and the dense low-density lipoprotein phenotype. **Circulation**, v. 121, p. 1722-34; 2010.

ZHENG, J.; SONG, M.; DONG, P. et al. Identification of novel bioactive metabolites of 5-demethylnobiletin in mice. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 57, p. 1999–2007; 2013.

ZHENG, J.; BI, J.; JOHNSON, D. et al. Analysis of 10 metabolites of polymethoxyflavones with high sensitivity by electrochemical detection in high-performance liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, v. 63, p. 509-16; 2015.