



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

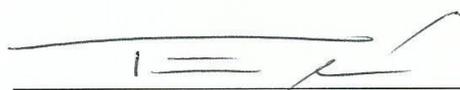
DANIELLE RAQUEL GONÇALVES

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

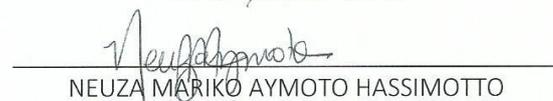
Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutora em Alimentos e Nutrição

Araraquara, 31 de outubro de 2016

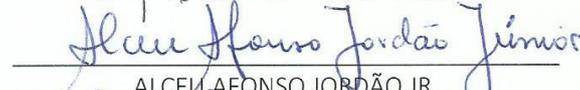
BANCA EXAMINADORA



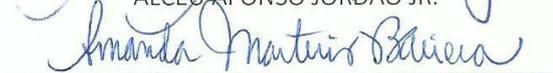
THAIS BORGES CÉSAR



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 microsossomal (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
¹ 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 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
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 α	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- α	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

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

LISTA DE FIGURAS

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

Figura 27.	Imagens em microscopia confocal das células Huh7.5 após 24h de incubação com meio de cultura DMEM-C.....	86
Figura 28.	Espetros de fluorescência das PMFs e dos metabólitos incorporados pelas células Huh7.5 após 24h de tratamento.....	87
Figura 29.	Imagens em microscopia confocal dos espectros de fluorescência das PMFs e dos metabólitos incorporados pelas células Huh7.5 após 24h de tratamento.....	88
Figura 30.	Atividade da MTP após 24h de tratamento das células Huh7.5 com as PMFs purificadas nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 μ M.....	88
Figura 31.	Atividade da MTP após 24 de tratamento das células Huh7.5 com as PMFs purificadas nas concentrações de 5, 10 e 25 μ M..	89
Figura 32.	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

Anexo 1.	Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	116
-----------------	---	-----

SUMÁRIO

	Página
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 triglicérides microssomal (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).

REVISÃO DA LITERATURA

Flavonoides cítricos

Flavonoides pertencem ao grupo dos compostos fenólicos; e são metabólitos secundários das plantas, para as quais eles atuam como protetores da fotoxidação e agentes atrativos para a polinização. A estrutura molecular dos flavonoides cítricos (C6-C3-C6) consiste de uma cadeia de 15 carbonos estruturados em dois anéis aromáticos, designados como A e B, os quais são conectados por uma cadeia linear de três carbonos, designada como anel C (Figura 1) (GATTUSO et al, 2007).

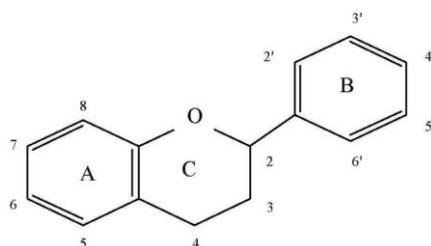


Figura 1: Estrutura molecular dos flavonoides (KUREK-GÓRECKA et al, 2014)

Os flavonoides são divididos em classes, de acordo com as características estruturais que apresentam no anel C. As principais classes de flavonoides encontradas em frutas e vegetais são: flavanonas, flavonas, flavonóis, isoflavonas, antocianinas e flavanas; dentre estas, as flavanonas, flavonas, flavonóis e antocianinas são os principais encontrados nas frutas cítricas (Figura 2). Os flavonoides cítricos são caracterizados em sua maioria pela presença de um derivado benzo-gama-pirano na posição C3 (anel C), podendo haver interconversão entre eles (LOPES et al, 2000; AZIK, 2015).

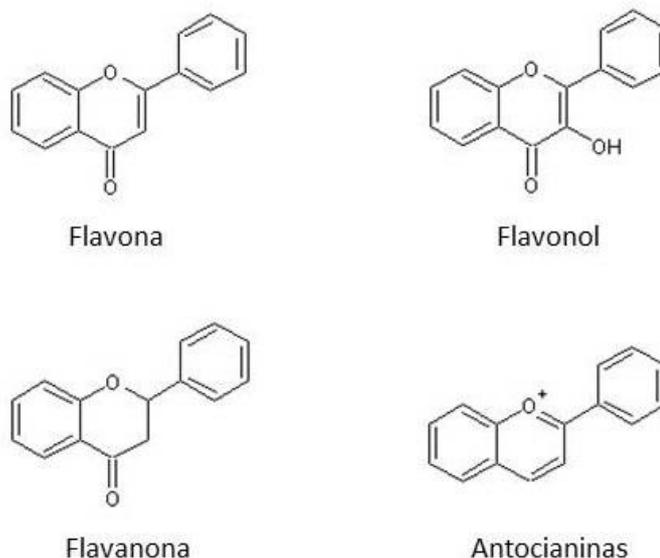


Figura 2: Estrutura molecular dos flavonoides cítricos (TAZZINI, 2014)

Existem mais de 4000 flavonoides identificados e esta lista está constantemente aumentando. Essa grande variedade no número de flavonoides é devido a substituições do grupo hidroxila (OH) que ocorrem nos anéis aromáticos, os quais podem estar livres; ligados a um grupo metoxil (OCH₃); ou a moléculas de açúcar (D'ARCHIVIO et al, 2007). As flavanonas são os flavonoides mais abundantes nas frutas cítricas, e normalmente são do tipo O-glicosídica, glicosiladas por um dissacarídeo no C7. As flavanonas O-glicosídicas são amplamente encontradas no suco, sendo a forma aglicona (ausência da fração de açúcar) menos frequente, devido às características lipofílicas que apresentam (TRIPOLI et al, 2007).

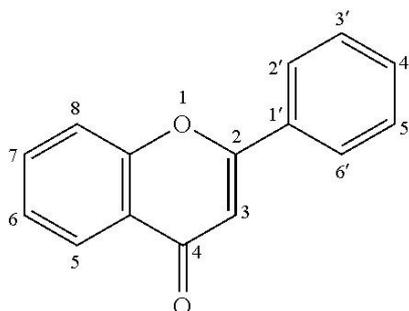
Dentre os flavonoides cítricos, as flavonas são as menos expressivas. No entanto, existe um grupo de flavonas cujas hidroxilas estão metoxiladas, denominadas polimetoxiflavonas (PMFs), as quais vêm despertando cada vez mais

interesse aos grupos de pesquisa, devido à ação farmacológica benéfica à saúde humana (EVANS et al, 2012).

Polimetoxiflavonas

As PMF são um grupo de flavonas metoxiladas que ocorrem somente na forma aglicona, estão presentes, exclusivamente, nas espécies cítricas, e são encontradas, essencialmente, no óleo da casca das laranjas doces (*Citrus sinensis*), laranjas azedas (*Citrus aurantium*), tangerinas (*Citrus reticulata*) e grapefruit (*Citrus paradisi*) (EVANS et al, 2012). As PMFs são observadas em pequenas quantidades nos sucos manualmente preparados, porém, o suco comercialmente processado apresenta maior teor de PMF, devido às técnicas de processamento que permitem maior extração dos compostos da casca das frutas (GATTUSO et al, 2007; AZIK, 2015).

São conhecidos mais de 20 flavonoides metoxilados e o tipo e conteúdo destes compostos varia entre as diferentes espécies cítricas (LI et al, 2006a). Alguns autores já sugeriram que a composição de PMFs poderia ser utilizada para diferenciação das espécies cítricas, bem como para autenticação do óleo da casca obtido a partir destas, quando comercializado como bioproduto. Entretanto, para a utilização deste recurso são necessários estudos mais aprofundados, pois se deve levar em consideração fatores como a espécie e cultivar de onde foi obtido, tamanho da fruta, condições de plantio, idade da árvore, variações climáticas entre os anos, entre outros (GAYDOU et al, 1987). A figura 3 apresenta as PMF encontradas no óleo da casca da espécie *Citrus sinenses*:



PMF	C3	C5	C6	C7	C8	C3'	C4'
Tetrametilescutelareina (TMS)	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃
Sinensetina (SIN)	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
Tangeretina (TAN)	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃
Nobiletina (NOB)	H	OCH ₃					
Hexametoxiflavona (HXF)	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
Heptametoxiflavona (HMF)	OCH ₃						

Figura 3: Estrutura molecular das polimetoxiflavonas (FISCHER et al, 2012)

A nobiletina (NOB) e a tangeretina (TAN) são as principais PMF observadas nos cítricos (MANTHEY 2011; EVANS, 2012) e as mais amplamente avaliadas em estudos experimentais. Apesar da heptametoxiflavona (HMF) também ser significativamente encontrada nas espécies cítricas (GAYDOU et al, 1987), não encontramos um número expressivo de estudos com esta PMF. Trabalhos de pesquisa em animais e *in vitro* demonstram uma variedade de efeitos benéficos biológicos das PMF, como anti-inflamatórios (MIYATA et al, 2011), anticâncer (WANG et al, 2014), antioxidantes (IHARA et al, 2012) e controle da síntese de lipídeos (KUROUSKA e MANTHEY, 2004). Nesse sentido, estudos recentes evidenciaram um efeito mais expressivo dos metabólitos das polimetoxiflavonas em

relação à forma química encontrada nas frutas (LI et al, 2007; CHENG et al, 2011; WU et al, 2015).

Nobiletina e seus metabólitos

Nobiletina, 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5,6,7,8-tetramethoxychromen-4-one (IUPAC), é um flavonoide O-metilado, ligado a seis grupos metoxil (5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona), com massa molecular de 402,40 g.mol⁻¹ (~402 g.mol⁻¹) e fórmula química C₂₁H₂₂O₈ (LI et al, 2006a; PubChem CID 72344, 2015) (Figura 4). Esta é a PMF mais abundante nas frutas cítricas (LI et al, 2014) e nos sucos de laranja fresco e comercialmente processados (SILVEIRA et al, 2014).

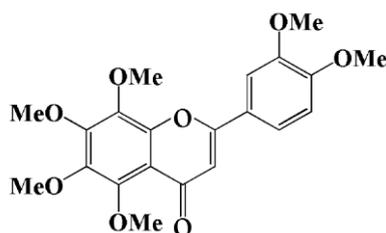


Figura 4: Estrutura molecular da nobiletina (UCKOO et al, 2012)

A nobiletina foi isolada pela primeira vez em 1938, pelo pesquisador chinês Tseng (GAYDOU et al, 1987), e desde então vários trabalhos foram desenvolvidos a fim de avaliar os efeitos biológicos desta PMF à saúde. Os resultados apontam que a nobiletina é capaz de inibir parâmetros biológicos e histológicos relacionados ao dano oxidativo e inflamatório como aqueles induzidos por radicais livres NO₂⁻, O₂⁻ e COX-2, além de reduzir a infiltração leucocitária e proliferação de células epiteliais tumorais (MURAKAMI et al, 2000). Outro estudo sugeriu que a nobiletina também

pode atuar contra a angiogênese, uma vez que ela foi capaz de reduzir a expressão de sinalizadores transcricionais de proliferação, migração e crescimento tubular (KUNIMASA et al, 2010). Whitman e col. (2005) demonstraram que a nobiletina reduz o acúmulo de ésteres de colesterol em macrófagos, atuando como agente protetor da lesão aterosclerótica. A nobiletina é capaz ainda de inibir a ativação de agonistas da agregação plaquetária, mostrando ser um possível agente antitrombótico e adjuvante contra as doenças coronarianas (VAIYAPURI et al, 2015).

No entanto, os metabólitos da NOB vêm mostrando resultados superiores no que diz respeito à função farmacológica desta PMF. Vários autores relatam a identificação de metabólitos de NOB a partir de amostras de urina e órgãos de roedores. Yasuda e col. (2003) identificaram três metabólitos de NOB na forma hidroxilada, porém, apenas um metabólito possuía condições suficientes para completa identificação, sendo este o principal produto da metabolização da NOB [402-H]⁻: *m/z* 388 (4'-hidroxi-3',5,6,7,8-pentametoxiflavona); os outros dois metabólitos observados apresentavam massa molecular de *m/z* 388 e 374, indicando a perda de um e dois grupos metoxil, possivelmente no C-3' e C-3'e 4', respectivamente. Li e col. (2014) recentemente relataram que além destes metabólitos, o processo de metabolização da NOB apresenta uma rede de possibilidades para demetilação desta PMF: C-6 ou C-7-demetilnobiletina; 5,6,7,8,3',4'-hidroxinobiletina (menos frequente); além de processos de glucuronidação e/ou sulfatação. Manthey e col. (2011) em estudo da farmacocinética das PMF identificaram três metabólitos glucuronados de NOB [402-H]⁺: dois com íon em *m/z* 565-389 (provenientes da mono-demetilação no C-3'ou 4'); e um com íon em *m/z* 551-375 (proveniente da di-demetilação nos C-3'e 4').

Estudos apontam que os metabólitos 3',4'-didemetilnobiletina e 4'-demetilnobiletina apresentam efeitos anticarcinogênico e anti-inflamatório, uma vez que foram capazes de reduzir a expressão gênica de *iNOS* e *COX-2*, efeito que não foi observado com a nobiletina neste estudo (LI et al, 2007), uma vez que a alteração destes parâmetros inflamatórios está diretamente interligada ao desenvolvimento de tumores (LAI et al, 2008). Os metabólitos de NOB também foram capazes de inibir mais expressivamente a produção de proMMP-9 quando comparado com o composto original (OSHITARA et al, 2011). O metabólito 3',4'-didemetilnobiletina mostrou poder antioxidante superior contra a oxidação da apoB100, redução da transcrição de receptores *scavengers* para diferenciação de monócito para macrófago, e conseqüentemente a formação de células espumosas quando comparado com NOB (LO et al, 2010). Alguns autores acreditam que este efeito acentuado dos metabólitos de NOB em relação ao composto original é, possivelmente, devido à ortho-hidroxilação do metabólito em relação à PMF (SU et al, 2012).

Tangeretina e seus metabólitos

Tangeretina, 5,6,7,8-tetramethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one (IUPAC), é um flavonoide O-metilado, porém, ligada a cinco grupos metoxil (5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona), com massa molecular de 372,37 g.mol⁻¹ (~372 g.mol⁻¹) e fórmula química C₂₀H₂₀O₇ (PubChem CID 68077, 2015; Li et al, 2006a) (Figura 5).

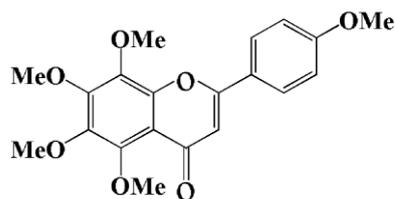


Figura 5: Estrutura molecular da tangeretina (UCKOO et al, 2012)

A tangeretina foi a primeira PMF isolada a partir de cítricos, em 1934, pelo pesquisador Nelson (GAYDOU et al, 1987). Ela não é encontrada em larga quantidade nas frutas e sucos cítricos como a NOB (GATTUSO et al, 2007; SILVEIRA et al, 2014), mas desperta grande interesse quanto às suas funções biológicas. A maioria dos estudos com TAN são voltados para sua ação anticâncer. Esta PMF é capaz de bloquear eficientemente a proliferação de células tumorais e induzir a apoptose sem causar danos citotóxicos às células saudáveis (HIRANO et al, 1995), o que ocorre possivelmente, por meio da sua capacidade de inibição dos sistemas quinase de progressão do ciclo celular (G0/G1 – S+G2/M), e aumento da atividade dos inibidores da divisão celular (PAN et al, 2002). Estudos apontam ainda que a TAN pode otimizar o efeito da terapia medicamentosa, reduzindo os efeitos citotóxicos que elas causam (ARAFAT et al, 2009). Porém, a tangeretina também possui efeito hipolipidêmico, uma vez que é capaz de reduzir a secreção de apoB, e a atividade de enzimas que participam da síntese de triacilglicerol (KUROWSKA et al, 2004), além de inibir a agregação plaquetária, atuando como agente protetor contra o risco de doenças cardiovasculares (DCV) (VAIYAPURE et al, 2013).

Assim como observado para NOB, um trabalho recente demonstrou um efeito farmacológico superior do metabólito de TAN (4'-hydroxy-5,6,7,8-

tetramethoxyflavone) em relação à PMF da qual é derivado (CHENG et al, 2011). Nielsen e col. (2000) realizaram o primeiro estudo sobre a biotransformação e excreção da tangeretina e seus metabólitos a partir de urina e fezes de ratos. A partir de análises de cromatografia líquida acoplada a detector de massas (LC/MS) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear bidimensional ($^1\text{H-NMR}$) foram detectados metabólitos com perda de um, dois ou três grupos metoxil [372-H^-]: m/z 357 (4'-hidroxi-5,6,7,8-tetrametoxiflavona); m/z 357 (6-hidroxi-4',5,7,8-tetrametoxiflavona); m/z 343 (4',7-dihidroxi-5,6,8-trimetoxiflavona); m/z 343 (4',6-dihidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona); m/z 343 (5,6-dihidroxi-4',7,8-trimetoxiflavona); m/z 329 (4',6,7-trihidroxi-5,8-dimetoxiflavona); além de metabólitos hidroxilados no C-3': m/z 373 (3',4'-dihidroxi-5,6,7,8-tetrametoxiflavona), dentre outros cuja nomenclatura não foi definida: m/z 345; m/z 331; m/z 359. É importante ressaltar que neste estudo foram detectados metabólitos conjugados com ácido glucurônico e/ou sulfatos, os quais foram hidrolisados a partir de enzimas para liberação dos metabólitos hidroxilados, porém, outros estudos já relataram a presença de metabólitos conjugados ao ácido glucurônico, apresentando íon em m/z 535-359 [372-H^+], proveniente da mono-demetilação no C-4' (MANTHEY et al, 2011).

Heptametoxiflavona e seus metabólitos

Heptametoxiflavona, O=C1C=C(C2=CC(OC)=CC2OC)C3=CC(OC)=CC3OC1 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5,6,7,8-pentamethoxychromen-4-one (IUPAC), também é um flavonoide O-metilado, e é a PMF com o maior número de grupos metoxil (sete): 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona. Esta PMF possui massa molecular de $432,43 \text{ g.mol}^{-1}$ (~432

g.mol⁻¹) e fórmula química C₂₂H₂₄O₉ (PubChem CID 150893, 2015; LI et al, 2006a) (Figura 6).

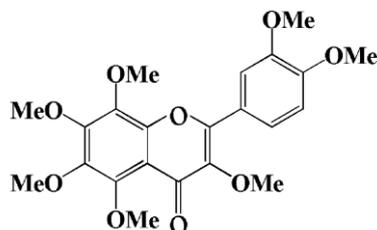


Figura 6: Estrutura molecular da heptametoxiflavona (UCKOO et al, 2012)

A HMF foi isolada e reportada pela primeira vez em 1967, pelo pesquisador Swift (GAYDOU et al, 1987). Estudos mostram que a HMF é capaz de reduzir a produção de marcadores inflamatórios como IL-10 e MIP-1 α , além de reduzir a expressão gênica de TNF- α (MANTHEY et al, 1999). Em avaliação dos efeitos biológicos de PMF, HMF se mostrou capaz de reduzir a captação de LDL oxidada (oxLDL), possivelmente pela redução da expressão do receptor *scavenger* A (SR-A) durante a diferenciação celular monócito para macrófago, processo decisivo para o desenvolvimento da aterosclerose (KOU et al, 2013). HMF também apresenta efeito quimiopreventivo, uma vez que foi capaz de retardar tanto o estágio de iniciação quanto promoção da carcinogênese (IWASE et al, 2001). Estudos recentes apontam para um possível efeito neuroprotetor da HMF, pois esta PMF foi capaz de aumentar a neurogênese após isquemia cerebral através da indução da produção de fatores protetores de injúria cerebral (OKUYAMA et al, 2012), além de proteger as células neurais da morte após o quadro de isquemia, evitando assim a perda de memória e anormalidades relacionadas ao acidente vascular cerebral (OKUYAMA et al, 2014), além de redução na produção de interleucinas pró-inflamatórias como a IL-1 β (OKUYAMA et al, 2015).

Não há relatos na literatura de ensaios biológicos com os metabólitos de HMF, bem como de caracterização dos metabólitos provenientes desta PMF. Um estudo realizado, recentemente, por Manthey e Bendele (2008), no qual era investigada a ação anti-inflamatória da HMF, foi observada a presença de dois metabólitos hidroxilados (419 *amu* e 405 *amu*), juntamente com seus metabólitos glucuronídeos conjugados (595 *amu* e 581 *amu*, respectivamente) no soro dos animais avaliados. A proposição da estrutura molecular destes metabólitos não foi realizada neste trabalho.

Metabolismo dos flavonoides/polimetoxiflavonas

O metabolismo dos polifenóis em geral ocorre por uma via comum, na qual os compostos na forma aglicona podem ser diretamente absorvidos no intestino delgado, porém, os compostos glicosídicos precisam sofrer hidrólise pelas enzimas intestinais para serem absorvidos. Durante o processo de absorção, os polifenóis são amplamente metabolizados no intestino delgado e mais tarde no fígado, por meio de reações de metilação, sulfatação, glucuronidação ou oxidação (MANACH et al, 2004). A lipofilicidade da molécula influencia no processo de absorção dos diferentes flavonoides (MANACH et al, 2003), e vários autores afirmam que as polimetoxiflavonas são mais biodisponíveis, justamente devido à polimetoxilação dos grupos hidroxilas, os quais são encontrados livres nos flavonoides em geral (WEN e WALLE, 2006; GATTUSO et al, 2007; WALLE, 2007; EVANS et al, 2012; AZIK, 2015).

Os metabólitos de flavanonas cítricas, como a hesperitina e a naringenina, são encontrados na circulação sanguínea e excreção urinária, na sua maioria, como

conjugados glucuronados (87%) ou sulfo-glucuronados (13%); já entre os metabólitos das PMF, apenas 38% são encontrados conjugados ao ácido glucurônico ou grupos sulfatos, enquanto que 60% da metabolização destes compostos são excretados como agliconas livres, resultantes de reações de demetilação e hidroxilação (TRIPOLI et al, 2007). Estes dados indicam que a metabolização dos flavonoides passa pelo processo de metabolismo de fase I, onde ocorre oxidação/redução dos compostos e transformação dos metabólitos para a forma aglicona; e passam também pelo processo de metabolismo de fase II, onde ocorre a conjugação dos compostos e formação de metabólitos glucuronados ou sulfatados (SPENCER et al, 2004). De acordo com as propriedades de ocorrência destas vias de metabolização, o metabolismo de fase I dos flavonoides ocorre no fígado, com ação de enzimas oxidases da classe do citocromo P450 associadas a membranas expressas no retículo endoplasmático (RE) dos hepatócitos. No metabolismo de fase II ocorreria o acoplamento dos flavonoides a substratos endógenos como ácido glucurônico e seus derivados, sulfonatos, acetato ou aminoácidos, processo esse intermediado por enzimas de transferência presentes tanto no citosol quanto no RE das células hepáticas e outros tecidos (Figura 7). É importante ressaltar que essas duas vias de metabolização ocorrem independentemente uma da outra e que as enzimas envolvidas nas reações de oxidação/redução e de conjugação/hidrólise frequentemente competem pelos compostos absorvidos (TANIGUCHI e GUENGERICH, 2015).

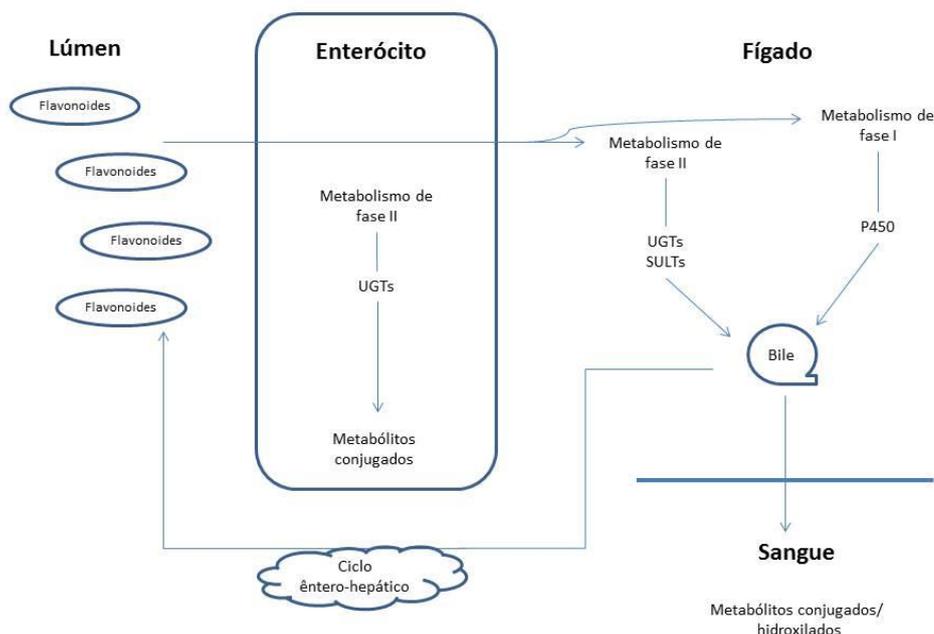


Figura 7: Fases do metabolismo dos flavonoides (Adaptado de BRAND et al, 2008)

O fígado é um importante órgão do metabolismo, no entanto, o trato gastrointestinal merece uma menção especial, visto que esse órgão, à semelhança do fígado, pode contribuir para o efeito de primeira passagem através do metabolismo de compostos administrados por via oral antes que alcancem a circulação sistêmica (TANIGUCHI e GUENGERICH, 2015). A barreira intestinal atua como determinante para a biodisponibilidade do flavonoide e tipo de metabólito formado, pois exerce um papel importante na conjugação de fase II, uma vez que os flavonoides podem ser submetidos ao metabolismo de primeira passagem nas células intestinais, sendo então conjugados pelas enzimas glucuronosiltransferases (UGTs) presentes nestas células. (SILBERBERG et al, 2006; BRAND et al, 2010). Estudos comprovam que os produtos da conjugação pelas enzimas intestinais seguem para a veia mesentérica, no entanto, de acordo com os resultados

observados, esta conjugação ocorre antes da transferência do flavonoide para a camada serosa do intestino. Quando os metabólitos resultantes da conjugação intestinal são secretados na veia mesentérica, uma proporção destes é captada e metabolizada pelo fígado, e então, parcialmente secretada na bile (ciclo êntero-hepático); a proporção de secreção biliar influencia na biodisponibilidade do flavonoide (CRESPY et al, 2003).

Com a ativação do ciclo êntero-hepático após a entrada do composto no fígado, este é excretado pela bile até o trato gastrintestinal, onde é novamente absorvido pela corrente sanguínea (uma vez que a bile é reabsorvida durante o processo de digestão) e enviado ao fígado, sendo excretado novamente pela bile, repetindo-se o ciclo. Este processo resulta em aumento no período de tempo de ação do composto consumido (OLIVEIRA, 2008). Dados sugerem que os hepatócitos são um sítio de desconjugação para as formas circulantes provenientes da veia mesentérica, e que a atividade conjugativa dos hepatócitos produz metabólitos disponíveis para a bile e tecidos periféricos (CRESPY et al, 2003).

Dislipidemias

O termo dislipidemias refere-se a alterações no metabolismo dos lipídios, as quais se refletem nos níveis séricos das lipoproteínas. Essas alterações podem ocorrer devido à predisposição genética, mutações nos genes que codificam o metabolismo das lipoproteínas, fatores ambientais, ou ainda, devido a manifestações secundárias de outras doenças. Estas alterações contribuem para o desenvolvimento da síndrome metabólica, e estão diretamente associadas com a

aterosclerose e o aumento do risco de DCV (GIBBONS et al, 2004; RAMASAMY, 2014).

O aumento da síntese de VLDL e atraso na depuração hepática de lipoproteínas que contém a apoB têm sido atribuídos a falhas nos receptores hepáticos da apoB100, ausência de apoE, aumento de apoC3 na partícula de lipoproteína nascente, redução da atividade da LPL, entre outros, e são frequentemente observados em indivíduos com hipertrigliceridemia (ZHENG et al, 2010). Indivíduos com hipertrigliceridemia também apresentam níveis elevados de moléculas pró-inflamatórias tais como IL-6, ICAM-1, VCAM-1, e MCP-1, especialmente depois de uma refeição rica em gorduras (NORATA et al, 2007).

O nível elevado de triglicerídeo (TG) no sangue é um fator de risco predominante para DCV, e para as complicações metabólicas associadas à obesidade e resistência à insulina. Estudos apontam que além da hipercolesterolemia, o nível de TG pode atuar como biomarcador independente para o risco de DCV, devido a sua associação com lipoproteínas aterogênicas e apolipoproteínas (SARWAR et al, 2007). Assim como a oxLDL, lipoproteínas ricas em TG também podem sofrer acúmulo no endotélio, favorecendo o recrutamento de macrófagos e desenvolvimento das células espumosas, com consequente surgimento de placas de ateroma (TALAYERO e SACKS, 2012). Neste sentido, estudos também apontam a apoB como um excelente indicador de DCV, sendo inclusive superior ao LDL-C e ao não-HDL-C. Esta indicação seria porque, em quadros de hipertrigliceridemia, o conteúdo de colesterol nas LDL pode estar reduzido, porém, a presença da apoB ainda se mantém constante. Sendo assim, a concentração de apoB pode ser mais relevante para a predição de aterosclerose do

que a quantidade de colesterol que a VLDL e a LDL carregam (TALAYERO e SACKS, 2012; PISCHO et al, 2005).

Nos últimos anos houve significativos avanços no diagnóstico e tratamento dos distúrbios do metabolismo lipídico, porém, existe um grande interesse em se buscar melhorias no tratamento tradicional (RAMASAMY, 2014).

Síntese hepática de lipoproteínas e a participação da MTP

A síntese das partículas de VLDL ocorre em duas etapas: 1º) uma pequena quantidade de TG associa-se à apoB durante a sua translocação através de um canal de proteína na membrana do retículo endoplasmático (RE). Esta fase é acompanhada pela aquisição de um invólucro de fosfolípidios envolvendo o TG, e resulta em uma partícula pequena e densa, chamada precursor de VLDL, contendo apoB; a formação deste precursor é dependente da proteína transferidora de triglicerídeos microssomal (MTP); 2º) na etapa seguinte, de maturação, ocorre a fusão do precursor de VLDL contendo apoB com um "gota" maior de TG (GIBBONS et al, 2004; XIAO et al, 2011). A primeira etapa de montagem e maturação da VLDL ocorre no RE, em seguida uma vesícula de transporte de VLDL se funde com o Golgi hepático e a partícula é secretada para a corrente sanguínea (RAMASAMY, 2014).

A VLDL secretada é um substrato para a lipoproteína lipase (LPL), presente na superfície luminal do endotélio capilar. A hidrólise desta partícula fornece ácidos graxos livres para o tecido muscular e adiposo. A partícula resultante da ação da LPL (remanescente de VLDL) possui menos TG, e por isso, é denominada lipoproteína de densidade intermediária (IDL), que pode ser rapidamente eliminada

da circulação pelo fígado ou sofrer ainda mais catabolismo pela LPL e se tornar uma LDL (BLASIOLE et al, 2007; XIAO et al, 2011). As LDL são capturadas no fígado ou tecidos periféricos pelos receptores de LDL (LDL-R), os quais controlam o nível de colesterol no sangue. A síntese intracelular do colesterol hepático depende da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase. No interior das células, o colesterol livre é esterificado pela ação da enzima acil-CoA:colesteril aciltransferase (ACAT) antes de sua deposição (XAVIER et al, 2013).

No sentido inverso, as lipoproteínas de alta densidade (HDL) transportam o colesterol até o fígado, onde são captadas pelos receptores *scavengers* classe B-1 (SR-B1). O transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado é denominado transporte reverso do colesterol, o qual é esterificado pela lecitina-colesterolaciltransferase (LCAT). O processo de esterificação do colesterol ocorre principalmente nas HDL, e é fundamental para sua estabilização e transporte plasmático. Durante a hidrólise das VLDL, essas lipoproteínas também estão sujeitas a trocas lipídicas com as HDL; este processo é intermediado pela proteína de transferência do éster de colesterol (CETP), onde as VLDL trocam TG por ésteres de colesterol das HDL (XAVIER et al, 2013 e RAMASAMY, 2014) (Figura 8).

A apoB é a única proteína remanescente da hidrólise da VLDL, e é a responsável pela ligação do LDL aos LDL-R nos tecidos. A transcrição da apoB é relativamente constante, e um dos principais determinantes para sua translocação para a VLDL é a MTP, uma enzima com atividade de transferência de lipídeos presente no lúmen do RE de enterócitos e hepatócitos. Esta enzima possui três principais domínios: ligação à apoB; transferência de lipídeos; e associação às membranas. Acredita-se que a MTP esteja localizada na região de translocação da

apoB, facilitando a transferência de lipídeos e montagem da apolipoproteína, à medida que esta sai do ribossomo e entra no lúmen do RE.

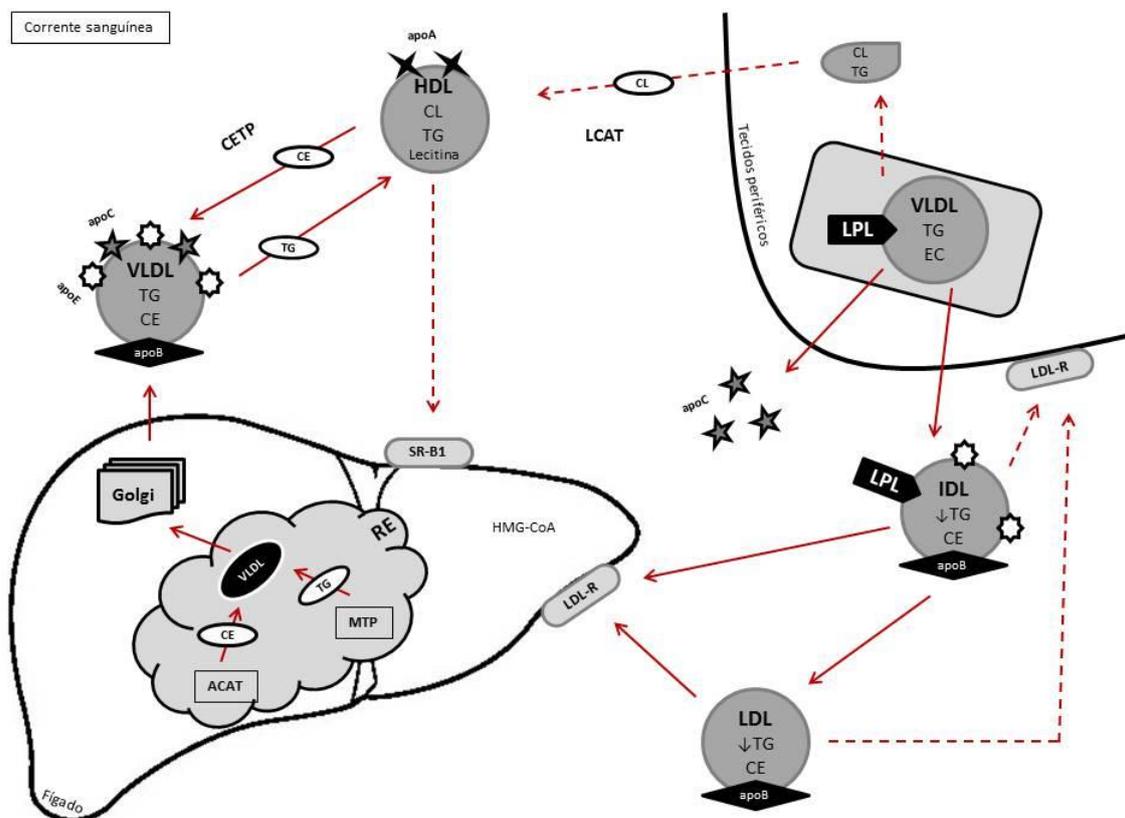


Figura 8: Metabolismo das lipoproteínas (Adaptado de BLASIOLE et al, 2007)

Mutações genéticas ou deficiência de MTP podem resultar na montagem incorreta e degradação da apoB, com conseqüente redução na secreção de lipoproteínas (XIAO et al, 2011). Estudos prévios apontam que inibidores da MTP reduzem a transferência de TG nas células hepáticas, reduzindo assim os níveis plasmáticos de lipoproteínas contendo apoB. Isso pode causar aumento de TG intra-hepático, além de má absorção de gorduras e vitaminas lipossolúveis. Nesse sentido, o uso de inibidores da MTP que não provocassem estes efeitos adversos seria interessante (CHANDLER et al, 2003). Por outro lado, o uso de inibidores da

apoB reduzem sua síntese, sem interferir na montagem das VLDL ou em seu conteúdo de TG, sendo portanto, um alvo de estratégias terapêuticas para redução do risco de doenças cardiovasculares (REYES-SOFFER et al, 2016).

Ação dos flavonoides cítricos/polimetoxiflavonas nas dislipidemias

Diversos estudos mostram que os flavonoides cítricos têm alto potencial de redução de lipídeos e lipoproteínas. Esses efeitos são atribuídos à capacidade que estes compostos têm de inibir a superprodução de lipoproteínas, reduzir o acúmulo hepático e plasmático de lipídeos, melhorar o metabolismo da glicose, além de influenciar na resposta de células endoteliais, células musculares lisas, e macrófagos, prevenindo assim a progressão da aterosclerose (ASSINI et al, 2013a; MULVIHILL et al, 2016). Após o consumo de 500 mg de hesperidina glicosilada por indivíduos com hipertrigliceridemia, durante 24 semanas, foi observada redução no nível de TG plasmático, possivelmente em decorrência da supressão da síntese de VLDL e apoB, e redução na formação de partículas de LDL (MIWA et al, 2005). Estudos experimentais encontraram que camundongos alimentados com dieta rica em colesterol ou triglicerídeos apresentaram esteatose hepática, associada ao aumento da produção de VLDL e apoB100, e níveis elevados de TG, porém, o tratamento com naringenina melhorou a hiperlipidemia reduziu esteatose hepática, e também reduziu a concentração de macrófagos e expressão de citocinas inflamatórias no fígado e tecido adiposo (ASSINI et al, 2013b).

Neste sentido, o consumo de PMF também vem apresentando efeito hipolipidêmico (ROZA et al, 2007). A suplementação de hamsters induzidos à hipercolesterolemia com dieta contendo 1% de PMFs (NOB e TAN) reduziu

significativamente os níveis séricos de VLDL e LDL-C, e sinalizaram uma tendência para reduzir TG. É importante salientar que resultados semelhantes foram previamente observados após tratamento com flavanonas cítricas, porém, somente com dosagem três vezes maior do que a utilizada para PMF (KUROWSKA e MANTHEY, 2004). Estudos em células HepG2 e camundongos tratados com NOB inibiu a secreção de apoB100 por meio da ativação da proteína quinase MAPK/ERK, refletindo em menor disponibilidade de TG para a montagem e secreção da VLDL. Estes resultados foram associados à redução da atividade da MTP, indicando que a NOB limita a disponibilidade e armazenamento de gordura pelo fígado e demais tecidos periféricos (MULVILHILL et al, 2011).

Pesquisas também apontam que o consumo regular de suco de laranja, fonte das flavanonas cítricas glicosiladas (naringina e hesperidina) e PMF, está associado a menores níveis séricos de colesterol total, LDL-C e apoB, além de maior proteção ao endotélio vascular, por meio da redução de TNF- α , moléculas de adesão celular, e proteína C reativa ultrasensível (CRP-US), tanto em indivíduos normolipidêmicos quanto hipercolesterolêmicos (APTEKMANN et al, 2013; MORAND et al, 2011; RIZZA et al, 2011).

A ação hipolipidêmica dos flavonoides cítricos provém da capacidade que eles possuem em reduzir a expressão da ACAT2, responsável pela síntese e acúmulo de ésteres de colesterol no lúmen do RE, além de inibirem a atividade da MTP, e o suprimento de TG para a secreção da VLDL/apoB. Consequente a estes efeitos, os flavonoides cítricos contribuem para menor formação plasmática das partículas de LDL, e aumento da expressão dos LDL-R hepático, esta atividade promove um aumento na captação do LDL-C circulante, reduzindo ainda mais seus níveis séricos (BORRADAILE et al, 1999; WILCOX, et al, 2001).

Embora esteja estabelecido que os flavonoides cítricos possuam a capacidade de interferir no metabolismo das lipoproteínas e reduzir os riscos associados às dislipidemias, são raros os estudos sobre a ação específica dos metabólitos de PMFs sobre o metabolismo lipídico em humanos ou modelos experimentais. Sabe-se que os hepatócitos são hábeis para metabolizar os flavonoides, gerando metabólitos conjugados ou hidroxilados, e por isso, acredita-se que estes compostos sejam os responsáveis diretos pelos benefícios observados após o uso das PMFs, no que se refere ao metabolismo das lipoproteínas (KUROWSKA e MANTHEY, 2004).

Desta forma, 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, no que diz respeito à biossíntese e secreção de lipoproteínas pelas células hepáticas.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Isolar as polimetoxiflavonas: tangeretina, nobiletina e heptametoxiflavona e avaliar a atividade de seus metabólitos sobre a proteína transferidora de triglicerídeos microsossomal (MTP) em cultura celular de hepatoma humano Huh7.5.

Objetivos específicos

- Isolar e purificar as PMF, tangeretina, nobiletina e heptametoxiflavona a partir do extrato seco da casca de laranjas *Citrus sinensis*, para administração em ratos Wistar, e posterior obtenção da urina dos animais.
- Isolar e identificar os metabólitos das PMF encontrados na urina dos ratos.
- Investigar a incorporação e localização das PMF e seus metabólitos em células hepáticas humanas.
- Avaliar a ação das PMF e seus metabólitos isolados sobre a síntese hepática de lipoproteínas, por meio da atividade da MTP em modelo *in vitro* de hepatoma humano Huh7.5.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento da pesquisa

Este trabalho envolve duas etapas com estudo experimental prospectivo, sendo uma em animais e outra *in vitro*; e uma etapa de estudo observacional analítico transversal.

Desenho experimental

O desenho experimental é constituído por três fases, as quais são esquematizadas na Figura 9 e descritas a seguir:

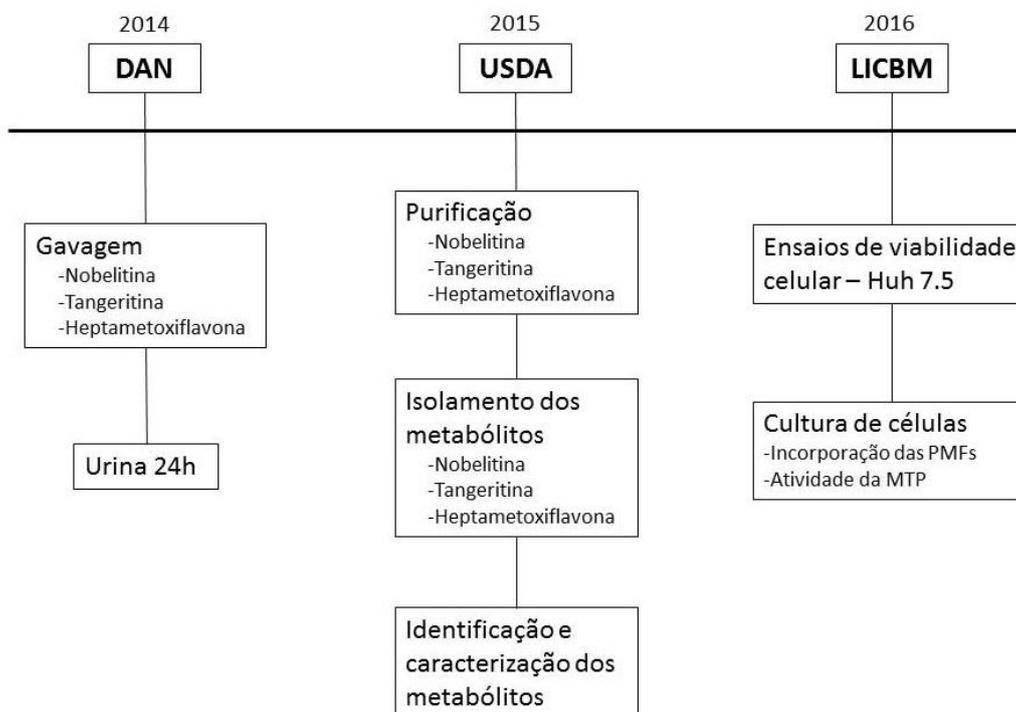


Figura 9. Desenho experimental.

- 1) Na fase inicial do trabalho foi realizado o estudo experimental em animais, com a administração das polimetoxiflavonas, coleta da urina de 24h e eutanásia dos animais (Protocolo CEUA/FCF/CAr n°68/2015). Esta etapa foi conduzida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP – Departamento de Alimentos e Nutrição (DAN).
- 2) A etapa seguinte do trabalho foi conduzida no United States Horticultural Research Laboratory do Agricultural Research Service do United States Department of Agriculture (USHRL-ARS-USDA). Nesta fase foi realizada a purificação de flavonas cítricas para a administração nos animais; identificação dos metabólitos na urina; e isolamento dos metabólitos para análise de sua ação em cultura de células.
- 3) Na etapa final deste trabalho foram realizados estudos experimentais *in vitro*, com a avaliação da atividade biológica dos metabólitos das polimetoxiflavonas sobre etapas do metabolismo lipídico hepático. Esta etapa foi conduzida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP – Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular (LICBM), do Departamento de Análises Clínicas.

Isolamento e purificação das polimetoxiflavonas

Cromatografia líquida de baixa pressão de fase normal

As polimetoxiflavonas foram isoladas a partir de amostras de extrato seco do óleo da casca da laranja por meio de sistema de cromatografia de baixa pressão – Biotage Flash-Isolera™ One (Biotage, Uppsala, Suécia). O isolamento da nobelitina

ocorreu em coluna SNAP HP-Sil-50g (Biotage[®]), utilizando 2,5g do extrato seco/coluna. O isolamento da tangeritina e da heptametoxiflavona ocorreu em coluna Septra Si 50 SF65-400g (AnaLogix[®]), utilizando 20g do extrato seco/coluna. Antes do início da corrida de cada uma das colunas, as amostras foram suspensas em Benzeno (C₆H₆), em banho-maria a 40°C. A adição de Benzeno ocorreu em diferentes volumes, até a obtenção de um líquido homogêneo e translúcido. A etapa de isolamento das PMF foi realizada em sucessivas eluições, até a obtenção do volume necessário para a administração nos animais durante os vinte dias, ou seja, 10 g de cada um dos compostos.

Para o isolamento das PMF foi utilizado o sistema de solvente *n*-hexano/acetato de etila e detector de UV visível com absorvância de 280/330 nm. A nobelitina foi isolada em gradiente variando de 90/10 para 30/70 (*n*-Hexano/Acetato de etilo), com vazão de 50 ml/min; a tangeritina e a heptametoxiflavona foram isoladas em gradiente variando de 80/20 para 40/60 (*n*-hexano/acetato de etila), com vazão de 100 ml/min. Os compostos, contidos no solvente, foram coletados em frações de 27 ml/tubo, e ao final de cada corrida cromatográfica, as frações correspondentes a cada pico foram combinadas em um mesmo recipiente e o solvente evaporado em rotavapor sob vácuo (RE111, BUCHI[®]). Em seguida, os frascos foram enxaguados com acetona, e a suspensão transferida para tubos de ensaio, os quais foram armazenados em *freezer* -20°C para precipitação dos resíduos sólidos.

Após a precipitação dos compostos, os frascos foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante removido, e o *pellet* ressuspenso com acetona, a qual foi evaporada no rotavapor sob vácuo. Seguido à evaporação, foi obtida uma porção sólida, que foi removida e pesada. Uma pequena alíquota de

cada um dos resíduos foi dissolvida em 1 ml de DMSO, e o composto identificado por cromatografia líquida de alta pressão – HPLC.

Cromatografia líquida de baixa pressão de fase reversa

Não foi possível obter o volume necessário das PMF tangeritina e heptametoxiflavona completamente isoladas somente a partir da cromatografia de baixa pressão de fase normal, pois estas duas polimetoxiflavonas apresentaram tempo de eluição muito próximo. Para tanto, a partir de 5,5 g de resíduos sólidos heterogêneos obtidos no Biotage Flash-Isolera™ One, foram realizadas corridas cromatográficas de fase reversa no sistema CombiFlash™Sg 100c (Teledyne-Isco, Nebraska, EUA), equipado com coletor de frações Foxy Jr. (Teledyne-Isco) e detector de UV visível UA-6 (Teledyne-Isco). Previamente, as amostras foram suspensas em metanol (MeOH), o volume misturado com sílica LRP-2 (Whatman®), e a amostra foi secada em rotavapor sob vácuo. Em seguida, a amostra foi manualmente empacotada em cartucho seco, e a separação cromatográfica ocorreu em coluna RediSep™ C18-Reverse Phase-130g. O isolamento destas duas PMF foi realizado em dois ensaios, sendo utilizados 2,3 g de amostra/coluna.

Para o isolamento da tangeritina e heptametoxiflavona foi utilizado o sistema de solvente MeOH/Água-0.5% ácido fórmico [gradiente: 55% MeOH (0h) – 65% MeOH (2h) – 75% MeOH (4h)], detector de UV visível com absorvância de 310 nm e vazão de 10 ml/min. Antes do início da corrida e conexão do cartucho contendo a amostra, as colunas foram pré-condicionadas com 100% MeOH (1L) seguido de 55% MeOH (1L). Os compostos, contidos no solvente, foram coletados em frações

de 20 ml/tubo, sendo as frações correspondentes a cada pico combinadas em um mesmo recipiente, e o solvente evaporado em rotavapor sob vácuo (RE111, BUCHI®). Os frascos foram enxaguados com MeOH, e a suspensão transferida para tubos de ensaio, os quais foram armazenados em *freezer* -20°C. Em seguida, o MeOH foi evaporado no rotavapor sob vácuo, uma pequena alíquota de cada um dos resíduos foi dissolvida em 1 ml de DMSO, e o composto identificado por cromatografia líquida de alta pressão – HPLC.

Cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC

A identificação dos compostos foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão em HPLC-ESI-MS, sendo o HPLC Waters 2695 Alliance conectado em paralelo com detector de arranjo fotodiodo 996 (PDA) e espectrômetro de massa quadrupolo simples Micromass ZQ, equipado com fonte de ionização *electrospray* (ESI). A divisão pós-coluna para o PDA e o detector de massa ZQ foi com proporção de 10:1. A análise cromatográfica ocorreu em coluna C8 XBridge (4.6 x 150 mm), utilizando sistema de gradiente linear aquoso 0,5% de ácido fórmico/acetonitrila, inicialmente composto de 90:10 (v/v), sendo a concentração de acetonitrila aumentada para 80:20, 75:25, 60:40, 30:70, 30:70, e depois reduzida novamente para 90:10, 90:10 (v/v) nos tempos 0, 10, 15, 23, 40, 45, 53 e 60 min, respectivamente, e vazão de 0,75 ml/min.

Esta caracterização dos compostos foi realizada por meio do software Mass Lynx ver. 4.1 (Micromass, Divisão de Waters Corp, Beverly, MA), sendo os parâmetros de determinação de cada uma das massas os seguintes: modo de ionização, ESI-positivo; voltagem da capilaridade, 3.0 kV; voltagem do extrator, -4

V; temperatura da fonte, 100 °C; temperatura dessolvatação, 250 °C; fluxo de dessolvatação de N₂, 550 L/h; fluxo do cone de N₂ flow, 100 L/h; voltagem do cone, 40 V. Portanto, a identificação das flavonas cítricas isoladas e purificadas foi baseado nas características dos espectros de UV e massa molecular que cada um dos resíduos sólidos apresentaram. Após a identificação destes resíduos obtidos, os compostos equivalentes foram combinados, e o peso conferido: nobelitina, 12g; tangeritina, 10g; heptametoxiflavona, 9,2g.

Remoção de interferentes indesejáveis

Após a obtenção do volume necessário de cada uma das polimetoxiflavonas, agora isoladas, elas passaram por uma etapa de refluxo e cristalização, para remoção de resíduos indesejáveis, como por exemplo, os solventes utilizados durante o isolamento. Para purificação de cada um dos compostos, os resíduos sólidos foram transferidos para um recipiente, e adicionados de 70 ml de acetona. Esta suspensão passou pelo processo de refluxo, sendo aquecida a 40°C e resfriada com água em temperatura ambiente durante 40 min, para dissolução dos resíduos sólidos. Passado este período, o recipiente foi repousado em gelo por cerca de 1h30min, para a cristalização dos compostos. Em seguida, a fase solvente e cristalizado foram filtrados (Pyrex[®]) sob vácuo, e o conteúdo sólido retido no filtro foi enxaguado com mais 100 ml de acetona aquecida a 40°C, e reservado. A fase solvente foi evaporada em rotavapor sob vácuo, e o resíduo sólido obtido a partir desta fase foi enxaguado com 50 ml de acetona aquecida a 40°C. As duas frações de resíduo sólido foram combinadas e secadas sob vácuo.

Previamente a etapa de purificação, uma alíquota de cada uma das flavonas foi dissolvida em 1 ml de acetona e reservada. Após a obtenção dos compostos puros, foi realizado um teste de cromatografia em camada fina (TLC), utilizando o sistema de solvente: Hexano/Acetona/Butanol (70/20/10 – v/v/v), para confirmação da pureza dos compostos.

Remoção do odor de solventes

A última etapa de purificação das polimetoxiflavonas, antes do envio para administração aos ratos, consistiu da remoção de odores não característicos aos compostos. Para a realização deste processo, os compostos foram acondicionados em papel de filtro e enxaguados três vezes com 200 ml de hexano. O filtro foi mantido em temperatura ambiente para evaporação do solvente, e em seguida transferidos para frascos, tampados, e deixados *overnight* em estufa a vácuo, para a completa secagem dos compostos.

Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com idade de 40 dias (peso corporal de 180 ± 5 gramas), procedentes do Biotério Central do Campus de Botucatu – UNESP – São Paulo Brasil. Para a administração de cada um dos flavonoides foram utilizados 10 animais, os quais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, e passaram por um período de adaptação de três dias. Durante toda a fase experimental os animais receberam água e alimentação “*ad libitum*”, e o biotério foi mantido em ciclo de luz de 12 horas (luzes acessas às 6h e desligadas às 18h),

temperatura constante de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade de $55 \pm 5\%$. Os animais foram pesados a cada dois dias, para checagem do peso atual e ajuste da dose de cada flavonoide; e o monitoramento da ingestão alimentar foi realizado uma vez ao dia.

Preparo das polimetoxiflavonas

As PMF foram incorporadas em iogurte natural (Nestle[®]) para administração nos animais via gavagem. A incorporação das PMF ao iogurte ocorreu em ambiente termostatisado a 25°C , durante 10 minutos, sob rotação de 27.000 rpm em homogeneizador modelo Metabo[®]. Cada animal recebeu um volume de 1 ml/dia.

As polimetoxiflavonas, tangeritina (TAN), nobelitina (NOB) e heptametoxiflavona (HMF) foram isoladas a partir de extratos secos do óleo da casca da laranja, e administradas em concentração de 200 mg/kg/dia, durante 15 dias cada uma. A gavagem foi realizada diariamente.

Coleta da urina

Após a administração da dose diária das PMF, às 17:30h, iniciava-se a coleta da urina de 24h, a qual foi realizada duas vezes ao dia, às 8h e às 17h. A urina foi recolhida em frascos individuais, transferida para tubos Falcon (15 ml) após cada período de coleta, e centrifugada ($1700\times g$ durante 10 minutos) para sedimentação de resíduos sólidos. Em seguida, todo o volume de urina foi homogeneizado e fracionado em tubos Falcon de 50 ml. Após a coleta do período da manhã, as frações de urina eram mantidas refrigeradas (4°C) até o horário da coleta da tarde, momento no qual as frações de urina dos dois períodos foram misturadas. Obtido,

portanto, a urina de 24h, os frascos foram congelados em *freezer* -20°C e após uma semana transferidos para um *biofreezer* -80°C. No momento da extração dos metabólitos na urina, o volume total proveniente de cada um dos flavonoides foi misturado, não se fazendo distinção de cada dia de coleta.

As amostras de urina das flavonas cítricas foram eluídas em metanol, utilizando uma coluna C18. As frações de metanol foram concentradas em rotavapor (MA120, Marconi[®]) e secadas em evaporador (MST-12060-C00, Genevac Solvent[®]). Em seguida, os extratos secos foram enviados ao USHRL-ARS-USDA para extração, identificação e isolamento dos metabólitos. Os procedimentos de eluição e secagem das amostras de urina foram realizados no Laboratório de Nutrição do Departamento de Alimentos e Nutrição-FCF Araraquara-UNESP.

Isolamento dos metabólitos das polimetoxiflavonas

Extração dos metabólitos na urina de rato

A extração dos metabólitos contidos na urina dos ratos ocorreu a partir dos extratos secos obtidos após a eluição da urina em metanol. Inicialmente, o extrato seco, proveniente de cada uma das polimetoxiflavonas, foi dissolvido em 200 ml de MeOH, e adicionado 800 ml de H₂O-0,5% de ácido fórmico. Este volume foi transferido para um funil de separação, e acrescido de 500 ml de acetato de etilo, os quais foram misturados sob agitação manual, em duas seções de 30 segundos cada uma. Em seguida, o funil foi deixado em repouso para a separação das fases aquosa e solvente. Cada uma das fases foi recolhida separadamente em um recipiente, e a extração dos metabólitos contidos na fração aquosa foi repetida mais

duas vezes, sendo utilizados 500 ml de acetato de etilo em cada uma das seções. Ao final, todas as frações de solvente foram combinadas em um único frasco, e foi realizado mais um processo para a extração, com a adição de 300 ml de H₂O deionizada à fração orgânica. Esta mistura de água e solvente também foi agitada duas vezes, durante 30 segundos, e aguardou-se a separação das fases aquosa e solvente. A fração aquosa foi recolhida e misturada à fração aquosa obtida previamente, e a fração de acetato de etilo foi recolhida separadamente em outro recipiente.

Uma pequena alíquota das frações aquosa e solvente foi tomada e analisada em HPLC, para verificação da eficácia da extração. Em seguida, cada uma das frações foi evaporada em rotavapor sob vácuo; o volume, agora reduzido, foi transferido para um tubo de ensaio. A fração aquosa foi armazenada em *freezer* - 20°C, e iniciou-se o processamento da fração de acetato de etilo, para obtenção dos metabólitos de flavonas cítricas isolados.

Primeira etapa para isolamento dos metabólitos

A primeira etapa de isolamento dos metabólitos ocorreu por meio de cromatografia de partição centrífuga, um subtipo da cromatografia em contracorrente, utilizando o sistema Kromaton-FCPC[®], equipado com software Waters 600 Controller (Waters Corporation, Milford, MA), coletor de frações Retriever[®]IV (Teledyne-Isco) e detector de UV visível UA-6 (Teledyne-Isco). O sistema de solvente bifásico foi definido, baseado em experiências prévias do laboratório, nas quais também foram utilizadas amostras de flavonoides cítricos. Portanto, o sistema bifásico utilizado foi composto por acetato de

etila/acetona/água-0.5% de ácido fórmico (1/1/2 – v/v/v), sendo a fase móvel constituída pela fração orgânica (*upper phase*) e a fase estacionária pela fração aquosa (*lower phase*). Previamente, a fração de acetato de etilo contendo os metabólitos foi secada em condensador a vácuo (SpeedVac 200H-Savant[®]), e em seguida, dissolvida em 40 ml do solvente bifásico, sendo este volume constituído por partes iguais da fração aquosa e orgânica. Antes da injeção no cromatógrafo, a amostra foi filtrada em filtro de 45 µm, o qual foi enxaguado com mais 20 ml do solvente bifásico (v/v). As condições da corrida cromatográfica foram as seguintes: fluxo do sistema, ascendente; volume do rotor, 1L; velocidade do rotor, 1200 rpm; detector de UV visível com absorvância de 254 nm; tamanho da célula, 2 mm; sensibilidade de detecção, 2.0; vazão de 20 ml/min. A corrida cromatográfica teve duração de 3 horas (duas horas em fase ascendente e uma hora em fase descendente), sendo coletados 20 ml de amostra por tubo. Os tubos correspondentes à mesma fração foram combinados em um mesmo frasco, e o solvente evaporado em rotavapor sob vácuo. Em seguida, os frascos foram enxaguados com MeOH, e o volume transferido para tubos de ensaio, os quais foram armazenados em *freezer* -20°C, até a etapa seguinte de purificação.

Ao final da análise para a amostra de urina com tangeretina, foi observado no cromatograma que os metabólitos foram eluídos praticamente ao mesmo tempo, gerando picos com largura bastante ampla. Devido a isso, foi preparada uma placa de 96 poços para leitura da absorvância das amostras coletadas e determinação de quais destas corresponderiam à mesma fração. Para tanto, as amostras correspondentes aos picos foram tomadas a cada dois tubos, e diluídas na fração orgânica, em concentração de 1:10, sendo o solvente definido como branco da leitura. A placa foi analisada em leitora de microplacas Epoch[®] (BioTek), com

absorbância de 280 e 330 nm. Após a obtenção dos resultados, as frações foram determinadas e seguiram o mesmo processo de evaporação de armazenamento em *freezer* citados acima.

Purificação dos metabólitos

A purificação dos metabólitos de cada uma das PMF ocorreu em HPLC preparativo Varian ProStar 210/215, equipado com detector de UV (Walnut Creek, CA), GalaxyTM Chromatography Data System, coletor de frações Foxy[®]200 (Teledyne-Isco) e loop de 1mL para injeção das amostras. As análises foram realizadas em colunas preparativas de fase reversa C8 ou C18. As condições das corridas cromatográficas como volume de injeção, tempo de coleta por fração, composição da fase móvel e eluição da coluna (gradiente ou isocrático) foram ajustadas de acordo com o comportamento de cada um dos metabólitos. Essas determinações foram definidas a partir das informações fornecidas pela análise do HPLC analítico (HPLC-ESI-MS) das frações coletadas na cromatografia de partição centrífuga rápida. Todas as amostras foram diluídas em DMSO em volumes variados, a fim de se atingir um material translúcido para a análise; as amostras que ainda apresentaram característica turva foram centrifugadas em microtubos durante 5 min a 4000 rpm. Para estas amostras, o pellet foi descartado e o sobrenadante, contendo os compostos de interesse, foi injetado no HPLC preparativo para a separação dos metabólitos.

A escolha das frações provenientes da cromatografia de partição centrífuga rápida também foi determinada de acordo análises prévias no HPLC analítico

(HPLC-ESI-MS), a partir das quais pudemos identificar quais delas continham os metabólitos.

Purificação dos metabólitos glucuronídeos de TAN

A amostra de urina com tangeretina foi a primeira a ser trabalhada para o isolamento e purificação dos metabólitos. Foram corridas as frações 3 e 4 obtidas da cromatografia de partição centrífuga rápida no HPLC preparativo. A fração 4 foi, inicialmente, analisada em coluna AtlantisTM dC18 (OBDTM 19 x 100 mm, 5 µm) e eluída em gradiente composto por 0,5% ácido fórmico (A)/acetonitrila (B), inicialmente composto de 85:15 (v/v), sendo a concentração de acetonitrila aumentada para 70:30, 70:30, 85:15, 85:15, 85:15, nos tempos 0, 45, 50, 55, 65 min, respectivamente, vazão de 5 ml/min, frações de 1 min/tubo e 65 min de corrida cromatográfica. Ao final da corrida, a composição dos picos foi verificada em HPLC-ESI-MS. As frações contendo metabólitos puros foram concentradas com a remoção da fase móvel, enxaguadas com MeOH e armazenadas em tubos de ensaio a -20°C. As frações ainda contendo mais de um metabólito também foram concentradas e enxaguadas com MeOH, e em seguida secadas em evaporador (SAVANT), para nova corrida de separação. A partir desta etapa, estas frações com metabólitos heterogêneos foram testadas em coluna XBridgeTM prepC8 (OBDTM 19 x 100 mm, 5 µm) e método de eluição isocrático, com o percentual de acetonitrila em 20%.

A fração 3 da amostra de urina com tangeretina foi diretamente testada na coluna XBridgeTM prepC8 e método de eluição isocrático com 20% de acetonitrila, vazão de 5 ml/min, frações de 5 ml/tubo e 65 min de corrida cromatográfica. Os procedimentos seguintes tomados para a fração 3 foram os mesmos daqueles

adotados para a fração 4, onde os metabólitos puros foram armazenados em *freezer* -20°C, e as frações ainda heterogêneas sofreram sucessivas corridas cromatográficas até a purificação dos metabólitos contidos nelas.

Purificação dos metabólitos glucuronídeos de NOB

Para o isolamento dos metabólitos de contidos na urina com nobiletina, foi analisado no HPLC preparativo, apenas a fração 6 da cromatografia de partição centrífuga rápida. A amostra foi inicialmente testada na coluna XBridge™ prepC8 em modo de eluição isocrático com 20% acetonitrila, vazão de 5 ml/min, frações de 1 min/tubo e 65 min de corrida cromatográfica. Após a corrida, foram investigados quais tubos possuíam metabólitos puros, os quais foram concentrados, enxaguados com MeOH e armazenados em *freezer* -20°C. Assim como para as frações heterogêneas de TAN, as frações desta corrida com a amostra de NOB que continham mais de um metabólito foram combinadas e testadas novamente, com diferentes percentuais do solvente B. No entanto, a separação dos metabólitos não foi eficientemente atingida com a utilização da coluna XBridge™ prepC8, mesmo com inúmeras tentativas de ajuste na composição de eluição, e por isso, foi trocada tanto a fase estacionária quanto a fase móvel para esta análise.

Portanto, nas etapas seguintes de isolamento e purificação dos metabólitos de NOB foram utilizadas as colunas Phenomenex C18 (21 x 250 mm, 10 µm) em eluição isocrática com 50% MeOH ou a Atlantis™ dC18 também com eluição isocrática, mas com 25% acetonitrila. As corridas cromatográficas foram realizadas sucessivamente, até a obtenção dos metabólitos de nobiletina purificados, os quais também foram identificados e armazenados a -20°C.

Purificação dos metabólitos glucuronídeos de HMF

O procedimento inicial de isolamentos dos metabólitos de heptametoxiflavona foi diferente do adotado para as demais PMF. Antes do início da separação no HPLC preparativo, as frações 4, 5 e 6 provenientes da cromatografia de partição centrífuga rápida foram analisadas em coluna de filtração em gel Sephadex™ LH-20. Foram preparadas duas colunas, uma utilizando metanol como eluente, e outra o etanol (EtOH); o empacotamento das colunas foi feito manualmente. Para a coluna de MeOH foi utilizada uma bomba de baixa pressão para infusão do solvente, com vazão de 1mL/min e coleta de frações com 3mL/tubo. Já para a coluna de EtOH foi utilizada a gravidade para infusão do solvente, porém, a vazão foi verificada, apresentando-se com aproximadamente 1mL/min, e por isso, o coletor foi ajustado para 2min/tubo. Ambos os desempenhos das colunas foi monitorado pela leitura de UV ~310nm.

A partir das corridas cromatográficas realizadas na coluna em gel LH-20 foi possível observar frações com metabólitos de HMF praticamente puras, no entanto, as frações ainda heterogêneas foram injetadas no HPLC preparativo, utilizando a coluna Phenomenex C18 em eluição isocrática com acetonitrila. As condições de eluição destas amostras também foram ajustadas de acordo com as características dos metabólitos a serem isolados, sendo que o percentual de acetonitrila variou entre 27% a 45 %. O fluxo de vazão da coluna foi de 5 ml/min, com coletas de frações com 0,5 min/tubo e a corrida cromatográfica com duração de 65 min. Após a purificação dos metabólitos, estes foram armazenados em *freezer* -20°C.

Purificação dos metabólitos hidroxilados das PMF

A nobiletina utilizada administrada aos ratos neste estudo estava com apenas 60% de pureza, sendo os outros 40% divididos em: 15% TMS, 15% SIN e 10% entre impurezas e traços de HMF e TAN. Devido a isto, durante as análises das frações de NOB obtidas da cromatografia de partição centrífuga rápida foi observada uma quantidade significativa de metabólitos hidroxilados provenientes de diferentes PMF na fração 1, os quais foram isolados e purificados.

A primeira etapa de isolamento dos metabólitos hidroxilados das PMF também ocorreu no sistema Kromaton-FCPC[®], sendo as condições da corrida cromatográfica as seguintes: fluxo do sistema, ascendente; volume do rotor, 1L; velocidade do rotor, 1000 rpm; detector de UV visível com absorvância de 254 nm; tamanho da célula, 0.01 mm; sensibilidade de detecção, 0.1; vazão de 20 ml/min. A corrida cromatográfica teve duração de 4 horas (três horas em fase ascendente e uma hora em fase descendente), sendo coletados 20 ml de amostra por tubo. Devido à característica menos polar destes metabólitos, foram realizados testes para a determinação do sistema de solvente a ser utilizado. Foi escolhido o que apresentou valor de K mais próximo a 1: hexano/acetato de etila/metanol/água-0.5% de ácido fórmico (3/5/3/5 – v/v/v), sendo a fase móvel constituída pela fração orgânica (*upper phase*) e a fase estacionária pela fração aquosa (*lower phase*). Antes da injeção no cromatógrafo, a amostra foi diluída no sistema bifásico (v/v) e filtrada em filtro de 45 μ m, sendo o volume final injetado de 18 mL. Os tubos correspondentes à mesma fração foram combinados em um frasco, e o solvente foi evaporado. Os frascos foram enxaguados com MeOH e armazenados a -20°C.

A presença dos metabólitos hidroxilados das PMFs foi verificada nas frações 2, 3, 4 e 5 da FCPC, conforme análise feita no HPLC-ESI-MS. Cada uma destas

frações foi então analisada em placas de cromatografia líquida em camada fina preparativa – prep TLC 20 x 20 cm (Uniplate™ Analtech, Inc.). Previamente, as frações, contidas no MeOH, foram concentradas para 4mL de volume de amostra, aplicadas nas placas de prep TLC e em seguida secadas em câmara de vácuo sem aquecimento, durante 30 minutos. Após este período, as placas foram colocadas dentro de um tanque para testes de TLC contendo o solvente de eluição: Benzeno/Acetona (4/1). A análise ocorreu durante 2h30min, e depois as placas foram deixadas para secar dentro do fluxo durante 1h. Passado este período, a separação dos compostos foi verificada com a utilização de uma lâmpada de fluorescência a 254 nm. As linhas formadas na sílica foram delimitadas, sendo estas áreas da resina removidas da placa e transferidas separadamente para um papel filtro. Em seguida, cada uma das linhas de resina foram enxaguadas com 150 ml de MeOH e analisadas no HPLC-ESI-MS. As linhas que possuíam metabólitos purificados foram identificados e armazenados em *freezer* -20°C; já as linhas que possuíam mais de um metabólito foram concentradas e secadas em evaporador, e iniciou-se o isolamento e purificação destas frações no HPLC preparativo, seguindo as seguintes condições: coluna preparativa Phenomenex C18 (21 x 250 mm, 10 µm) em eluição isocrática com água-0,5% ácido fórmico/acetonitrila, vazão de 5 ml/min, com coletas de frações com 0,5 ou 0,3 min/tubo e a duração da foi de 65 min. O percentual de acetonitrila utilização para a eluição também variou conforme as características da amostra, variando entre 37% e 55%. Após a obtenção dos metabólitos purificados, eles foram armazenados em MeOH a -20°C.

Identificação dos metabólitos das PMF

Após a purificação dos metabólitos conjugados e hidroxilados, eles foram analisados em HPLC acoplado com fonte de ionização *electrospray* (ESI) positiva, utilizando condições similares às aquelas descritas anteriormente: coluna C8 XBridge (4.6 x 150 mm), sistema de gradiente linear aquoso 0,5% ácido fórmico/acetonitrila, inicialmente composto de 90:10 (v/v), aumentando para 80:20, 75:25, 60:40, 30:70, 30:70, e depois reduzido novamente para 90:10, 90:10 (v/v) nos tempos 0, 10, 15, 23, 40, 45, 53 e 60 min, respectivamente, com vazão de 0,75 ml/min. As amostras que apresentavam mesma massa molecular, com tempo de retenção e absorvância de UV muito próximos foram analisados a fim de verificar se representavam o mesmo composto. Aqueles que se mostraram idênticos foram combinados em um mesmo frasco e secados em evaporador até obtenção de uma massa seca.

Determinações iniciais da estrutura química foram realizadas para a maioria dos metabólitos isolados, por meio de UV, ESI-MS, fluorescência e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H NMR). A determinação da estrutura final dos demais compostos exigirá estudos de degradação química e instrumentos mais avançados. Após a conclusão deste passo, poderemos propor a fórmula química e estrutura molecular de todos os metabólitos das PMFs isolados.

Espectro de UV-Vis das PMF e dos metabólitos

O espectro de UV-Vis dos metabólitos foi medido utilizando-se o detector de arranjo fotodiodo (PDA) Waters 996. As medições foram registradas entre 400 e 230 nm, com resolução de 1.2 nm, e taxa de amostragem de 0,5 espectros/segundos.

Os espectros de UV das PMF administradas aos ratos foram diferentes entre si, e os metabólitos obtidos a partir de cada uma delas exibiram espectros de UV tipicamente semelhantes aos compostos originais. Desta maneira, os espectros de UV dos metabólitos foram úteis para identificar o composto do qual originaram, e fornecer informações iniciais da estrutura química.

Análise ESI-MS dos íons fragmentados dos metabólitos das PMF

Como apresentado anteriormente, a estrutura química das PMFs consiste de dois anéis aromáticos (A e B), ligados entre si pelo anel C. Em análises em HPLC, à medida que se aumentou a energia de fragmentação MS dos compostos, denominada "voltagem do cone", os metabólitos apresentaram íons com massa molecular característicos de substituintes padrão nos anéis A e B, esperados para os compostos aqui estudados.

As análises de fragmentação dos íons (ESI-MS) foram realizadas no espectrômetro de massa quadrupolo, Waters ZQ, nas seguintes condições: capilar 3.2 kV; voltagem do cone a 20, 30, 40, 60 e 70 V; exaustor com 3V; lente Rf 0.30V; temperatura da fonte, 100°C; temperatura do gás de dessolvatação, 250°C; dessolvatação caudal de gás, 500 L/h; taxa de fluxo do gás do cone, 200 L/h; resolução LM, 15.0; resolução HM, 15; energia dos íons, 0.10; e multiplicador 650. A detecção destes íons gerados pelos metabólitos também foi utilizada para obter uma caracterização inicial da estrutura química dos mesmos.

Espectro de fluorescência das PMF e seus metabólitos

PMFs e alguns dos metabólitos isolados neste estudo foram observados em relação à fluorescência sob luz UV, e a natureza da fluorescência emitida por estes compostos foi característica da estrutura química das flavanonas polimetoxiladas. O espectro de fluorescência foi medido em espectrofotômetro de fluorescência Perkin Elmer LS-55, em temperatura ambiente. Para a realização dos testes, as amostras foram preparadas em solução de MeOH com concentrações máximas de 0,01 mg/ml. Os espectros de emissão foram obtidos utilizando excitação a 330 nm (foi observada pouca diferença nos espectros utilizando-se excitação a 280 nm). Outras configurações do instrumento incluíram: pontos de corte de excitação e emissão de 5 nm, velocidade de escaneamento de 200 nm/min, com média de 8 *scans* acumulados.

Avaliação das PMF e seus metabólitos sobre a atividade da MTP

Cultura de células

Células Huh7.5 foram utilizadas nos ensaios *in vitro* para análise da atividade biológica das PMF e seus metabólitos sobre a síntese hepática de lipídeos. As células foram cedidas pela profa. Dra. Paula Rahal (Laboratório de Estudos Genômicos do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto/SP) e são derivadas da linhagem celular Huh7, uma linhagem de hepatócitos provenientes de carcinoma

celular que foram originalmente retirados de um indivíduo japonês, com idade de 57 anos, em 1982.

As células Huh7.5 foram cultivadas em frascos de 75 cm², em meio de cultura DMEM-Sigma D1152 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% solução de aminoácidos não-essenciais (meio de cultura completo – DMEM-C), e foram mantidas em estufa umidificada com 5% CO₂ à 37°C. A troca do meio de cultura para manutenção celular era realizado a cada dois dias, ocorrendo lavagem prévia do frasco com 10 ml de PBS estéril a 37°C. Repiques celulares foram realizados ao se observar confluência celular superior a 90% da área do frasco.

Análise da viabilidade celular

A análise de citotoxicidade das PMF e dos metabólitos em células Huh7.5 foi realizada por meio do ensaio colorimétrico MTT, que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (sal de MTT), em cristais de cor azul-púrpura que se acumulam no citoplasma celular. O ensaio foi realizado conforme metodologia padronizada no Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular – FCFar/UNESP.

Uma suspensão de células Huh7.5, contendo 1x10⁶ cel./ml, preparada em meio de cultura DMEM-C foi distribuída num volume de 200 µL/poço em placa de 96 orifícios de fundo plano. A placa foi incubada a 37°C, em estufa umidificada com 5% de CO₂, por um período de 24 h. Em seguida, o meio foi aspirado e as células tratadas com os respectivos compostos. As PMF e os metabólitos foram preparados

em meio de cultura DMEM-C e adicionados nas concentrações de 0, 5, 10, 25, 50, 100 e 500 μM . A placa foi novamente incubada por 24h em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Após este período, o meio foi removido e as células lavadas com PBS. Foram então adicionados 100 μL /poço da solução de MTT a 1mg/ml em meio DMEM incompleto, e feita uma incubação de 1h, nas mesmas condições anteriores. Em seguida, a solução de MTT foi removida, as células lavadas com PBS, e adicionados 100 μL /poço de DMSO. A placa foi gentilmente agitada por 5 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, e os resultados obtidos em espectrofotômetro a 490/630 nm. O controle negativo do teste foi composto por células tratadas apenas com meio DMEM-C, considerando-as como 100% da viabilidade celular. Como controle de morte celular, células foram incubadas durante 10, 20 ou 30 minutos com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,001 M e lavadas com PBS, antes da adição da solução de MTT. Os testes foram realizados em triplicada, em três ensaios distintos.

Grupos experimentais

De acordo com os resultados obtidos no ensaio da viabilidade celular ($\geq 80\%$) as concentrações de 5, 10, 25 e 50 μM foram selecionadas para a realização dos ensaios com as PMF, e as concentrações de 5, 10 e 25 μM foram selecionadas para a realização dos ensaios com os metabólitos, para a análise da ação destes sobre a síntese hepática de lipídeos. Os grupos experimentais são descritos abaixo. Os metabólitos identificados com “G” indicam aqueles conjugados ao ácido glucurônico, e os identificados com “OH” indicam os hidroxilados (perda de um ou mais grupos metil).

1. Controle negativo: apenas DMEM-C
2. Controle positivo TAN: purificada, com massa molecular de $[372+H]^+$
3. Controle positivo NOB: purificada, com massa molecular de $[402+H]^+$
4. Controle positivo HMF: purificada, com massa molecular de $[432+H]^+$
5. Metabólito teste TAN-G1: purificado, com massa molecular de $[534/358+H]^+$
6. Metabólito teste TAN-G2: purificado, com massa molecular de $[520/344+H]^+$
7. Metabólito teste TAN-OH1: purificado, com massa molecular de $[358+H]^+$
8. Metabólito teste TAN-OH2: purificado, com massa molecular de $[358+H]^+$
9. Metabólito teste NOB-G: purificado, com massa molecular de $[564/388+H]^+$
10. Metabólito teste NOB-OH: purificado, com massa molecular de $[388+H]^+$
11. Metabólito teste HMF-OH: purificado, com massa molecular de $[580/404+H]^+$

Incorporação celular das PMF e seus metabólitos

Foram realizadas análises em microscopia confocal com a finalidade de se verificar a incorporação das PMF e seus metabólitos pelas células Huh7.5. Para a realização destes testes, uma suspensão de células contendo 1×10^5 cel./ml, preparada em meio de cultura DMEM-C foi distribuída num volume de 2 ml, em placa própria para microscopia confocal (35 x 10 mm e lamínula de vidro aderida, 22x22 mm). A placa foi incubada a 37°C, em estufa umidificada com 5% de CO₂, por um período de apenas 12 h, para evitar um aumento excessivo na confluência celular. Após este período, o meio foi descartado, e as PMF foram adicionadas na concentração de 50 µM em meio de cultura DMEM-C, enquanto os metabólitos foram adicionados na concentração de 25 µM. As placas foram novamente incubadas, agora durante 24h. Em seguida, o meio foi removido e as células

lavadas duas vezes com PBS. Neste momento, 1 ml de PBS foi adicionado à cada placa para a obtenção das imagens, pois, a permanência do meio de cultura promove um *background*, proveniente de sua coloração, associado aos compostos livres que não foram incorporados pelas células.

As concentrações de 50 μM para as PMF e 25 μM para o metabólitos foram definidas para este experimento, pois além de manterem a viabilidade celular $\geq 80\%$, proporcionam alta intensidade na fluorescência emitida pelos compostos dentro da célula. O controle negativo do teste foi composto por células tratadas apenas com meio DMEM-C. As imagens foram obtidas a partir do Microscópio Confocal Zeiss 780 do Instituto de Física de São Carlos-USP. O espectro de fluorescência dos compostos incorporados pelas células foi obtido utilizando-se laser de 405nm; filtros de 413 a 692nm; pinhole de 98 μm ; e objetiva de 40x. As imagens foram realizadas com laser de 405 nm, também em objetiva de 40x, e filtro de emissão variando entre 415 e 550 nm.

Determinação do comprimento de onda para as análises em microscopia confocal

Antes da realização das análises de incorporação das PMF e dos metabólitos pelas células Huh7.5, foram investigadas as condições adequadas para melhor obtenção das imagens. Para a realização do teste, foi preparada uma solução de cada uma das PMF em DMSO, e 200 μL da solução foram adicionados a uma placa de 96 orifícios de fundo plano. O DMSO puro foi utilizado como branco, e as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro de fluorescência Synergy H1 Hybrid Read. As amostras foram avaliadas em triplicata, e os resultados analisados no software Gen5-2.07. Dois protocolos foram estabelecidos para determinar o

comprimento de onda ótimo para excitação e emissão da fluorescência destes compostos (Figuras 10 e 11).

1) Protocolo de excitação: o escaneamento variou entre os comprimentos de onda de 250 e 530 nm, sendo realizada uma leitura a cada 10 nm.

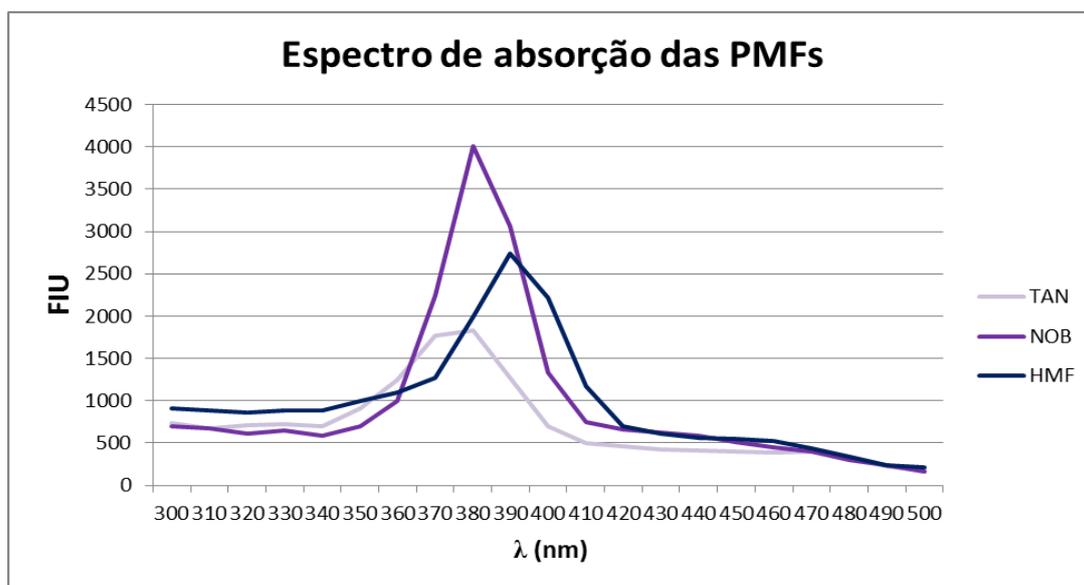


Figura 10: Espectro de absorção de fluorescência das PMF purificadas

2) Protocolo de emissão: a partir da definição do comprimento de onda adequado para excitação (380 nm), foi então realizado o escaneamento para emissão, o qual variou entre 400 e 700 nm; também foi realizada uma leitura a cada 10 nm.

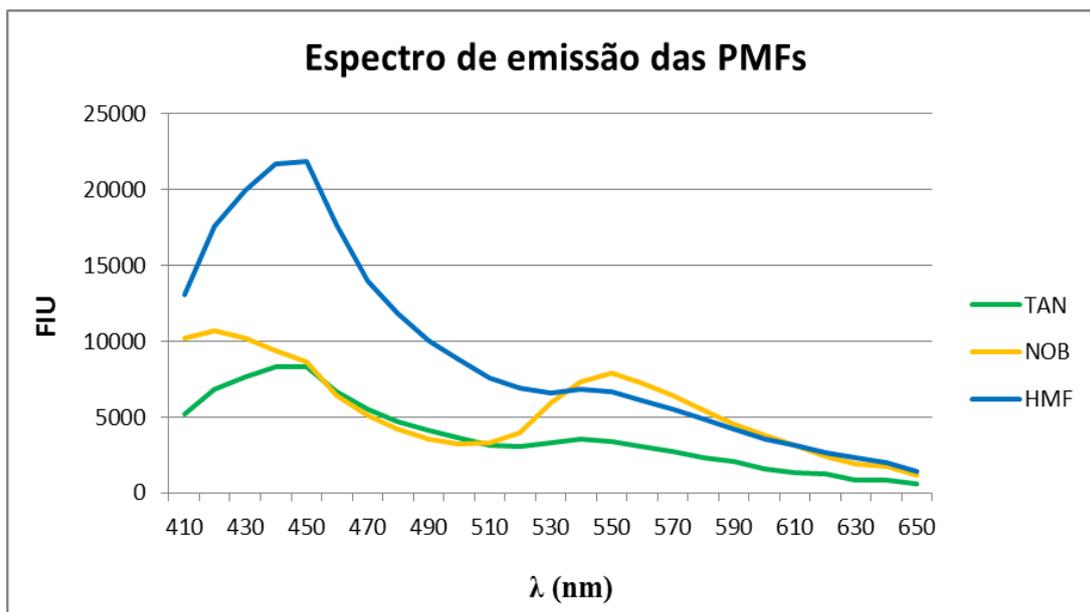


Figura 11: Espectro de emissão de fluorescência das PMF purificadas

Após a definição destas condições, foram preparadas lâminas para microscópio de fluorescência (Olympus BX60), a fim de se confirmar a incorporação dos compostos pelas células. Dez μL de uma suspensão celular contendo 1×10^6 cel./ml foram adicionados às lâminas, que foram deixadas pra secar à 37°C (em média 1 minuto); em seguida, foi colocada a lamínula e uma gota de glicerina. As lâminas foram observadas em objetiva com aumento de 40x, e filtro de 380 nm. Com a realização destes testes, foi observado que as células Huh7.5 também apresentam autofluorescência, com comprimento de excitação próximo ao ultravioleta (~ 400 nm). Porém, a confirmação da incorporação dos flavonoides pelas células pôde ser realizada pela diferença de intensidade e espectro de fluorescência emitida em cada grupo experimental.

Atividade da proteína transferidora de triglicerídeos microsomal (MTP)

Foi avaliada utilizando um kit de ensaio de MTP (Biomedical Roar, Nova York, NY), que se baseia na transferência de fluorescência, decorrente da atividade da MTP, entre partículas doadoras e receptoras de fluorescência. Para a realização do ensaio, uma suspensão de células Huh7.5, contendo 1×10^6 cel./ml, preparada em meio de cultura DMEM-C foi distribuída num volume de 500 μ L/poço em placa de 48 orifícios de fundo plano. A placa foi incubada a 37°C, em estufa umidificada com 5% de CO₂, por um período de 24 h. Em seguida, o meio foi removido e as células tratadas com as PMF, nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 μ M, ou com os metabólitos, nas concentrações de 5, 10 e 25 μ M. A placa foi novamente incubada (37°C e 5% de CO₂) durante 24h, e, após este período, o meio foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS a 37°C. Em seguida, foram adicionados 150 μ L de tampão de lise (Tris 10 mM e pH 7,4; NaCl 150 mM, 1 mM EDTA, adicionados de inibidores de protease: PMSF 100 mM e Leupeptina 1 mg/mL) em cada orifício. As células foram lisadas (3 x 5 segundos) em sonicador e as proteínas totais quantificadas pelo método de Bradford.

A atividade da MTP foi avaliada pela incubação de 50 μ g de proteína celular com 5 μ L da partícula doadora e 5 μ L da partícula receptora, num volume final de 250 μ L em tampão de ensaio (Tris 15 mM e pH 7,4; NaCl 40 mM, 1 mM EDTA). A análise foi preparada em placa negra com fundo transparente, a qual foi incubada em estufa convencional a 37°C durante 12 horas. O sinal de fluorescência foi medido em fluorímetro (Biotek LFX800, Software-Gen5) com excitação de 465/20 nm e emissão de 535/20 nm. Para a quantificação da intensidade de fluorescência (FIU), foi preparada uma curva padrão de isopropanol e 5 μ L da partícula doadora

de fluorescência em diluição seriada, que também foi medida em excitação de 465/20 nm e emissão de 535/20 nm, num volume de 100 μ L (Figura 12).

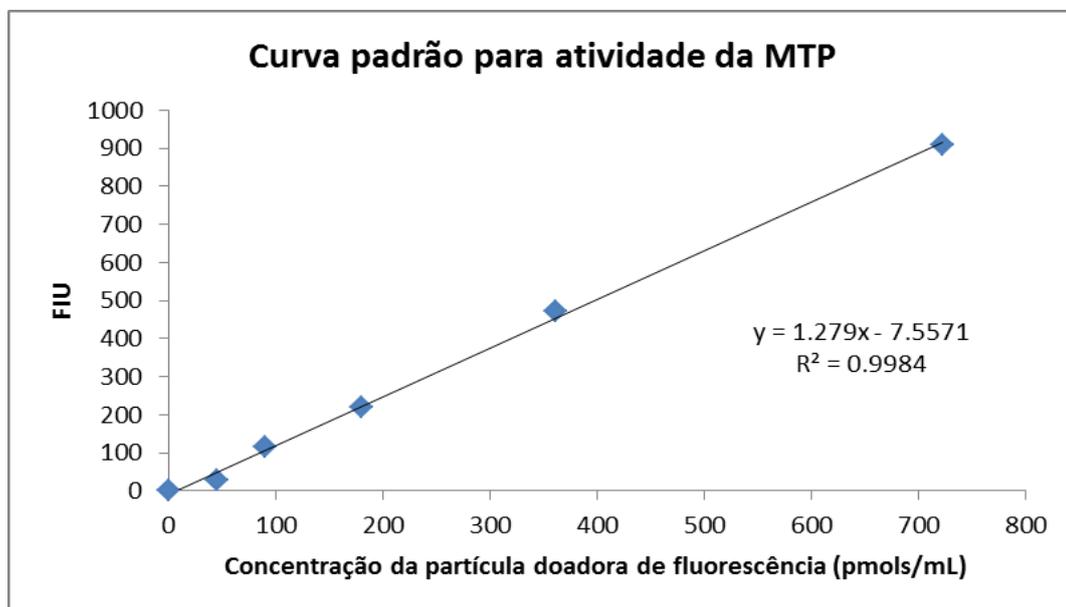


Figura 12: Curva padrão utilizada para análise da atividade da MTP após 24h de incubação com as PMF e os metabólitos

Quantificação das proteínas totais

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford. O reagente foi preparado utilizando 50 mg de azul de Coomassie G-250, dissolvido em 25 mL de etanol 100%; 50 mL de ácido fosfórico 85%, em água, com volume final de 500 mL. As amostras de lisado celular foram em NaCl 0.15 M (1:10) em 100 μ L, adicionadas de 1 mL do reagente de Bradford, agitadas em vórtex e incubadas durante 5 minutos ao abrigo da luz. Após este período as amostras, preparadas em duplicata, foram avaliadas em espectrofotômetro a 595 nm. Uma curva padrão de albumina 1 mg/mL foi preparada em NaCl 0.15 M nas concentrações de 5, 10, 20,

50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 13), e utilizada para a quantificação de proteínas nas células no ensaio da MTP.

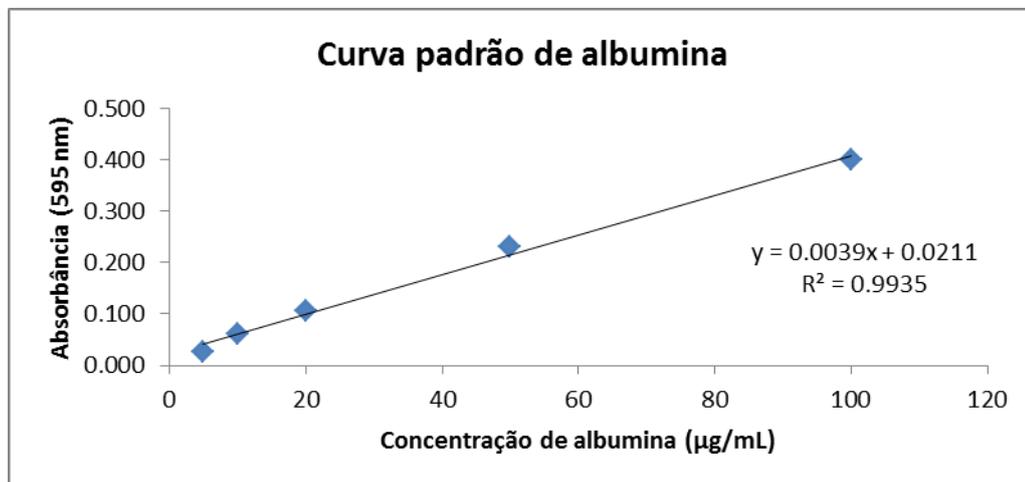


Figura 13: Curva padrão de albumina utilizada para quantificação das proteínas totais das células Huh7.5 após 24h de incubação com as PMF e os metabólitos

Forma de análise dos resultados

Os resultados de viabilidade celular e atividade da MTP são apresentados como média \pm desvio padrão. A distribuição dos dados foi testada quanto à normalidade, e em seguida, a variação entre os grupos foi avaliada pela análise de variância One-Way (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey, com a finalidade de identificar os grupos que apresentavam diferença. As análises realizadas apenas entre dois grupos foram avaliadas pelo teste T para amostras não pareadas. O nível de significância considerado foi $P < 0,05$ (GraphPad Prism 5).

RESULTADOS

Durante o período de administração dos compostos de PMF, não houve perda de nenhum dos ratos, mostrando que estes toleram bem uma dose de 200 mg/kg/dia. Os animais mantiveram consumo de ração e água adequados, além de ganho de peso habitual para a espécie.

Os procedimentos utilizados para o isolamento das polimetoxiflavonas permitiu a obtenção dos compostos tangeretina e heptametoxiflavona com grau de pureza maior que 95% (Figura 14 e 15), no entanto, a utilização destes métodos para o isolamento da nobiletina não apresentou a mesma eficácia, visto que a amostra utilizada para administração nos animais possuía apenas 60% de nobiletina, e foi composta também por 15% de sinensetina, 15% de tetrametilescutelareína, além de 10% de impurezas e traços de HMF e TAN (Figura 16).

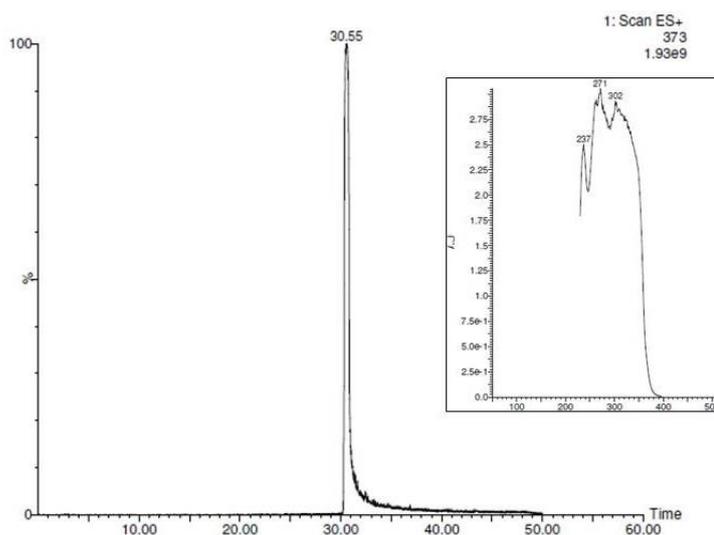


Figura 14: Cromatograma (MS e UV) da TAN purificada a partir do extrato seco do óleo da casca da laranja. HPLC-MS, $[372+H]^+$

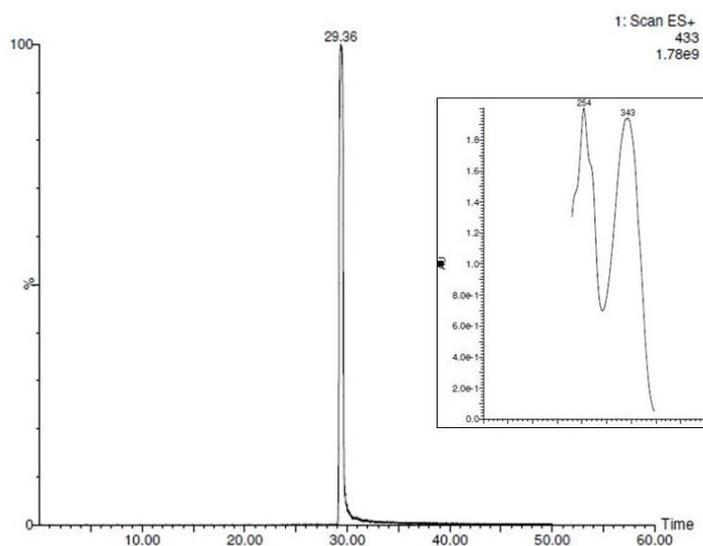


Figura 15: Cromatograma (MS e UV) da HMF purificada a partir do extrato seco do óleo da casca da laranja. HPLC-MS, $[432+H]^+$

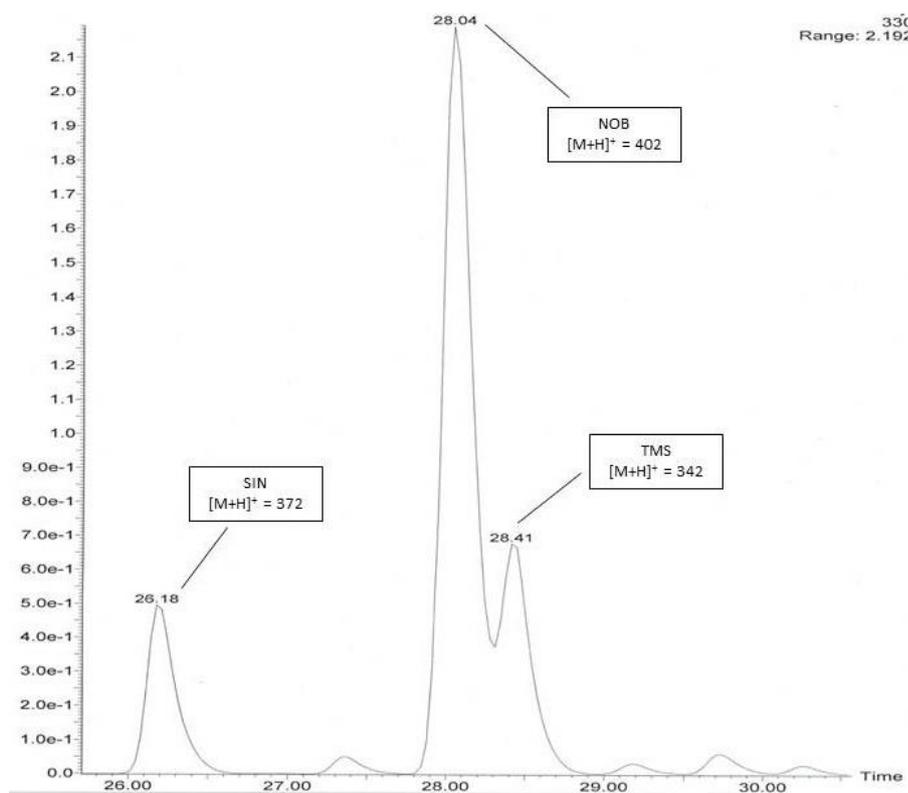


Figura 16: Cromatograma (UV) da NOB purificada a partir do extrato seco do óleo da casca da laranja $[402+H]^+$

Após o processo de eluição e extração da urina coletada dos animais, foi observado que a maior concentração dos metabólitos das PMF encontrava-se na fração orgânica, proveniente da extração líquida-líquida com acetato de etilo e água 0,5% ácido fórmico. Na fração aquosa da extração foram encontrados os metabólitos de PMF conjugados a grupos sulfato (dados não apresentados), enquanto que na fração orgânica foram encontrados os metabólitos na forma hidroxilada e os conjugados ao ácido glucurônico.

Abaixo são apresentados os cromatogramas da fração orgânica das amostras de urina para tangeretina (Figura 17), nobiletina (Figura 18) e heptametoxiflavona (Figura 19), obtidos a partir da análise com HPLC-MS-ESI. As bandas cromatográficas estão sinalizadas com as respectivas massas moleculares e tempo de retenção.

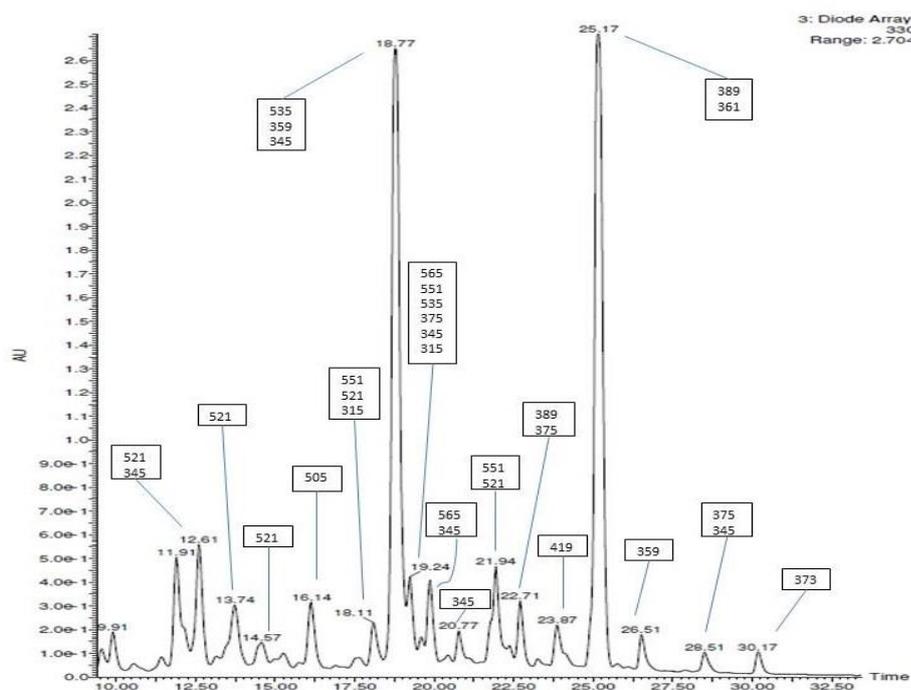


Figura 17: Cromatograma da fração orgânica da extração da urina de TAN com acetato de etila. HPLC-MS, $[M+H]^+$

É importante ressaltar que a eluição com metanol das amostras de urina de NOB e TAN ocorreu na mesma coluna, nesta ordem, e por isso, foram observados algumas bandas com massa molecular correspondente à amostra de NOB no cromatograma de extração da amostra de TAN. No entanto, este fato não interferiu no objetivo do trabalho, uma vez que a obtenção de metabólitos puros e isolados foi alcançada.

A partir das frações resultantes da análise de cromatografia de partição centrífuga rápida, iniciaram-se os procedimentos para isolamento dos metabólitos glucuronados das PMF, e também daqueles na forma hidroxilada. As tabelas 1 (análise dos cromatogramas de massas e UV) e 2 (espectros de fluorescência) apresentam os metabólitos isolados, purificados e parcialmente caracterizados, utilizados nos ensaios *in vitro* deste estudo.

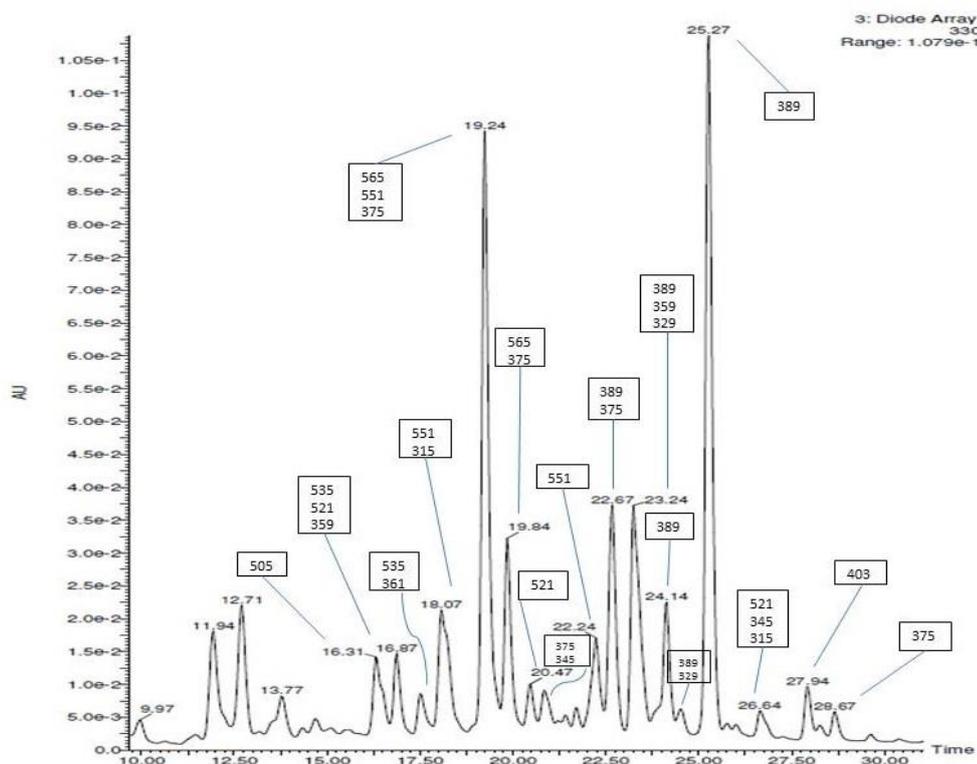


Figura 18: Cromatograma da fração orgânica da extração da urina de NOB com acetato de etilo. HPLC-MS, $[M+H]^+$

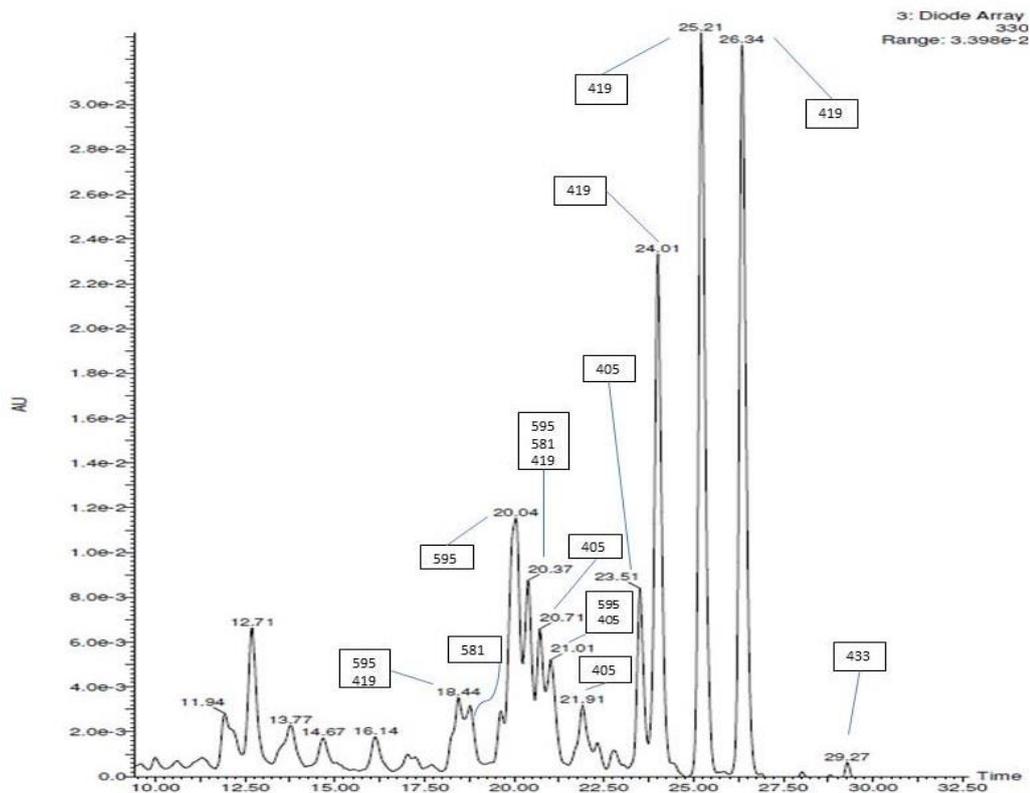


Figura 19: Cromatograma da fração orgânica da extração da urina de HMF com acetato de etilo. HPLC-MS, $[M+H]^+$

O composto TAN-G1 corresponde a um metabólito da TAN após a perda de um grupamento metil (CH_2) no $\text{C4}'$, seguido de uma conjugação ao ácido glucurônico ($\text{MM} = 176 \text{ g.mol}^{-1}$). Aqui, foi possível observar um fragmento iônico de massa molecular igual $359 [M+H]^+$, correspondente à perda do CH_2 desta molécula. O metabólito TAN-G2 também é derivado da TAN administrada nos animais; as análises de ^1H NMR 60 MHz apontam que ele representa a perda de dois CH_2 pelo composto original, seguido da conjugação de uma das hidroxilas livres ao ácido glucurônico (TAN-dihidroxi-glucuronídeo). Neste caso, foram observados fragmentos de íons com massa molecular igual a: $345/197/169/121/119$. Os compostos TAN-OH1 e TAN-OH2 correspondem a metabólitos provenientes da TAN

após oxidação/redução de um grupo metil e consequente hidroxilação do oxigênio remanescente (O^-), em diferentes posições (TR = 25.22 e 23.40 min, respectivamente).

Os metabólitos NOB-G e NOB-OH correspondem a compostos gerados a partir da NOB administradas nos animais. O primeiro representa a perda de um CH_2 seguido da conjugação ao ácido glucurônico, enquanto o segundo representa somente a perda de um metil, deixando uma hidroxila livre. A partir da análise de ESI-MS $[M+H]^+$ dos substituintes nos anéis A e B, observados um fragmento de MM= 389 para o metabólito NOB-G, e fragmentos com MM= 389/359/344/210/183/151/149 para o metabólito NOB-OH.

Já o metabólito HMF-OH é o único isolado a partir da amostra de HMF administrada aos animais. Ele representa a perda de dois CH_2 pelo composto original, seguido da conjugação de uma das hidroxilas livres ao ácido glucurônico, gerando íons com massa molecular igual a 405/211/183/137.

As tabelas 3 e 4 apresentam os demais metabólitos isolados a partir da amostra de urina dos animais administrados com as PMF, mas que ainda necessitam de análises mais aprofundadas para a completa caracterização.

Tabela 1. Metabólitos utilizados nos ensaios *in vitro* com as células Huh7.5.

Metabólito	ESI-MS ⁺	TR (min)	Íons fragmentados	Espectro de UV	Composto proposto	Qnt. (µg)
TAN-G1	535/359	18.74	Em andamento	230/271/320	TAN-4'-glucuronídeo	9630
TAN-G2	521/345	16.70	345/197/169/121/119	329/264/243	TAN-dihidroxi-glucuronídeo	910
TAN-OH1	359	25.22	210/183/121/119	268/325	TAN-4'-monohidroxilada	1480
TAN-OH2	359	23.40	181/153/151/149	242/265/333	TAN-monohidroxilada	690
NOB-G	565/389	19.40	Em andamento	249/267/336	NOB-glucuronídeo	3580
NOB-OH	389	25.21	359/344/210/183/151/149	249/271/332	NOB-monohidroxilada	5220
HMF-OH	405	23.38	405/211/183/137	254/270/346	HMF- monohidroxilada	1850

Tabela 2. Espectro de fluorescência dos metabólitos utilizados nos ensaios *in vitro* com as células Huh7.5

Composto proposto	Intensidade da fluorescência	Emissão máxima de fluorescência
TAN-4'-glucuronídeo	165	384 > 368, 410
TAN-dihidroxi-glucuronídeo	260	382 > 364, 410
TAN-4'-monohidroxilada	175	384 > 368, 410
TAN-monohidroxilada	247	451
NOB-glucuronídeo	212	446 – 383
NOB-monohidroxilada	460	450 – 390
HMF- monohidroxilada	382	470

Tabela 3. Metabólitos glucuronídeos na urina dos ratos.

Metabólito	Tempo de retenção (min)	UV (nm)
<u>G.I - [M+H]⁺ = 565 amu</u>		
a	16.54	250/337
<u>G.II - [M+H]⁺ = 551 amu</u>		
a	17.94	271/329
<u>G.III - [M+H]⁺ = 535 amu</u>		
a	16.74	243/266/327
b	17.47	245/265/329
<u>G.IV - [M+H]⁺ = 521 amu</u>		
a	15.85	245/265/325
<u>G.V - [M+H]⁺ = 505 amu</u>		
a	16.11	266/320
b	16.35	266/320

Tabela 4. Metabólitos hidroxilados das PMF na urina dos ratos

Metabólito	Tempo de retenção (min)	UV (nm)
<u>A.I - [M+H]⁺ = 389 amu</u>		
a	24.07	251/278/336
b	24.38	251/334
c	25.48	267/276/296

Tabela 4. Continuação.

<u>A.II - [M+H]⁺ = 375 amu</u>		
a	20.84	252/279/339
b	21.65	252/340
c	22.55	253/339
d	22.61	252/269
e	28.51	255/283/342
<u>A.III - [M+H]⁺ = 359 amu</u>		
a	23.34	257/302
b	23.52	249/314
c	29.41	244/275/342
<u>A.IV - [M+H]⁺ = 329 amu</u>		
a	23.24	259/289
b	24.44	331/276/325
<u>A.V - [M+H]⁺ = 315 amu</u>		
a	18.54	265/327
<u>A.VI - [M+H]⁺ = 419 amu</u>		
a	23.90	252/342
<u>A.VII - [M+H]⁺ = 405 amu</u>		
a	20.57	254/343

Antes da realização do ensaio biológico com as PMF ou os metabólitos isolados, foram realizadas análises da citotoxicidade celular destes compostos em cultura de células Huh7.5. De acordo com os resultados obtidos a partir do teste MTT, as três PMFs (TAN, NOB e HMF) apresentaram viabilidade celular acima de 80% para as concentrações de 5 a 50 μM (Figura 20 A, B e C), enquanto para os metabólitos esta viabilidade foi observada apenas até a concentração de 25 μM (Figuras 21 A – G).

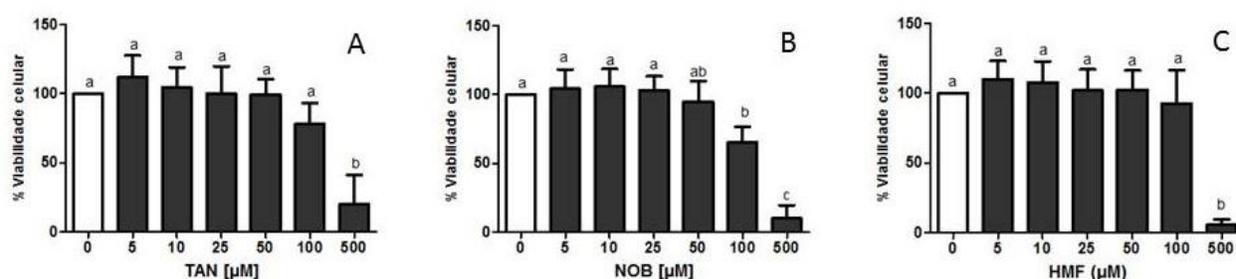


Figura 20. Viabilidade celular das células Huh7.5 após 24 de tratamento com as PMF purificadas nas concentrações de 5, 10, 25, 50; 100 e 500 μM . A) TAN; B) NOB; C) HMF. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P > 0.05$) entre as concentrações testadas.

A concentração de 500 μM foi significativamente inviável para todos os compostos; porém, os metabólitos TAN-G2 e TAN-OH2 não foram avaliados nesta concentração, devido ao baixo volume obtido no isolamento destes compostos (Tabela 1). O controle de morte celular (H_2O_2 0.001 M) apresentou viabilidade inferior a 80% em todas as condições de avaliação (Figura 22).

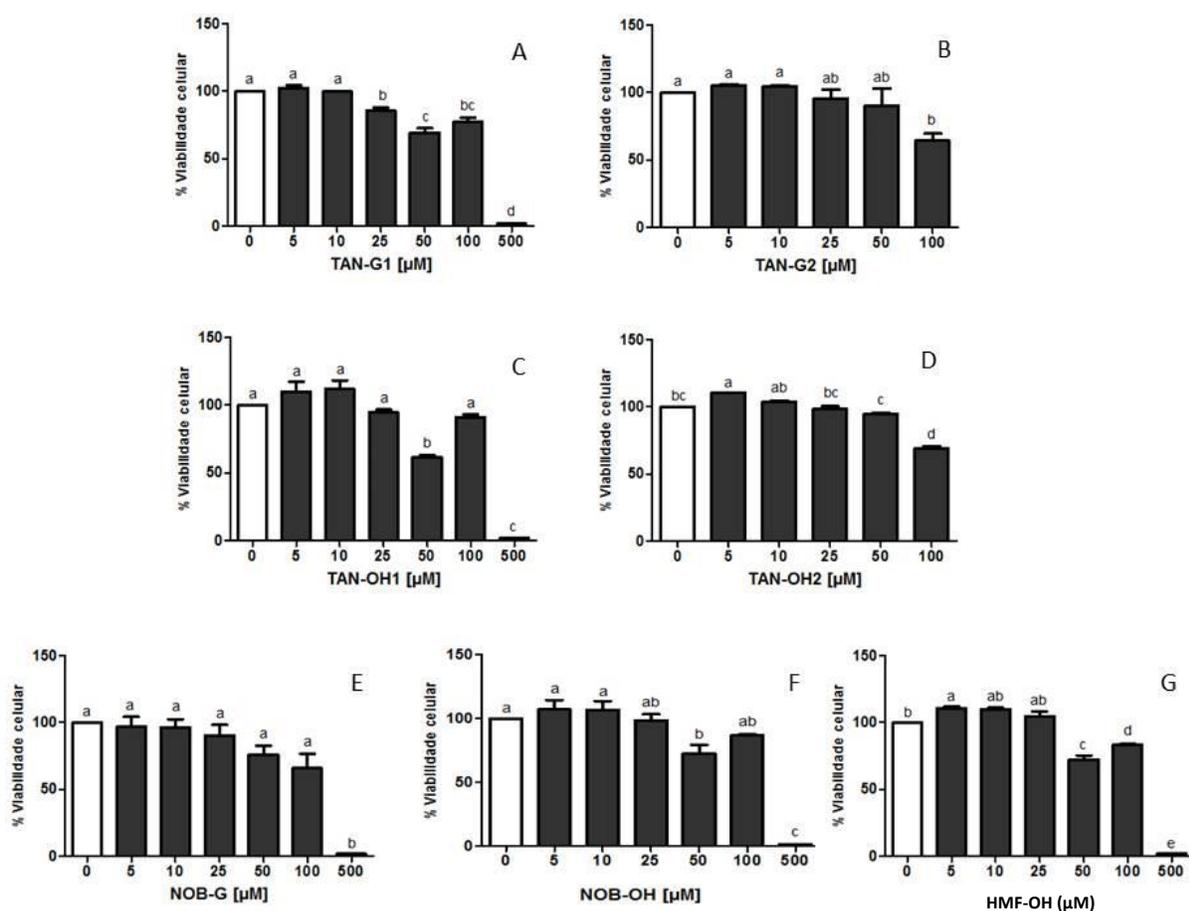
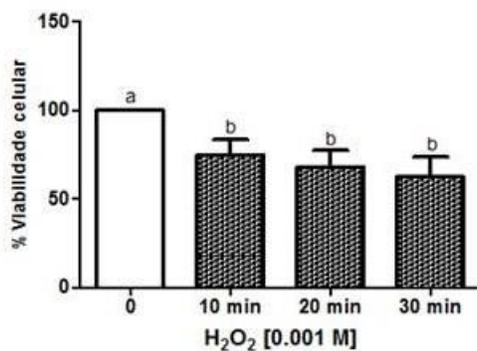


Figura 21. Viabilidade celular das células Huh7.5 após 24 de tratamento com os metabólitos nas concentrações de 5, 10, 25, 50; 100 e 500 µM. A) TAN-G1; B) TAN-G2; C) TAN-OH1; D) TAN-OH2; E) NOB-G; F) NOB-OH; G) HMF-OH. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P > 0.05$) entre as concentrações testadas.



Figuras 22. Viabilidade celular das células Huh7.5 tratamento com H₂O₂ 0.001 M após 10, 20 ou 30 minutos de incubação. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P > 0.05$) entre os tempos de incubação.

Apesar de a HMF ainda ter apresentado percentual de viabilidade acima de 90% na concentração de 100 μM , estipulou-se trabalhar com as três PMF nas mesmas concentrações, a fim de comparar a ação destas no modelo experimental proposto, eliminando-se assim, possíveis vieses nas condições do estudo. Entre os metabólitos, TAN-G2 e TAN-OH2 também apresentaram viabilidade celular acima de 80% na concentração de 50 μM , porém, os mesmos critérios definidos para os ensaios *in vitro* com as PMFs foram utilizados para os metabólitos. Curiosamente, para os metabólitos TAN-G1, TAN-OH1, NOB-OH e HMF-OH foi observada aumento da viabilidade celular na concentração de 100 μM , quando comparada com a concentração de 50 μM , sendo que para os compostos TAN-OH1, NOB-OH e HMF-OH essa recuperação foi para uma viabilidade superior a 80%.

O IC_{50} para cada um dos compostos avaliados foi: TAN = 225 μM ; TAN-G1 = 139 μM ; TAN-G2 = 129 μM ; TAN-OH1 = 173 μM ; TAN-OH2 = 132 μM ; NOB = 139 μM ; NOB-G = 123 μM ; NOB-OH = 172 μM ; HMF = 216 μM ; HMF-OH = 163 μM .

Quando comparamos a viabilidade celular entre todos os grupos experimentais, dentro da mesma concentração testada, foram observadas diferenças apenas na concentração de 50 μM (Figura 23 A – F).

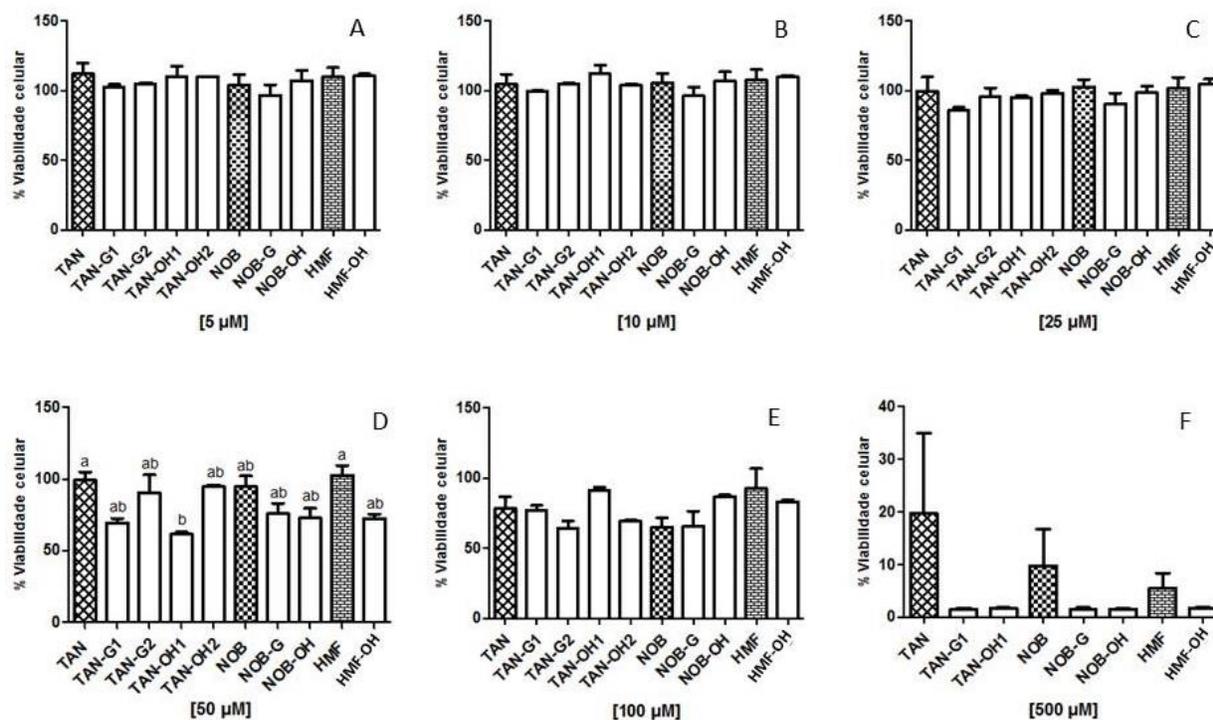


Figura 23. Viabilidade celular das células Huh7.5 após 24 de tratamento com as PMF e os metabólitos TAN; TAN-G1; TAN-G2; TAN-OH1; TAN-OH2; NOB; NOB-G; NOB-OH; HMF; HMF-OHG. A) 5 µM; B) 10 µM; C) 25; D) 50 µM; E) 100 µM ; F) 500 µM. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P > 0.05$) entre os grupos avaliados.

Compostos aromáticos, tais como as PMF, são capazes de emitir uma autofluorescência, e por isso, após a definição das concentrações de PMFs e dos metabólitos que seriam utilizadas no estudo, foram feitas imagens de fluorescência em microscopia confocal, com a finalidade de investigar a incorporação destes compostos pelas células Huh7.5, e em qual região do hepatócito eles estariam localizados. As figuras 24 (TAN, em verde), 25 (NOB, em amarelo), 26 (HMF, em ciano) e 27 (Controle, em azul) mostram as imagens obtidas após incubação de 24h das células Huh7.5 com as PMFs (50 µM) e seus metabólitos isolados (25 µM), além das imagens do controle negativo (células incubadas durante 24h apenas com DMEM-C).

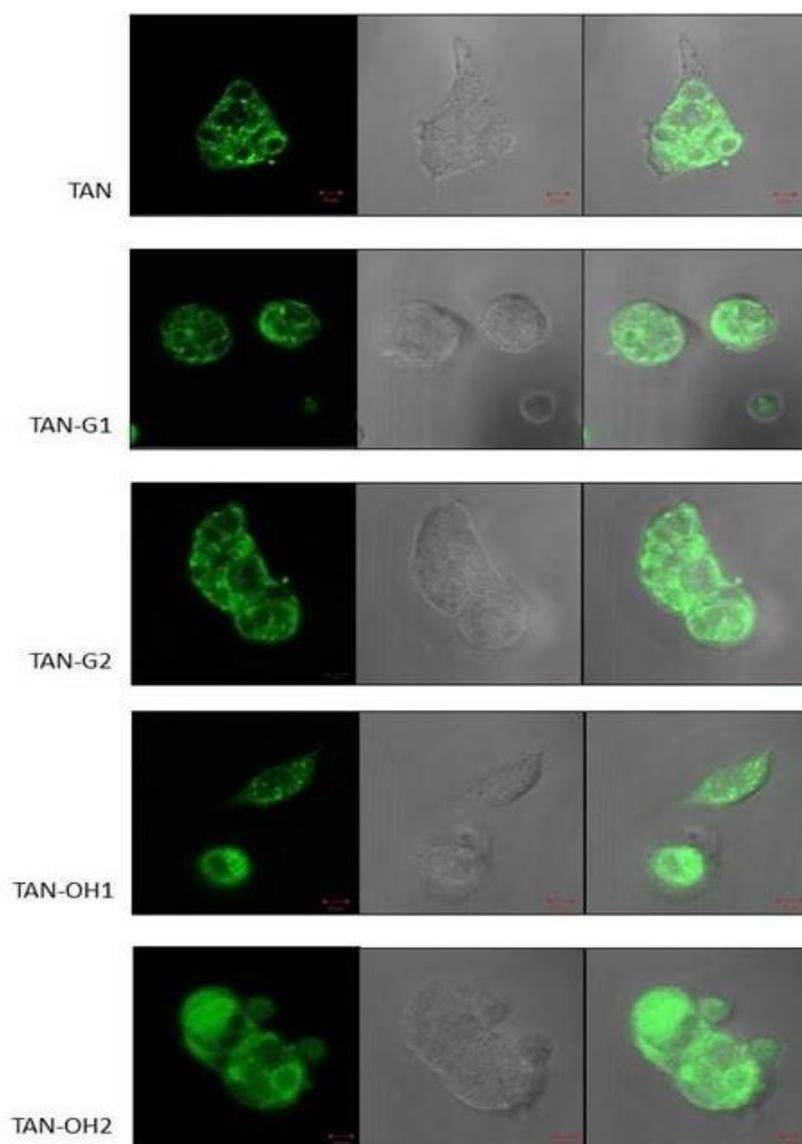


Figura 24. Imagens em microscopia confocal das células Huh7.5 após 24h de incubação com TAN, TAN-G1, TAN-G2, TAN-OH1 e TAN-OH2. Escalas em 10 ou 50 μm .

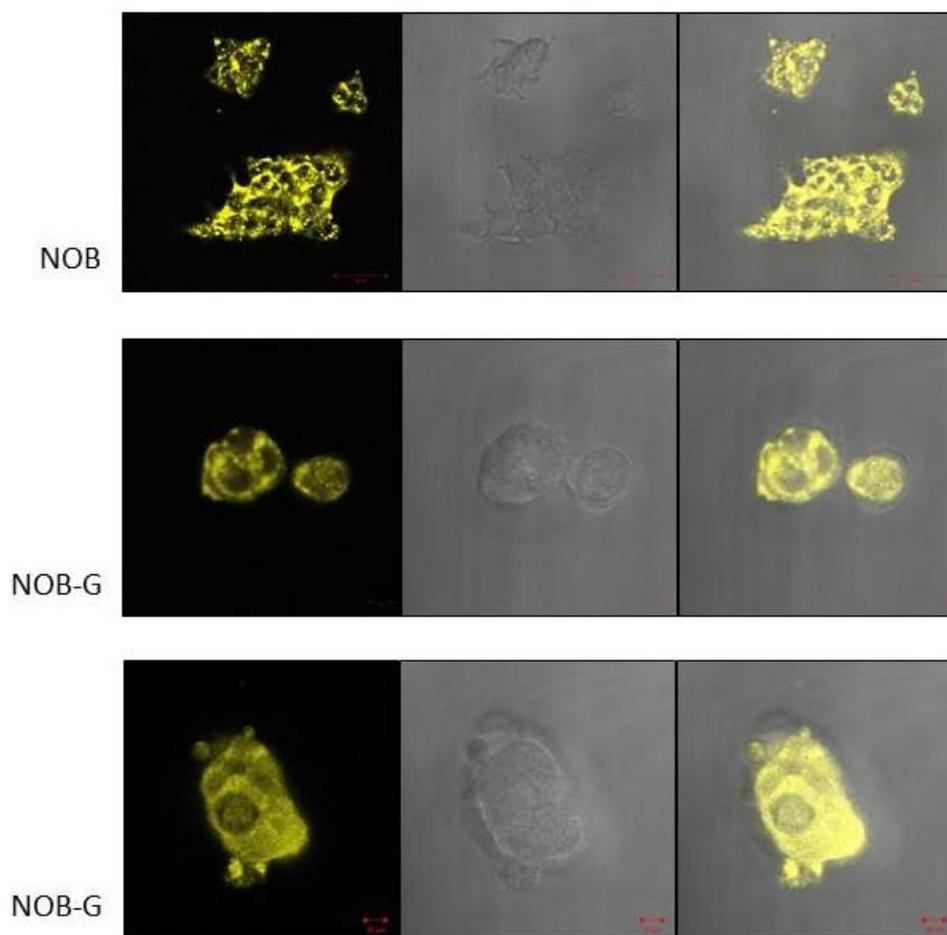


Figura 25. Imagens em microscopia confocal das células Huh7.5 após 24h de incubação com NOB, NOB-G1, NOB-OH. Escalas em 10 ou 50 μm .

As imagens são observadas em três campos: escuro, para fluorescência; claro, para microscopia óptica; e por último uma sobreposição das imagens em campo claro e escuro. E as cores utilizadas para cada grupo são apenas representativas, uma vez que todas as PMF e o grupo controle absorvem e emitem fluorescência em região muito próxima (λ). Conforme observado nos testes iniciais, as células Huh7.5 também apresentam autofluorescência com região de absorção e emissão bem próximos aos das PMFs (~ 380 e $\sim 420/550$ nm). Por isso, a FIU do espectro de fluorescência (Figuras

28 e 29) foi utilizada como critério qualitativo para confirmar a entrada dos compostos nas células. A ordem de FIU observada, partindo-se da maior para a menor intensidade, foi: HMF > HMF-OH > NOB-OH > TAN = TAN-G2 > NOB = TAN-OH2 > TAN-G1 = TAN=OH1 = Controle > NOB-G.

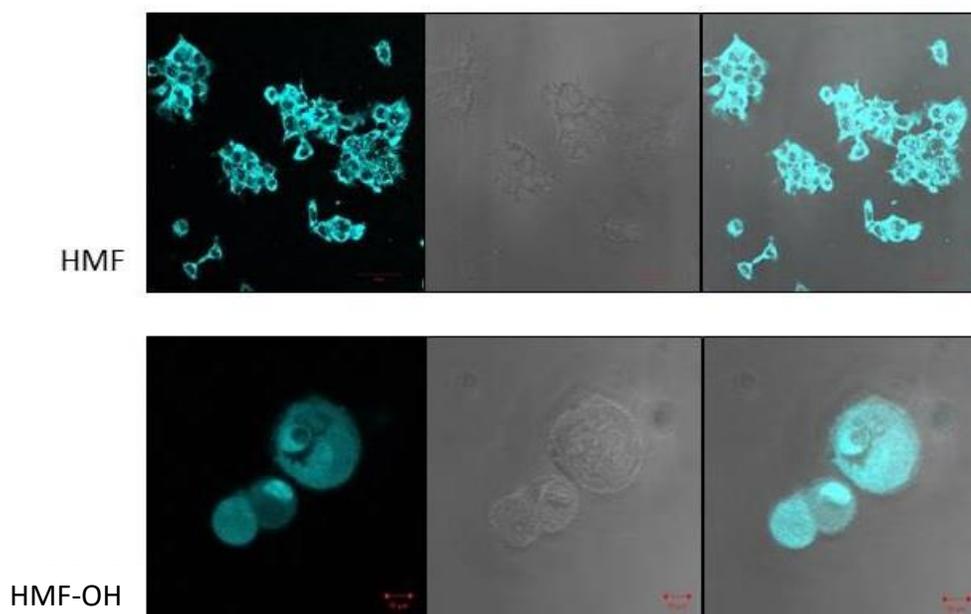


Figura 26. Imagens em microscopia confocal das células Huh7.5 após 24h de incubação com HMF, HMF-OH. Escalas em 10 ou 50 μm .

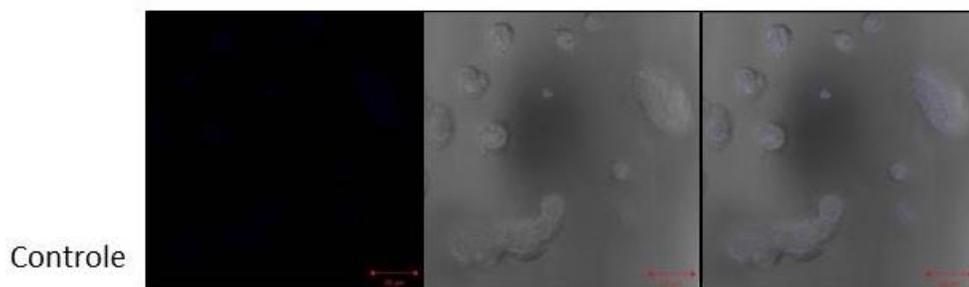


Figura 27. Imagens em microscopia confocal das células Huh7.5 após 24h de incubação com meio de cultura DMEM-C. Escalas em 10 μm .

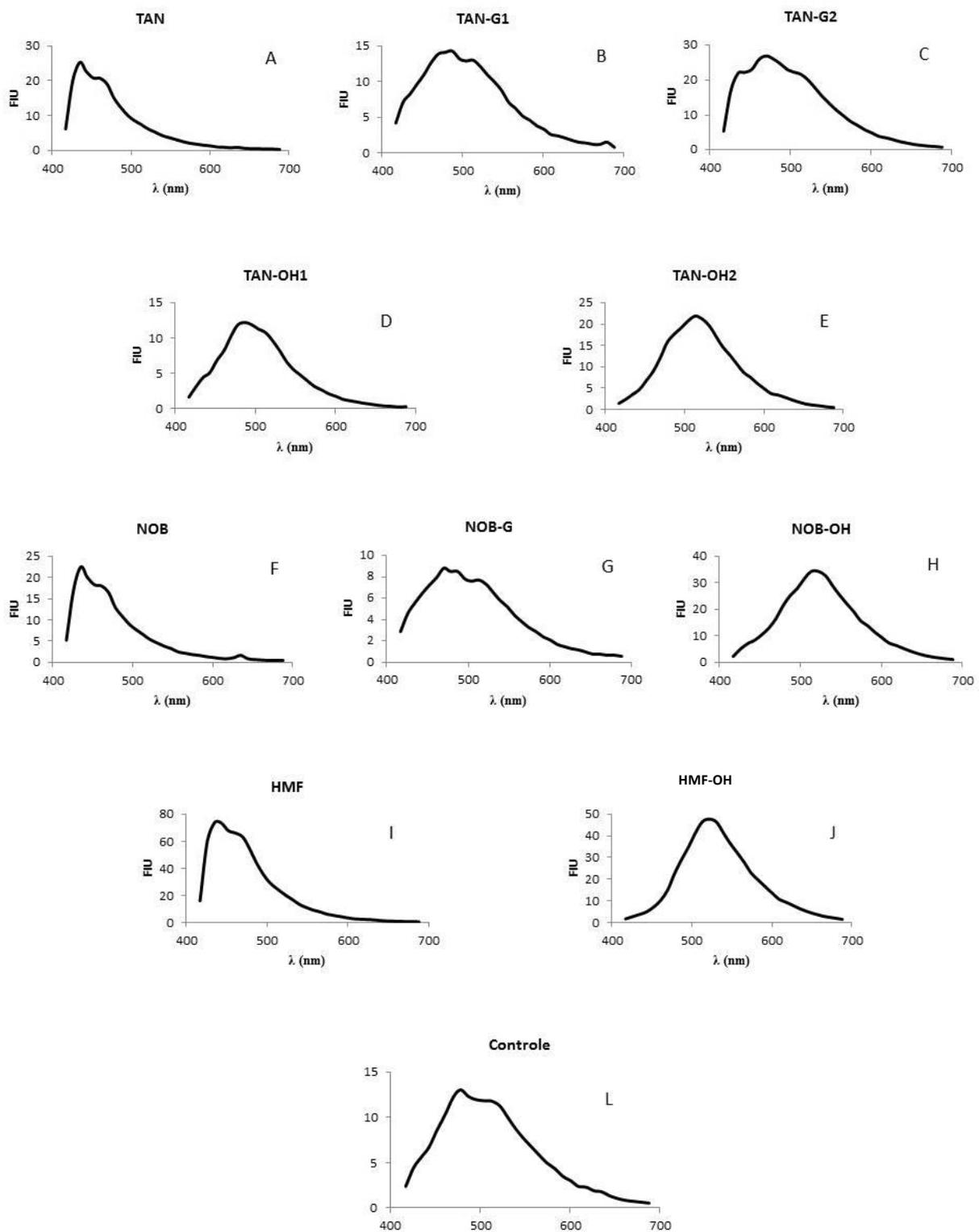


Figura 28. Espetros de fluorescência das PMF e dos metabólitos incorporados pelas células Huh7.5 após 24h de tratamento.

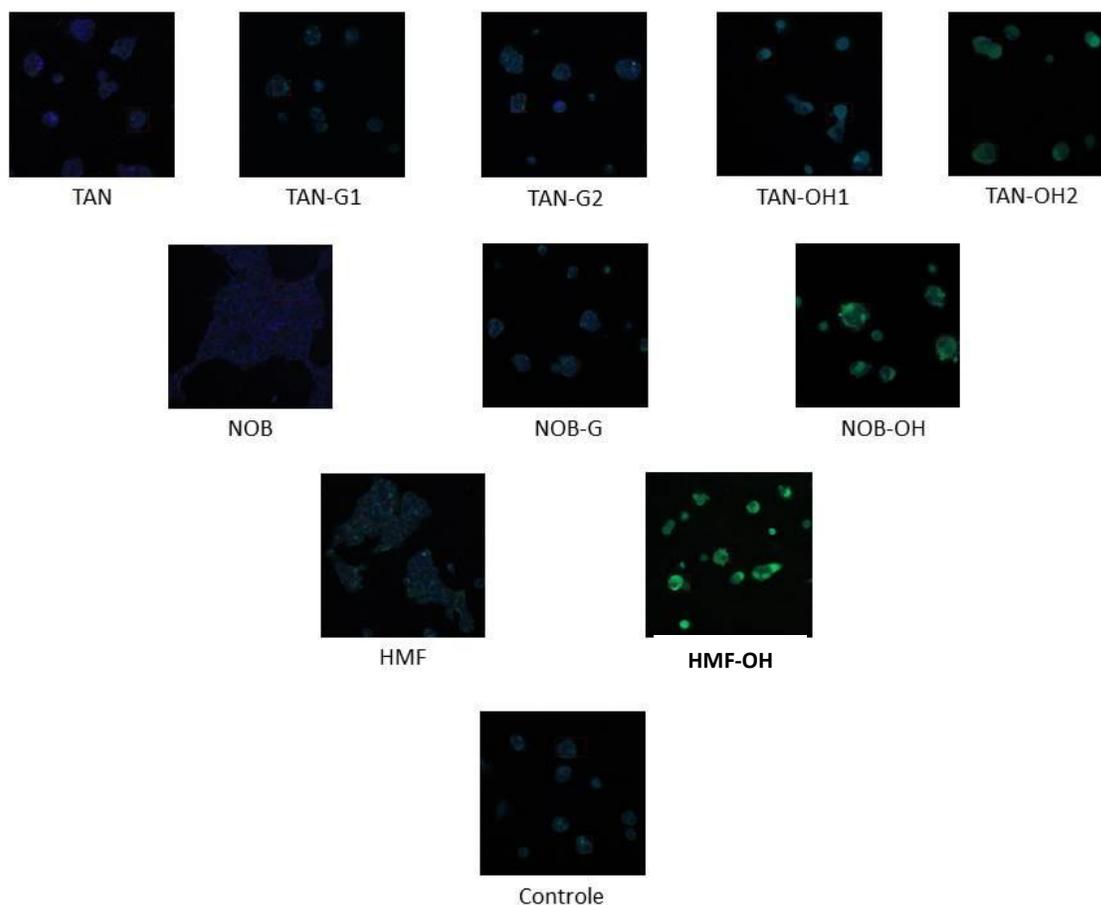


Figura 29. Imagens em microscopia confocal dos espectros de fluorescência das PMF e dos metabólitos incorporados pelas células Huh7.5 após 24h de tratamento.

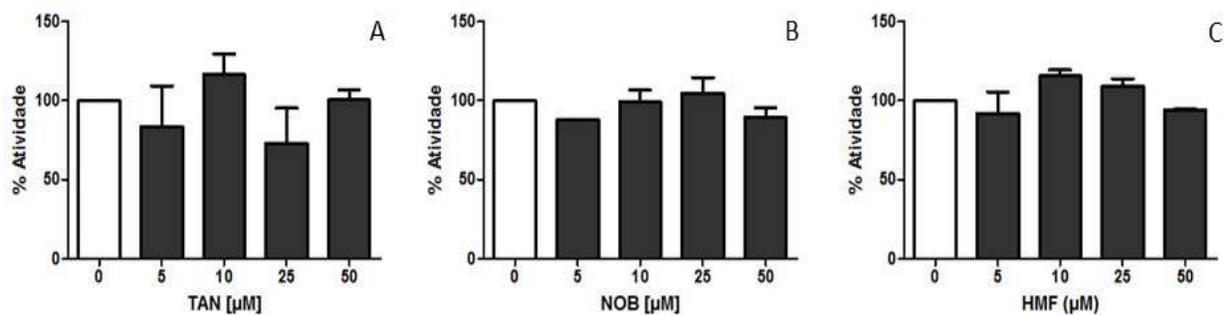


Figura 30. Atividade da MTP após 24 de tratamento das células Huh7.5 com as PMF purificadas nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 μM. A) TAN; B) NOB; C) HMF. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P > 0.05$) entre as concentrações testadas.

Em seguida, a influência das PMF e dos metabólitos isolados foi avaliada sobre a síntese hepática de lipoproteínas, por meio da atividade da MTP. As PMF foram avaliadas para as concentrações de 5 a 50 μM (Figura 30 A, B e C), enquanto os metabólitos foram testados para as concentrações de 5 a 25 μM (Figura 31 A – G). De acordo com os resultados observados, os metabólitos TAN-OH1 e NOB-OH reduziram a atividade da MTP, nas concentrações de 5 μM e 25 μM , respectivamente.

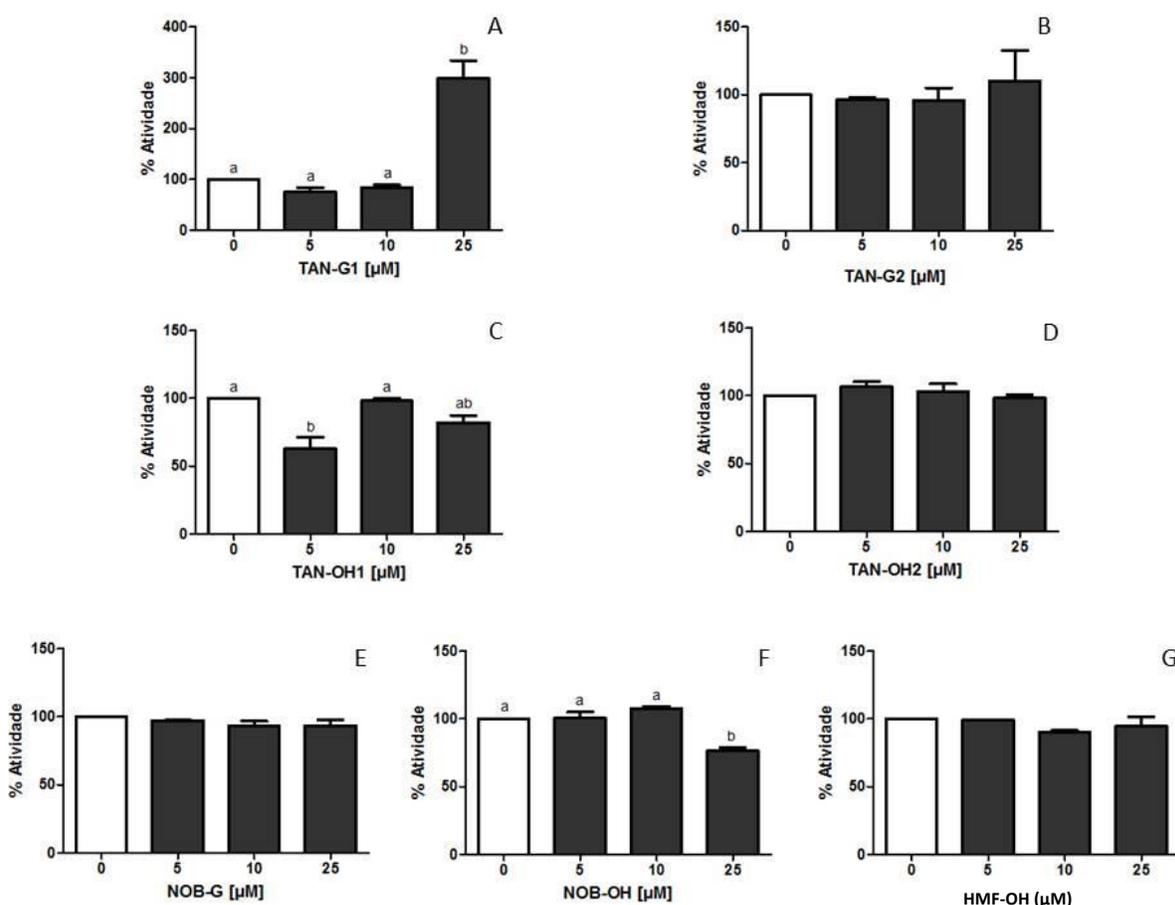


Figura 31. Atividade da MTP após 24 de tratamento das células Huh7.5 com as PMF purificadas nas concentrações de 5, 10 e 25 μM . A) TAN-G1; B) TAN-G2; C) TAN-OH1; D) TAN-OH2; E) NOB-G; F) NOB-OH; G) HMF-OH. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P > 0.05$) entre as concentrações testadas.

Por outro lado, o metabólito TAN-G1 na concentração de 25 μM estimulou significativamente a atividade da enzima. Quando avaliada a ação dos metabólitos comparada à ação das PMFs das quais eles originaram, nas mesmas concentrações (Figura 32 A – I), apenas o HMF-OH mostrou-se capaz de reduzir a atividade da MTP em relação à HMF.

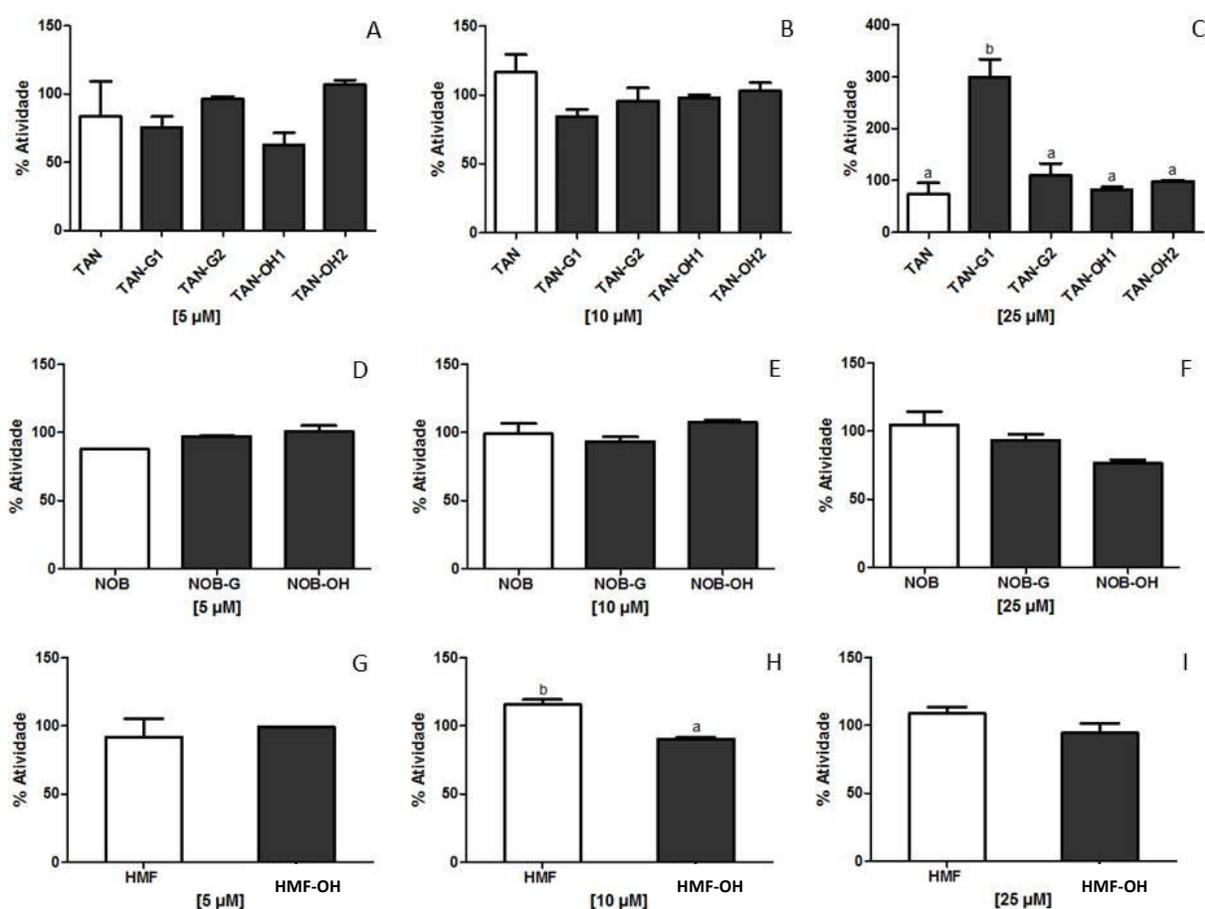


Figura 32. Atividade da MTP após 24 de tratamento das células Huh7.5 com os metabólitos *versus* as PMF dos quais eles originaram. A) TAN, TAN-G1, TAN-G2, TAN-OH1, TAN-OH a 5 μM ; B) TAN, TAN-G1, TAN-G2, TAN-OH1, TAN-OH a 10 μM ; C) TAN, TAN-G1, TAN-G2, TAN-OH1, TAN-OH a 25 μM ; D) NOB, NOB-G, NOB-OH a 5 μM ; E) NOB, NOB-G, NOB-OH a 10 μM ; F) NOB, NOB-G, NOB-OH a 25 μM ; G) HMF, HMF-OH 5 μM ; H) HMF, HMF-OH 10 μM ; I) HMF, HMF-OH 25 μM . Letras diferentes indicam diferença significativa ($P > 0.05$) entre os grupos avaliados.

DISCUSSÃO

A administração das PMF purificadas em ratos Wistar durante um período de 15 dias permitiu a identificação de um grande número de metabólitos, conjugados ao ácido glucurônico ou hidroxilados. A partir das técnicas utilizadas neste estudo, foi possível isolar alguns destes metabólitos e avaliar sua atividade sobre a enzima MTP, em cultura celular de hepatoma humano Huh7.5.

Apesar de alguns estudos apontarem que o consumo simultâneo de flavonoides e proteínas pode reduzir a atividade antioxidante (ARTS et al, 2002), a utilização do iogurte como veículo de administração das PMF não interferiu na metabolização e obtenção dos metabólitos. Estudos prévios já comprovaram que a ingestão concomitante de fontes proteicas e flavonoides não altera biodisponibilidade destes compostos (HOF et al, 1998; HOLLMAN et al, 2001; MULLEN et al, 2008). Além disso, a absorção das PMFs pelo trato-gastrointestinal é bastante eficiente, em consequência do grande número de grupos metoxil ligados à molécula (WALLE, 2007; LI et al, 2006a). A absorção dos flavonoides depende de suas propriedades físico-químicas tais como solubilidade, tamanho e configuração da molécula (HOLLMAN et al, 2004). As análises de HPLC-ESI-MS mostraram que foi possível isolar duas vezes mais metabólitos hidroxilados em relação aos glucuronados, confirmando que a metabolização das PMFs tem maior tendência para oxidação/redução, do que para reações de conjugação (TRIPOLI et al, 2007).

Estudos anteriores já identificaram metabólitos de PMF em amostras biológicas de roedores. Em nosso trabalho, a partir das amostras de urina, foi possível isolar e

identificar dois metabólitos com massa molecular m/z 359 $[M+H]^+$ originados da TAN (TAN-OH1 e TAN-OH2). De acordo com Nielsen e col. (2000), a TAN-OH1 corresponde ao metabólito 4'-hidroxi-5,6,7,8-tetrametoxiflavona descrito por estes autores, os quais encontraram que este metabólito, assim como em nosso estudo, se apresentava em maior abundância na urina dos animais. Também baseado na abundância de composto encontrado na urina, o metabólito com massa molecular m/z 389 $[M+H]^+$ originado da NOB (NOB-OH), corresponde à 4'-hidroxi-3',5,6,7,8-pentametoxiflavona descrita por Yasuda e col. (2003). Já a TAN-OH2, presente em menor quantidade, poderia corresponder à 5-hidroxi-4',6,7,8-tetrametoxiflavona (ZHENG et al, 2015) ou à 6-hidroxi-4',5,7,8-tetrametoxiflavona (NIELSEN et al, 2000). O HMF-OH corresponde à perda de dois grupos metoxil da heptametoxiflavona m/z 405 (HMF-OH). Os metabólitos conjugados ao ácido glucurônico identificados em nosso estudo, como m/z 535 $[M - 176 + H]^+$ (TAN-G1), m/z 521 $[M - 176 + H]^+$ (TAN-G2), m/z 565 $[M - 176 + H]^+$ (NOB-G), originados da TAN e NOB, ainda não foram completamente descritos na literatura, mas estudos apontam sua presença na urina ou plasma de animais tratados com PMF (MANTHEY e BENDELE, 2008; MANTHEY et al, 2011).

Os demais metabólitos isolados em nosso estudo (Tabelas 3 e 4) apresentam massa molecular e espectros de UV correspondente a outros já descritos na literatura, mas como eles foram isolados em quantidade muito pequena, demandam o uso de técnicas mais aprofundadas para caracterização da estrutura química. Outros trabalhos também relatam a dificuldade em se caracterizar alguns metabólitos, devido à quantidade insuficiente obtidas nas amostras (LI et al, 2006b; YASUDA et al, 2003). A partir da massa molecular destes compostos, sugerimos que o metabólito G.1a (m/z

565) seria proveniente da NOB após a perda de um grupo metil, seguido de conjugação ao ácido glucurônico, mas em posição diferente da ocorrida para o NOB-G; a pesar de estes dois metabólitos possuírem a mesma massa molecular, sabemos que se trata de dois compostos diferentes, devido ao TR que cada um apresenta 16.54 (G.Ia) e 19.40 (NOB-G). Já o metabólito G.IIa (m/z 551) seria proveniente da perda de dois grupos metil, seguido de conjugação ao ácido glucurônico; enquanto os metabólitos A.Ia-c (m/z 389) e A.IIa-e (m/z 375) seriam provenientes da NOB após a perda de um ou dois grupos metil, respectivamente, em diferentes posições da cadeia carbônica, com conseqüente hidroxilação do oxigênio remanescente deixando as hidroxilas livres (LI et al, 2014).

Os metabólitos G.Va,b (m/z 505) e A.IVa,b (m/z 329) seriam provenientes da TMS presente no extrato de NOB administrado aos animais. Esta é uma tetrametoxiflavona que apresenta peso molecular igual a 342 g.mol^{-1} (Figura 3), encontrada na casca e no suco de laranjas doces (SILVEIRA et al, 2014), cujo metabólitos não são descritos na literatura. As duas 505 *amu* seriam provenientes da perda de um grupo metil seguido da conjugação com um ácido glucurônico, com duas vias de metabolização possíveis (TR = 16.11 e 16.35 min); e as duas 329 *amu* seriam provenientes da TMS após a perda de um grupo metil e conseqüente hidroxilação, também em duas posições diferentes da cadeia de carbonos (TR = 23.24 e 24.44 min).

Já os metabólitos A.VIa (419 *amu*) e A.VIIa (405 *amu*) seriam provenientes da HMF derivados da perda de um ou dois grupos metil, respectivamente, com conseqüente hidroxilação do O⁻ em todos os casos. Os metabólitos da HMF também são raramente estudados (MANTHEY e BENDELE, 2008), porém, visto que esta é a

única PMF conhecida cuja perda de grupos metil seja capaz de gerar íons as massas moleculares aqui observadas (LI et al, 2006a).

A suposição dos metabólitos G.IIIa,b (m/z 535), G.IVa (m/z 521) e A.IIIa-c (m/z 359) isolados neste estudo permanece em aberto, pois, avaliando-se apenas a massa molecular e o espectro de UV, eles podem ser oriundos da TAN ou SIN, ambas com peso molecular de $372 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (LI et al, 2006a). Uma vez que estes metabólitos foram isolados a partir da urina dos ratos administrados com o extrato de NOB, e esta continha traços de outras PMFs em sua composição. De qualquer modo, podemos observar que os metabólitos com massa molecular 535 *amu* derivam da perda de um grupo metil seguido da conjugação com um ácido glucurônico, em duas possíveis vias de metabolização (G.IIIa e G.IIIb). Já o metabólito com massa molecular 521 *amu* (G.IVa) deriva da perda de dois grupos metil e conjugação a um ácido glucurônico. Aqui, sabemos que este metabólito representa um composto diferente do TAN-G2, devido ao tempo de retenção que cada um deles apresenta: 15.85 para o primeiro, e 16.70 para o segundo, além das diferenças nos cromatogramas de UV. Os metabólitos A.IIIa-c com massa molecular de 359 *amu* correspondem à perda de um grupo metil seguido de hidroxilação, sendo que este processo pode ocorrer em diferentes posições da cadeia carbônica destas PMF.

Por fim, o metabólito A.Va, com massa molecular 315 *amu* também pode ser proveniente da TMS, após perda de dois grupos metil e hidroxilação do O[•]. Porém, este metabólito também pode ser proveniente da metabolização de alguns compostos derivados de isoflavona presente na ração comercial consumida pelos animais do estudo (BROWN e SETCHELL, 2001), pois, durante as análises em HPLC-MS-ESI das

frações de eluição e extração das amostras de urina, foram observadas massas moleculares correspondentes a estes compostos (dados não foram apresentados). Esta suposição foi levantada apenas pela observação do tempo de retenção apresentada por este metabólito (TR = 18.54 min), o qual é precoce comparado aos demais metabólitos hidroxilados das PMFs. No entanto, estes dados só poderão ser confirmados a partir de técnicas mais aprofundadas para caracterização da estrutura química deste metabólito.

Outra técnica que pode ser utilizada para identificação de compostos fenólicos é o espectro de fluorescência emitida por eles. A estrutura molecular dos flavonoides, e neste caso das PMF, produz, naturalmente, autofluorescência (MONAGO-MARANA et al, 2016), e esta característica é mantida mesmo após a metabolização destes compostos, pois, em nosso estudo, observamos que os metabólitos também emitiram fluorescência entre as regiões 360 e 500 nm. Baseado nestas observações, foi investigada a entrada das PMF e dos metabólitos no interior de células hepáticas Huh7.5, a qual foi confirmada pela diferença de FIU em relação ao controle, utilizando-se a microscopia confocal de fluorescência. São poucos os trabalhos que tenham explorado a presença das PMFs ou seus metabólitos no interior de células ou tecidos, sendo comumente utilizadas, apenas técnicas de HPLC-MS para a realização deste tipo de investigação (AL RAHIM et al, 2009; SAIGUSA et al, 2011).

A partir das imagens em microscopia confocal de fluorescência, pudemos observar que as PMF (TAN, NOB e HMF) e os metabólitos TAN-G2, TAN-OH2, NOB-OH e HMF-OH foram incorporados pelas células Huh7.5, conforme indicado pela diferença na FIU em relação ao controle negativo, porém, alguns metabólitos não

apresentaram esta diferença (TAN-G1, TAN-OH1 e NOB-G). Este fato pode ser devido à posição da hidroxilação/conjugação que eles sofreram durante a metabolização, aliados ao meio em que as imagens obtidas (PBS) (JURD, 1962; PARK et al, 2013). Portanto, a ausência de fluorescência não significa que o composto não tenha sido incorporado pelas células. É importante ressaltar que após a ingestão, a absorção dos polifenóis em geral ocorre por difusão passiva nas células intestinais (SILBERBERG et al, 2006), porém, ainda não está bem elucidado a via de absorção destes fenólicos nos tecidos periféricos; alguns estudos apontam que eles possam ser transportados pela albumina, a qual facilitaria sua entrada nas células (KANAKIS et al, 2006; XIE et al, 2005).

Uma vez confirmada a incorporação das PMF e dos metabólitos pelas células Huh7.5, avaliamos a ação destes sobre a atividade da MTP. A MTP é responsável pela transferência de lipídeos do lúmen do RE intestinal e hepático para a apoB, processo determinante para a montagem e secreção hepática das partículas de VLDL, onde, o uso de inibidores da MTP reduz a transferência de TG nas células hepáticas, reduzindo assim os níveis plasmáticos de lipoproteínas contendo apoB (XIAO et al, 2011; CHANDLER et al, 2003). Vários estudos mostram que os flavonoides cítricos atuam como agentes hipolipidêmicos, e possuem a capacidade de reduzir a atividade e expressão de RNAm da MTP (ASSINI et al, 2013a; BORRADAILE et al, 1999; WILCOX et al, 2001). Alguns autores sugerem que esta capacidade dos flavonoides em reduzir a atividade da MTP poderia ser explicada pela semelhança da estrutura molecular destes compostos, com medicamentos usados controle do TG plasmático, como o 4-bromo-metaqualona, CP-10447 (LIN et al, 2011).

Entre os grupos experimentais e as doses avaliadas, apenas os metabólitos TAN-OH1 (5 μ M) e NOB-OH (25 μ M) foram capazes de reduzir a atividade da MTP (37,4% e 23,5%, respectivamente). Estudos prévios mostraram que hamsters alimentados com dieta contendo 1% de PMF (TAN + NOB) apresentaram redução nos níveis séricos de VLDL e LDL, sem alterações na HDL, sendo estes efeitos atribuídos aos metabólitos das PMFs encontrados nas amostras de sangue, urina e fígado dos animais, e identificados por HPLC-MS (KUROWSKA e MANTHEY, 2004). Do mesmo modo, Lin e col. (2011), encontraram que além das PMF, TAN e NOB, seus metabólitos, 4'-hidroxi-5,6,7,8-tetrametoxiflavona e 4'-hidroxi-3',5,6,7,8-pentametoxiflavona, respectivamente, foram capazes de inibir a secreção de apoB em hepatoma humano HepG2, possivelmente, pela inibição da atividade da MTP, mostrando, portanto, que a atividade biológica dos metabólitos de PMF é mantida, mesmo após a metabolização. Resultados semelhantes foram observados por Nahmias e col. (2008), onde também houve redução (-58%) na atividade da MTP em células Huh7.5.1 (outra derivação da Huh7.), tratadas com 200 μ M de naringenina. Apesar de não haverem dados explorando os efeitos dos metabólitos das PMF em células Huh7, estudos apontam que esta linhagem não apresenta comportamento diferente do observado para as células HepG2, no que diz respeito ao metabolismo de lipídeos (HIGASHI et al, 2002; MEEEX et al, 2011).

Quando avaliamos o efeito dos metabólitos comparado à sua PMF de origem, apenas o HMF-OH na dose de 10 μ M reduziu a MTP (-21,8%). De acordo com pesquisas recentes, a posição e o tipo de substituição dos radicais ligados à molécula dos flavonoides durante a metabolização pode interferir na atividade biológica que o

novo composto irá exercer (KAWAI et al, 2008; LIN et al, 2011; LOLITO et al, 2011; CHANET et al, 2013). Lo e col. (2010) encontraram a NOB não apresentou atividade antioxidante contra a oxidação da LDL, enquanto seu metabólito 4',3'-dihidroxi-,5,6,7,8-tetrametoxiflavona foi altamente antioxidante, além de desacelerar a diferenciação de monócito/macrófago. Zheng e col. (2013) observaram que os metabólitos da PMF 5-desmetilnobiletina apresentaram maior efeito inibitório em células humana de câncer de cólon quando comparados com o composto de origem. Do mesmo modo, Cheng e col. (2011) também encontraram que a 4'-hidroxi-5,6,7,8-tetrametoxiflavona possui efeito antitumoral superior quando comparado à TAN, sugerindo ainda que este resultado seria uma consequência da possível metabolização da PMF pelas células utilizadas no estudo.

Esta capacidade de metabolização celular em modelos *in vitro* já foi apontada em macrófagos RAW264 tratados com quercetin-3-glucuronide, onde após 24h de incubação, foi encontrada grande abundância de agliconas de quercetina (KAWAI et al, 2008). Em nosso trabalho não foi investigada a capacidade de metabolização das PMF ou dos metabólitos pelas células Huh7.5, porém, estudos exploratórios em microscopia confocal de fluorescência mostraram que a incubação de curto prazo (< 2h) com a 5-desmetilnobiletina não apresentou emissão de fluorescência, sendo esta uma característica de flavonoides que possuem –OH na posição C5. No entanto, pôde-se observar uma emissão de fluorescência após 24h de tratamento com esta PMF (dados não apresentados).

Contrariamente ao que vem sendo demonstrado na literatura, no presente trabalho, encontramos que o metabólito da TAN, a TAN-G1, na concentração de 25

μM , aumentou significativamente a atividade da enzima MTP, mecanismo este que necessita de maior investigação. Outros trabalhos apontam a influência dos flavonoides cítricos sobre o metabolismo de lipídeos em células Huh7 em diferentes vias de ação (GOLDWASSER et al, 2010), as quais poderiam explicar o resultado aqui encontrado para a TAN-G1.

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^{-/-}* 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- α -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 α , PPAR γ and LXR α . **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- α 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^o. 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.

ANEXA – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 42/2015

Interessada: MARILIA CAROLINE MARTINI RODRIGUES

Orientadora: Profa. Dra. Thais Borges César

Projeto: Biodisponibilidade e capacidade antioxidante da suplementação crônica da nobelitina, tangeritina e heptametoxiflavona em ratos

Parecer nº 68/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP (campus Araraquara), reunida em 12 de agosto de 2015, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Biodisponibilidade e capacidade antioxidante da suplementação crônica da nobelitina, tangeritina e heptametoxiflavona em ratos”, apresentado pela pós-graduanda MARILIA CAROLINE MARTINI RODRIGUES, sob orientação da Professora Doutora Thais Borges César, do Departamento de Alimentos e Nutrição desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JANEIRO de 2016 em formulário para este fim.

Araraquara, 17 de agosto de 2015.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA