

Capítulo 10

ESTUDO DOS EFEITOS DO R-(+)-LIMONENO SOBRE MODELO DE ESTRESSE OXIDATIVO E REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIA AORTA DE RATOS DIABÉTICOS

JOSÉ VINICIUS DE SOUSA FRANÇA¹
LEONARDO DA ROCHA SOUSA¹
NILDOMAR RIBEIRO VIANA¹
JOSÉ OTÁVIO CARVALHO SENA DE ALMEIDA¹
EMERSON IURI RODRIGUES QUEIROZ¹
JOSÉ MOREIRA TAVARES NETO¹
RENATO SAMPAIO MELLO NETO¹
ANDRESSA AMORIM DOS SANTOS¹
ANA VICTÓRIA DA SILVA MENDES¹
JOSIENE FÉLIX DE MOURA MACEDO¹
ANA KAROLINNE DA SILVA BRITO¹
ESMERALDA MARIA LUSTOSA BARROS¹
MARIA DO CARMO DE CARVALHO E MARTINS¹
DANIEL DIAS RUFINO ARCANJO¹

1. LAFMOL – Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia, Departamento de Biofísica e Fisiologia, Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Palavras-chave

R-(+)-Limoneno; Diabetes; Estresse oxidativo.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico que afeta atualmente mais de 536,6 milhões de pessoas no mundo, com previsão de chegar a 783,2 milhões em 2045 (IDF, 2021). O DM está entre as principais doenças crônicas no Brasil, representando elevado número de mortes prematuras. O DM pode ser definido por uma síndrome de etiologia múltipla de distúrbios metabólicos caracterizados por hiperglicemia sustentada. Estas alterações glicêmicas são consequências de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambos. Em geral, este agravo pode ser classificado em dois: tipo 1 e tipo 2 (QUEIROZ *et al.*, 2011).

Acredita-se que a hiperglicemia crônica no DM esteja envolvida na gênese de diversos eventos bioquímicos, os quais resultam em um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante em neutralizá-las, resultando em um estado de estresse oxidativo (MAIESE, 2015). Em condições patológicas, pode ocorrer um aumento da produção de EROs associado ou não à redução das defesas antioxidantes das células. De fato, a relação entre o aumento na produção de espécies reativas e muitas alterações patológicas já está bem estabelecida, sendo que o estresse oxidativo pode estar implicado na gênese de mais de 200 doenças humanas, entre elas, o DM e as doenças cardiovasculares (NOWOTNY *et al.*, 2015). Nesse contexto, estudos clínicos em humanos e com modelos animais têm demonstrado que a injúria que determina a morte celular no DM é resultado do aumento da liberação de EROs (MAIESE, 2015). Uma vez formadas, as EROs causam a depleção dos sistemas de defesa antioxidante, tornando os

tecidos mais susceptíveis ao dano oxidativo (NIEDOWICZ & DALEKE, 2005).

O limoneno é uma substância de origem natural, pertencente à classe química dos monoterpenos, que está presente em abundância na casca de frutos cítricos, podendo ser obtido por um custo relativamente baixo (VIGUSHIN *et al.*, 1998). É o monoterpeno mais comum, perfazendo até 95% do óleo da casca de frutas cítricas. Trata-se de uma molécula quiral com dois enantiômeros possíveis: o D-limoneno (dextrógiro, forma quiral R) e o L-limoneno (levógiro, forma quiral S). O isômero mais comum tem a configuração (R), que corresponde ao D-(+)-limoneno (CAS 5989-27-5). Sua nomenclatura química completa (*Chemical Abstract*) é (R)-1-metil-4-(1-metiletenil)-ciclo-hexeno e pela International Union of Pure and Applied Chemistry é (R)-(+)-para-menta-1,8-dieno (BATHAIE & TAMANOI, 2014). Além de ação benéfica na asma brônquica e de sua atividade gastroprotetora, o limoneno também possui atividade antinociceptiva devido, provavelmente, à inibição da síntese ou da ação de mediadores inflamatórios, atividade anti-hiperglicêmica em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (MURALI & SARAVANAN, 2012), além de efeito vasorrelaxante sobre aorta isolada de ratos (AMARAL *et al.*, 2007).

Isto posto, o trabalho teve como objetivo investigar os efeitos do monoterpeno R-(+)-limoneno em modelo de estudo relacionados ao sistema cardiovascular e à diabetes através da investigação do perfil de estresse oxidativo e dos sistemas antioxidantes em homogenatos de aorta torácica, além da avaliação das curvas de reatividade vascular da artéria aórtica torácica de cada grupo experimental.

MÉTODO

Drogas utilizadas

O R-(+)-Limoneno foi adquirido do fornecedor Sigma-Aldrich Chemicals (St Louis, Missouri, EUA). Além disso, durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas: cloridrato de L-(-)-fenilefrina, cloridrato de acetilcolina (obtida da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), pirogalol, estreptozotocina e indometacina (obtidas da Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). A metformina e a glibenclamida foram adquiridas na Farmácia de Manipulação Botica, Teresina-PI, Brasil, enquanto a insulina NPH utilizada foi obtida da Aspen Pharma, Serra-ES, Brasil.

Animais utilizados no protocolo

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí, com idade média de 6 meses, pesando entre 180 e 250 g. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em temperatura controlada (23 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água, sendo que após a indução do diabetes o consumo de ração e água foi controlado e registrado diariamente. Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFPI (CEUA/UFPI nº 457/18).

Indução de diabetes mellitus tipo 1

Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas e posteriormente submetidos a indução de diabetes mellitus por meio da aplicação intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (45 mg/kg) em tampão citrato pH 4,5 (CHEN *et al.*, 2012). Os animais do grupo controle normal receberam apenas tampão citrato pH 4,5, via

intraperitoneal. Durante as primeiras 24 horas que sucederam a indução, foi fornecida solução de glicose a 10% aos animais, para evitar hipoglicemia. Após um período de 72 horas da injeção de STZ, os animais foram deixados em jejum por 12 horas e, em seguida, tiveram sua glicemia aferida. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram valores de glicemia iguais ou superiores a 250 mg/dL ou 15 mM (BASHA; SANKARANARAYANAN, 2015).

Divisão dos grupos testes

Os animais foram divididos em 8 grupos com 14 animais cada, como descrito a seguir:

CN: Controle Normal (sem indução de diabetes), tratados com veículo (tween 80 1% em água destilada), VO, por 4 semanas;

CD: Controle Diabético (animais diabéticos induzidos por estreptozotocina), tratados com veículo, VO, por 4 semanas;

LM12,5: Animais diabéticos tratados com R-(+)-Limoneno 12,5 mg/kg, VO, por 4 semanas;

LM25: Animais diabéticos tratados com R-(+)-Limoneno 25 mg/kg, VO, por 4 semanas;

LM50: Animais diabéticos tratados com R-(+)-Limoneno 50 mg/kg, VO, por 4 semanas;

INS: Animais diabéticos tratados com insulina humana NPH 100UI/mL, na dose de 6 UI, SC, pela manhã por 4 semanas (FARBOOD *et al.*, 2019; MORAIS *et al.*, 2014);

MET: Animais diabéticos tratados com metformina 150 mg/kg, VO, por 4 semanas;

GLIB: Animais diabéticos tratados com glibenclamida 600 µg/kg, VO, por 4 semanas.

Todos os animais receberam apenas uma dose diária do tratamento. À exceção do grupo INS, que recebeu insulina por via subcutânea, todos os demais grupos foram tratados por via oral (VO). O tratamento de todos os animais

durou 28 dias. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico tiopental sódico na dose de 150 mg/kg, administrado via IP, precedido por lido-caína na dose de 10 mg/kg, IP. Imediatamente após a eutanásia, foi realizada coleta de sangue e demais materiais biológicos para análises posteriores.

Obtenção de arco aórtico para análise de estresse oxidativo

Imediatamente após a eutanásia dos animais, o arco aórtico foi retirado. As amostras desse tecido foram pesadas para análise de biomarcadores do estresse oxidativo e conservadas a -40 °C até a realização das análises. Para obtenção do homogenato de tecido, o arco aórtico foi macerado (1:20 p/v) em tampão fosfato com pH conforme análise a ser realizada.

Determinação da atividade da mieloperoxidase tecidual (MPO)

A medida de atividade da MPO foi realizada pelo método da velocidade de oxidação do substrato O-dianisidina na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e evidenciada pela mudança de absorvância medida a 450 nm (BRADLEY *et al.*, 1982). A atividade da MPO foi calculada a partir da velocidade máxima da reação, e o resultado expresso em U_{MPO}/μL de amostra. Uma unidade de MPO é definida como a quantidade de H₂O₂ (μmol) degradada por minuto.

Determinação de nitrito tecidual (NO₂⁻)

A determinação da concentração de nitrito foi feita pelo método de Griess, conforme descrito por Green *et al.* (1982). Antes da análise, as amostras de tecido (300 μL do sobrenadante da mistura de arco aórtico macerado

com tampão fosfato na proporção de 50 mg/1 mL) foram desproteinizadas pela adição de solução de sulfato de zinco 0,15 M e hidróxido de sódio 10 M, de acordo com o método de Romitelli *et al.* (2007) e Moshage *et al.* (1995). A concentração de nitrito foi determinada através de uma curva de calibração (560 nm) para o nitrito de sódio (NaNO₂) em diluições seriadas (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56 μM).

Determinação da atividade da superóxido dismutase tecidual (SODt)

A medida da atividade da SOD tecidual (arco aórtico) foi baseada na habilidade de consumir o radical O₂⁻ diminuindo a razão de autooxidação do pirogalol (1,2,3-trihidroxibenzeno). Após reação com brometo de dimetiliazol-difeniltetrazol (MTT), o cálculo do resultado foi considerado que uma unidade de SOD (U_{SOD}) é capaz de evitar a autooxidação de 50% de pirogalol do padrão. O resultado foi expresso em unidades de atividade da SOD por mg de tecido (FURTADO *et al.*, 2022).

Determinação da atividade da catalase tecidual (CATt)

A atividade da catalase tecidual foi determinada segundo o método descrito por Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela enzima por meio do decréscimo da densidade óptica a 230 nm a 37 °C. A CAT propicia a oxidação do peróxido de hidrogênio a H₂O e O₂. Os resultados foram expressos em U/g de tecido. Uma unidade (U) da catalase correspondeu à atividade da enzima que permitiu a hidrólise de 1 μmol de H₂O₂ por minuto a 37 °C em pH 8,0.

Avaliação dos efeitos vasculares do R-(+)-Limoneno em estudos *ex vivo*

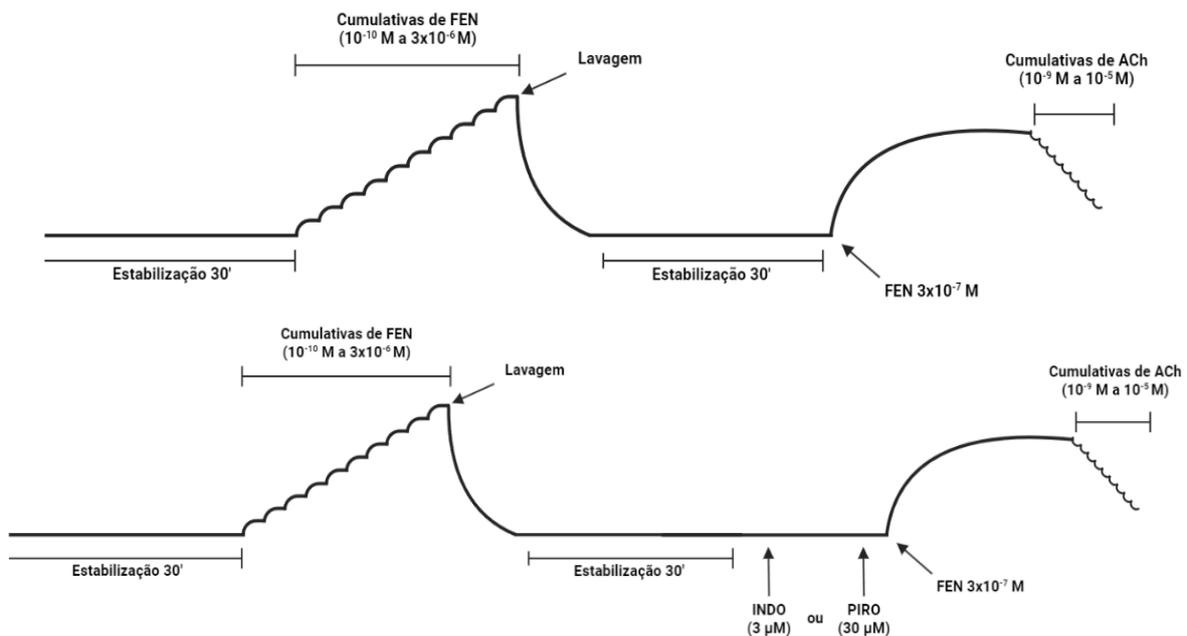
Após eutanásia, fez-se uma incisão na região ântero-inferior do animal a fim de permitir a abertura da caixa torácica e a posterior dissecação da artéria aorta. Após a dissecação da mesma, procedeu-se a remoção do tecido perivascular, gordura e tecido conjuntivo, e então ao corte transversal desta para a formação dos segmentos da aorta de 2,0 a 3,0 mm, que então foram montados em banho de órgãos sob solução de Krebs (mM): NaCl (118.0); KCl (4.6); CaCl₂.2H₂O (2.5); MgSO₄.7H₂O (5.7); NaHCO₃ (25.0); KH₂PO₄.H₂O (1.1); e D-glicose (11.0) a 37 °C, continuamente aerados com mistura de CO₂ 5%, O₂ 21% e N₂ 74% e sob uma tensão de estabilização de 1 gf (ARCANJO *et al.*, 2015).

Os anéis foram suspensos por linhas de algodão e fixados a transdutores de força acoplados a um sistema de aquisição de dados para o registro das tensões isométricas

(AQCAD 2.3.8., AVS Projetos, SP, Brasil). Após 30 minutos de estabilização, a presença de endotélio funcional foi determinada pela aplicação de acetilcolina (ACh) (10 µM) capaz de induzir relaxamento superior a 70% em segmentos aórticos previamente contraídos com fenilefrina (FEN) (1 µM).

Após a montagem dos segmentos de aorta, estabilização do sistema e demonstração de presença de endotélio funcional, deu-se seguimento a obtenção de dados para montagem das curvas de dose-resposta para concentrações cumulativas de FEN (10⁻¹⁰ M a 3×10⁻⁶ M) e concentrações cumulativas de ACh (10⁻⁹ M a 10⁻⁵ M) em segmentos previamente contraídos com FEN (3×10⁻⁷ M), e concentrações cumulativas de ACh (10⁻⁹ M a 10⁻⁵ M) sob efeito de indometacina (INDO) (3 µM) por 30 minutos ou pirogalol (PIRO) (30 µM) por 10 minutos em segmentos previamente contraídos com FEN (3×10⁻⁷ M) seguindo o protocolo esquematizado na **Figura 10.1**.

Figura 10.1 Desenho experimental do protocolo de obtenção das curvas cumulativas para FEN e ACh



O efeito da contração mediada pela FEN em cada uma das concentrações foi calculado pela diferença (isto é, $\Delta_{\text{Tensão}}$) entre a tensão basal e a tensão obtida após a adição de FEN. Já os resultados de relaxamento mediados pelas concentrações de ACh foram expressos em percentual de relaxamento a partir da resposta de contração máxima obtida pela FEN (3×10^{-7} M) a fim de normalizar os dados obtidos. Quanto aos valores de pD_2 (logaritmo negativo da EC_{50}) e $E_{\text{máx}}$ (efeito máximo), estes foram calculados a partir da regressão não-linear dos dados utilizados na montagem das curvas de dose-resposta.

Análise estatística

Os valores foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por meio de aplicação de Teste t de Student não-pareado e de análise de variância ANOVA, One-way/Two-way, seguida de pós-teste de Tukey para comparações múltiplas ou teste de Bonferroni, quando cabível. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Para análise dos resultados foi utilizado o *software* estatístico Graph Pad Prism versão 8.0. (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A relevância deste trabalho se baseia na busca por novas alternativas terapêuticas para a diabetes dentro das possibilidades de compostos bioativos que podem ser encontradas em nossa flora, visto que o uso de hipoglicemiantes orais e injetáveis convencionais está associado a uma ampla gama de efeitos colaterais (AL-KURY *et al.*, 2021).

Assim, o R-(+)-Limoneno apresenta diversas atividades biológicas conhecidas e que serviram de alicerce para a investigação do

efeito antioxidante tecidual em homogenato de artéria aorta e da reatividade vascular. Dentro desse contexto, historicamente, diversos modelos animais têm sido utilizados para a investigação das alterações patofisiológicas do DM, assim como para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para a síndrome (AL-AWAR *et al.*, 2016). Dentre as alternativas disponíveis, o DM pode ser induzido quimicamente utilizando-se a toxina estreptozotocina (ETZ). Feito isso, nosso modelo experimental foi realizado através do tratamento por 4 semanas com o R-(+)-Limoneno em diferentes doses, bem como solução salina (controle negativo) e fármacos hipoglicemiantes (controles positivos), onde posteriormente foram realizadas as análises pertinentes.

Efeitos do R-(+)-Limoneno sobre marcadores do estresse oxidativo

Pacientes diabéticos apresentam elevado grau pró-oxidante e marcadores de dano tecidual oxidativo, correlacionando assim envolvimento entre estresse oxidativo e diabetes mellitus (DM). A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode comprometer a integridade e as funções fisiológicas das células, contribuindo de forma direta para a patogênese do DM (JAGANJAC *et al.*, 2013). Dito isso, a produção de EROs aumenta ao passo que as vias enzimáticas pró-oxidantes são ativadas devido a acometimentos patológicos inflamatórios. Nesse caso, a enzima mieloperoxidase e a via de formação de nitrito podem ser utilizadas para investigação do potencial dano oxidativo, já que sua sinalização culmina na formação de EROs e consequente estresse oxidativo (KOCH *et al.*, 2021; RADY, 2018). Além disso, é importante ressaltar que as EROs podem ser removidas através de mecanismos celulares de defesa, dentre elas, as enzimas

superóxido dismutase e catalase (HUANG *et al.*, 2016). Logo, é de suma importância a avaliação de compostos que apresentem potencialidade para reduzir a sinalização excessiva das vias pró-oxidantes e que consigam otimizar a produção celular de defesas antioxidantes.

Atividade da mieloperoxidase tecidual (MPOt)

No homogenato do arco aórtico foi examinada a atividade da mieloperoxidase (MPO), enzima derivada de leucócitos, com aparecimento em processos inflamatórios e que tem a capacidade de reduzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie reativa de oxigênio. Em situações em que há exacerbação da produção de EROs, a atividade da MPO está aumentada, servindo assim como um marcador para avaliação do estresse oxidativo presente no animal (KOCH *et al.*, 2021).

A pesquisa da atividade da mieloperoxidase mostrou que o homogenato do arco aórtico do grupo CD apresentou maior atividade em relação ao CN, diferindo significativamente. Além disso, os grupos tratados com R-(+)-Limoneno apresentaram redução significativa da atividade da MPO nos grupos LM25 e LM50 quando comparados ao grupo CD. Com relação aos controles positivos, os grupos INS, MET e GLIB apresentaram uma redução significativa na atividade da MPO quando comparados ao grupo CD (**Figura 10.2**).

Os animais diabéticos sem tratamento apresentaram um aumento da atividade da MPO tecidual, evidenciando que a produção de EROs está aumentada na DM (ASMAT *et al.*, 2016). A redução considerável da atividade da MPO nos animais tratados com R-(+)-Limoneno nas doses de 25 e 50 mg/kg pode ser explicada por seu potencial efeito na diminuição na de citocinas pró-inflamatórias e na prevenção do

estresse oxidativo provocado pela produção de EROs, corroborando os achados de Rehman *et al.* (2014) e D'Alessio *et al.* (2013).

Determinação de nitrito tecidual (NO_2^-)

Assim como os níveis de MPO, a concentração de nitrito encontrado no arco aórtico seguiu o mesmo perfil de aumento nos animais diabéticos sem tratamento com relação aos animais normais, indicando maior produção de radicais livres e consequente espécies reativas no DM.

Quando comparados ao CD ($36,53 \pm 2,65$), todos os grupos analisados apresentaram redução nos níveis de nitrito tecidual, no entanto, apenas o grupo CN ($26,56 \pm 2,45$) mostrou diferença estatisticamente significativa (**Figura 10.2**). Apesar disso, Lorigooini *et al.* (2021) observaram redução dos níveis de nitrito em animais tratados com R-(+)-Limoneno nas doses de 10 e 20 mg/kg em modelos de neuroinflamação. Ademais, estudos conduzidos por Alves-Silva *et al.* (2019) com óleo essencial de *Santolina impressa*, rico em monoterpenos em sua composição, dentre eles o R-(+)-Limoneno (9,1%), levaram a uma diminuição significativa na produção de óxido nítrico em macrófagos, sugerindo, desta forma, seu potencial antioxidante.

Atividade da superóxido dismutase tecidual (SODt)

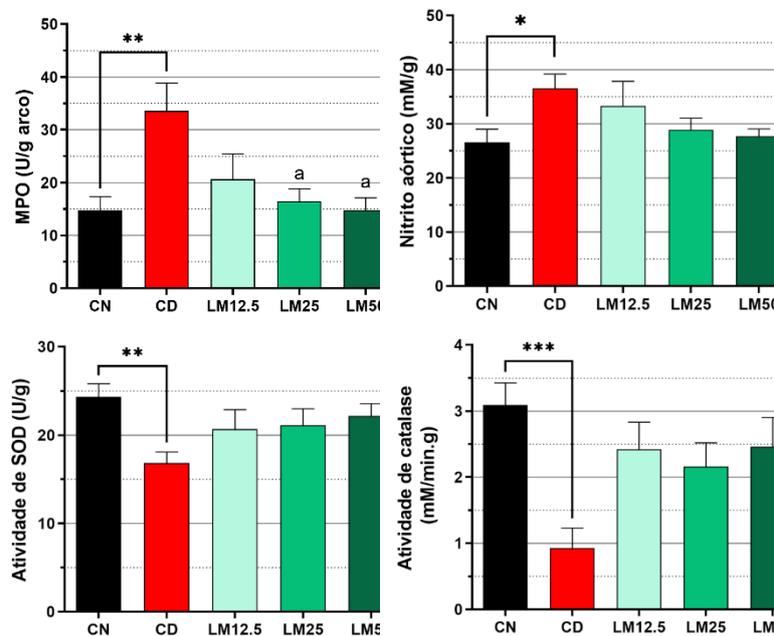
Os mecanismos de defesa antioxidante possuem papel importante na manutenção das espécies reativas, sendo as vias enzimáticas as principais vias de regulação para que não ocorra amplo dano oxidativo. A diminuição nos níveis dessas enzimas reflete em aumento das EROs, danos às organelas celulares, aumento da peroxidação lipídica e desenvolvimento de resistência à insulina, tornando os tecidos

suscetíveis ao estresse oxidativo e as complicações diabéticas, em particular, no desenvolvimento de complicações vasculares (ASMAT *et al.*, 2016). Dentre os mecanismos de defesa, há a superóxido dismutase (SOD), uma enzima encontrada no citoplasma ou nas mitocôndrias das células e que a função consiste em catalisar a conversão de ânions superóxido em dióxigênio e peróxido de hidrogênio.

Bacanli *et al.* (2017) demonstraram um aumento nas atividades das enzimas SOD e CAT em amostras de fígado e rins de animais diabéticos tratados com R-(+)-Limoneno na

dose de 50 mg/kg. Por sua vez, no presente estudo, a análise da atividade da SOD em amostras de arco aórtico no grupo CD demonstrou uma redução significativa quando comparada com todos os demais grupos, além do grupo CN. Os demais grupos tratados com R-(+)-Limoneno nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg, assim como os com os controles positivos INS, MET e GLIB, apresentaram um discreto aumento na atividade da SOD, sendo apenas estatisticamente significativo no grupo INS quando comparado com o grupo CD (Figura 10.2).

Figura 10.2 Efeito do R-(+)-Limoneno em ratos diabéticos sem tratamento ou tratados com R-(+)-Limoneno ou com fármacos hipoglicemiantes padrões sobre os níveis de nitrito e as atividades da MPO, SOD e catalase no arco aórtico



Nota: Média ± EPM (Erro Padrão da Média) de 5-10 animais/grupo. Teste t de Student e One Way ANOVA seguido de teste de Tukey. As diferenças significativas são apresentadas como: * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 quando comparado ao CN; ^ap < 0,05 quando comparado ao CD. As comparações entre os grupos testes e fármacos padrões foram ignoradas.

Atividade da catalase tecidual (CATt)

Assim como a SOD, a catalase (CAT) também compõe o sistema antioxidante enzimático promovendo a conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, substâncias menos danosas às células

(RAHMAN, 2007; BARBOSA *et al.*, 2010). No presente estudo, a atividade enzimática da CAT tecidual se mostrou significativamente diminuída no grupo CD quando comparada ao grupo CN. Por sua vez, os grupos LM12,5, LM25 e LM50 apresentaram aumento da

atividade da catalase juntamente com os controles positivos INS, MET e GLIB. No entanto, as respostas encontradas para nenhum desses grupos mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo CD (**Figura 10.2**).

Além dos achados de Bacanli *et al.* (2017) acerca do aumento na atividade da CAT tecidual em amostras de fígado e rins de animais tratados com R-(+)-Limoneno 50 mg/kg, Roberto *et al.* (2010) observaram um aumento da atividade da catalase em linfócitos murinos, bem como demais enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase e superóxido dismutase. Ainda no campo de estudo dos efeitos do R-(+)-Limoneno sobre a atividade da CAT, Wang *et al.* (2018) avaliaram a eficácia terapêutica do R-(+)-Limoneno na lesão cerebral associada à isquemia em ratos espontaneamente hipertensos, e observou que o tratamento com 20 mg/kg aumentou significativamente as atividades das defesas antioxidantes SOD e CAT.

Efeitos do R-(+)-Limoneno sobre a reatividade vascular induzida por fenilefrina (FEN)

A fenilefrina é uma droga simpaticomimética sintética na qual tem ação direta sobre os receptores α_1 -adrenérgicos. Dentre suas ações, promove vasoconstrição periférica através da mobilização de cálcio intracelular e extracelular, principalmente pela geração de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e 1,2-diacilglicerol (DAG), respectivamente, com consequente ativação da proteína quinase C (PKC) (MINNEMAN, 1988). No presente estudo, a vasoconstrição induzida por FEN foi medida através da diferença entre a tensão basal e a tensão após a adição de concentrações cumulativas de FEN em preparações de artéria

aorta dos diferentes grupos experimentais. A vasoconstrição obtida para grupo CD foi significativamente atenuada em relação ao grupo CN. Ou seja, as artérias aorta dos animais diabéticos sem tratamento apresentaram uma perda considerável na responsividade à FEN.

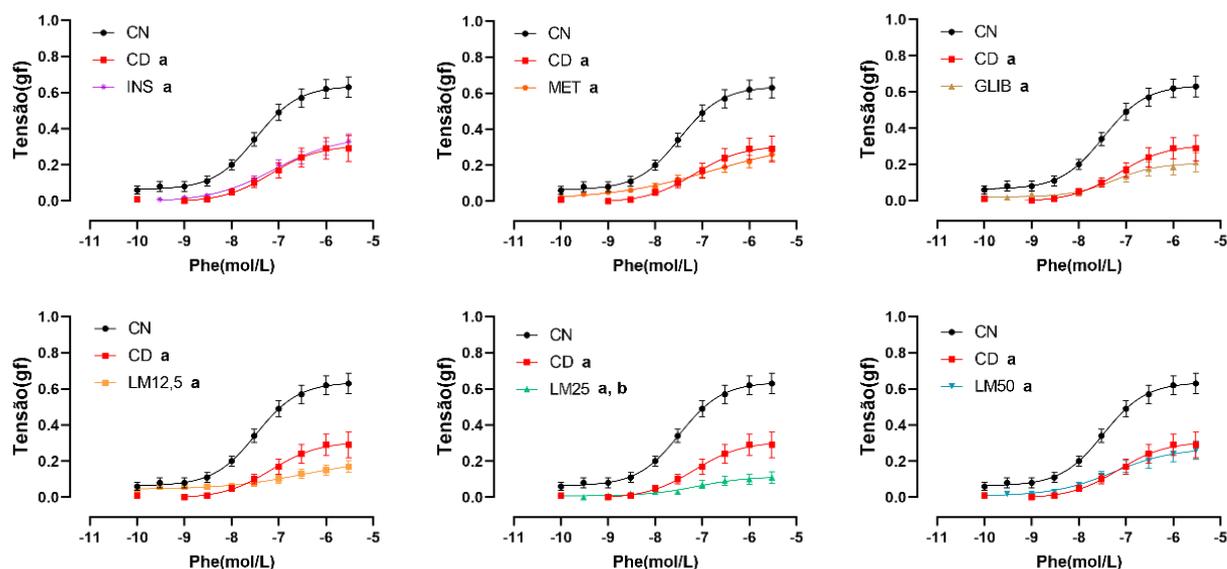
A redução da contração induzida pela fenilefrina (FEN) nos animais diabéticos sem tratamento em relação aos animais normais pode ser explicada pelas alterações morfológicas e funcionais na vasculatura causadas pelo diabetes, resultando em respostas anormais aos mais diversos estímulos. Assim sendo, a resposta diminuída à FEN pode não estar relacionada a uma dessensibilização mas a um tônus vascular naturalmente tensionado nos animais diabéticos, fazendo com que a resposta seja branda (XIONG *et al.*, 2020). No presente estudo, os grupos tratados com R-(+)-Limoneno nas doses de 12,5 e 50 mg/kg não apresentaram diferença estatística comparadas ao CD, não conseguindo reverter a resposta à FEN em animais diabéticos, assim como os grupos tratados com os controles positivos INS, MET e GLIB. A comparação entre as tensões obtidas pelos grupos tratados R-(+)-Limoneno em relação ao CD demonstrou diferença estatística significativa apenas para o grupo grupo LM25, sendo, porém, uma redução ainda maior da resposta vasocontrátil (**Figura 10.3**).

Tal redução na contratilidade vascular nos grupos tratados com R-(+)-Limoneno pode estar correlacionada à indução do aumento da atividade da SOD no tecido aórtico (**Figura 10.2**), indo de encontro com efeitos observados em experimentos conduzidos por Rehman *et al.* (2014), onde as artérias aortas de ratos diabéticos incubadas com SOD 150 U/mL apresentaram redução significativa da contração induzida por FEN. Ademais, Cardoso-Teixeira *et al.* (2018) reportaram que concentrações

cumulativas de R-(+)-limoneno aumentaram significativamente o tônus de repouso de anéis aórticos de ratos. Neste contexto, concentrações cumulativas de FEN não teriam ampla ação

sobre a contração vascular devido uma tensão basal aumentada previamente estabelecida pelo R-(+)-limoneno.

Figura 10.3 Comparativo das curvas dose-resposta para a FEN nos grupos controle e tratados com R-(+)-Limoneno



Nota: Média \pm EPM (Erro Padrão da Média) de 5-10 animais/grupo. Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. As diferenças significativas são apresentadas como: (a) diferença significativa com o grupo CN ($p < 0,05$); (b) diferença significativa com o grupo CD ($p < 0,05$).

Efeitos do R-(+)-Limoneno sobre o vasorrelaxamento induzido por acetilcolina (ACh) em preparações pré-contraídas com fenilefrina (FEN)

A acetilcolina é um fármaco que se liga a receptores muscarínicos acoplados à proteína G (mAChRs) na membrana da célula endotelial, que medeiam uma elevação transitória do cálcio livre intracelular. Esse aumento intracelular de cálcio é responsável por desencadear várias respostas celulares, incluindo a síntese de óxido nítrico que causa um pronunciado efeito vasorrelaxante. O NO difunde-se através das endotélio arterial para a camada média da parede arterial, atuando nas células do músculo liso. No entanto, em situações patológicas que levam a uma disfunção endotelial significativa, a liberação de NO é reduzida ou abolida,

diminuindo a resposta vasodilatadora (EDWARDS *et al.*, 2020).

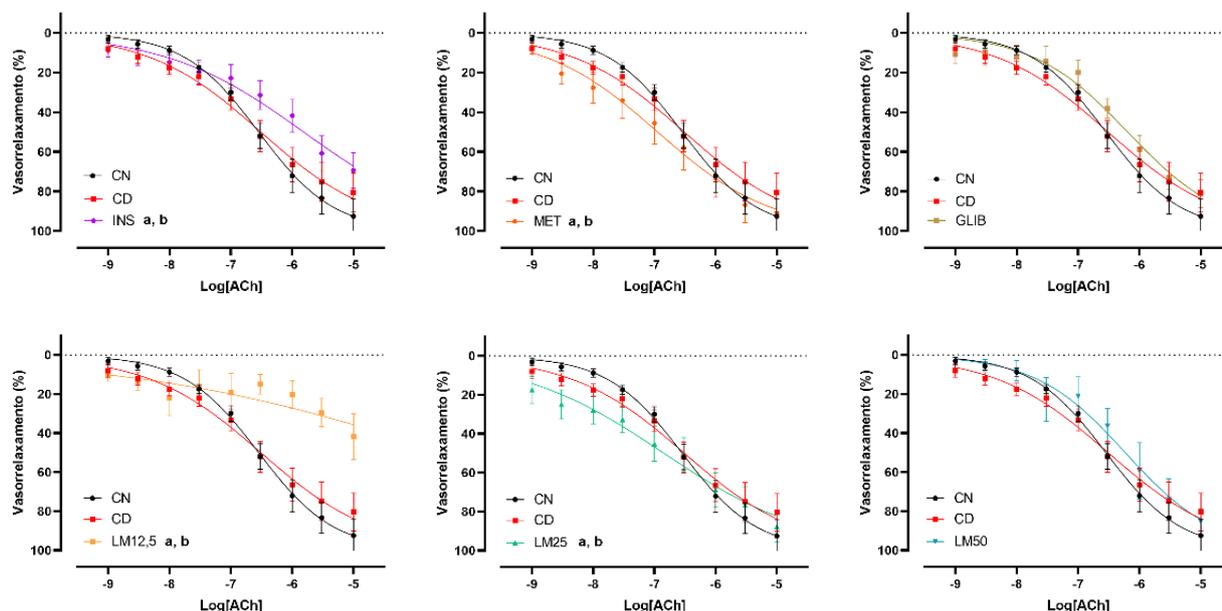
Curvas normais

Na comparação entre as curvas dose-resposta dos grupos CD e CN, não foi observada diferença estatisticamente significativa. No entanto, é possível observar que ambas as curvas dose-resposta se comportam de maneira ligeiramente diferentes entre si, apresentando nas concentrações inferiores de ACh um maior percentual de vasorrelaxamento no grupo CD. Este efeito se se inverte na medida em que são aumentadas as concentrações de ACh, onde o grupo CD passa a apresentar um menor percentual de vasorrelaxamento em relação ao grupo CN. A ausência de diferença significativa entre as curvas dose-resposta das preparações de anéis de artéria aorta dos animais diabéticos

e dos animais normais corroboram os resultados encontrados por Labazi *et al.* (2018), cuja vasodilatação induzida por ACh (dependente de endotélio) em preparações de animais diabéticos teve leve redução em comparação aos animais normais, porém, sem diferença estatís-

tica significativa. Por sua vez, as curvas dose-resposta dos grupos INS e MET diferiram significativamente do grupo CD, enquanto o grupo GLIB não apresentou diferença (**Figura 10.4**).

Figura 10.4 Comparativos das curvas dose-resposta para ACh nos grupos controle e tratados com R-(+)-Limoneno



Nota: Média \pm EPM (Erro Padrão da Média) de 5-10 animais/grupo. Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. As diferenças significativas são apresentadas como: (a) diferença significativa com o grupo CN ($p < 0,05$); (b) diferença significativa com o grupo CD ($p < 0,05$).

A insulina apresenta efeito hipotensor dependente de endotélio, no entanto, em condições patológicas que proporcionam disfunção endotelial, como é o caso do diabetes, foi mostrado experimentalmente que esse efeito hipotensor é atenuado (SUBRAMANIAM *et al.*, 2009). Isto posto, nosso modelo experimental pôde certificar a relação da insulina e de um endotélio íntegro para uma resposta vasorrelaxante total, já que no diabetes o endotélio sofre agressões oxidativas que levam a uma diminuição do endotélio funcional. Já a melhora na vasodilatação dos animais tratados com metformina pode ser explicada pela sua associação já descrita na literatura, sobre cardioproteção, vasorrelaxamento e normali-

zação da função endotelial. Estudos prévios sugerem uma ação direta na diminuição da atividade do nervo simpático renal assim como na pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (GUTIÉRREZ-LARA *et al.*, 2017; LEE & PEULER, 1998).

Os animais diabéticos tratados com R-(+)-Limoneno na dose de 12,5 mg/kg apresentaram redução do efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e um deslocamento da curva dose-resposta para a direita, expondo que a sua potência farmacológica está diminuída e que maiores concentrações de ACh são necessárias para atingir o EC_{50} , indicando uma resposta significativamente reduzida ao vasorrelaxamento induzido pela ACh em comparação com o grupo de

animais diabéticos sem tratamento (CD). Em contraste, os animais tratados com as doses de 25 e 50 mg/kg apresentaram $E_{m\acute{a}x}$ ligeiramente mais acentuado ($87,65 \pm 7,59$ e $85,18 \pm 6,67$, respectivamente) que os animais diabéticos sem tratamento ($80,38 \pm 9,64$), apesar de não diferirem significativamente. Quanto à comparação das curvas dose-resposta, a curva dos animais tratados com a dose de 25 mg/kg apresentou maior percentual de vasorrelaxamento nas concentrações iniciais de ACh, expondo melhor resposta e tendo uma diferença significativa quando comparado ao controle diabético (**Figura 10.4**). Essa resposta observada para a menor dose de R-(+)-Limoneno é semelhante aos achados *in vitro* de Cardoso-Teixeira *et al.* (2018), cujas preparações pré-contráidas com FEN apresentaram um pico de contração quando adicionadas doses cumulativas mais baixas de limoneno. Em contraste, ao passo que foram aumentadas as doses de limoneno, houve um aumento pronunciado de vasodilatação, explicando a melhor resposta vascular frente à ACh dos animais tratados com concentrações de 25 e 50 mg/kg de limoneno.

Curvas com adição de indometacina

As artérias também foram incubadas com indometacina previamente à adição de ACh, um inibidor da ciclo-oxigenase (COX). Essa adição de indometacina ao experimento acontece devido às possíveis alterações causadas pelas prostaglandinas vasoativas liberadas pelo endotélio (PGs) que afetariam a resposta. Além disso, estudos indicam uma maior produção de prostaglandinas pelas ratas em determinadas fases do ciclo estral, sendo observada uma ação moduladora dos hormônios sexuais nesses animais sobre a síntese de prostaglandinas (MOTTA *et al.*, 1994; MARTÍNEZ *et al.*, 2006). Para tanto, a adição de indometacina

pretende deixar o modelo livre de interferências e avaliar o efeito direto das substâncias testes sobre o endotélio.

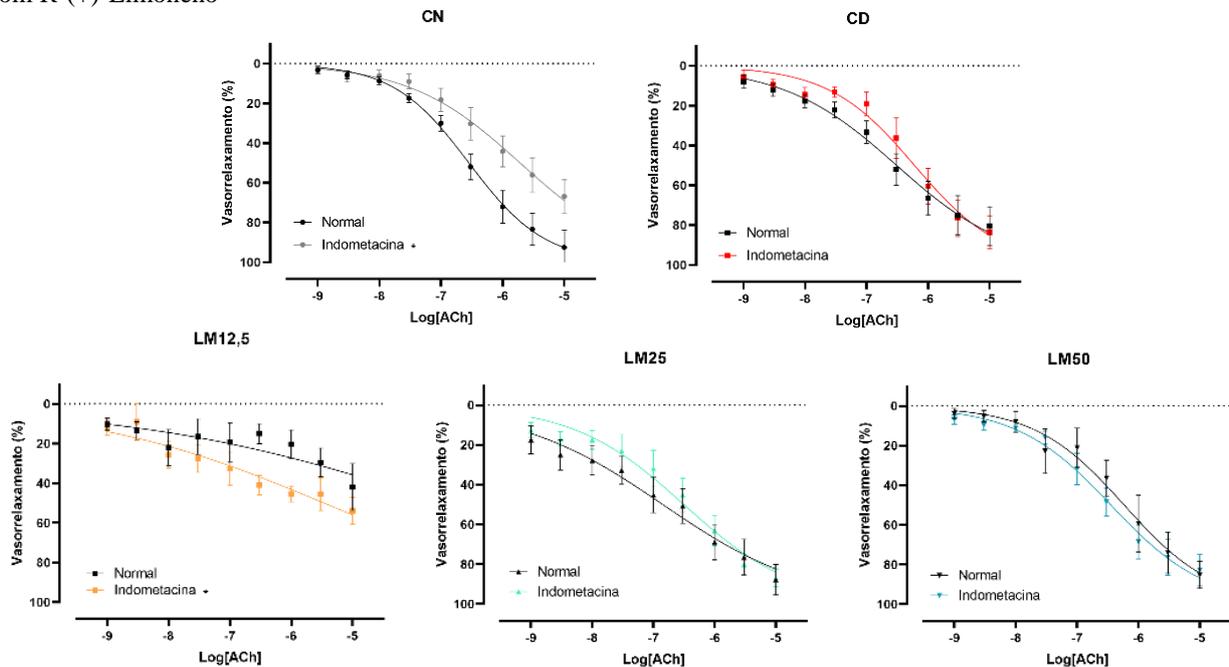
Assim, foram comparadas as curvas dose-resposta normais, ou seja, sem adição de indometacina, e as curvas dose-resposta com a incubação prévia com indometacina. Com isso foi possível observar uma redução significativa na resposta vasorrelaxante no grupo CN com adição de indometacina frente a resposta do grupo CN normal. Já o grupo CD não apresentou diferença estatística significativa entre as curvas dose-resposta (**Figura 10.5**). Foi previamente demonstrada uma relação das prostaglandinas e a vasodilatação dependente de endotélio, comprovada pela redução no fluxo sanguíneo da pele de 11 voluntários saudáveis após a administração de um inibidor inespecífico da COX, o ceterolaco, previamente à administração de ACh em relação ao fluxo sanguíneo desses voluntários quando administrado somente ACh (KELLOGG *et al.*, 2005). Ademais, tem sido reportada uma variação entre a produção de prostaglandinas vasoativas e o tempo de indução do diabetes com STZ (PEREDO *et al.*, 2006), onde uma superprodução de PGI_2 pode ter um papel compensatório na aorta diabética em estágio iniciais (CSANYI *et al.*, 2007). Portanto, pode se levantar a hipótese de que a indometacina utilizada para inibir as possíveis interferências das prostaglandinas vasoativas no endotélio não foi suficiente devido a um aumento rebote na produção de PGI_2 que não pôde ser inibida na concentração utilizada.

Nas curvas dos grupos tratados com R-(+)-Limoneno e pré-incubadas com indometacina, foram obtidas as seguintes respostas: os grupos LM25 e LM50 não apresentaram diferença estatística significativa em comparação as curvas normais, enquanto o grupo LM12,5

apresentou vasodilatação superior frente a curva normal com diferença significativa entre elas (**Figura 10.5**). Esses achados podem ser explicados por uma ação direta da indometacina em produzir radicais O_2^- que reagem diretamente com o NO, formando $ONOO^-$ (interação entre EROs e NO), causando consequente vasodilatação. Angelis *et al.* (2004) relatam que o pré-tratamento com SOD possibilita a abolição do aumento da vasodilatação induzida pela ACh na presença de indometacina. Essa

observação pode ser correlacionada aos achados experimentais deste trabalho, já que os grupos LM25 e LM50 apresentaram maior atividade de SOD no tecido aórtico (**Figura 10.2**). Por sua vez, o grupo LM12,5 apresentou menor atividade de SOD no tecido aórtico em relação aos outros grupos LM. A presença de indometacina não conseguiu abolir o efeito vasodilatador induzido por ACh. Esta evidência pode ainda corroborar o fato do grupo CD ter apresentado maior resposta vasodilatadora.

Figura 10.5 Comparação entre as curvas normais e as curvas com indometacina para os grupos controle e de tratamento com R-(+)-Limoneno



Nota: Média \pm EPM (Erro Padrão da Média) de 5-10 animais/grupo. Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. As diferenças significativas são apresentadas como: (*) diferença significativa entre as curvas normais e as curvas com indometacina para um mesmo grupo ($p < 0,05$).

Logo, foi demonstrado que a manutenção das curvas de dose-resposta para a ACh incubadas com indometacina pode descender de dois mecanismos distintos e concomitantes: 1) exacerbação da produção de prostaciclina como efeito rebote para uma compensação dos efeitos agressores endoteliais causados pela progressão da diabetes; e 2) demonstração da correlação entre a deterioração das defesas antioxidantes da vasculatura analisada e,

consequentemente, maior produção de superóxidos vasoativos.

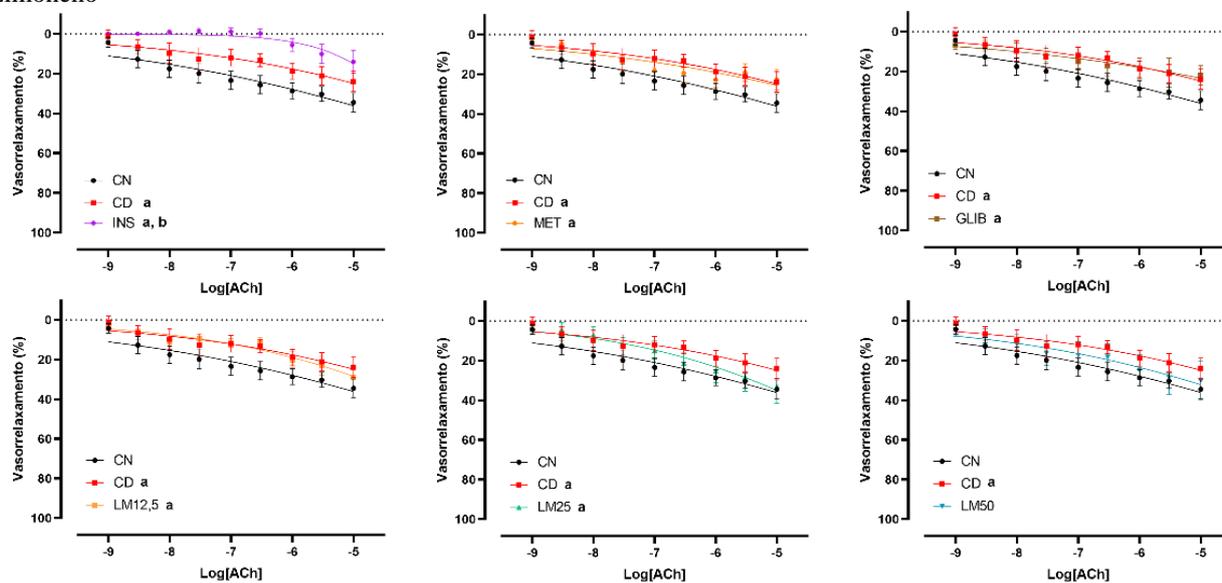
Curvas com adição de pirogalol

A curva dose-resposta para ACh do grupo CD apresentou-se estatisticamente diferente em comparação ao grupo CN, mostrando que a disfunção endotelial induzida pelo pirogalol foi ainda mais acentuada nos animais diabéticos sem tratamento, possivelmente por conta da

depleção das defesas antioxidantes nesses animais. Os grupos tratados com MET e GLIB também não foram capazes de reverter o dano oxidativo induzido pelo pirogalol e se mantiveram próximos da resposta do CD. Já o grupo

padrão INS apresentou uma redução significativa da atividade vasorrelaxante induzida por ACh até mesmo quando comparado ao grupo controle diabético (**Figura 10.6**).

Figura 10.6 Curvas dose-resposta para ACh frente ao efeito de pirogalol nos grupos controle e tratados com R-(+)-Limoneno



Nota: Média \pm EPM (Erro Padrão da Média) de 5-10 animais/grupo. Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. As diferenças significativas são apresentadas como: (a) diferença significativa com o grupo CN ($p < 0,05$); (b) diferença significativa com o grupo CD ($p < 0,05$).

Uma melhora na resposta vasorrelaxante após a incubação com pirogalol nos grupos LM12,5, LM25 e LM50 pôde ser observada em praticamente todas as concentrações de ACh em comparação aos animais diabéticos sem tratamento. Além disso, foi possível observar que os grupos tratados com R-(+)-Limoneno nas doses de 25 e 50 mg/kg apresentaram uma resposta vasorrelaxante mais próxima da apresentada pelo grupo CN. Contudo, apenas o LM50 não apresentou diferença significativa ao grupo CN, evidenciando curvas dose-resposta semelhantes. Esses achados podem ser possivelmente relacionados ao poder antioxidante do R-(+)-Limoneno em reverter agressões induzidas por estresse oxidativo, como já demonstrado neste trabalho (**Figura 10.6**).

A incubação de segmentos de aorta com o pirogalol, um gerador de superóxido, causa disfunção endotelial por meio da inativação do óxido nítrico e consequente diminuição da resposta vasodilatadora do ACh (HANSPAL *et al.*, 2002). Devido a esse mecanismo, uma perda de eficácia da ACh é observada, sendo ainda mais proeminentes em animais diabéticos devido a uma instaurada reatividade vascular anormal, além da depleção das defesas antioxidantes nesses animais. Por sua vez, os grupos tratados com R-(+)-Limoneno nas doses de 25 e 50 mg/kg conseguem melhorar o vasorrelaxamento com adição de pirogalol em relação ao CD. Isso pode ser explicado pela diminuição da formação de agente pró-oxidantes e pela melhora das defesas

antioxidantes nos animais desses grupos como discutido anteriormente (**Figura 10.2**).

CONCLUSÃO

O tratamento com R-(+)-Limoneno em diferentes doses não apresentou diferença significativa nas atividades enzimáticas de SOD e CAT aórticos em ratos diabéticos, mesmo com um discreto aumento em suas atividades. Por sua vez, observou-se uma redução significativa na atividade de MPO aórtica e nos níveis de nitrito em relação ao grupo controle diabético. Esses resultados possivelmente estão relacionados a uma diminuição do estresse oxidativo e melhora da

reatividade vascular no diabetes. Em estudos funcionais em artéria aorta de ratos diabéticos, o tratamento com R-(+)-Limoneno não apresentou melhora na vasoconstrição induzida pela fenilefrina. Quanto à vasodilatação dependente de endotélio induzida por acetilcolina na presença e ausência de indometacina e pirogalol, as discretas alterações na responsividade vascular observadas parecem estar possivelmente relacionadas com uma atenuação do estresse oxidativo. Portanto, é relevante que haja mais estudos com doses maiores de R-(+)-Limoneno para observar possíveis maiores impactos na melhora da responsividade vascular no diabetes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-AWAR, A. *et al.* Experimental diabetes mellitus in different animal models. *Journal of Diabetes Research*, 2016. doi: 10.1155/2016/9051426.
- AL-KURY, L.T. *et al.* In vitro and in vivo antidiabetic potential of monoterpenoids: an update. *Molecules*, v. 27, 2021. doi: 10.3390/molecules27010182.
- ALVES-SILVA, J.M. *et al.* Unveiling the bioactive potential of the essential oil of a Portuguese endemism, *Santolina impressa*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 244, p. 112120, 2019. doi: 10.1016/j.jep.2019.112120.
- AMARAL, J.F. *et al.* Antinociceptive effect of the monoterpene R-(d)-Limonene in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, p. 1217, 2007. doi: 10.1248/bpb.30.1217.
- ANGELIS, A. *et al.* Indomethacin potentiates acetylcholine-induced vasodilation by increasing free radical production. *British Journal of Pharmacology*, v. 142, p. 1233, 2004. doi: 10.1038/sj.bjp.0705877.
- ARCANJO, D.D.R. *et al.* A novel vasoactive proline-rich oligopeptide from the skin secretion of the frog brachycephalus ephippium. *Plos One*, v. 10, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0145071.
- ASMAT, U. *et al.* Diabetes mellitus and oxidative stress: a concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 24, 2016. doi: 10.1016/j.jsps.2015.03.013.
- BACANLI, M. *et al.* D-limonene ameliorates diabetes and its complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food And Chemical Toxicology*, v. 110, p. 434, 2017. doi: 10.1016/j.fct.2017.09.020.
- BASHA, R.H. & SANKARANARAYANAN, C. B-caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, v. 245, p. 50, 2015. doi: 10.1016/j.cbi.2015.12.019.
- BATHAIE, S.Z. & TAMANOI, F., organizadores. *Natural products and cancer signaling: isoprenoids, polyphenols and flavonoids*. Amsterdam: Elsevier, 2014.
- BEUTLER, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton, 1975.
- BRADLEY, P.P. *et al.* Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 78, p. 206, 1982. doi: 10.1111/1523-1747.ep12506462.
- CARDOSO-TEIXEIRA, A.C. *et al.* Hydroxyl group and vasorelaxant effects of perillyl alcohol, carveol, limonene on aorta smooth muscle of rats. *Molecules*, v. 23, p. 1430, 2018. doi: 10.3390/molecules23061430.
- CSANYI, G. *et al.* Lack of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) up-regulation in endothelial dysfunction in aorta in diabetic rats. *Pharmacological Reports*, v. 50, p. 447, 2007.
- D'ALESSIO, P.A. *et al.* Oral administration of d-Limonene controls inflammation in rat colitis and displays anti-inflammatory properties as diet supplementation in humans. *Life Sciences*, v. 92, p. 1151, 2013. doi: 10.1016/j.lfs.2013.04.013.
- EDWARDS, J.M. *et al.* The obligatory role of the acetylcholine-induced endothelium-dependent contraction in hypertension: can arachidonic acid resolve this inflammation? *Current Pharmaceutical Design*, v. 26, p. 3723, 2020. doi: 10.2174/1381612826666200417150121.
- FARBOOD, Y. *et al.* Ellagic acid protects against diabetes-associated behavioral deficits in rats: Possible involved mechanisms. *Life Sciences*, v. 225, p. 8, 2019. doi: 10.1016/j.lfs.2019.03.078.
- FURTADO, M. *et al.* Effects of ω -3 PUFA-rich oil supplementation on cardiovascular morphology and aortic vascular reactivity of adult male rats submitted to an hypercholesterolemic diet. *Biology*, v. 11, 2022. doi: 10.3390/biology11020202.
- GREEN, L. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, 1982. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-x.
- GUTIÉRREZ-LARA, E.J. *et al.* Pharmacological evaluation of metformin and N-benzylbiguanide, a novel analogue of metformin, on the vasopressor responses to adrenergic system stimulation in pithed rats with fructose-induced insulin resistance. *European Journal of Pharmacology*, v. 814, p. 313, 2017. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.08.044.
- HANSPAL, I.S. *et al.* The effect of oxidative stress on endothelium-dependent and nitric oxide donor-induced relaxation: implications for nitrate tolerance. *Nitric Oxide*, v. 6, p. 263, 2002. doi: 10.1006/niox.2001.0412.
- HUANG, Y. *et al.* Self-assembly of multi-nanozymes to mimic an intracellular antioxidant defense system. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 55, p. 6646, 2016. doi: 10.1006/niox.2001.0412.

- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION - IDF. IDF diabetes atlas. 10. ed. Brussels: IDF, 2021.
- JAGANJAC, M. *et al.* Reactive aldehydes: second messengers of free radicals in diabetes mellitus. *Free Radical Research*, v. 47, p. 39, 2013. doi: 10.3109/10715762.2013.789136.
- KELLOGG, D.L. *et al.* Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin. *Journal Of Applied Physiology*, v. 98, p. 629, 2005. doi: 10.1152/japplphysiol.00728.2004.
- KOCH, M.S. *et al.* Aspectos gerais da mieloperoxidase e seu envolvimento em doenças: uma breve revisão. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, p. 28677, 2021. doi: 10.34117/bjdv7n3-536.
- LABAZI, H. *et al.* Functional changes in vascular reactivity to adenosine receptor activation in type I diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 820, p. 191, 2018. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.12.034.
- LEE, J.M. & PEULER, J.D. Acute vasorelaxant effects of metformin and attenuation by stimulation of sympathetic agonist release. *Life Sciences*, v. 64, p. 57, 1998. doi: 10.1016/s0024-3205(98)00563-3.
- LORIGOOINI, Z. *et al.* Limonene through attenuation of neuroinflammation and nitrite level exerts antidepressant-like effect on mouse model of maternal separation stress. *Behavioural Neurology*, v. 2021, 2021. doi: 10.1155/2021/8817309.
- MAIESE, K. New insights for oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. doi: 10.1155/2015/875961.
- MARTÍNEZ, S. *et al.* 17- β -estradiol upregulates COX-2 in the rat oviduct. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, v. 80, 2006. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2006.06.002.
- MINNEMAN, K.P. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca²⁺. *Pharmacological Reviews*, v. 40, p. 87, 1988.
- MORAIS, H. *et al.* Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. *Behavioural Brain Research*, v. 258, p. 52, 2014. doi: 10.1016/j.bbr.2013.10.011.
- MOSHAGE, H. *et al.* Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clinical Chemistry*, v. 41, 1995.
- MURALI, R. & SARAVANAN, R. Antidiabetic effect of d-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, v. 2, p. 269, 2012. doi: 10.1016/j.bionut.2012.08.008.
- NIEDOWICZ, D.M. & DALEKE, D.L. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 43, p. 289, 2005. doi: 10.1385/CBB:43:2:289.
- NOWOTNY, K. *et al.* Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*, v. 16, p. 194, 2015. doi: 10.3390/biom5010194.
- PEREDO, H.A. *et al.* Long-term streptozotocin-induced diabetes alters prostanoid production in rat aorta and mesenteric bed. *Autonomic and Autacoid Pharmacology*, v. 26, p. 355, 2006. doi: 10.1111/j.1474-8673.2006.00375.x.
- QUEIROZ, P.C. *et al.* Prevalência das complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes mellitus e síndrome metabólica. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*, v. 9, p. 254, 2011. doi: 10.1590/S0104-42302004000300031.
- RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxyxynitrite: redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 115, p. 5839, 2018. doi: 10.1073/pnas.1804932115.
- RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, v. 2, p. 219, 2007.
- REHMAN, M. *et al.* D-limonene suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and inflammation via repression of COX-2, iNOS, and NF κ B in kidneys of Wistar rats. *Experimental Biology and Medicine*, v. 239, p. 465, 2014. doi: 10.1177/1535370213520112.
- ROBERTO, D. *et al.* Antioxidant Activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to h₂O₂ modulation and cell proliferation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 106, p. 38, 2010. doi: 10.1111/j.1742-7843.2009.00467.x.
- SUBRAMANIAM, G. *et al.* Effect of acidosis on the mechanism(s) of insulin-induced vasorelaxation in normal Wistar-Kyoto (WKY) rat aorta. *Regulatory Peptides*, v. 155, p. 70, 2009. doi: 10.1016/j.regpep.2009.04.008.
- VIGUSHIN, D.M. *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 42, p. 111, 1998. doi: 10.1007/s002800050793.
- WANG, X. *et al.* Protective effects of D-Limonene against transient cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 15, p. 699, 2018. doi: 10.3892/etm.2017.5509.