

FERNANDA DOS SANTOS RAPUCCI MORAES

**“ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus aurantifolia*: ANÁLISE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DOS
EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE SOBRE CÉLULAS
MUSCULARES DISTRÓFICAS DE CAMUNDONGOS *MDX*”**

**“ESSENTIAL OIL *Citrus aurantifolia*: CHEMICAL ANALYSIS AND EVALUATION OF
ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT EFFECTS ON DYSTROPHIC
MUSCLE CELLS OF MDX MICE”**

Campinas, 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

FERNANDA DOS SANTOS RAPUCCI MORAES

“ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus aurantifolia*: ANÁLISE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DOS
EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE SOBRE CÉLULAS MUSCULARES
DISTRÓFICAS DE CAMUNDONGOS *MDX*”

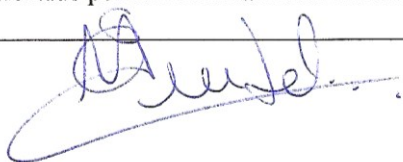
“ESSENTIAL OIL *Citrus aurantifolia*: CHEMICAL ANALYSIS AND EVALUATION OF
ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT EFFECTS ON DYSTROPHIC MUSCLE
CELLS OF MDX MICE”

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre em Biociências e Tecnologia
de Produtos Bioativos. Área de concentração: Fármacos,
Medicamentos e Insumos para Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Minatel

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos José Salvador

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida
pelo aluno **Fernanda dos Santos Rapucci Moraes** e
orientado pela Profa. Dra. Elaine Minatel.



CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

D741o Dos Santos, Fernanda Rapucci Moraes, 1986-
Óleo essencial de *Citrus aurantifolia* : análise química e avaliação dos efeitos anti-inflamatório e antioxidante sobre células musculares distróficas de camundongos mdx / Fernanda dos Santos Rapucci Moraes. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Elaine Minatel.

Coorientador: Marcos José Salvador.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Citrus aurantiifolia*. 2. Óleo essencial. 3. Antioxidantes. 4. Células - Cultura e meios de cultura. 5. Distrofia muscular. I. Minatel, Elaine, 1976-. II. Salvador, Marcos José, 1971-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Essential oil *Citrus aurantifolia* : chemical analysis and evaluation of anti-inflammatory and antioxidant effects on dystrophic muscle cells of mdx mice

Palavras-chave em inglês:

Citrus aurantiifolia

Essential oil

Antioxidants

Cell culture

Muscular dystrophy

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

Elaine Minatel [Orientador]

Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Adriana Pertille

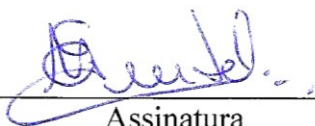
Data de defesa: 10-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

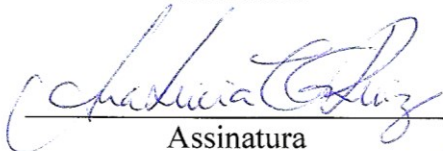
Campinas, 10 de janeiro de 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

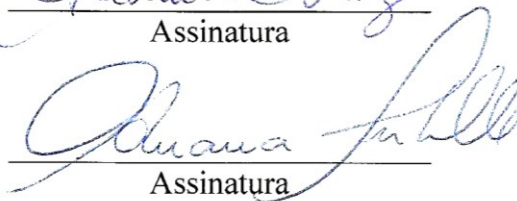
Profa. Dra. Elaine Minatel


Assinatura

Dra. Ana Lucia Tasca Gois Ruiz


Assinatura

Profa. Dra. Adriana Pertille


Assinatura

Dra. Taize Machado Augusto

Assinatura

Prof. Dr. Renato Ferretti

Assinatura

RESUMO

Os anti-inflamatórios corticosteróides são os fármacos mais utilizados no tratamento da distrofia muscular de Duchenne. Porém, devido aos severos efeitos colaterais que apresentam, é fundamental a busca por terapias alternativas que minimizem a evolução da doença e melhorem a qualidade de vida dos pacientes distróficos e ao mesmo tempo apresentem menos efeitos colaterais do que os corticosteróides. Recentes estudos, em modelos experimentais, demonstram que os óleos essenciais extraídos de espécies do gênero *Citrus* apresentam potencial efeito benéfico sobre doenças associadas ao estresse oxidativo e/ou inflamação. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo realizar o estudo químico do óleo essencial de *Citrus aurantifolia* obtido a partir de prensagem a frio da casca dos frutos, seguido de destilação a vapor, comercializado sob o nome de Lima destilada e avaliar seu potencial efeito anti-inflamatório e antioxidante sobre células musculares distróficas de camundongos mdx. O estudo consistiu em duas partes. Na primeira realizou-se a caracterização do perfil químico por CG-EM e a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial utilizando-se os ensaios de redução do radical DPPH e ORAC_{FL}. A segunda parte consistiu na administração do óleo essencial de *C. aurantifolia in vitro* sobre células musculares distróficas de camundongos mdx. Após o tratamento, avaliou-se a toxicidade do óleo essencial, e realizou-se a quantificação de H₂O₂ e de TNF- α , NF- κ B e 4-HNE nas células musculares (Western Blotting). O óleo essencial de *C. aurantifolia* estudado apresentou como constituintes químicos majoritários o limoneno (42,6%), α -terpineol (11,76%), cimenol (11,80%), γ -terpineno (4,63%) e terpinoleno (5,30%), com resultados coerentes com o esperado para esta espécie vegetal; apresentou-se ativo com capacidade antioxidante *in vitro* nos ensaios DPPH (forte resultado antioxidante na diluição 1:250 (v/v) em metanol) e ORAC_{FL} (950 μ mol/TE g⁻¹); demonstrou não ser tóxico, uma vez que a viabilidade celular, tanto nas células controle (C57BL/10) como nas células distróficas, se

manteve acima de 90%; atenuou os efeitos deletérios que ocorrem nas células musculares distróficas, no que diz respeito à inflamação (reduziu o conteúdo de TNF- α) e estresse oxidativo (reduziu o conteúdo de 4-HNE e a produção de H₂O₂). Diante do exposto, acreditamos que o óleo essencial de Lima destilada possa ser potencialmente útil para o tratamento farmacológico da distrofia muscular. Entretanto, são necessários estudos futuros para se verificar qual é a dosagem e o tempo de tratamento adequados para se obter o melhor efeito deste óleo essencial.

Palavras chaves: *Citrus aurantifolia*, óleo essencial, antioxidante, anti-inflamatório, distrofia muscular

ABSTRACT

Anti-inflammatory corticosteroids are the most commonly used drugs for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. However, due to their severe side effects, it is essential to search for alternative therapies that minimize the evolution of the disease and improve the life quality of dystrophic patients while showing fewer side effects than corticosteroids. Recent studies in experimental models have shown that essential oils extracted from genus *Citrus* species have a potential beneficial effect on diseases associated with oxidative stress and/or inflammation. Thus, the aim of the present study is to perform the chemical study of the *Citrus aurantifolia* essential oil obtained from cold pressing the peel of the fruit, followed by steam distillation, marketed under the name Lima distilled and evaluate its potential antioxidant and anti-inflammatory effects on dystrophic muscle cells of *mdx* mice. The project consisted of two parts. The first was carried out to characterize the chemical profile by GC-EM and evaluation of *in vitro* antioxidant activity of the essential oil using trials reduction of DPPH radical and ORAC_{FL}. The second part consisted of the administration of the *C. aurantifolia* essential oil *in vitro* on dystrophic muscle cells from *mdx* mice. After treatment, the toxicity of essential oil was evaluated, the concentration of H₂O₂ was detected and TNF- α , NF-kB and 4-HNE levels in muscle cells were quantified (Western blotting). Essential Distilled Lime Oil studied showed important chemical constituents as major limonene (42.6%), α -terpineol (11,76%), cymene (11,80%), γ -terpinene (4,63%) e terpinolene (5,30%), with results consistent with expectations for this plant species; it was active with an antioxidant capacity *in vitro* on the DPPH and ORAC_{FL} assays (950 μ mol/TE g⁻¹); was not toxic, the cell viability in both control cells (C57BL/10) and in dystrophic muscle cells was above 90%; it also attenuated the deleterious effects that occur in dystrophic muscle cells in relation to inflammation (reduced TNF- α content) and oxidative stress (reduced 4-HNE content and H₂O₂ production). Therefore, we believe that the Essential Distilled Lime Oil can be

potentially useful for the pharmacological treatment of muscular dystrophy. However, future studies are needed to check what is the dosage and period of treatment suitable to achieve the best effect of this essential oil.

Key words: *Citrus aurantifolia*, essential oil, antioxidant, anti-inflammatory, muscular dystrophy

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	IX
ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XVII
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	3
1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	4
1.3 RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	7
1.4 PLANTAS MEDICINAIS	10
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 AVALIAÇÃO QUÍMICA.....	16
3.1.1 Óleo essencial	16
3.1.2 Análise dos constituintes voláteis presentes e perfil químico por CG-EM.....	16
3.1.3 Ensaio para a avaliação da atividade antioxidante in vitro.....	17
3.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE EM CULTURA MUSCULAR PRIMÁRIA DISTRÓFICA.....	19
3.2.1 Animais	19
3.2.2 Protocolo Experimental	19
3.2.3 Tratamentos	20
3.2.4 Análise da viabilidade celular	21
3.2.5 Quantificação do conteúdo de TNF- α , NF- κ B e 4-HNE nas células musculares (Western Blotting).....	23
3.2.6 Detecção H ₂ O ₂ nas células musculares	25
3.2.7 Análise Estatística	25
4 RESULTADOS	26
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO POR CG-EM.	26
4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO.....	29
4.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR	30
4.4 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE TNF-A, NF-KB E 4-HNE (WESTERN BLOTTING)	34
4.5 DETECÇÃO H ₂ O ₂ NAS CÉLULAS MUSCULARES	37
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO.....	46
7 BIBLIOGRAFIA.....	47
8 ANEXO 1	66

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes” .

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Todos sabem que um trabalho como este não se faz sozinho. Ainda que a responsabilidade pelos erros e omissões seja minha, uma vez que sou a redatora desta tese, há pessoas que colaboraram com sua elaboração de tal forma que preciso creditar um pouco do resultado a elas.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Elaine Minatel. Com a Prof^a Elaine aprendi quase tudo o que sei sobre questões teóricas e práticas da nossa profissão. Pela preparação que me proporcionou para a docência e principalmente a amizade e a confiança que depositou no meu trabalho.

Outra pessoa a quem quero agradecer nominalmente, sem a qual este trabalho não teria sido feito, é meu co orientador Prof Dr Marcos Jose Salvador, que se envolveu pessoalmente com meu trabalho, colaborando com materiais e conselhos, ajudando na minha orientação.

Por fim, mas não menos importante, aos meus pais. Sem vocês eu certamente não teria chegado até aqui.

Ao meu marido Luis Henrique, que me fizera imensos favores, e infinito apoio e compreensão!

Não poderia me esquecer dos demais colegas de trabalho: Aline Macedo, Daniela, Amanda, Priscyla, Túlio, Ayslan, Carolina, Matheus e Nathalia pela atenção e pela força dadas através do companheirismo, sempre que precisei.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos, em particular ao secretário Rafael, muito obrigada pela sua prestação e atenção aos meus pedidos.

No final, quero dizer que agradeço a Deus. No final porque, para mim, Ele resume tudo e é o motivo de tudo. Ele me conforta para seguir em frente lutando sempre!

ABREVIATURAS E SIGLAS

µg/mL – micrograma por mililitro

µm – micrometro

µmol - micromolar

4-HNE – 4-hidroxinonenal

AAPH – 2,2'-Azobis (2-aminodiopropane) dihydrochloride

ANOVA – Análise de variância não paramétrico

C. aurantifolia – *Citrus aurantifolia* sp.

C57BL/10 – Camundongo C57Bl/10ScCr/PasUnib

CCDC – Cromatografia de Camada Delgada Comparativa

CDG – Complexo Distrofina Glicoproteína

CEEA-IB/UNICAMP - Comissão de Ética na Experimentação Animal – Instituto de Biologia /
Universidade Estadual de Campinas

Cels – células

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de
Laboratório - Unicamp

CG-EM – Cromatografia Gasosa Acoplada ao Detector de Massas

CO₂ – Dióxido de Carbono

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX-2 – Ciclo-oxigenase-2

DBV-IB/UNICAMP – Departamento de Biologia Vegetal – Instituto de Biologia/Universidade
Estadual de Campinas

DMD – Distrofia Muscular de Duchenne

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPBS – Di-Phosphate Buffered Saline

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EDTA – Edetato dissódico

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

GAPDH – Desidrogenase de Gliceraldeído 3-fosfato

GST – Glutathione S-transferase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido Clorídrico

hs – horas

IgG – Imunoglobulina G

IL-16 – Interleucina 16

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

iNOS- oxido nítrico sintase

Interferon- γ – interferon gama

kDa – kilodalton

MDA - Malondealdeido

Mdx – camundongo distrófico (Murine dystrophin X-linked – C57Bl/10Dmdmdx/PasUnib)

Mdx OE100 – camundongo mdx tratado com Óleo essencial de Lima destilada na concentração de 100 μ g/mL

MeOH – Metanol

mM – Milimol

mm – Milímetro

mRNA – RNA Mensageiro

MTT – [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]

NADPH-oxidase - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear kappa B

NO – Oxido Nítrico

O₂ – Oxigênio Singleto

OE100 – Óleo essencial de Lima destilada na concentração de 100 μ g/mL

OE50 – Óleo essencial de Lima destilada na concentração de 50 μ g/mL

OE60 – Óleo essencial de Lima destilada na concentração de 60 μ g/mL

OE70 – Óleo essencial de Lima destilada na concentração de 70 μ g/mL

OE80 – Óleo essencial de Lima destilada na concentração de 80 μ g/mL

OE90 – Óleo essencial de Lima destilada na concentração de 90 μ g/mL

ORAC_{FL} – Oxygen Radical Absorbance Capacity com fluoresceína como sonda fluorescente

PBS – Phosphate buffer saline
PGM – Proliferation Growth medium
PMSF – Phenylmethanesulfonyl fluoride
TACE – TNF-alpha-converting enzyme
TBS-T - Tris-Buffered Saline and Tween 20
TE – Trolox Equivalente
TNF- fator de necrose tumoral
U/ml – unidade por mililitro
IK – Índice de Kovats

1 INTRODUÇÃO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença muscular progressiva que atinge 1 a cada 3500 crianças do sexo masculino nascidas vivas, que normalmente leva o paciente ao óbito aos 20-30 anos de idade. É uma doença recessiva ligada ao cromossomo X, cuja alteração genética causa modificação do gene responsável pela codificação da proteína distrofina (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHBECK, 1994). A deficiência da distrofina e do complexo proteico a qual está integrada, denominado complexo distrofina-glicoproteínas (CDG), conduz a uma instabilidade sarcolemal, permitindo o influxo exacerbado de íons cálcio, o qual promove a ativação de proteases endógenas dependentes do cálcio, inibição da atividade mitocondrial e hipercontração da fibra muscular (CHAKKALAKAL et al., 2005). Além do nível elevado de cálcio intracelular, outros fatores também estão envolvidos na fisiopatologia da DMD, como o estresse oxidativo e a resposta inflamatória exacerbada (WHITEHEAD; YEUNG; ALLEN, 2006; DECONINCK; DAN, 2007).

No tratamento da DMD as estratégias farmacológicas têm como objetivo principal a diminuição do acometimento muscular, minimizando os prejuízos funcionais decorrentes da doença (PORTER et al., 2002). Atualmente, o tratamento mais utilizado para redução da resposta inflamatória excessiva no paciente distrófico é a administração de glicocorticóides. Entretanto, o uso prolongado desses medicamentos produz diversos efeitos colaterais, como ganho de peso, desenvolvimento de catarata e glaucoma, retardo no desenvolvimento ósseo e surgimento de osteoporose, decorrente da perda de osso trabecular, e alterações no metabolismo da glicose, com indução ou agravamento de quadro de diabetes (RICOTTI et al., 2013). Desta forma, é fundamental a busca por terapias alternativas que minimizem a evolução da doença e melhorem

a qualidade de vida dos pacientes distróficos e ao mesmo tempo apresentem menos efeitos colaterais do que os corticosteróides.

A literatura revela uma grande variedade de compostos químicos isolados de plantas medicinais usada na terapia de inúmeras doenças (CHIN et al., 2006). Dentre estas plantas, as aromáticas têm sido amplamente utilizadas desde os tempos antigos. As propriedades farmacêuticas destas plantas são parcialmente atribuídas aos óleos essenciais (EDRIS, 2007). As atividades terapêuticas dos óleos essenciais têm sido bastante estudadas (DANESI et al., 2008; CAMPÊLO et al., 2011a; CAMPÊLO et al., 2011b; TUNDIS et al., 2012). Recentes estudos, em modelos experimentais, demonstram que os óleos essenciais extraídos da espécie *Citrus* apresentam potencial efeito benéfico sobre doenças associadas ao estresse oxidativo e/ou inflamação (CAMPÊLO et al., 2011a; CAMPÊLO et al., 2011b).

Estudos preliminares realizados no laboratório de Produtos Naturais, Tecnologia Fitofarmacêutica e Bioensaios do Curso de Farmácia/DBV-IB/UNICAMP sugerem que o óleo essencial de *Citrus aurantifolia* apresenta potencial para ser explorado quanto à atividade antioxidante. Colaborando com esses resultados, recentes estudos, em modelos experimentais, demonstram que os óleos essenciais extraídos da espécie *Citrus* apresentam efeito benéfico sobre doenças associadas ao estresse oxidativo e/ou inflamação exacerbada (CAMPÊLO et al., 2011a; CAMPÊLO et al., 2011b). Outros trabalhos também já haviam relatado a atividade anti-inflamatória de óleos essenciais frente à inflamação no modelo de edema de pata induzido pela carragenina em ratos (OCETE et al., 1989; MARTIN et al., 1993). Em adição, estudo *in vivo* detectou efeito do óleo essencial de *Citrus aurantium* na regeneração muscular de camundongos *mdx* (De Souza et al., 2011).

Diante do exposto, levantamos a hipótese que o óleo essencial de *C. aurantifolia* pode

apresentar efeitos antioxidante e antiinflamatório e consequentemente constituir uma terapia alternativa e auxiliar para a DMD.

1.1 Distrofia Muscular de Duchenne

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) se destaca, dentre as distrofias musculares, por ser a mais comum e devastadora das distrofias musculares humanas, atingindo cerca de 1 a cada 3.500 indivíduos do sexo masculino nascidos vivos (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHBECK, 1994).

A DMD é uma doença degenerativa progressiva das fibras musculares que afeta músculos esqueléticos e cardíaco. Os primeiros sinais clínicos da doença manifestam-se ao redor dos quatro anos de idade através da dificuldade de caminhar e erguer-se de superfícies. Por volta dos cinco a seis anos, a doença evolui para a perda progressiva da musculatura, aumento do tecido conjuntivo fibroso intersticial e substituição das fibras musculares por tecido adiposo (SEIXAS et al, 1997), progredindo também para escoliose, incapacidade de locomoção e finalmente morte do paciente, que ocorre em geral por volta dos 20 anos de idade, frequentemente por broncopneumonia e/ou falência cardíaca (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHBECK, 1994).

É uma miopatia ligada ao cromossomo X, cuja anormalidade genética está presente no braço curto do cromossomo X (locus Xp21.1) responsável pela produção de uma proteína denominada distrofina. A distrofina é encontrada na face citoplasmática do sarcolema, ligada aos miofilamentos da fibra muscular e a um complexo de glicoproteínas da membrana. O complexo distrofina glicoproteínas (CDG) é constituído de proteínas sarcolemas e expresso em alta

concentração no músculo esquelético estriado (RANDO, 2001), que estabelece conexão do citoesqueleto intracelular com a matriz extracelular da fibra muscular (PETROF, 2002; SPENCER; MELLGREN, 2002). A falta de distrofina e de componentes do CDG prejudica esta conexão, interrompendo a ligação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto da fibra, promovendo a instabilidade do sarcolema durante os ciclos de contração muscular e relaxamento. Dessa forma, ocorre influxo exacerbado de íons cálcio, hipercontração miofibrilar, ativação de proteases endógenas e necrose da fibra muscular (BIGGAR et al., 2002; BOGDANOVICH et al., 2004).

Além do nível elevado de cálcio intracelular, outros fatores também estão envolvidos na fisiopatologia da DMD, como o estresse oxidativo e a resposta inflamatória exacerbada (WHITEHEAD; YEUNG; ALLEN, 2006; DECONINCK; DAN, 2007).

1.2 Espécies Reativas de Oxigênio e Distrofia Muscular de Duchenne

O estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio entre a formação e remoção de agentes oxidantes no organismo, decorrente da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou diminuição de antioxidantes endógenos.

O sistema antioxidante é composto por enzimas e substâncias protetoras não enzimáticas (ZWART et al., 1999). Algumas atuam reduzindo a velocidade de iniciação dos processos radicalares, suprimindo a geração de radicais livres, ou eliminando-os. Algumas enzimas, tais como a glutathione peroxidase e catalase, decompõem hidroperóxidos lipídicos e o peróxido de hidrogênio sem gerar radicais livres. Proteínas transportadoras de íons ferro e cobre, como a transferrina e a ceruloplasmina, atuam impedindo que estes metais catalisem reações oxidativas,

já os carotenóides e a enzima superóxido dismutase atuam suprimindo o oxigênio singlete (O_2) e catalisando a dismutação do ânion radical superóxido, respectivamente (FRIDOVICH, 1997). Os antioxidantes sequestradores captam os radicais rapidamente, inibindo a iniciação da cadeia radicalar e/ou interrompendo a propagação da mesma, doando um átomo de hidrogênio para formar um composto estável e um radical derivado do antioxidante. Esses antioxidantes podem ser hidrossolúveis ou lipossolúveis. Os compostos tais como ascorbato, urato, bilirrubina, albumina e componentes contendo grupamento tiol agem como antioxidantes hidrossolúveis, sendo capazes de sequestrar radicais livres somente no meio aquoso, não podendo sequestrar radicais lipofílicos localizados nas membranas celulares. Já o alfa-tocoferol é conhecido como um importante sequestrador de radicais lipossolúveis, protegendo as membranas celulares contra radicais lipofílicos (HALLIWELL, 1994). Os componentes do sistema de reparo são enzimas capazes de destruir proteínas danificadas por radicais livres, remover ácidos graxos oxidados presentes nas membranas e reparar lesões no DNA induzidas por radicais livres (HALLIWELL, 1994; SLUPPHAUG; KAVLI; KROKAN, 2003). Estes antioxidantes agem cooperativamente protegendo os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios das EROs.

Segundo a literatura, as EROs estão envolvidas na patogênese das distrofias musculares (MERCURI; MUNTONI, 2013; TERRIL et al., 2013). A primeira hipótese foi inicialmente baseada nas similaridades entre as mudanças patológicas que ocorrem nos músculos de pacientes distróficos e/ou no camundongo *mdx* (modelo experimental da distrofia muscular de Duchenne; BULFIELD et al., 1984) com as mudanças que ocorrem no músculo sob diferentes condições de estresse oxidativo, como isquemia, exercício físico intenso e deficiência de vitamina E (MENDELL; ENGEL; DERRER, 1971; IRINTCHEV; WERNIG, 1987; MURPHY; KEHRER, 1989). Foram observadas alterações bioquímicas no músculo distrófico que são características de

lesão oxidativa (MURPHY; KEHRER, 1989; HAUSER et al., 1995; HAYCOCK et al., 1996; RAGUSA; CHOW; PORTER, 1997). O aumento do estresse oxidativo na distrofia muscular de Duchenne é indicado por: aumento da excreção do 8-hidroxy-2'-deoxyguanosine, indicativo de lesão oxidativa no DNA (RODRIGUEZ; TARNOPOLSKY, 2003); alterações nas proteínas (NIEBROJ-DOBOSZ et al., 2002), indução de enzimas antioxidantes (MECHLER; IMRE; DIOSZEGHY, 1984) e acúmulo de lipofuscina no músculo distrófico (NAKAE et al., 2004). Outro ponto a ser destacado é que as células distróficas são especificamente mais sensíveis à lesão por estresse oxidativo do que células musculares normais (RANDO et al., 1998) e que tratamentos com antioxidantes apresentam efeito benéfico sobre as fibras musculares distróficas (WHITEHEAD et al., 2008; TONON et al., 2012).

A produção elevada de EROs no músculo distrófico pode ser justificada pelo acúmulo intracelular de íons cálcio, o qual conduz a uma captação anormal deste pela mitocôndria, resultando em produção elevada destas espécies (BROOKES 2004). Outra possibilidade de mecanismo de formação de EROs é através da NADPH-oxidase, a qual se tem conhecimento que produz rapidamente EROs durante o ciclo de relaxamento das células musculares lisas (GROTE et al., 2003). Recentemente, constatou-se a presença de subunidades de NADPH-oxidase no músculo estriado esquelético junto ao sarcolema (JAVESGHANI et al., 2002). Whitehead et al. (2006) sugeriram que este complexo enzimático pode ser regulado pela distrofina ou por outras proteínas do CDG. Desta forma, sua função pode estar alterada nos músculos distróficos, levando a uma maior produção de EROs.

Tradicionalmente, considera-se que os oxidantes exerçam seu efeito via ação tóxica direta sobre as células alvo. Contudo, estudos recentes têm sugerido sua contribuição na indução de genes, como por exemplo, na ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B (POWERS;

KAVAZIS; MCCLUNG, 2007). O fator NF- κ B pode promover o aumento da expressão de moléculas inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, moléculas de adesão e matriz metaloproteinase-9, as quais podem causar direta ou indiretamente perda muscular (REID; LI, 2001; SENFTLEBEN; KARIN, 2002); aumentar a atividade do sistema ubiquitina-proteassoma, o qual promove a degradação de proteínas musculares e promove perda muscular (LLOVERA et al., 1997; REID; LI, 2001) e/ou interferir no processo de diferenciação do músculo esquelético, o qual é requerido para o reparo do tecido lesado (GUTTRIDGE et al., 2000; LANGEN et al., 2001).

1.3 Resposta Inflamatória

A resposta inflamatória do tecido muscular se inicia previamente à morte das fibras musculares. Ela compreende uma série de eventos que envolvem a integração do sistema imunológico com o tecido lesado e sua finalidade é o reparo tecidual, para que a regeneração possa acontecer (PRISK; HUARD, 2003). As fibras musculares em degeneração liberam várias substâncias, dentre as quais se destacam as citocinas pró-inflamatórias, proteases, prostaglandinas, collagenases, fatores quimiotáticos e fatores de crescimento. As citocinas pró-inflamatórias e os fatores quimiotáticos estimulam o deslocamento de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, para local da lesão (TIDBALL, 2005; WEHLING-HENRICKS et al., 2005). Os neutrófilos e macrófagos liberam proteases que degradam os fragmentos celulares e fagocitam estes fragmentos, auxiliando na remoção dos mesmos do local da lesão. As proteases liberadas por estas células podem provocar danos ao tecido muscular

íntegro que circunda a lesão e assim aumentar a área da lesão, gerando aumento da resposta inflamatória local (para revisão ver TIDBALL, 2005; WEHLING-HENRICKS et al, 2005).

Em condições patológicas tais como nas miopatias e nas distrofias, além da lesão provocada pelo excesso do íon cálcio no interior das fibras musculares, a resposta inflamatória excessiva também pode promover mionecrose. A inibição das células inflamatórias pode diminuir a degeneração e a necrose do tecido muscular. Estudos utilizando antiinflamatórios mostram redução significativa da mionecrose em músculos esqueléticos de camundongos *mdx* (HODGETTS et al., 2006; RADLEY; GROUNDS, 2006).

Dentre os mecanismos moleculares envolvidos na resposta inflamatória na DMD e no camundongo *mdx*, destaca-se a via de sinalização do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- κ B) (KUMAR; BORIEK, 2003).

O fator NF- κ B foi descrito em 1986 como um fator nuclear que, uma vez ativado por agentes como lipopolissacarídeos, possui a capacidade de ligar-se a uma sequência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo das células B (κ B) (JACKMAN; KANDARIN, 2004). Existem cinco proteínas pertencentes à família do NF- κ B que podem formar complexos homo ou heterodiméricos estáveis, são elas: RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50) e NF- κ B2 (p52). A dimerização de duas dessas proteínas é necessária para ativação da interação proteína-DNA. O dímero predominantemente ativado no músculo esquelético é o heterodímero p50-65. Para que ocorra a ativação do NF- κ B é necessário que haja um sinal para a degradação proteolítica da proteína inibidora I- κ B, que libera o complexo p65-p50, permitindo sua translocação do citoplasma para o núcleo, onde ele se liga a regiões promotoras específicas e promove a transcrição de genes que codificam uma série de

mediadores inflamatórios, tais como citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e enzimas induzíveis (iNOS e COX-2) (YOSHIMURA, 2006; JANSSEN-HEININGER; POYNTER; BAEUERLE, 2000).

Além disso, NF- κ B p65 contém um domínio pós-transcricional terminal-COOH que é crucial para sua capacidade de ativação da expressão dos genes inflamatórios (YAMAMOTO; GAYNOR, 2004). Independente do estímulo, parece haver participação das EROs e do aumento de cálcio intracelular para ativação do NF- κ B. Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a I- κ B (GLEZER et al., 2003).

O NF- κ B regula a expressão de genes envolvidos nas respostas inflamatória e imunológica, aumentando a taxa de transcrição destes genes, com consequente síntese de mRNA e proteínas. Apresenta papel importante na produção de mediadores pró-inflamatórios (citocinas, enzimas, receptores imunes e moléculas de adesão), além de iniciar a transcrição de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-2 e IL-6 (CELEC, 2004).

Estudos mostram elevação expressiva do nível de TNF- α nos músculos de pacientes distróficos e dos camundongos *mdx* (GROUNDS et al., 2008; TONON et al., 2012; de SENZI et al., 2013). Tem sido proposto que o aumento exacerbado de TNF- α conduz a degeneração muscular nas fibras distróficas (HODGETTS et al., 2006; RADLEY; GROUNDS, 2006). Considera-se também que o TNF- α é um dos mais importantes indutores de NF- κ B, contribuindo para um feedback positivo (MESSINA et al., 2006).

O TNF- α foi descrito em 1975 e inicialmente foi nomeado como caquexina, devido seu potente efeito citotóxico contra células tumorais. É uma citocina pró-inflamatória que atua na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e na infecção. É um polipeptídeo trimérico (17 kDa), liberado por macrófagos, mastócitos, pelas próprias miofibrilas lesadas, além de outras

células (RADLEY; GROUNDS, 2006). O TNF- α é produzido a partir da forma não-clivada do TNF- α de 26 kDa associada a membrana pela TNF-alpha-converting enzyme (TACE). Pode atuar em quase todo o tipo de células nucleadas, através de dois tipos de receptores de membrana, tipo I (RTNF-1, p55) e tipo II (RTNF-II, p75). Estudos demonstram a presença de ambos os tipos de receptores, tanto no músculo esquelético (FIGUERAS et al., 2005), como cardíaco (ANKER; VON HAEHLING, 2004). Quando o TNF- α de 17 kDa se liga ao RTNF-1, pode levar a apoptose celular ou a ativação de NF- κ B presente no citoplasma que por sua vez se desloca para o núcleo da célula e ativa a transcrição de genes pró-inflamatórios e de proteínas pró-apoptóticas.

1.4 Plantas medicinais

A literatura revela uma grande variedade de compostos químicos isolados de plantas medicinais usada na terapia de inúmeras doenças. Dentre estas plantas, as aromáticas têm sido amplamente utilizadas desde os tempos antigos. As propriedades farmacêuticas destas plantas podem estar relacionada a presença de óleos essenciais (EDRIS, 2007). Os óleos essenciais são constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância de muitas plantas e podem ser obtidos de flores, folhas, frutos, sementes, raízes, rizomas e caules das plantas (COSTA, 1994). As atividades terapêuticas dos óleos essenciais têm sido bastante estudadas (DANESI et al., 2008; CAMPÊLO et al., 2011a; CAMPÊLO et al., 2011b; TUNDIS et al., 2012).

Dentre as várias espécies medicinais que vem sendo estudadas pelo laboratório de Produtos Naturais, Tecnologia Fitofarmacêutica e Bioensaios do Curso de Farmácia/DBV-IB/UNICAMP as espécies *Citrus* (família Rutaceae), popularmente conhecido como laranja-

amarga ou laranja-azeda (SANTOS, TORRES; LEONART, 1988; SANGUINETTI, 1989; VIEIRA, 1992), são espécies vegetais bastante empregadas para usos medicinais (CORRÊA, 1978), onde suas partes mais utilizadas para fins medicinais são as cascas dos frutos, flores e folhas. Estas plantas são utilizadas popularmente para o tratamento de distúrbios do trato gastrointestinal, além de apresentar ação diurética, antiespasmódica e anti-taquicárdica (SANTOS, TORRES; LEONART, 1988; SANGUINETTI, 1989; VIEIRA, 1992; CORDEIRO; NUNES; ALMEIDA, 1996). Recentes estudos, em modelos experimentais, demonstram que os óleos essenciais extraídos *Citrus* apresentam potencial efeito benéfico sobre doenças associadas ao estresse oxidativo e/ou inflamação exacerbada (CAMPÊLO et al., 2011a; CAMPÊLO et al., 2011b). A atividade anti-inflamatória de óleos essenciais pode ser atribuída não apenas as suas atividades antioxidante, mas também devido a interações com as cascatas de sinalização envolvendo citocinas e transcrição de fatores reguladores da expressão de genes pró-inflamatórios (MIGUEL, 2010).

A atividade antioxidante dos óleos essenciais é outra propriedade biológica de grande interesse, porque eles podem conservar alimentos contra os efeitos tóxicos dos oxidantes (MAESTRI et al., 2006). Além disso, os óleos essenciais, também são capazes de eliminarem radicais livres, podendo desempenhar um papel importante na quimioprevenção de doenças degenerativas, tais como disfunções cerebrais, câncer, doenças cardíacas e do sistema imunológico. Os autores sugerem que estas doenças podem resultar em danos celulares causados pelos radicais livres (ARUOMA 1998; KAMATOU; VILJOEN 2010).

A capacidade dos óleos essenciais em sequestrar alguns radicais livres, pode também apresentar relação com seu potencial efeito como agentes anti-inflamatórios, porque processos oxidativos participam das respostas inflamatórias que ocorre em diversas células (monócitos,

neutrófilos, eosinófilos e macrófagos).

Ocete et al. (1989) e Martin et al. (1993), avaliaram a atividade dos terpenos α -pineno e β -cariofileno frente à inflamação em edema de pata induzido pela carragenina em ratos e concluíram que os óleos essenciais constituídos com esses terpenos apresentaram atividade inibitória sobre a formação de edema, podendo ser útil no controle do processo inflamatório exacerbado.

A caracterização fitoquímica do óleo essencial obtido por hidrodestilação das cascas do fruto de *Citrus aurantium* L. (família Rutaceae), (parte mais utilizada na etnofarmacologia desta espécie) apontou a presença de três constituintes majoritários: d-limoneno (97,8%), mirceno (1,43%) e octanal (0,45%) (MORAES et al., 2009).

Singh et al. (2010) estudaram quimicamente por CG-EM os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação a partir das folhas frescas de *Citrus máxima* identificando como constituintes majoritários β -pineno (3,71%), β -mirceno (0,90%), α -limoneno (31,83%), Z-citral (13,38%) e E-citral (17,75%) e das cascas de *Citrus sinensis* onde α -limoneno (90,66%) e β -mirceno (1,71%) foram os constituintes majoritários detectados. Estes óleos essenciais apresentaram promissora atividade antioxidante no ensaio com o radical DPPH com valores de IC₅₀ de 8,84 e 9,45 μ L/mL para os óleos de *C. sinensis* e *C. maxima*, respectivamente.

O óleo essencial de *Citrus aurantifolia* é conhecido por aliviar dores de estômago e tosse e também é usado como inseticida (AIBINU et al., 2007). O óleo essencial de Lima destilada (Ferquima®, CAS Number: 90063-52-8) obtido por destilação a vapor do óleo prensado a frio dos frutos de *C. aurantifolia* apresenta aproximadamente 45% de limoneno, 10% de α -terpineol, 5% de γ -terpineno e 5% de terpinoleno (FERQUIMA, 2013). Razzaghi-Abyaneh et al., 2009, reportam como constituintes químicos majoritários do óleo essencial obtido por hidrodestilação

das folhas frescas de *C. aurantifolia* os terpenos pineno (1,5%), sabineno (1,4%), mirceno (1,8%), telineno (2,4%) e limoneno (85,5%). Estudos anteriores documentados na literatura já demonstraram atividade do óleo essencial puro e de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *C. aurantifolia* contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (óleo essencial é mais eficaz que o extrato aquoso e hidroalcoólico) e *Shigella flexnerii* (extrato aquoso é mais eficaz). O mesmo estudo demonstrou atividade anti-fúngica do óleo essencial frente à *Candida spp.* e *Aspergillus niger* (AIBINU et al., 2007). O óleo essencial de *C. aurantifolia* também é eficaz contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sp.* e *Proteus mirabilis* (EBANA et al., 1991). A atividade do óleo de *C. aurantifolia* contra algumas bactérias associadas à formação da placa bacteriana na cárie dentária já foi comprovada anteriormente, sendo este óleo bioativo frente às indicadoras: *Streptococcus mutans*, *L. acidophilus*, *A. viscosus*, *P. aeruginosa*, *V. alcaligenes*, *N. asteroides* e *Staphylococcus aureus*. O mesmo estudo demonstrou prevalência de *S. mutans* entre colônias isoladas de cárie dentária (OWHE-UREGHE; EHWARIEME; EBOH, 2010).

Gerhäuser et al. (2003) e Wei; Shibamoto (2007) demonstraram que d-limoneno possui comprovada ação antioxidante ao inibir a expressão das espécies reativas ao oxigênio (EROs) em ensaios *in vitro*. van Lieshout et al., (1998) demonstraram que o d-limoneno foi capaz de aumentar os níveis de glutathione S-transferase (GST), enzima com atividade antioxidante e anticâncer. Souza et al. (2003) e Toro-Arreola et al. (2005) comprovaram que a atividade imunorreguladora do d-limoneno é decorrente de uma redução da reação de hipersensibilidade e também da inibição da produção de óxido nítrico (NO) e das citocinas inflamatórias (IL-4 e interferon- γ). O limoneno também tem comprovada atividade antiasmática, pois diminuiu o

infiltrado inflamatório periovascular e periobronquiolar em ratos asmáticos (KEINAN et al., 2005).

No tratamento da DMD as estratégias farmacológicas têm como objetivo principal a diminuição do acometimento muscular, minimizando os prejuízos funcionais decorrentes da doença (PORTER et al., 2002). Os antiinflamatórios corticosteróides são os fármacos mais utilizados na tentativa de minimizar a evolução da doença. Porém seus efeitos colaterais são severos (PARREIRA et al., 2007; RADLEY et al., 2007; MANZUR et al., 2008). Desta forma, é fundamental a busca por terapias alternativas que minimizem a evolução da doença e melhorem a qualidade de vida dos pacientes distróficos e ao mesmo tempo apresentem menos efeitos colaterais do que os corticosteróides.

Diante do exposto, levantamos a hipótese que o óleo essencial de *C. aurantifolia* pode apresentar potencial efeito antioxidante e antiinflamatório e conseqüentemente constituir uma terapia alternativa e auxiliar para a DMD.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo traçar o perfil químico do óleo essencial de *C. aurantifolia* (Lima destilada) e avaliar seus efeitos anti-inflamatório e antioxidante sobre células musculares distróficas de camundongos *mdx*.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar por CG-EM os constituintes voláteis presentes no óleo essencial de *C. aurantifolia* obtido a partir de prensagem a frio da casca dos frutos, seguido de destilação a vapor, comercializado sob o nome de Lima destilada;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* (ensaio autográfico em CCDC para DPPH e ensaio ORAC_{FL}) do óleo essencial de *C. aurantifolia*;
- Analisar a viabilidade celular (Vermelho Neutro, Trypan Blue e MTT) em culturas primárias de células musculares distróficas tratadas com o óleo essencial de *C. aurantifolia*;
- Determinar o conteúdo de TNF- α , NF- κ B e 4-HNE em culturas primárias de células musculares distróficas tratadas com o óleo essencial de *C. aurantifolia*;
- Proceder à análise de H₂O₂ nas culturas primárias de células musculares distróficas tratadas com o óleo essencial de *C. aurantifolia*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Avaliação Química

3.1.1 Óleo essencial

O óleo essencial de *C. aurantifolia* (Rutaceae) utilizado no estudo foi adquirido comercialmente da indústria Ferquima[®] (Ferquima Indústria e Comércio Ltda., Brasil) em outubro de 2012, lote 199. Foi utilizada amostra do óleo essencial de *C. aurantifolia* que consiste no óleo obtido a partir de prensagem a frio da casca dos frutos desta espécie vegetal, seguido de destilação a vapor, comercializado sob o nome de Lima destilada (Ferquima[®], CAS Number: 90063-52-8).

3.1.2 Análise dos constituintes voláteis presentes e perfil químico por CG-EM

O óleo essencial de *C. aurantifolia* foi submetido à caracterização química utilizando a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM), determinando-se a porcentagem relativa dos constituintes majoritários presentes na amostra.

As análises por CG-EM (70 eV) foram realizadas em equipamento Shimadzu equipado com uma coluna capilar Durabond-DB5 (30m x 0,25mm x 0,25mm) e operado de acordo com metodologia descrita por Stefanello e colaboradores (2008): temperatura inicial da coluna de 60°C por 3min. e, em seguida, uma rampa de 60-220°C com aumento de 5°C/min e depois mantido em isoterma a 220°C por 5 min. O gás de arraste foi o hélio (1mL/min) e a temperatura

do injetor foi de 250°C. As análises foram realizadas no modo de injeção split 1:20 (v/v). Os componentes do óleo essencial foram identificados por comparação de seus índices de retenção (em relação aos n-alcenos) e os espectros de massas por comparação com aqueles encontrados na literatura (ADAMS, 2007) e armazenados no banco de dados do espectrômetro (NIST-05, Versão 2.0). Amostras-padrão comerciais dos constituintes majoritários detectados nos óleos essenciais analisados (limoneno, p-cimeno, α -terpineol) foram utilizadas para confirmação da identificação desses constituintes, empregando o método de co-injeção com as amostras-padrão.

3.1.3 Ensaio para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Na avaliação antioxidante *in vitro* foram utilizados os ensaios como descritos por Pascoal et al., (2011 a,b):

Ensaio autográfico de CCDC para DPPH (sequestrador de radical)

Amostra de 10 μ l do óleo essencial de *C. aurantifolia* (diluição de 1:250 (v/v) em metanol) foi aplicada em placas de CCDC (silica gel 60 GF254, Fluka, AG, Switzerland). A seguir, estas placas foram pulverizadas com uma solução a 0,2% de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) em MeOH e deixadas à temperatura ambiente. Os constituintes ativos presentes na amostra foram observados como manchas amarelas em um fundo roxo após 30 minutos da pulverização em exposição da cromatoplaça a luz ambiente. A atividade sequestradora de radical DPPH foi atribuída como "forte" (amostras que produziram uma zona brilhante amarela intensa), "média" (amostras que produziram uma mancha de cor amarela clara), "fracas" (amostras que produziram apenas uma mancha fracamente visível

amarela) e "não ativa" (amostras que produziram nenhum sinal de qualquer mancha amarela) (CAVIN et al., 1998).

Ensaio ORAC_{FL}

A capacidade antioxidante dos extratos e frações foi mensurada utilizando-se o ensaio ORAC_{FL} com fluoresceína como sonda fluorescente e AAPH (2,2'-Azobis (2-amidiopropane) dihydrochloride) como fonte de radical livre. Os experimentos foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços de acordo com metodologia descrita por Prior et al. (2003) e com modificações de Salvador et al. (2006). Para tanto foram preparadas soluções estoques do óleo essencial (50mg/mL) e amostras-padrão (1mg/mL) em tampão fosfato/DMSO (99:1, v/v) e diluídas 100, 500, 1000, 5000 e 10000 vezes com tampão fosfato (pH 7,4). O Trolox (substância de referência (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) - análogo da vitamina E) foi analisada na concentração de 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 µM, empregando-se o mesmo sistema diluente. A leitura foi realizada utilizando-se filtro fluorescente (excitação $\lambda=485\text{nm}$ e emissão $\lambda=528\text{nm}$) em leitor de microplaca monitorando a cinética de reação a cada 2 min por um período de 70 min (temperatura=37°C). Os resultados foram expressos como µmol de Trolox equivalente (TE) por grama de extrato ou de substancia padrão em base seca (µM de TE/g). Como controle positivo foram utilizados Oxido de cariofileno, (E)-cariofileno, limoneno e quercetina e como controle negativo a solução diluente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2 Avaliação dos efeitos anti-inflamatório e antioxidante em cultura muscular primária distrófica

3.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos *mdx* e como controle camundongos da linhagem C57BL/10 [camundongos heterozigotos para o gene que desencadeia a DMD e que deram origem à linhagem *mdx* (BULFIELD et al., 1984)], de ambos os sexos, com 28 dias de vida pós-natal, obtidos de casais mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia. As matrizes foram oriundas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Após o nascimento, os filhotes permaneceram com a fêmea até o dia da eutanásia. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas com 12 horas de ciclo claro/escuro, ração e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa-IB/UNICAMP; nº 3168-1).

3.2.2 Protocolo Experimental

Para a realização da cultura primária de células musculares foram utilizados os músculos do membro pélvico (quadríceps femoral, tibial anterior, extensor longo dos dedos, gastrocnêmio, sóleo e plantar) de 10 camundongos de cada uma das linhagens (C57BL/10 e *mdx*) com 28 dias de vida. Os animais foram eutanasiados com super-dosagem de uma solução de cloridrato de

xilazina 2% (*Vyrbaxyl*, *Virbac*) e cloridrato de quetamina (*Francotar*, *Virbac*) na proporção de 1:1 (intra-peritoneal) e rapidamente os músculos foram isolados em DPBS (pH 7,2). contendo glicose 1% (p/v) e penicilina 1% (w/v). Durante 10 min. o tecido muscular foi triturado (com o auxílio de uma tesoura) e a suspensão digerida com collagenase II 1,5% (w/v), tripsina 2,5% (w/v) e DNase 0,1% (w/v) em DMEM contendo glicose 1% (w/v) e penicilina 1% (w/v) a 37°C por 30 min. DMEM (15mL) contendo soro de cavalo 10% (v/v), soro fetal bovino 10% (v/v), L-glutamina 2mM e penicilina 1% (v/v) foi adicionado (meio de crescimento). A suspensão foi centrifugada a 1000rpm, a 4°C por 20 min. e o sobrenadante descartado. 20 mL do meio de crescimento foram novamente adicionados, a suspensão foi filtrada através de um filtro esterelizado com poros de 50 µm e as células foram sedimentadas em placas de 6wells de 13mm cobertos com matrigel 0,1% (w/v) por (incubadas CO₂, 37°C, 24 hs) a uma densidade de 6x10⁴ células por prato. Entre 48-72 hs após o início da preparação das culturas, o meio de crescimento foi alterado para meio de fusão contendo soro de cavalo 10% (v/v) e L-glutamina 2mM (LYNGE; JUEL; HELLSTEN, 2001; SILVEIRA et al., 2006). A partir da confluência entre o 5° ou 6° dias, as culturas de células foram tratadas ou não com óleo essencial de *Citrus aurantifolia*.

3.2.3 Tratamentos

Após o período de diferenciação (5 ou 6 dias), as células foram tratadas por 24hs com 50, 60, 70, 80, 90 e 100µg/ml com óleo essencial de *Citrus aurantifolia* diluído em solução aquosa 0,5% de Tween 80, para verificar o nível de toxicidade do óleo. Células não tratadas e tratadas com Tween foram usadas como controle.

3.2.4 Análise da viabilidade celular

A viabilidade das células musculares distróficas (*mdx*) e controle (C57BL/10) não tratadas e tratadas com 50, 60, 70, 80, 90 e 100µg/ml de óleo essencial de *Citrus aurantifolia* foi avaliada através de 3 parâmetros: marcação do Trypan Blue, redução do MTT e ensaio de incorporação do Vermelho Neutro. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Vermelho Neutro

É uma análise colorimétrica para quantificação de permeabilidade de membrana e atividade lisossômica de células em resposta ao medicamento utilizado. É um ensaio de sobrevivência/viabilidade celular, baseado na capacidade das células viáveis de incorporar o vermelho neutro dentro dos lisossomos (MELO 1996). A quantidade de corante incorporado às células é medida por espectrometria, a 540nm, que corresponde diretamente ao número de células com membrana intacta. Procedimento: Após os devidos tratamentos as placas foram retiradas da incubadora, todo o meio das células foi retirado e adicionado uma quantidade igual de solução (25:1 de DMEM + Vermelho Neutro), em seguida foi incubada por 3 horas na incubadora de CO₂ 5% a 37°C. Após 3 horas as células foram lavadas com PBS (pH 7,2) e em seguida lavada com uma solução de 1% CaCl₂ em Formaldeído 0,5%, após lavagem, foi adicionada solução de 1% ácido acético em etanol 50%. As placas foram delicadamente agitadas e colocadas no aparelho Sinergy para leitura por espectrofotômetro a 540nm. As amostras foram feitas em triplicatas.

Trypan Blue

Para a determinação da viabilidade celular, após o tratamento proposto foi utilizado reagente Trypan Blue (Sigma T6146). Procedimento: Após serem tratadas por 24hs as células foram lavadas 2x em PBS, ressuspensas por solução de tripsina (1:10) e deixadas por 3 min. na estufa de CO₂. Em seguida foi adicionado 500µl de PGM imediatamente, e todo o conteúdo foi transferido para um tubo eppendorf (2mL), para centrifugação em 5min. a 200g. O sobrenadante foi descartado e o conteúdo celular novamente foi homogeneizado em PGM e centrifugado 5min. Após descartar o sobrenadante, o conteúdo celular foi diluído (1:10) em solução de Trypan Blue 0,4%, e uma quantidade foi pipetada na câmara de Neubauer para contagem de células viáveis e não viáveis para proceder-se com o seguinte cálculo:

Viabilidade Celular (%) = total de células viáveis (não coradas) ÷ total de células (coradas e não coradas) X 100.

MTT

Na análise colorimétrica para quantificação de metabolismo mitocondrial e atividade da cadeia respiratória de células em resposta ao medicamento foi utilizado o método MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide].

O método é baseado na redução do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] a formazan (SIEUWERTS et al., 1995). Procedimento: Para este

experimento as células após serem tratadas, foram incubadas em DMEM sem fenol vermelho e em seguida foi adicionada 500µl de solução MTT (SIGMA M5655) equivalente a 10% do volume de meio celular. E novamente as células retornaram para a incubadora e permaneceram por 3-4 horas. Após incubação, todo o meio foi retirado e foi adicionada uma quantidade igual de solvente MTT (30ml isopropanol : 100µl HCl 37% P.A). A leitura foi realizada medindo absorbância em 570nm, utilizando o equipamento Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy H1M (Bio-Tek Instruments). As amostras foram feitas em triplicatas.

3.2.5 Quantificação do conteúdo de TNF- α , NF- κ B e 4-HNE nas células musculares (Western Blotting)

Após o tratamento das culturas celulares, o meio foi removido e as células musculares foram imediatamente lavadas com PBS (pH 7,2), raspadas e homogeneizadas em 0,5 ml de tampão para homogeneização (Triton X-100 1%, tris-HCl 100mM (ph 7,4), pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, ETDA 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1mg/ml de aprotinina). Os extratos obtidos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi utilizado para análise do extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método de BRADFORD (1976). As amostras do extrato protéico foram tratadas com 50% tampão Laemmli (azul de bromofenol 0,1% e fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditiotreitol 100Mm e aquecidas à 95-100°C em banho seco por 5 minutos. Em seguida, 30 µg de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida a 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90

minutos a 120V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução basal (Trisma base 10mM, cloreto de sódio 150mM e Tween-20 0,02%) contendo 5% de leite desnatado, por 2 horas em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com 10 μ g (20 μ L) de anticorpo primário: anticorpo policlonal anti-TNF- α , (Chemicon); e/ou anticorpo policlonal anti-NF- κ B, (p65, Santa Cruz Biotechnology); e/ou anticorpo policlonal anti-4HNE, (Santa Cruz Biotechnology) diluído em 10ml de solução basal contendo 3% de leite desnatado a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10ml de solução basal contendo 1% de leite desnatado e 2,5 μ g de anticorpo secundário (anti-mouse IgG Peroxidase; e/ou anti-rabbit IgG Peroxidase; e/ou anti-goat IgG Peroxidase) por duas horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal. Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescent, Pierce) por 5 minutos, seguidas de exposição no equipamento G-BOX (Syngene) acoplado a um microcomputador *Intel Pentium4*. As densidades das bandas e das amostras foram “salvas” no computador para quantificação, usando o programa GeneTool do próprio equipamento G-BOX para quantificação.

Para a normalização dos dados obtidos foi realizado o controle interno através da incubação das amostras com o anticorpo GAPDH (FL-335, rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology;). O protocolo consiste na reutilização das membranas utilizadas para detecção do TNF- α , NF- κ B, e/ou 4HNE. Para tanto, as referidas membranas foram lavadas com TBS-T (solução basal) 3 vezes, por 10 minutos. Em seguida, foram incubadas com 10 mL de *Stripping Buffer* (10mM Tris-HCl pH 7.5; β -Mercaptoethanol 0.1M; Uréia 8M) durante 1 hora, à

60°C. Após esse período, as membranas foram re-equilibradas e lavadas com TBS-T. A seguir foram incubadas com 10µg do anticorpo primário GAPDH e 2,5µg do anticorpo secundário (goat anti-rabbit IgG Peroxidase labeled), seguindo o protocolo acima descrito.

3.2.6 Detecção H₂O₂ nas células musculares

Após o tratamento por 24hs as células foram mantidas a 37° C em solução Krebs Ringer (500mL) e carregadas com a sonda *Amplex red* (50µM) e horseradish peroxidase (0,1U/mL) por 30 min. Durante este período, as placas foram protegidas da luz (embaladas com papel alumínio). Após este período, 100 µL do meio foi coletado e inserido em placa escura (preta) e a intensidade de fluorescência determinada em 530nm de excitação e 590nm de emissão em equipamento Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy H1M (Bio-Tek Instruments). Para o controle positivo foi utilizado 20 mM de H₂O₂ em solução tampão. No controle negativo foi utilizado somente solução tampão. Foram realizadas análises em triplicata.

3.2.7 Análise Estatística

Para análise dos resultados dos experimentos *in vitro* (cultura celular) foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0. A partir do programa foi executada o teste ANOVA (one way), e quando este resultou em um valor de $p < 0,05$, diferenças estatisticamente significativa foram identificadas pelo procedimento para comparação múltipla de Tukey (Tukey HSD, de Honestly Significant Difference).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do perfil químico do óleo por CG-EM.

A análise por CG-EM foi realizada utilizando uma coluna Durabond-DB5. Como mostrado na Tabela 1, foi possível identificar vinte e quatro constituintes (93% dos constituintes voláteis) no óleo essencial de *C. aurantifolia*, que consiste no óleo obtido a partir de prensagem a frio da casca dos frutos desta espécie vegetal, seguido de destilação a vapor, comercializado com a denominação de óleo essencial de Lima destilada pelo Fabricante Ferquima® (Figura 1). O óleo essencial apresentou como compostos majoritários: limoneno (42,60%), cimeneno (11,80%), α -terpineol (11,76%), terpinoleno (5,30%) e γ -terpineno (4,63%). A identificação dos constituintes químicos foi feita por análise comparativa dos espectros de massas com os dados espectrais da biblioteca eletrônica do sistema CG/EM (NIST-05, Versão 2.0) e com base nos índices de retenção dos analitos calculados pela co-injeção de uma mistura de padrões de hidrocarbonetos (C-8 a C-22), sendo estimados os seus índices de Kovats e comparados com dados encontrados na literatura (ADAMS, 2007).

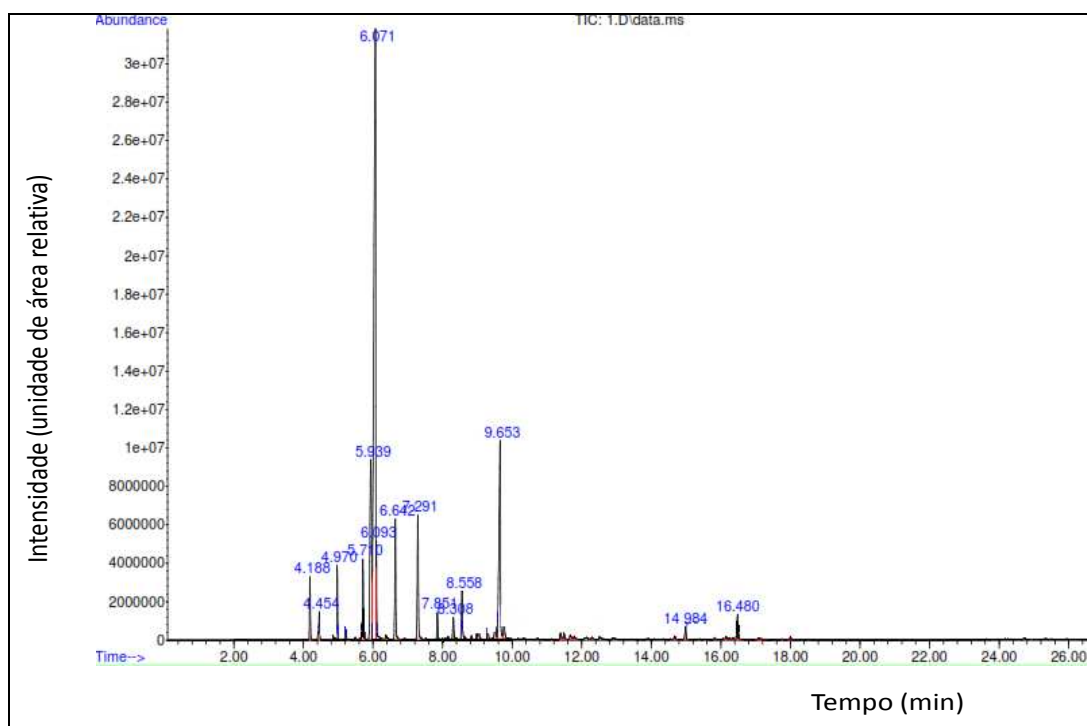


Figura 1: Cromatograma do óleo essencial de *Citrus aurantifolia* (Lima destilada), após análise por Cromatografia Gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM).

Tabela 1: Constituintes químicos identificados por CG/EM no óleo essencial de *Citrus aurantifolia* (Lima destilada)

Constituinte	RT (min) ^a	% área ^b	IK calculado ^c	IK Literatura ^d
α-pineno	4,188	1,95	934	932
canfeno	4,454	1,12	949	946
sabineno	4,900	0,05	974	969
β-pineno	4,970	2,40	978	974
mirreno	5,209	0,52	992	988
α-felandreno	5,493	0,11	1006	1002
3-careno	5,618	0,05	1012	1008
isocineol	5,710	3,50	1016	1012
para-cimeno	5,939	11,8	1027	1020
limoneno	6,071	42,6	1033	1024
eucaliptol	6,093	2,31	1034	1026
γ-terpineno	6,642	4,63	1060	1054
terpinoleno	7,291	5,30	1090	1086
exo-fenchol	7,851	1,05	1116	1118
1-terpineol	8,308	0,99	1136	1130
cis-β-terpineol	8,982	0,23	1166	1140
borneol	9,037	0,52	1168	1165
Terpineno-4-ol	9,299	0,60	1180	1174
α-terpineol	9,653	11,8	1195	1186
γ-terpineol	9,767	0,87	1200	1199
cariofileno	14,675	0,21	1424	1417
trans-α-bergamoteno	14,984	0,63	1439	1432
β-bisaboleno	16,351	0,08	1505	1505
óxido de cariofileno	17,998	0,16	1589	1582
Total identificado		93,5%		

Notas: As substâncias estão listadas em ordem de eluição de uma coluna Durabond-DB5. Identificação dos constituintes químicos foi feita por análise comparativa dos espectros de massas com os dados espectrais publicados na biblioteca eletrônica do sistema CG/EM (NIST-05, Versão 2.0, nível de qualidade acima de 90%) e com base nos índices de retenção dos analitos. **RT.** tempo de retenção na coluna Durabond-DB5. **% área.** porcentagem da área do constituinte em relação a área total. **IK calculado.** índice de Kovats calculado através de n-alcanos (C8 – C20) na coluna Durabond-DB5. **IK Literatura** índice de Kovats encontrados na literatura (ADAMS, 2007).

4.2 Atividade antioxidante *in vitro*

As atividades antioxidantes do óleo essencial de Lima destilada foram determinadas pelos métodos de ensaio autográfico de CCDC para DPPH (sequestrador de radical) utilizando solução de DPPH em etanol e por ORAC_{FL} e os resultados da atividade antioxidante do óleo essencial de Lima destilada e das amostras-padrão de óxido de cariofileno, cariofileno, limoneno e quercetina, estão resumidos na Tabela 2.

No ensaio ORAC_{FL} (ensaio direto, baseado em mecanismos de transferência de hidrogênio), o resultado obtido para o óleo essencial foi $950,34 \pm 4,10 \mu\text{mol} / \text{TE g}^{-1}$, enquanto na análise por CCDC (ensaio indireto, baseado em mecanismos de transferência de elétrons) do óleo essencial na diluição de 1:250 (v/v) em metanol, produziu uma mancha amarela intensa quando revelado com solução metanólica a 0,2% de DPPH, devido a redução do radical DPPH, indicando atividade antioxidante em ambos os métodos direto e indireto. O óleo essencial mostrou considerável atividade antioxidante, com resultados similares ao das substâncias de referência utilizadas, incluindo a de constituintes majoritários do óleo de Lima destilada como o terpenóide Limoneno que apresenta relatos de atividade antioxidante documentados em literatura (ROBERTO et al., 2010). Segundo Roberto et al. (2010) e Dugo e Mondello (2010) o Limoneno tem efeito antioxidante por diminuir o nível de H₂O₂ e aumentar a atividade da catalase.

Tabela 2: Capacidade antioxidante do óleo essencial de *Citrus aurantifolia* (Lima destilada).

Óleo Essencial / Controle Positivo	ORAC _{FL} ^(a) ($\mu\text{mol} / \text{TE g}^{-1}$) ^(b)	DPPH ^(c)
Óleo essencial de Lima destilada	950,30 $\pm$ 4,10	forte
Oxido de cariofileno ^(d)	1202,50 $\pm$ 1.80	forte
(<i>E</i>)-cariofileno ^(d)	1080,00 $\pm$ 3.20	forte
Limoneno ^(d)	1280,00 $\pm$ 1.20	forte
Quercetina ^(d)	5200,00 $\pm$ 0.90	forte

^(a) Média (% DPR, desvio padrão relativo) dos ensaios em triplicata. ^(b) dados de ORAC_{FL} expressos como μmol de Trolox equivalente por grama de óleo essencial (μmol de ET g^{-1}). ^(c) Resultado da atividade antioxidante qualitativa no ensaio em CCDC utilizando solução metanólica a 0,2% do radical DPPH como sistema revelador e amostras testes na diluição de 1:250 (v/v) em metanol, sendo a atividade sequestradora de radical DPPH foi atribuída como "forte" (amostras que produziram uma mancha amarela intensa), "média" (amostras que produziram uma mancha de cor amarela clara), "fracas" (amostras que produziram apenas um fracamente visível mancha amarela) e "não ativa" (amostras que produziram nenhum sinal de qualquer mancha amarela) (CAVIN et al., 1998; TAKAMATSU et al., 2003). ^(d) Substancias utilizadas como controle positivo.

4.3 Análise da viabilidade celular

Vermelho Neutro

Na avaliação da citotoxicidade celular utilizando o corante Vermelho Neutro, verificou-se que os grupos experimentais *mdx* e controle (C57BL/10) com as concentrações de 50, 60 e 70 $\mu\text{g/ml}$ de óleo essencial apresentaram viabilidade celular acima de 94% (**Gráfico 1**). Os grupos experimentais com as concentrações de 80, 90 e 100 $\mu\text{g/ml}$ apresentaram viabilidade acima de 180% (**Gráfico 1**).

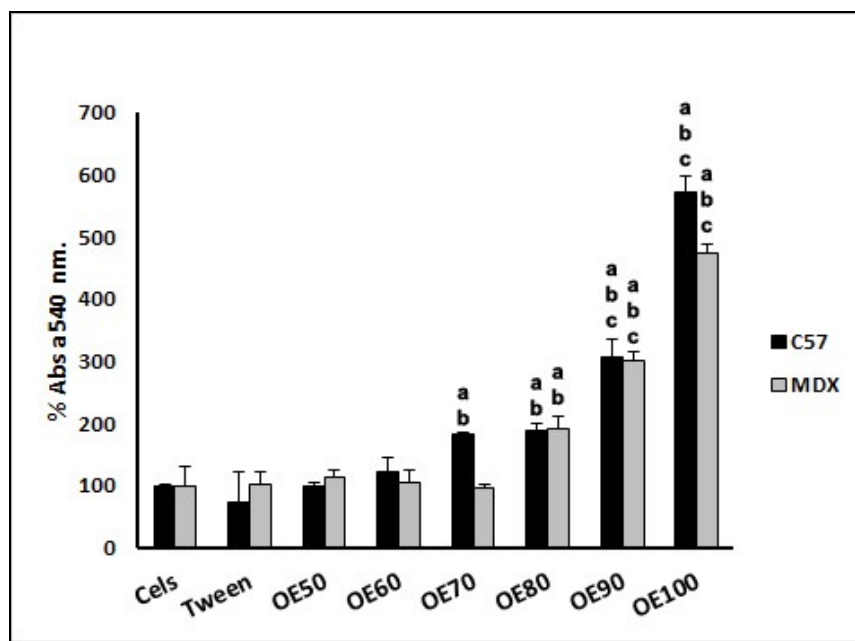


Gráfico 1. Análise da viabilidade celular por ensaio de incorporação do Vermelho Neutro em células musculares primárias de camundongos das linhagens C57BL/10 (C57) e *mdx*. **Cels:** sem tratamento; **Tween:** Tween diluído no meio; **OE50:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 50µg/ml; **OE60:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 60µg/ml; **OE70:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 70µg/ml; **OE80:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 80µg/ml; **OE90:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 90µg/ml; **OE100:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 100µg/ml. ^a Difere do grupo Cels; ^b Difere do grupo Tween; ^c Difere dos grupos OE50, OE60 e OE70; p<0,05; ANOVA "one-way", seguida de comparação múltipla do teste de Tukey.

Trypan Blue

Verificou-se, através da marcação com Trypan Blue, observou-se que os grupos experimentais *mdx* e controle (C57BL/10) com as concentrações de 50, 60, 70 80, 90 e 100µg/ml de óleo essencial apresentaram viabilidade celular acima de 90% (**Gráfico 2**). Com exceção do

grupo C57 na concentração de 80 $\mu\text{g/ml}$ que apresentou viabilidade de aproximadamente 85% (Gráfico 2).

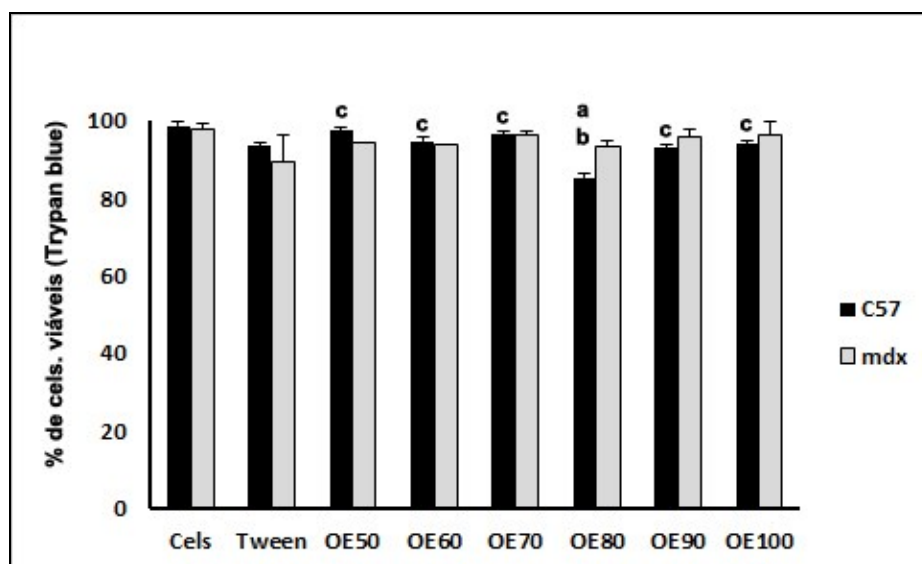


Gráfico 2. Análise da viabilidade celular com marcador Trypan Blue (Azul de Trypan) em células musculares primárias de camundongos das linhagens C57BL/10 (C57) e *mdx*. **Cels:** sem tratamento; **Tween:** Tween diluído no meio; **OE50:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$; **OE60:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 60 $\mu\text{g/ml}$; **OE70:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 70 $\mu\text{g/ml}$; **OE80:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 80 $\mu\text{g/ml}$; **OE90:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 90 $\mu\text{g/ml}$; **OE100:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$. ^a Difere do grupo Cels; ^b Difere do grupo Tween; ^c Difere dos grupos OE50, OE60, OE70 e OE80; $p < 0,05$; ANOVA "one-way", seguida de comparação múltipla do teste de Tukey.

MTT

Através da análise do MTT, verificou-se que os grupos experimentais *mdx* e controle (C57BL/10) com as concentrações de 50, 60 e 70 de óleo essencial apresentaram viabilidade celular acima de 90% e os grupos nas concentrações 80, 90 e 100µg/ml acima de 100% (**Gráfico 3**).

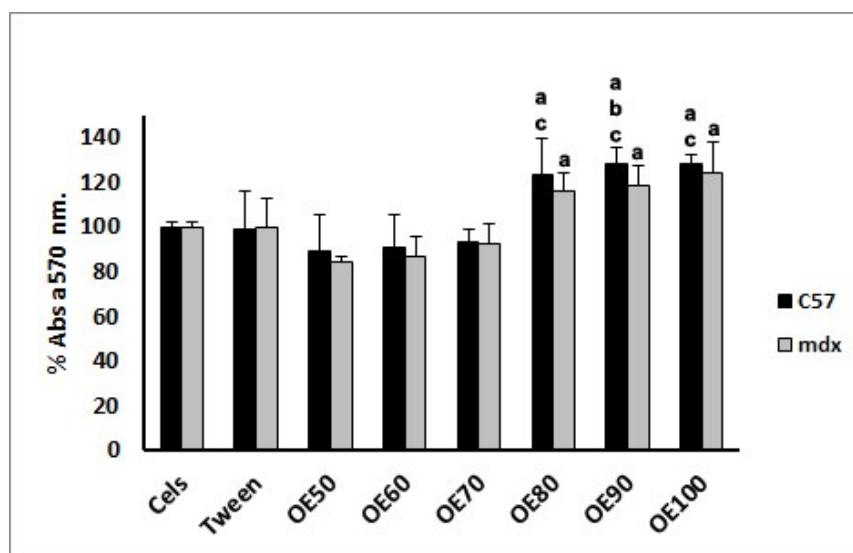


Gráfico 3. Viabilidade celular medida como absorbância (ensaio MTT) em células musculares primárias de camundongos das linhagens C57BL/10 (C57) e *mdx*. **Cels:** sem tratamento; **Tween:** Tween diluído no meio; **OE50:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 50µg/ml; **OE60:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 60µg/ml; **OE70:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 70µg/ml; **OE80:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 80µg/ml; **OE90:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 90µg/ml; **OE100:** óleo essencial de Lima destilada na concentração de 100µg/ml. ^a Difere do grupo Cels; ^b Difere do grupo Tween; ^c Difere do grupo OE80; $p < 0,05$; ANOVA "one-way", seguida de comparação múltipla do teste de Tukey.

4.4 Análise do conteúdo de TNF- α , NF- κ B e 4-HNE (Western Blotting)

Segundo a literatura, as propriedades anti-inflamatórias dos óleos essenciais são dose-dependente. Os resultados terapêuticos mais expressivos obtidos com os óleos essenciais são com doses acima de 100mg/kg (CAMPÊLO et al., 2011a,b; TAKAYAMA et al., 2011). Desta forma, em nossos experimentos a análise do conteúdo de TNF- α , NF- κ B, 4-HNE e H₂O₂ foi realizada com culturas tratadas com o óleo essencial de lima na concentração de 100 μ g/ml.

TNF- α

Verificou-se marcação expressiva do conteúdo de TNF- α nas células musculares distróficas em relação às células controle (Figura 2). Redução do conteúdo de TNF- α nas células musculares *mdx* foi observada após tratamento com OE100, com os valores próximos ao controle ($p < 0.00001$).

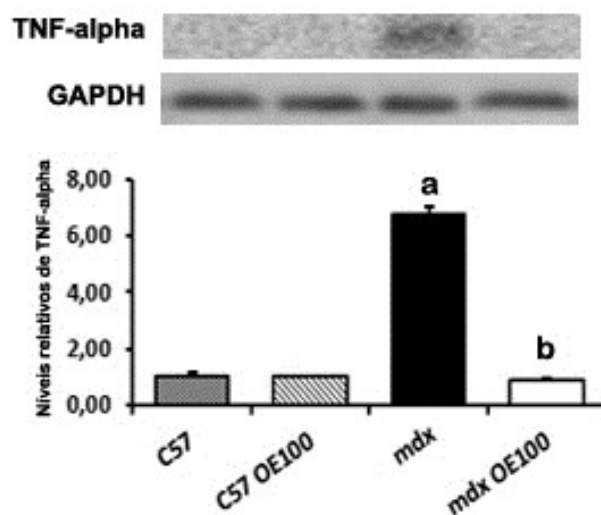


Figura 2. Quantificação do conteúdo de TNF- α em células musculares primárias por Western Blotting. **C57:** células do grupo controle (C57BL/10) sem tratamento; **mdx:** células distróficas sem tratamento; **mdx OE100:** células distróficas que receberam óleo essencial de Lima destilada na concentração de 100 μ g/ml. ^a Difere do grupo C57; ^b Difere do grupo *mdx*; $p < 0,00001$; ANOVA "one-way", seguida de comparação múltipla do teste de Tukey.

NF- κ B

Não foi observada alteração do conteúdo de NF- κ B entre as células musculares *mdx* e controle (Figura 3). Mesmo assim, verificou-se diminuição significativa (36%; $p < 0,05$) do conteúdo de NF- κ B nas células *mdx* tratadas com OE100 quando comparados às células musculares *mdx* que não receberam tratamento.

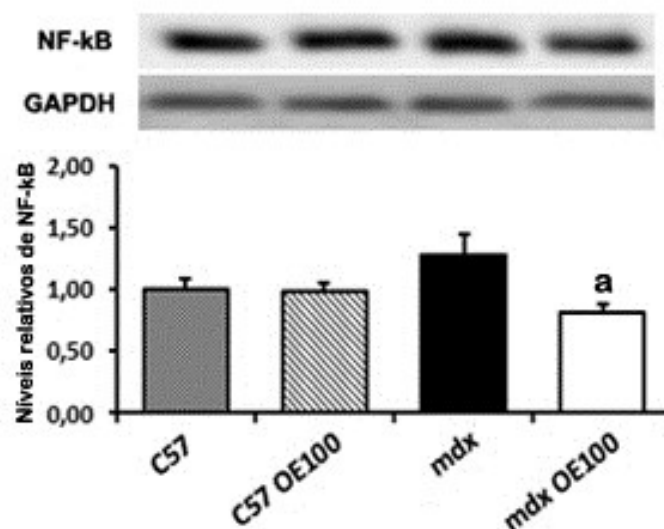


Figura 3. Quantificação do conteúdo de NF-κB em células musculares primárias por Western Blotting. **C57:** células do grupo controle (C57BL/10) sem tratamento; **mdx:** células distróficas sem tratamento; **mdx OE100:** células distróficas que receberam óleo essencial de Lima destilada na concentração de 100μg/ml. ^a Difere do grupo *mdx*; $p < 0,05$; ANOVA "one-way", seguida de comparação múltipla do teste de Tukey.

4-HNE

Observou-se aumento significativo do conteúdo de 4-HNE ($p < 0,05$) nas células musculares distróficas em relação às células controle (Figura 4). Diminuição deste aumento (50%) foi observada após tratamento com OE100, porém esta redução não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

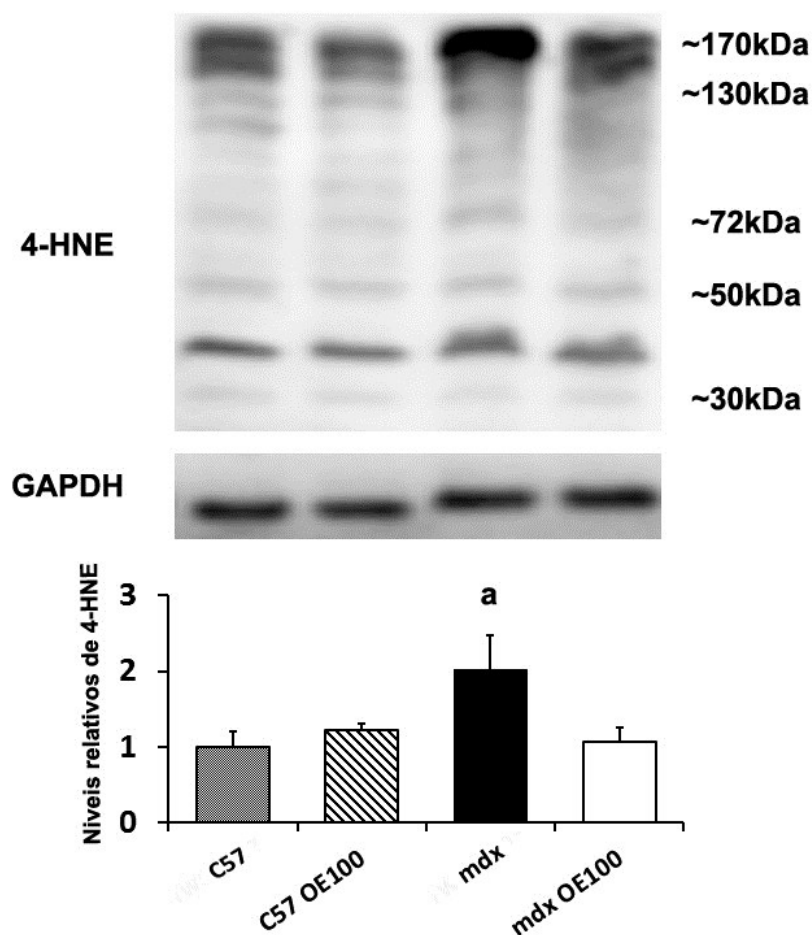


Figura 4. Quantificação do conteúdo de 4-HNE em células musculares primárias por Western Blotting. **C57:** células do grupo controle (C57BL/10) sem tratamento; **mdx:** células distróficas sem tratamento; **mdx OE100:** células distróficas que receberam óleo essencial de Lima destilada na concentração de 100µg/ml. ^a Difere do grupo C57; p<0,05; ANOVA "one-way", seguida de comparação múltipla do teste de Tukey.

4.5 Detecção H₂O₂ nas células musculares

Na Figura 05 pode-se observar aumento significativo da liberação de H₂O₂ nas células

musculares *mdx* quando comparado ao das células obtidas dos camundongos C57BL/10 (controle). Tratamento com OE100 reduziu (74%) a liberação de H₂O₂ nas células musculares *mdx* em relação às células *mdx* não tratadas.

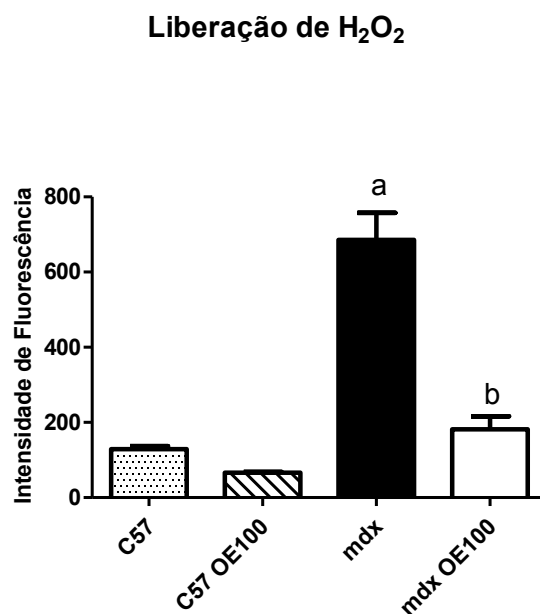


Figura 5. Detecção de H₂O₂ utilizando o kit Amplex Red/HRP (horseradish peroxidase). **C57:** células do grupo controle (C57BL/10) sem tratamento; ***mdx*:** células distróficas sem tratamento; ***mdx* OE100:** células distróficas que receberam óleo essencial de Lima destilada na concentração de 100µg/ml. ^a Difere do grupo C57; ^b Difere do grupo *mdx* p<0,05; ANOVA "one-way", seguida de comparação múltipla do teste de Tukey.

5 DISCUSSÃO

O óleo de *C. aurantifolia* é bem conhecido por sua aplicação em produtos farmacêuticos e cosméticos e também pelo potencial efeito benéfico sobre doenças relacionadas ao estresse oxidativo e/ou inflamação (CAMPÊLO et al., 2011a; CAMPÊLO et al., 2011b). Neste contexto, o presente estudo é uma tentativa de compreender a composição química do óleo essencial de Lima destilada (óleo essencial de *C. aurantifolia* obtido a partir de prensagem a frio da casca dos frutos desta espécie vegetal, seguido de destilação a vapor, comercializado com a denominação de óleo essencial de Lima destilada pelo Fabricante Ferquima®, utilizada em nossos experimentos) e seu potencial efeito anti-inflamatório e antioxidante sobre células musculares distróficas de camundongos *mdx*.

Composição Química e avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Recentemente, a composição química do óleo de *C. aurantifolia* foi documentada na literatura após análise por GC-EM com a identificação de 22 constituintes (90% dos voláteis identificados), sendo o principal constituinte identificado o limoneno (30,13%), além de outros constituintes tais como trans-p-menta-2, 8-dienol, β -linalol, fenchol, p-Menti-8-en-1-ol, α -terpineol, mirtenol e c-terpineol (JAIPRAKASH et al., 2009). Nas análises do presente estudo foi possível identificar vinte e quatro substâncias, com o predomínio de monoterpenos, estando dentre os constituintes majoritários o limoneno (42,60%), α -terpineol (11,76%), cimeno (11,80%), γ -terpineno (4,63%) e terpinoleno (5,30%). O óleo de Lima destilada estudado consiste no óleo obtido a partir de prensagem a frio da casca dos frutos de *C. aurantifolia*, seguido de destilação a vapor. Segundo o fabricante o óleo de Lima destilada apresenta

aproximadamente 45% de limoneno, 10% de α -terpineol, 5% de γ -terpineno e 5% de terpinoleno (FERQUIMA, 2013) e os resultados obtidos para este óleo essencial estão coerentes com o esperado. A variação na composição de óleos essenciais pode ser devido às diferenças no seu local de crescimento, fatores ambientais, no tempo de colheita e na parte da planta utilizada para a extração do óleo essencial e/ou metodologia empregada.

Outra análise realizada em nossos experimentos foi à avaliação da capacidade antioxidante do óleo essencial de Lima destilada em ensaios *in vitro*. A atividade antioxidante dos óleos essenciais tem despertado grande interesse, devido a sua capacidade de conservar alimentos dos efeitos tóxicos dos oxidantes (MAESTRI et al., 2006) e também por poder atuar em doenças causadas por estresse oxidativo (MIGUEL, 2010). Os métodos mais comuns que têm sido utilizados para determinar a capacidade antioxidante incluem o ORAC_{FL} e o ensaio DPPH. Nossos resultados reforçam os dados da literatura, demonstrando que o óleo essencial de Lima destilada apresenta atividade antioxidante, como outros óleos essenciais de espécies de *Citrus* (SINGH et al., 2010).

Viabilidade Celular, Efeito Anti-inflamatório e Antioxidante

Com relação aos ensaios biológicos, o primeiro parâmetro avaliado em nossos experimentos foi a citotoxicidade do óleo de Lima destilada sobre as células musculares, a qual foi avaliada por meio de testes de viabilidade celular. Dentre os testes mais citados na literatura encontramos o MTT, o Vermelho Neutro e o Trypan Blue (MELO 1996; HARBELL et al., 1997; STROBER 2001).

O ensaio do MTT se baseia na redução do MTT, um sal tetrazólico, pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis para formar como produto o azul de Formazan. O ensaio mede a

respiração celular, que é proporcional à quantidade de Formazan produzida e ao número de células viáveis em cultura (HARBELL et al., 1997). Com relação ao Vermelho Neutro, este em pH fisiológico passa facilmente através da membrana plasmática e se concentra no interior dos lisossomos, portanto analisa a viabilidade lisossomal das células (HARBELL et al., 1997). Na análise do Trypan Blue, as células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma coloração. Como as células mortas têm suas membranas danificadas, ocorre o fluxo de corante para o interior da célula fornecendo uma coloração azul (STROBER 2001).

Em nossos experimentos a viabilidade celular se manteve normalmente acima de 90%, tanto nas células controle (C57BL/10) como nas células distróficas. Colaborando com nossos resultados, outros estudos não destacam efeito tóxico do óleo essencial de *Citrus* em seus experimentos (CAMPÊLO et al., 2011a; CAMPÊLO et al., 2011b).

Ainda em relação à viabilidade celular, verificamos que na análise por Vermelho Neutro, as células tratadas nas concentrações de 80 e 90µg/ml do óleo de Lima destilada apresentaram um alto índice de viabilidade. Os resultados obtidos no ensaio com Vermelho Neutro são dependentes de dois fatores principais: (1) do número de células viáveis na cultura, onde há relação linear entre o corante extraído da cultura e o número de células viáveis na mesma, o que implica que alterações tóxicas na proliferação celular podem modificar significativamente os resultados e (2) da viabilidade lisossomal das células ou função dessas. Ainda, segundo Melo (1996) a incorporação do Vermelho Neutro por células viáveis pode ser modificada por alterações na superfície celular ou na membrana lisossomal. Diante do exposto, uma hipótese para os resultados obtidos no presente trabalho é que o óleo essencial nas concentrações de 80 e 90µg/ml pode ter promovido alterações na membrana celular. Em experimentos realizados por Di Pasqua et al. (2006), concentrações elevadas de limoneno (constituente majoritário do óleo

essencial utilizado em nossos experimentos) promoveram alterações substanciais na membrana de bactérias, resultando em maior sobrevivência dessas em condições adversas de pH e acidez.

Outro parâmetro avaliado foi o efeito anti-inflamatório do óleo de Lima destilada, uma vez que a resposta inflamatória exacerbada participa expressivamente na patofisiologia das fibras musculares distróficas (GROUNDS et al., 2008). Segundo Campêlo et al., (2011a,b) os óleos essenciais extraídos da espécie *Citrus* apresentam efeito benéfico sobre doenças associadas à inflamação. Em nossos experimentos, verificamos aumento significativo da expressão do TNF- α nas células musculares distróficas, o que está de acordo com outros trabalhos *in vivo* realizados por nosso grupo de pesquisa e também de outros pesquisadores (DE SENZI et al., 2013; TONON et al., 2012; GROUNDS et al., 2008). Em relação ao tratamento proposto, o óleo de Lima destilada reduziu expressivamente o conteúdo do TNF- α nas células distróficas. Ocete et al. (1989) e Martin et al. (1993) avaliaram a atividade dos terpenos, α -pineno e β -cariofileno frente à inflamação em edema de pata induzido pela carragenina em ratos e concluíram que os óleos essenciais constituídos com esses terpenos apresentaram atividade inibitória sobre a formação de edema, podendo ser útil no controle do processo inflamatório exacerbado, com resultados similares aos nossos para o óleo essencial de *C. aurantifolia* onde estes terpenos estão presentes em (1,95%) α -pineno e (0,16%) β -cariofileno. Em adição, o óleo essencial de *C. aurantium* e o limoneno seu constituinte majoritário (97,8%) apresentaram significativa atividade anti-inflamatória, tanto em modelos de inflamação aguda quanto em modelos crônicos de artrite reumatóide (MORAES, 2012). Segundo Moraes (2012) esta atividade anti-inflamatória parece estar relacionada com a inibição do aumento da expressão de vários fatores pró-inflamatórios, tais como: COX-1, COX-2, TNF- α , IL-1 β e óxido nítrico (NO). Recentemente, d'Alessio et al. (2013) demonstraram que o limoneno apresenta significativo efeito anti-

inflamatório em experimentos *in vivo* e *in vitro*, particularmente na redução do conteúdo de TNF- α .

Diferentemente dos experimentos com TNF- α , não observamos alteração na expressão do NF- κ B entre as células musculares distróficas e controle. Este resultado sugere que possivelmente outros mecanismos participam da liberação de citocinas pró-inflamatórias além do fator NF- κ B nas células distróficas. Estudo recente, com óleo essencial de *Citrus* (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*) apresentou inibição da ativação do fator NF- κ B em macrófagos murinos Raw 264.7 (KIM et al., 2013). Visto que, também observamos redução do conteúdo do fator NF- κ B nas células musculares distróficas após tratamento com o óleo essencial de Lima destilada, o estudo de Kim et al. (2013) nos incentiva a sugerir que os óleos essenciais de *Citrus* podem apresentar potencial efeito também sobre o NF- κ B. Outro estudo reforça esta sugestão, verificou-se que o óleo essencial de *Artemisia fukudo*, principalmente constituído por α -tujona, β -tujona, cânfora e cariofileno atenua a inflamação, por suprimir a ativação do NF- κ B em macrófagos murinos RAW 264.7 (YOON et al., 2010).

O efeito inibitório de alguns óleos essenciais na produção de citocinas pró-inflamatórias parece ser mediado pela supressão da expressão gênica destas citocinas. Segundo alguns autores, alguns óleos essenciais por eles estudados significativamente suprimiam a expressão de proteína e RNAm de citocinas em células estimuladas, assumindo por conseguinte, que o efeito inibitório destes óleos essenciais na expressão das citocinas pró-inflamatórias ocorre principalmente em nível transcricional (BURKOVSKÁ et al., 2007; DUNG et al., 2009; DUTRA et al., 2009; YOON et al., 2010).

Com relação ao estresse oxidativo, experimentos *in vivo* com camundongos *mdx* demonstraram peroxidação lipídica da membrana causada pelo aumento da produção de EROs

no período que antecede o início da degeneração das fibras musculares (DISATNIK et al., 1998). O processo de peroxidação lipídica causa a destruição de lipídeos presentes na membrana celular, resultando na formação de peróxidos lipídicos e aldeídos, como malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal 4-HNE; (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). Muitos biomarcadores vêm sendo utilizados para avaliar o estresse oxidativo, dentre eles o MDA (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990), dienos conjugados (DORMANDY; WICKENS, 1987), gases etano e pentano (FRANK; BAKER, 1980), isoprostanos (MORROW et al., 1995), 4-HNE (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991), modificações de proteínas (LEVINE; WETZEL, 1994) e modificações no DNA (MARNETT, 1999). O 4-HNE é um dos maiores produtos finais da peroxidação lipídica e tem sido largamente aceito como um indutor de estresse oxidativo, estando envolvido na patogênese de várias doenças degenerativas como a doença de Alzheimer, aterosclerose e câncer (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991; UCHIDA, 2003). Em nossos experimentos, analisamos o conteúdo de 4-HNE nas células musculares e verificamos aumento do conteúdo deste nas células distróficas. O tratamento com o óleo essencial de Lima destilada reduziu este aumento, confirmando sua atividade antioxidante, porém essa redução não foi significativa.

Outra análise realizada para avaliar o efeito antioxidante das drogas utilizadas, foi à quantificação da liberação de H_2O_2 . Verificamos diminuição significativa da liberação de H_2O_2 nas células musculares distróficas após tratamento com o óleo essencial de Lima destilada. Embora o H_2O_2 não seja um radical livre, tem sido considerado uma das mais importantes EROs devido a sua alta capacidade de difusão extracelular (YU, 1994) e também pela sua alta capacidade de gerar o radical OH, altamente reativo, via reação de Fenton (ARUOMA; HALLIWELL, 1989).

Colaborando com nossos achados, na literatura, outros óleos essenciais também apresentam efeito antioxidante. Na análise de peroxidação lipídica, o óleo de *Lavandula angustifolia* Mill apresentou potente efeito antioxidante (YANG et al., 2010). Os óleos de *Thymus vulgaris* L. e *Ocimum basilicum* L. demonstraram significativa atividade antioxidante comparável ao α -tocoferol (WEI; SHIBAMOTO, 2010).

6 CONCLUSÃO

Este estudo possibilitou concluir que o óleo essencial de Lima destilada apresentou constituintes químicos coerentes com o esperado para esta espécie vegetal, sendo o limoneno o constituinte majoritário; apresentou-se ativo com capacidade antioxidante *in vitro* nos ensaios ORAC_{FL} e DPPH; atenuou os efeitos deletérios que ocorrem nas células musculares distróficas *in vitro*, no que diz respeito aos marcadores avaliados de inflamação e estresse oxidativo. Diante do exposto, acreditamos que o óleo essencial de Lima destilada possa ser potencialmente útil para o tratamento farmacológico da distrofia muscular. Entretanto, são necessários estudos futuros *in vivo* para se verificar qual é a dosagem e o tempo de tratamento adequados para se obter o melhor efeito deste óleo essencial.

7 BIBLIOGRAFIA

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th Edition.; Allured Publ. Corporation: Carol Stream, IL, 2007. pp. viii + 804 pp.

AIBINU, I.; ADENIPEKUN, T.; ADELOWOTAN, T.; OGUNSANYA, T.; ODUGBEMI, T. Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus aurantifolia* (Lime fruit) as used locally. **Afr. J. Trad. Complement. Alter. Med.** v.4, p.185-190, 2007.

ANKER, S. D.; VON HAEHLING, S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. **Heart**. v.90, n.4, p.464–470, 2004.

ARUOMA, O.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v.75, p.199-212, 1998

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radic. Biol. Med.** v.6, p.593-7, 1989.

BIGGAR, W.D.; KLAMUT, H.J.; DEMACIO, P.C.; STEVENS, D.J.; RAY, P.N. Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. **Clin. Orthop. Relat. Research**. v.401, p.88-106, 2002.

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K.J.; KRAG, T.O.B.; KHURANA, T.S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **J. Mol. Med.** v.82, n.2, p.102-115, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v.72, p.248-254, 1976.

BROOKES, P.S. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Mitochondrion.** v.3, n.4, p.187-204, 2004.

BULFIELD, G.; SILLER, W.G.; WIGHT, P.A.L.; MOORE, K.J. X *chromosome-liked muscular dystrophy (mdx)* in the mouse. **Proc. Natl. Acad. Science.** v.81, p.1189-1192, 1984.

BURKOVSKÁ, A.; ČIKOŠ, Š.; JUHÁS, Š.; IL'KOVÁ, G.; REHÁK, P.; KOPPEL, J. Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice. **Mediat. Inflamm.** doi: 10.1155/2007/23296, 2007.

CAMPÊLO, L. M. L.; ALMEIDA, A. A. C.; FREITAS, R. L. M.; CERQUEIRA, G. S.; SOUSA, G. F.; SALDANHA, G.B.; FEITOSA, C. M.; FREITAS, R. M. Antioxidant and Antinociceptive Effects of Citrus limon Essential Oil in Mice. **J. Biomed. Biotechnol.** doi:10.1155/2011/678673, 2011a.

CAMPÊLO, L. M. L.; GONÇALVES, F. C. M.; FEITOSA, C. M.; FREITAS, R. M.. Antioxidant activity of Citrus limon essential oil in mouse hippocampus. **Pharm. Biol.** v.49, n,7, p.709–715, 2011b.

CAVIN, A.; POTTERAT, O.; WOLFENDER, J.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W. Flavonoids and phenylpropanoid derivatives from *Campanula barbata*. **J Nat. Prod.** v.61, p.1497-1501, 1998.

CELEC, P. Nuclear factor kappa B—molecular biomedicine: the next generation. **Biomed. Pharmacother.** v.58, p.365–371, 2004.

CHAKKALAKAL, J. V.; THOMPSON, J.; PARKS, R.J.; JASMIN, B.J. Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. **Faseb J.** v.19, p.880-91, 2005.

CHIN, Y.W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.B.; KINGHORN D. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal.** v.8, p.239-253, 2006.

CORDEIRO, R.; NUNES, V.A.; ALMEIDA, C.R. **Plantas que Curam.** São Paulo/São Paulo. Editora Três, 1996.

CORRÊA, M.P. **Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, pág.1926, 1978.

COSTA, A. F. **Farmacognosia.** 4 ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1994.

d’ALESSIO, P.A.; OSTAN, R.; BISSON, J.F.; SCHULZKE, J.D.; URSINI, M.V.; BÉNÉ, M.C. 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.1151-1156, 2013.

DANESI, F.; MARANESI, M.; ELEMENTI, S.; ANTUONO, L. F. D.; NERI, R.; BORDONI, A. Effect of Cultivar on the Protection of Cardiomyocytes from Oxidative Stress by Essential Oils and Aqueous Extracts of Basil (*Ocimum basilicum* L.). **J. Agric. Food. Chem.** v.56, p.9911–9917, 2008.

DECONINCK, N.; DAN, B. Pathophysiology of Duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. **Pediatr. Neurol.** v.36, p.1-7, 2007.

De SENZI, M.P.R.; FERRETTI, R.; MORAES, L.H.; NETO, H.S.; MARQUES, M.J.; MINATEL, E.. N-Acetylcysteine treatment reduces TNF- α levels and myonecrosis in diaphragm muscle of mdx mice. **Clin. Nutr.** v.32, p.472-475, 2013.

De SOUZA, P.A.T.; MARQUES, M.J.; LIMA, C.A.H.; MATHEUS, S.M.M. Effect of *Citrus aurantium* L. essential oil on muscle regeneration in *mdx* mice. **Int. J. Morphol.** v.29, p.1357-1363, 2011.

DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of Thymol, Carvacrol, Limonene, Cinnamaldehyde, and Eugenol in the growing media. *J. Agric. Food Chem.* v.54, p.2745-2749, 2006.

DISATNIK, M.H.; DHAWAN, J.; BEAL, M.F.; WHIRL, M.M.; FRANCO, A.A.; RANDO, T.A. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: Studies of the pre-necrotic state. **J. Neurol. Sci.** v.161, p.77-84, 1998.

DORMANDY, T.L.; WICKENS, D.G. The experimental and clinical pathology of diene conjugation. **Chem. Phys. Lipids.** v.45, n.2-4, p.353-64, 1987.

DUGO, G.; MONDELLO, L. **Citrus Oils. Composition, Advanced Analytical Technique, Contaminants, and Biological Activity.** Taylor & Francis Group, 2010.

DUNG, N.T.; BAJPAI, V.K.; YOON, J.I.; KANG, S.C. Anti-inflammatory effects of essential oil isolated from the buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) **Food Chem. Toxicol.** v.47, p.449-453, 2009.

DUTRA, R.C.; FAVA, M.B.; ALVES, C.S.C.; FERREIRA, A.P.; BARBOSA, N.R. Antiulcerogenic and antiinflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. **J. Pharm. Pharmacol.** v.61, p.243-250, 2009.

EBANA, R.U.B.; MADUNAGU, B.E.; EKPE, E.D.; OTUNG, W. Microbiological exploitation of cardiac glycosides and alkaloids from *Garcinia kola*. *Rorreria ocymoides*, *Kolanidita* and *Citrus aurantifolia*. **J.Appl. Bacteriol.** v.71, p.398-401, 1991.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A Review. **Phytother. Res.** v.21, p.308-323, 2007.

ENGEL, A.G.; YAMAMOTO, M.; FISCHBECK, K.H. Distrophinopathies. In: Engel, A.G.; Franzini-Armstrong, C. **Myology**. New York: McGraw-Hill, Inc., 1994. p. 1133-1187. ISBN 0070195595.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol.** v.186, p.407-21, 1990.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic. Biol. Med.** v.11, n.1, p.81-128, 1991

FERQUÍMICA. 2013. Especificações técnicas: Óleo essencial de Lima destilada. Disponível em http://www.ferquima.com.br/o_essenciais/lima.html Acessado em 20/11/2013.

FIGUERAS, M.; BUSQUETS, S.; CARBO, N.; ALMENDRO, V.; ARGILES, J.M.; LOPEZ-SORIANO, F.J. Cancer cachexia results in an increase in TNF-alpha receptor gene expression in both skeletal muscle and adipose tissue. **Int. Journal Oncology.** v.27, p.855-860, 2005.

FRANK, O.; BAKER, H. Vitamin profile in rats fed stock or liquid ethanolic diets. **Am. J. Clin. Nutr.** v.33, n.2, p.221-226, 1980.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), superoxide dismutases, and related matters. **J Biol. Chem.** v.272, p.18515-18517, 1997.

GERHÄUSER, C.; KLIMO, K.; HEISS, E.; NEUMANN, I.; GAMAL-ELDEEN, A.; KNAUFT, J.; LIU, GY.; SITTHIMONCHAI, S.; FRANK, N. Mechanism-based *in vitro* screening of potential cancer chemopreventive agents. **Mutat. Res.** v.523, p.163-172, 2003.

GLEZER, I.; ZEKKI, H.; SCAVONE, C.; RIVEST, S. Modulation of the innate immune response by NMDA receptors has neuropathological consequences. **J. Neurosci.** v.23, n.35, p.11094-103, 2003.

GRIFFON, G.; MERLIN, J. L.; MARCHAL, C. Comparison of sulforhodamine B, tetrazolium and clonogenic assays for *in vitro* radiosensitivity testing in human ovarian cell lines. **Anti-Cancer Drugs.** v.6, p.115-123, 1995.

GROTE, K.; FLACH, I.; LUCHTEFELD, M.; AKIN, E.; HOLLAND, S.M.; DREXLER, H.; SCHIEFFER, B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. **Circ. Res.** v.92, n.11, p.80-86, 2003.

GROUND, M.D.; RADLEY, H.G.; LYNCH, G.S.; NAGARAJU, K.; DE LUCA, A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Neurobiol. Dis.** v.31, p.1-19, 2008.

GUTTRIDGE, D.C.; MAYO, M.W.; MADRID, L.V.; WANG, C-Y.; BALDWIN Jr. A.S. NF- κ B Induced loss of MyoD messenger RNA: Possible role in muscle decay and cachexia. **Science** v.289, n.29, p.363-66, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr Rev** v.52, p.253-65, 1994.

HARBELL, J.W.; KOONTZ, S.W.; LEWIS, R.W.; LOVELL, D.; ACOSTA, D. IRAG working group 4. Cell cytotoxicity assays. Interagency regulatory alternatives group. **Food Chem. Toxicol.** v.35, p.79-126, 1997.

HAUSER, E.; HOGER, H.; BITTNER, R.; WIDHALM, K.; HERKNER, K.; LUBEC, G. Oxyradical damage and mitochondrial enzyme activities in the mdx mouse. **Neuroped.** v.26, p.260-2, 1995.

HAYCOCK, J. W.; MACNEIL, S.; JONES, P.; HARRIS, J. B.; MANTLE, D. Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. **Neuroreport.** v.8, p.357-61, 1996.

HODGETTS, S.; RADLEY, H.; DAVIES, M.; GROUNDS, M.D. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF- α function with Etanercept in mdx mice. **Neuromusc. Disord.** v.16, p.591-602, 2006.

IRINTCHEV, A.; WERNIG, A. Muscle damage and repair in voluntarily running mice: Strain and muscle differences. **Cell Tissue Res.** v.249, p.509-21, 1987.

JACKMAN, R.W.; KANDARIAN, S.C.. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** v.287, n.4, p.C834-843, 2004.

JAIPRAKASH R. PATIL A,C, G.K. JAYAPRAKASHA A, K.N. CHIDAMBARA MURTHY A, SHANE E. TICHY B, MAHADEV B. CHETTI C, BHIMANAGOUDA S. PATIL A. Apoptosis-mediated proliferation inhibition of human colon cancer cells by volatile principles of *Citrus aurantifolia*. **Food Chem.** v.114, p.1351–1358, 2009.

JANSSEN-HEININGER, Y.M.W.; POYNTER, M.E.; BAEUERLE, P.A. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor κ B. **Free Radic. Biol. Med.** v.28, p.1317-1327, 2000.

JAVESGHANI, D.; MAGDER, S.A.; BARREIRO, E.; QUINN, M.T.; HUSSAIN, S.N. Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscle. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v.165, n.3, p.412-8, 2002.

KAMATOU, G.P.P.; VILJOEN, A.M. A review of the application and pharmacological properties of α bisabolol and α -bisabolol-rich oils. **J. Am. Oil. Chem. Soc.** v.87, p.1-7, 2010

KEINAN, E.; ALT, A.; AMIR, G.; BENTUR, L.; BIBI, H.; SHOSEYOV, D. Natural ozone scavenger prevents asthma in sensitized rats. **Bioorg. Med. Chem.** v.13, p.557-562, 2005.

KIM, K.; KO, Y.; YANG, H.; HAM, Y.; ROH, S. W.; JEON Y.; AHN, G.; KANG, M.; YOON, W.; KIM, D.; ODA, T. Anti-inflammatory effect of essential oil and its constituents from fingered citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*) through blocking JNK, ERK and NF- κ B signaling pathways in LPS-activated RAW 264.7 cells. **Food Chem. Toxicol.** v.57, p.126–131, 2013.

KUMAR, A.; BORIEK, A.M. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. **Faseb J.** v.17, n.3, p.386-96, 2003.

LANGEN, R.; SCHOLS, A.M.; KELDERS, M.C.; WOUTERS, E.F.; JANSSEN-HEININGER, Y.M. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. **Faseb J.** v.15, p.1169-1180, 2001.

LEVINE, S.M.; WETZEL, D.L. *In situ* chemical analyses from frozen tissue sections by Fourier transform infrared microspectroscopy. Examination of white matter exposed to extravasated blood in the rat brain. **Am. J. Pathol.** v.145, n.5, p.1041-7, 1994.

LLOVERA, M.; GARCIA-MARTINEZ, C.; LOPEZ-SORIANO, J.; ARGILES, F.J. TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleous muscles. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v.230, p.238-241, 1997.

LYNGE, J.; JUEL, C.; HELLSTEN, Y. Extracellular formation and uptake of adenosine during skeletal muscle contraction in the rat: role of adenosine transporters. **J. Physiol.** v.537, p.597-605, 2001.

MAESTRI, D.M.; NEPOTE, V.; LAMARQUE, A.L.; ZYGADLO, J.A. Natural products as antioxidants. In: Imperato, F., Ed.; **Phytochemistry: Advances in Research**; Research Signopost: Kerala, India, pp. 105-135, 2006.

MANZUR, A.Y.; KUNTER, T.; PIKE, M.; SWAN, A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. **Cochrane Database Sys. Rev.** DOI: 10.1002/14651858.CD003725.pub3, 2008.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. **Mutat. Res.** v.424, n.1–2, p.83–95, 1999.

MARTIN, S.; OCETE, M.A.; GALVEZ, J.; JIMÉNEZ, J.; ZAZUELO, A. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum fruticosens*. **Planta Med.** v.59, p.533-536, 1993.

MECHLER, F.; IMRE, S.; DIOSZEGHY, P. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in muscle and erythrocytes in Duchenne muscular dystrophy. **J. Neurol. Sci.** v.63, n.3, p.279-83, 1984.

MELO, P.S. **Pigmentos obtidos *Chromobacterium violaceum* e *Serratia marcescens*, propriedade tripanocida da prodigiosina e estudos toxicológicos.** 1996. 92 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

MENDELL, J.R.; ENGEL, W.K.; DERRER, E.C. Duchenne muscular dystrophy: Functional ischemia reproduces its characteristic lesions. **Science.** v.172, p.1143-5, 1971.

MERCURI, E.; MUNTONI, F. Muscular dystrophies. **Lancet**, v.381, p.845-860, 2013.

MESSINA, S.; BITTO, A.; AGUENNOUZ, M.; MINUTOLI, L.; MONICI, M.C.; ALTAVILLA, D.; SQUADRITO, F.; VITA, G. Nuclear factor kappa-B blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in *mdx* mice. **Exper. Neurol.** v.198, p.234-241, 2006.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils. **Short Review Molecules.** v.15, p.9252-9287, 2010.

MORAES, T.M.; KUSHIMA, H.; MOLEIRO, F.C.; SANTOS, R.C.; ROCHA, L.R.; MARQUES, M.O.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. **Chem. Biol. Interact.** v.180, n.3, p.499-505, 2009.

MORAES, T. M. [Tese de Doutorado] Avaliação do óleo essencial de *Citrus aurantium* e do seu constituinte majoritário, limoneno, como adjuvantes no tratamento da artrite reumatóide em ratos com úlceras gástricas. UNESP, Botucatu, 2012.

MORROW, J.D.; FREI, B.; LONGMIRE, A.W.; GAZIANO, J.M.; LYNCH, S.M.; SHYR, Y.; STRAUSS, W.E.; OATES, J.A.; ROBERTS, L.J. 2nd. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. **N Engl J Med.** v. 332, n. 18, p.1198-203, 1995.

MURPHY, M.E.; KEHRER, J.P. Oxidative stress and muscular dystrophy. **Chem. Biol. Interact.** v.69, p.101-178, 1989.

NAKAE, Y.; STOWARD, P.J.; KASHIYAMA, T.; SHONO, M.; AKAGI, A.; MATSUZAKI, T.; NONAKA, I. Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and mdx mice. **J. Mol. Histol.** v.35, p.489-499, 2004.

NIEBRÓJ-DOBOSZ, I.; FIDZIANSKA, A.; GLINKA, Z.; HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ, I. Is the normal content of sulfhydryl groups attributable to sparing from dystrophic pathology in dystrophin-deficient muscles? **Folia Neuropathol.** v.40, p.143-50, 2002.

OCETE, M.A.; RISCO, S.; ZARZUELO, A.; LIMENEZ, J. Pharmacological activity of the essential oil of *Bupleurum gibraltarium*: anti-inflammatory activity and effects on isolated uteri. **J. Ethnopharmacol.** v.25, p.305-313, 1989.

OWHE-UREGHE, U.B.; EHWARIEME, D. A.; EBOH, D.O. **Afr. J. Biotechnol.** v.9, p.3163-3166, 2010.

PASCOAL, A.C.R.F.; LOURENÇO, C.C.; SODEK, L.; TAMASHIRO, J.Y.; FRANCHI, G.C.; NOWIL, A.E.; STEFANELLO, M.E.A; SALVADOR, M.J. Essential oil from the leaves of *Campomanesia guaviroba* (DC.) Kiaersk. (Myrtaceae): Chemical composition, antioxidant and cytotoxic activity. **J. Essential Oil Res.** v. 23, p.34-37, 2011a.

PASCOAL, A.C.R.F.; EHRENFRIED, C.A.; EBERLIN, M.N.; STEFANELLO, M.E.A; SALVADOR, M.J. Free radical scavenging activity, determination of phenolic compounds and HPLC-DAD/ESI-MS profile of *Campomanesia adamantium* Leaves. **Nat. Product Communications.** v. 6, p.969-972, 2011b.

PARREIRA, S.L.S. et al. Quantification of muscle strength and motor ability in patients with Duchenne muscular dystrophy on steroid therapy. **Arq. Neuropsiquiatr.** v.65, p.245-250, 2007.

PETROF, B.J. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophinglycoprotein complex. **Am. J. Phys. Med. Rehabil.** v.81, p.S162-S174, 2002.

PORTER, J.D.; KHANNA, S.; KAMINSKI, H.J.; RAO, J.S.; MERRIAN, A.P.; RICHMONDS, C.R.; LEAHY, P.; LI, J.; GUO, W.; ANDRADE, F.H. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophindeficient mdx mice. **Human Molecular Genetics.** v.11, n.3, p.263-272, 2002.

POWERS, S. K.; KAVAZIS, A. N.; MCCLUNG, J. M. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. **J. Appl. Physiol.** v.102, p.2389-2397, 2007.

PRISK, V.; HUARD, J. Muscle injuries and repair: The role of prostaglandins and inflammation. **Histol. Histopathol.** v.18, p.1243-1256, 2003.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **J. Agric. Food Chem.** v.51, p.3273-3279, 2003.

RADLEY, H.; GROUNDS, M. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. **Neurobiology of Disease.** v.23, p.387-397, 2006.

RADLEY, H.G.; DE LUCA, A.; LYNCH, G.S.; GROUNDS, M.D. Duchenne muscular dystrophy: Focus on pharmaceutical and nutritional interventions. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v.39, n.3, p.469-477, 2007.

RAGUSA, R.J.; CHOW, C.K.; PORTER, J.D. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscul.Disord.** v.7, p.379-386, 1997.

RANDO, T.A.; DISATNIK, M.H.; YU Y.; FRANCO, A. Muscle cells from mdx mice have an increased susceptibility to oxidative stress. **Neuromuscul.Disord.** v.8, p.14-21, 1998.

RANDO, T. A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. **Muscle Nerve.** v.24, p.1575-1594, 2001.

RAZZAGHI-ABYANEH, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; REZAEI, M.B.; JAIMAND, K.; ALINEZHAD, S.; SABERI, R.; YOSHINARI, T. Chemical composition and antiaflatoxic activity of *Carum carvi* L.; *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. **Food Control**. p.1018-1024, 2009

REID, M.B.; LI, Y-P. Tumor necrosis factor- α and muscle wasting: a cellular perspective. **Respir. Res.** v.2, n.5, p.269-272, 2001.

RICOTTI, V.; RIDOUT, D.A.; SCOTT, E.; QUINLIVAN, R.; ROBB, S.A.A.; MANZUR, A.Y.; MUNTONI, F. Long-term benefits and adverse effects of intermittent versus daily glucocorticoids in boys with Duchenne muscular dystrophy. **J. Neurology Neurosurgery Psychiatry**. v.84, n.6, p.698-705, 2013.

ROBERTO, D.; MICUCCI, P.; SEBASTIAN, T.; GRACIELA, F.; ANESINI, C. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** v.106, n.1, p.38-144, 2010.

RODRIGUEZ, M.C.; TARNOPOLSKY, M.A. Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress. **Free Radical Biol. Med.** v.34, p.1217-1220, 2003.

SALVADOR, M.J.; FERREIRA, E.O.; MERTENS-TALCOTT, S.U.; CASTRO, W.V.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D.A. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Zeitschrift Fur Naturforschung C**, **61c**: 19-25, 2006.

SANGUINETTI, E.E. **Plantas que curam**. 2.ed. Porto Alegre, Editora Rigel, 1989.

SANTOS, C.A.M.; TORRES, K.R.; LEONART, R. **Plantas medicinais** (herbarium, flora et. Scientia). 2.ed. São Paulo: Ícone, 1988.

SEIXAS, S.L.; LAGROTA-CANDIDO, J.; SAVINO, W.; QUIRICO-SANTOS, T. The importance of mdx mouse in the physiopathology of Duchenne's muscular dystrophy. **Arg. Neuropsiquiatr.** v.55, n.3B, p.610-7, 1997.

SENFTLEBEN, U.; KARIN, M. The IKK/NF-KappaB pathway. **Crit. Care Med.** v.30, p.S18-S26, 2002.

SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G.; PETERS, H. A.; FOEKENS, J. A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50- values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry.** v.33, n.11, p.813-823, 1995.

SILVEIRA, L.R.; PILEGAARD, H.; KUSUHARA, D.; CURI, R.; HELLSTEN, Y. The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (ppar)-gamma coactivator 1 alpha (pgc-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (ucp3) and hexokinase ii (hkii) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species. **Bioc. Biop. Acta. Mol. Cell. Res.** v.1763, p.969-976, 2006.

SINGH, P. et al. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus Maxima* Burm and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpenes, DL-limonene. **Food and Chemical Toxicology** v.48, p.1734-1740, 2010.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research.** v.531, p.231–251, 2003.

SOUZA, M.C.; SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.; MENEZES-DE-LIMA, O.J.; HENRIQUES, M.G. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. **Pharmazie**. v.58, p.582-586, 2003.

SPENCER, M.J.; MELLGREN, R.L. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. **Hum. Mol. Genet.** v.11, n.21, p.2645-55, 2002.

STEFANELLO ME., SALVADOR MJ., ITO IY., WISNIEWSKI JR. A., SIMIONATTO EL., DE MELLO-SILVA R.. Chemical composition, seasonal variation and evaluation of antimicrobial activity of essential oils of *Talauma ovata* A. St. Hil. (Magnoliaceae). **Journal of Essential Oil Research**. v.20, p.565-569, 2008.

STROBER, W. Trypan Blue exclusion test of cell biability. **Curr. Protocol. Immunol.** v.21, p.A.3B1-A.3B.2, 2001.

TAKAMATSU, S.; HODGES, T.W.; RAJBHANDARI, I.; GERWICK, W.H.; HAMANN, M.T.; NAGLE, D.G. Marine Natural Products as Novel Antioxidant Prototypes. **Journal of Natural Products**. v.66, p.605-608, 2003.

TAKAYAMA, C. A.; DE-FARIA, F. M.; ALMEIDA, A. C. A. DE; VALIM-ARAÚJO, D. A, E. O.; REHEN, C. S.; DUNDER, R. J.; SOCCA, E. A. R.; MANZO, L. P.; ROZZA, A. L.; SALVADOR, M. J.; PELLIZZON, C. H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; FERREIRA, A. L.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v.135, p.147–155, 2011.

TERRIL, J.R.; RADLEY-CRABB, H.G.; IWASAKI, T.; LEMCKERT, F.; ARTHUR, P.G.; GROUNDS, M.D. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. **FEBS J.** v.280, p.4149-4164, 2013.

TIDBALL, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v.288, p.R345-353, 2005.

TONON, E.; FERRETTI, R.; SHIRATORI, J.H.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J.; MINATEL, E. Ascorbic acid protects the diaphragm muscle against myonecrosis in mdx mice. **Nutrition.** v.28, n.6, p.686-90, 2012.

TORO-ARREOLA, S.; FLORES-TORALES, E.; TORRES-LOZANO, C.; DEL TORO-ARREOLA, A.; TOSTADO-PELAYO, K.; DANERI-NAVARRO, A. Effect of D-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. **Int. Immunopharmacol.** v.5, p.829-38, 2005.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M.R.; BONESI, M.; MENICHINI, F.; MASTELLONE, V.; COLICA, C.; MENICHINI, F. Comparative study on the antioxidant capacity and cholinesterase inhibitory activity of *Citrus aurantifolia* Swingle, *C. aurantium* L., and *C. bergamia* Risso and Poit. peel essential oils. **J. Food Sci.** v.77, n.1, p.H40-6, 2012.

UCHIDA, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. **Prog. Lipid. Res.** v.42, p.318- 343, 2003.

VAN LIESCHOU, E.M.; POSNER, G.H.; WOODARD, B.T.; PETERS, W.H. Effects of the sulforaphane analog compound 30, indole-3-carbinol, D-limonene or relafen on glutathione S-transferases and glutathione peroxidase of the rat digestive tract. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1379, n.3, p.325-326, 1998.

VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia: manual de plantas medicinais**. 2.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992.

WEHLING-HENRICKS, M.; JORDAN, M.C.; ROOS, K.P.; DENG, B.; TIDBALL, J.G. Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hearts is prevented by expression of a neuronal nitric oxide synthase transgene in the myocardium. **Hum. Mol. Genet.** v.14, p.1921-1933, 2005.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Activities and Volatile Constituents of Various Essential Oils. **J. Agric. Food Chem.** v.55, p.1737-1742, 2007.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. **J. Agr. Food Chem.** v.58, p.7218-7225, 2010.

WHITEHEAD, N.; YEUNG, E.W.; ALLEN, D.G. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.** v.33, p.657-662, 2006.

WHITEHEAD, N.P.; PHAM, C.; GERVASIO, O.L.; ALLEN, D.G. N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. **J. Phisyol.** v.586, n.7, p.2003-2014, 2008.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R.B. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. **Trends Biochem. Sci.** v.29, n.2, p.72-9, 2004.

YANG, E.-J.; KIM, S.S.; MOON, J.-Y.; OH, T.-H.; BAIK, J.S.; LEE, N.H.; HYUN, C.-G. Inhibitory effects of *Fortunella japonica* var. margarita and *Citrus sunki* essential oils on nitric oxide production and skin pathogens. **Acta Microbiol. Immunol. Hung.** v.57, p.15-27, 2010.

YOON, W.J.; MOON, J.Y.; SONG, G.; LEE, Y.K.; HAN, M.S.; LEE, J.S.; IHM, B.S.; LEE, W.J.; LEE, N.H.; HYUN, C.G. *Artemisia fukudo* essential oil attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF- κ B and MAPK activation in RAW264.7 macrophages. **Food Chem. Toxicol.** v.48, p.1222-1229, 2010.

YOSHIMURA, A. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. **Cancer Sci.** v.97, p.439-447, 2006.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews** v.74, p.139-161, 1994.

ZWART, L.L.D.; MEERMAN, J.H.; COMMANDEUR, J.N.; VERMEULEN, N.P. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radic. Biol. Med.** v.26, p.202-26, 1999.



CEUA/Unicamp

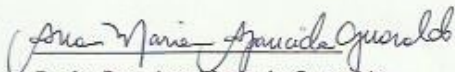
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

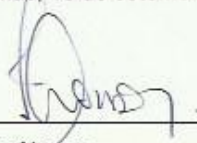
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Óleo essencial de Citrus aurantifolia: análise química e avaliação do potencial como agente terapêutico para o tratamento da degeneração muscular em camundongos distróficos da linhagem mdx" (protocolo nº 3168-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Elaine Minatel / Fernanda Dos Santos Rapucci Moraes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 18 de setembro de 2013.

Campinas, 18 de setembro de 2013.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Aleriso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>