

## TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL OE06C EM CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE *Sus scrofa domesticus* – UM MODELO ALTERNATIVO.

**NIELLE VERSTEG<sup>1</sup>; CRISTINE CIOATO DA SILVA<sup>2</sup>; RAFAEL MIELKE  
BARBOSA<sup>3</sup>; CARINE DAHL CORCINI<sup>4</sup>; KARINA AFFELDT GUTERRES<sup>5</sup>;  
MARLETE BRUM CLEFF<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – nielle.versteg@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - criscioato@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – rafaelmielkeb@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – corcinicd@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas - guterres.karina@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – marletecleff@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Há milhares de anos, os recursos vegetais do Brasil vêm sendo utilizados com fins medicinais, tanto em humanos como em animais. Porém, o uso das plantas à algumas décadas era estritamente empírico, sendo utilizado para orientação de uso o conhecimento passado de geração em geração, visto que é uma forma terapêutica de baixo custo e fácil acesso, principalmente à população de baixa renda (CAROCCIA et al., 2013).

Recentemente, tem se investido na comprovação dos efeitos benéficos das plantas medicinais, visto a crescente demanda de doenças de difícil tratamento e do desenvolvimento de resistência a inúmeras classes de medicamentos, sendo importante a realização de estudos para elucidação da composição, qualidade e eficácia dos recursos naturais (ZÖLLNER; SCHWARZ, 2013). Outro fator que contribui para a busca de comprovação desses efeitos é o fato de o Sistema Único de Saúde (SUS) estimular os médicos e outros profissionais da saúde, a utilizar tanto as plantas medicinais como seus compostos bioativos para tratamento dos pacientes usuários do SUS, além de incentivar a pesquisa (BARBOSA-FILHO et al., 2007).

Ainda, existe uma preocupação em averiguar a existência de efeitos deletérios dos recursos naturais e fitoterápicos à saúde humana e animal, visto que as plantas podem ter não só efeitos benéficos, mas podem apresentar um grau de toxicidade importante. A fim de avaliar a toxicidade de plantas e de evitar os testes desnecessários em animais, as células espermáticas podem ser utilizadas em avaliações iniciais de triagem toxicológica, visto que são células estruturalmente semelhantes às células somáticas e que apresentam grande sensibilidade a toxinas, além de serem de fácil obtenção, manuseio e avaliação (ANDERSSON et al., 2006, 2010).

Diante destas observações, o objetivo desse estudo foi determinar a toxicidade de diferentes concentrações do óleo essencial da planta OE06C, frente a células espermáticas.

### 2. METODOLOGIA

O material vegetal da planta foi obtido a partir distribuidor comercial com certificação botânica. A extração do óleo essencial foi realizada utilizando a extração com arraste a vapor em aparelho Clevenger, sendo este seco com sulfato de sódio anidro, armazenado em frasco âmbar e refrigerado.

Para as avaliações de toxicidade espermática, foram utilizadas as frações ricas provenientes de três ejaculados de cada macho suíno da espécie *Sus scrofa domesticus* com motilidade espermática >70%, diluída (1:1) em Beltsville Thawing Solution (BTS).

Para os tratamentos, foi adicionado ao sêmen o óleo essencial OE06C diluído em BTS até obtenção das concentrações finais de 0 (controle negativo: apenas BTS), 1, 2 e 4 mg.mL<sup>-1</sup>, em triplicata. O efeito do óleo essencial OE06C, foi observado nos tempos 0 e 24 horas de contato com o sêmen, armazenados sob refrigeração (17°C).

A cinética espermática foi avaliada através da análise computadorizada de espermatozoides (CASA) no equipamento Axio Scope A1 Ax10 (Zeiss), com o programa Sperm Vision®, em condições isotérmicas de 37°C, sendo realizada a média de leitura em 10 campos ( $\geq 1000$  células/campo). Os parâmetros avaliados foram motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP-%), distância média percorrida (DAP-mm), distância curvilínea (DCL- mm/s), distância linear (DSL-mm), velocidade média da trajetória (VAP- mm/s), velocidade curvilínea (VCL-mm/s), velocidade linear progressiva (VSL-mm/s), frequência do batimento flagelar cruzado (BCF-Hz), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH-mm), oscilação (WOB-Hz), linearidade (LIN-%) e retilinearidade (STR-%).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em ambos os momentos de leitura, em 0 e em 24 horas, observou-se a redução da motilidade total e progressiva em todas as concentrações de OE06C, proporcional ao aumento da concentração de óleo essencial testada. .

Os demais parâmetros da cinética espermática avaliados demonstraram resultados semelhantes, ocorrendo diminuição progressiva proporcionalmente ao aumento das concentrações. Entretanto, quando comparamos os tempos de exposição, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, LIN e BCF apresentaram melhores resultados em 24 horas do que em 0 hora (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados da avaliação das células espermáticas através de análise computadorizada (CASA) após contato com diferentes concentrações do óleo essencial OE06C em zero e 24 horas de exposição.

Parâmetros	Concentrações do óleo essencial (mg.mL <sup>-1</sup> )							
	0 Hora				24 Horas			
	0	1	2	4	0	1	2	4
MT (%)	<b>72,20</b>	<b>37,13</b>	<b>10,23</b>	<b>9,38</b>	<b>78,89</b>	<b>57,21</b>	<b>27,75</b>	<b>16,71</b>
MP (%)	<b>53,37</b>	<b>10,60</b>	<b>4,08</b>	<b>3,10</b>	<b>77,76</b>	<b>56,89</b>	<b>34,19</b>	<b>15,71</b>
DAP (μm/s)	<b>23,16</b>	<b>12,52</b>	<b>11,89</b>	<b>11,49</b>	<b>80,34</b>	<b>65,60</b>	<b>48,03</b>	<b>18,67</b>
DCL (μm/s)	<b>48,03</b>	<b>27,19</b>	<b>21,06</b>	<b>17,11</b>	<b>78,58</b>	<b>68,45</b>	<b>36,56</b>	<b>16,05</b>
DSL (μm/s)	<b>15,36</b>	<b>8,28</b>	<b>8,31</b>	<b>7,91</b>	<b>80,42</b>	<b>57,6</b>	<b>56,03</b>	<b>20,43</b>
VAP (μm/s)	<b>50,57</b>	<b>28,58</b>	<b>30,55</b>	<b>30,29</b>	<b>75,1</b>	<b>70,84</b>	<b>58,81</b>	<b>21,79</b>
VCL (μm/s)	<b>104,37</b>	<b>61,59</b>	<b>52,79</b>	<b>44,40</b>	<b>76,42</b>	<b>69,26</b>	<b>41,19</b>	<b>19,76</b>
VSL (μm/s)	<b>33,74</b>	<b>19,02</b>	<b>21,61</b>	<b>21,17</b>	<b>73,08</b>	<b>66,32</b>	<b>64,16</b>	<b>24,71</b>
STR (%)	<b>0,68</b>	<b>0,66</b>	<b>0,71</b>	<b>0,69</b>	<b>66,34</b>	<b>59,71</b>	<b>79,53</b>	<b>28,31</b>
LIN (%)	<b>0,33</b>	<b>0,32</b>	<b>0,45</b>	<b>0,48</b>	<b>63,00</b>	<b>62,26</b>	<b>91,81</b>	<b>29,52</b>
WOB (μm/s)	<b>0,48</b>	<b>0,47</b>	<b>0,62</b>	<b>0,68</b>	<b>60,55</b>	<b>63,24</b>	<b>97,00</b>	<b>29,05</b>
ALH (μm/s)	<b>2,75</b>	<b>2,52</b>	<b>3,09</b>	<b>3,04</b>	<b>60,13</b>	<b>79,92</b>	<b>78,25</b>	<b>29,76</b>

BCF (Hz) 33,56 27,12 24,48 28,46 67,26 67,53 58,00 22,52

BTS: Beltsville Thawing Solution MT: Motilidade total, MP: Motilidade progressiva, DAP: Distância média percorrida, DCL: Distância curvilínea, DSL: distância linear, VAP: Velocidade média da trajetória, VCL: Velocidade curvilínea, VSL: Velocidade linear progressiva, STR: Retilinearidade, LIN: Linearidade, WOB: Oscilação, ALH: Amplitude do deslocamento lateral da cabeça, BCF: Frequência do batimento flagelar cruzado.

Os estudos de toxicidade de óleos essenciais em células espermáticas ainda são escassos na literatura, uma vez que essa metodologia como triagem toxicológica, ainda está sendo difundida.

Quanto à viabilidade e à motilidade espermática do óleo essencial OE06C, LUÑO e colaboradores (2015) obtiveram bons resultados com *Ilex paraguariensis* (erva-mate) e *Melissa officinalis* (erva-cidreira), diferindo do presente estudo, onde se observou a redução da motilidade total e progressiva e de outros parâmetros relacionados à cinética espermática. O aumento da viabilidade e da motilidade observado por LUÑO e colaboradores (2015) foi relacionado à redução na lipoperoxidação da membrana plasmática dos espermatozoides, parâmetro que não foi avaliado nesse estudo, mas que poderia explicar o efeito tóxico observado no óleo essencial OE06C.

Segundo Giordani (2017), dos parâmetros espermáticos avaliados o VCL foi o mais afetado e o LIN o menos afetado utilizando extrato hidrolacoólico de *Schinus terebinthifolius*, diferindo dos resultados encontrados neste estudo onde, o VCL apresentou redução progressiva conforme a concentração, assim como os outros parâmetros avaliados e o LIN teve alteração nas concentrações mais elevadas (2 e 4 mg.mL<sup>-1</sup>).

As alterações observadas na cinética espermática, principalmente em relação à perda de motilidade, podem ser decorrentes de danos estruturais nas membranas plasmática e mitocondrial das células, uma vez que são importantes para o seu metabolismo e também para a capacitação espermática, reação acrosomal e penetração no oóbito (BUCAK et al., 2015; AITKEN, 2017). Nas concentrações testadas, o OE06C pode ter alterado a permeabilidade das membranas e alterado o fluxo celular de íons, levando à desestabilização, perda de motilidade e até mesmo, à morte celular (SERGENT et al., 2005; SIERRA-VALDEZ et al., 2013). Para elucidar o mecanismo tóxico do OE06C, são necessárias novas análises, como a citometria de fluxo, que permite a avaliação de inúmeras estruturas celulares.

#### 4. CONCLUSÕES

O óleo essencial OE06C reduziu a motilidade total e progressiva das células espermáticas, assim como outros parâmetros da cinética espermática, denotando efeito tóxico sobre esse tipo celular, nas concentrações testadas. Dessa forma, são necessários estudos complementares desse produto vegetal a fim de estabelecer as concentrações com menor toxicidade e seu mecanismo de ação, visando a viabilização de sua utilização medicinal.

Além disso, através desse estudo foi possível observar que as células espermáticas são bons indicadores de toxicidade, uma vez que apresentam uma alta sensibilidade às alterações em seu metabolismo e homeostase, que se refletiram rapidamente nos seus parâmetros cinéticos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular Reproduction Development**, p.1-14, 2017.
- ANDERSSON, M. C.; MIKKOLA, R.; KOTIAHO, M.; et al. Boar spermatozoa as a tool in toxicological research, a novel application for extended boar semen commercially produced by AI stations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 4, p. 303-303, 2006.
- ANDERSSON, M. A.; MIKKOLA, R.; RASIMUS, S.; et al. Boar spermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosol. **Toxicology In Vitro**, v. 24, n. 7, p. 2041-2052, 2010
- BARBOSA-FILHO, J. M.; NASCIMENTO JÚNIOR, F. A.; TOMAZ, A. C. A.; et al. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 141-148, 2007.
- BUCAK, M. N.; ATAMAN, M. B.; BASPINAR, N.; UYSAL, O.; TASPINAR, M.; BILGILI, A.; OZTURK, C.; GUNGOR, S.; INANÇ, M. E.; AKAL, E. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. **Andrologia**, v.45, n.5, p.545-552, 2015.
- CAROCCIA, G.H.G.; RODOLPHO, J.A.; OLIVEIRA, S.R.P.; CAMILLO, L.; MAGALHÃES, L.G.; ANIBAL, F.F. Atividade dos compostos curcumina e abendazol contra o nematódeo *Toxocara canis* in vitro. **Revista Saúde**, v. 7, n. 1-2, 2013.
- GIORDANI, C. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e toxicidade em modelos alternativos**. 2017. Tese (Doutorado em sanidade animal) - Programa de Pós Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.
- LUÑO, V.; GIL, L.; OLACIREGUI, M.; JEREZ, R. A.; BLAS, I.; HOZBOR, F. Antioxidant effect of lemon balm (*Melissa officinalis*) and mate tea (*Ilex paraguensis*) on quality, lipid peroxidation and DNA oxidation of cryopreserved boar epididymal spermatozoa. **Andrologia**, v.49, n.9, p. 1004-1011, 2015.
- SERGENT, O.; PEREIRA, M.; BELHOMME, C.; CHEVANNE, M.; HUC, L.; LAGADIC-GOSSMANN, D. Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.313, p.104–111, 2005.
- SIERRA-VALDEZ, F. J.; FORERO-QUINTERO, L. S.; ZAPATA-MORIN, P. A.; COSTAS, M.; CHAVEZ-REYES, A.; RUIZ-SUÁREZ, J. C. The Influence of Non Polar and Polar Molecules in Mouse Motile Cells Membranes and Pure Lipid Bilayers. **PLOS ONE**, v.8, n.4, p.1-6, 2013.
- ZÖLLNER, T.; SCHWARZ, M. Herbal Reference Standards: applications, definitions and regulatory requirements. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 1-21, 2013.