

ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CAPIM-LIMÃO E EUCALIPTO EM CÉLULAS HEPÁTICAS DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)

**CLEITON JESUS ANDRADE PEREIRA¹; MATHEUS PEREIRA ALBUQUERQUE,
MIKAELE VALÉRIO TAVARES, MILENA MATTES CERVEIRA²; JANICE
LUEHRING GIONGO². RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER³**

¹*Universidade Federal de Pelotas – andradec556@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – matheuspalbuquerque@hotmail.com;*

mikaelevalerio14@gmail.com; cerveiramm@gmail.com; janicegiongo@hotmail.com

³*Universidade Federal de Pelotas – rodvaucher@hotmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OE) são uma mistura complexa composta por metabólitos secundários produzidos por plantas, a partir de diversos métodos de extração (AL-GHANAYEM *et al.*, 2022). Para a obtenção dos OE, algumas variáveis influenciam diretamente a composição destes, como as diferentes partes anatômicas utilizadas, a idade da planta e localização geográfica (REICHLING, 2021). Dessa forma, os OE possuem uma complexa composição química, que em sua maioria inclui a presença de terpenos, fenóis e outros compostos aromáticos. A presença dessas moléculas aromáticas lhes confere propriedades terapêuticas distintas, na qual essa variabilidade na composição pode resultar em diferentes efeitos quando em contato com células vivas, necessitando de um estudo da bioprospecção dos OE em diferentes segmentos (ÁLVAREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2021).

No contexto da indústria farmacêutica, a avaliação da atividade citotóxica dos OE desempenha um papel fundamental no processo de descoberta de novos fármacos, devido à crescente busca por terapias alternativas e novos compostos naturais com potencial medicinal. No entanto, é crucial identificar quais compostos são eficazes sem causar danos às células saudáveis. A análise da atividade citotóxica dos OE envolve a avaliação dos efeitos desses compostos nas estruturas celulares, principalmente em culturas de células humanas ou de outros organismos-modelo. Essa avaliação é crucial para determinar os efeitos potencialmente prejudiciais ou benéficos dos OE, permitindo uma compreensão mais completa de suas propriedades farmacológicas. Além disso, essa análise também auxilia na identificação de concentrações seguras de uso, contribuindo para a segurança e eficácia dos produtos que os contenham. Os óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) são amplamente utilizados em diversas áreas, como a indústria alimentícia, farmacêutica e de perfumaria, estando presente numa ampla gama de produtos que entram em contato direto com o organismo humano, sendo indispensável a realização de testes e análise de parâmetros de toxicidade (GALLARDO *et al.*, 2022; (KHAZRAEI *et al.*, 2021).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade citotóxica dos óleos essenciais citados, através de dois diferentes testes utilizando células de fígado de peixe-zebra (*Danio rerio*): ensaio de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) e o ensaio de captação do cloridrato

de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina (vermelho neutro, VN), que são métodos rápidos e frequentemente utilizados para medir citotoxicidade.

2. METODOLOGIA

Para os ensaios de citotoxicidade descritos anteriormente foram utilizados hepatócitos de *zebrafish* (*Danio rerio*), da linhagem ZF-L (Cód. 0256) obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células desta linhagem apresentam morfologia epitelial e crescem de forma aderente. As células foram cultivadas e mantidas em meio inativado pelo calor e com antibiótico/antimicótico, armazenadas a 28 °C, sem a necessidade de CO₂. A contagem de células foi realizada calculando-se uma suspensão celular contendo 3x10⁵ células/mL para o plaqueamento. Duas placas de 96 poços (KASVI®, Brasil) foram utilizadas para os experimentos, uma referente ao ensaio de redução do MTT e outra referente ao ensaio de captação do VN. Cada poço da placa foi preenchido com 100 µL da suspensão celular e ambas as placas foram incubadas (28 °C , 24 h) para as células aderirem aos poços. A verificação da formação de monocamada nos poços foi realizada no dia seguinte, e os tratamentos com os dois óleos essenciais foram realizados em triplicata. Tanto o óleo de eucalipto (OEEG) quanto o óleo de capim limão (OECL) foram solubilizados primeiro em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em PBS, de forma que a concentração testada dos OE foi na faixa de 0,5 até 0,001%, após nove diluições seriadas, com a concentração de DMSO não ultrapassando 0,5% no meio de cultura. O controle positivo utilizado foi peróxido de hidrogênio à 5% (v/v) e o controle negativo utilizado foi uma solução salina (0.9%). As placas tratadas foram mantidas em estufa (28 °C, 24 h) sob leve agitação para facilitar a entrada dos compostos teste nas células. Uma solução de trabalho de MTT em PBS (1 mg/mL) e uma solução de VN (40 µg/mL) foram adicionados em 100 µL, e as placas foram seladas e incubadas por 4 h a 28 °C, abrigadas da ação da luz. Para o MTT, o meio contendo o reagente foi descartado e 100 µL de etanol absoluto foram adicionados em cada poço. O VN foi descartado e 100 µL de uma solução descorante composta por 50% etanol absoluto, 49% água deionizada e 1% ácido acético glacial foram adicionados em cada poço. As placas foram mantidas em incubação *overnight* para leitura em leitor de microplaca (Rosys Anthos 2010) na faixa de 570 nm, em ambos os testes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio de MTT permitiu observar a permanência da viabilidade celular após o tratamento com OECL a partir da quinta diluição (2,94 mg/mL), e com o OEEG a partir da terceira (14,3 mg/mL). Logo, pode-se afirmar que OEEG se apresenta menos citotóxico para os hepatócitos do que OECL, pois as células não entram em processo de morte celular mesmo em maiores concentrações. Os resultados foram comparados com o controle positivo utilizado (H₂O₂). Uma viabilidade celular acima de 100% foi obtida para os dois óleos, indicando que, nestas concentrações, os compostos não foram citotóxicos. Os resultados estão dispostos na figura 1.

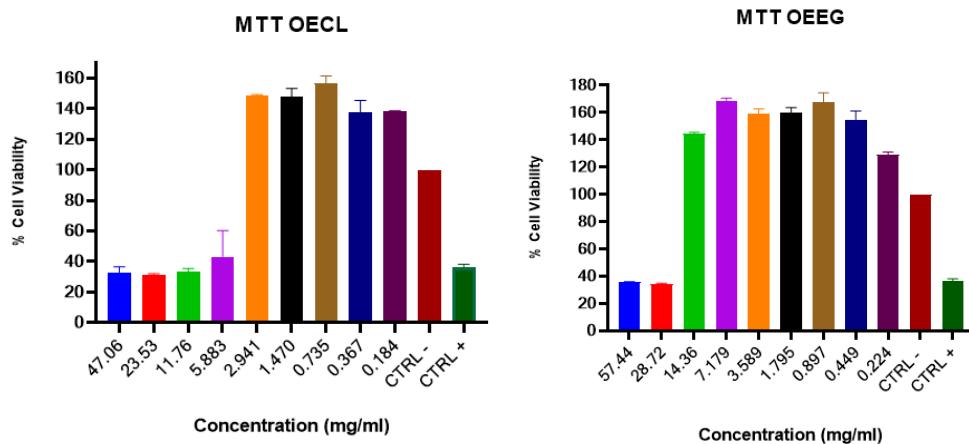


Figura 1. Atividade citotóxica de OEEG (direita) e OECL (esquerda) em células ZF-L pelo ensaio de redução do MTT.

Quanto à captação do VN, os compostos não exibiram atividade citotóxica desde a primeira concentração. Isso evidencia que os compostos não são capazes de alterar a função lisossomal nas concentrações testadas. Os resultados estão dispostos na Figura 2.

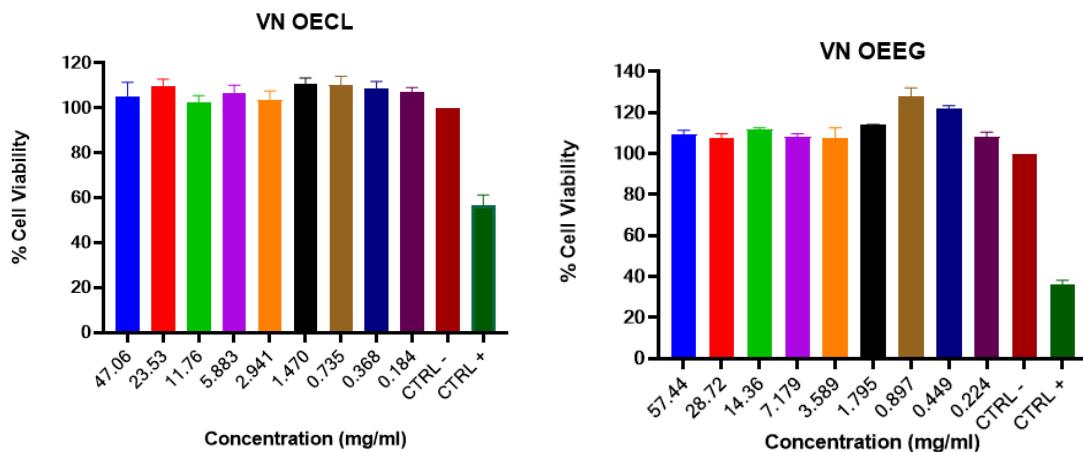


Figura 2. Atividade citotóxica de OEEG (direita) e OECL (esquerda) em células ZF-L pelo ensaio de captação do VN.

A alta concentração de eucaliptol, observada pela análise química por cromatografia gasosa (dado não exposto) no OEEG utilizado, pode explicar a alta viabilidade celular obtida, uma vez que este composto tem uma baixa capacidade de penetrar as membranas de células eucarióticas, sendo transportado principalmente por proteínas de transporte (IVANOV *et al.*, 2021). O eucaliptol é um agente flavorizante de produtos como pastas de dentes, xaropes e enxaguantes bucais, em parte devido à baixa citotoxicidade deste composto. O OEEG utilizado nos testes também continha grande concentração de compostos pouco citotóxicos como α -pineno (GAO *et al.*, 2022).

Adukuw *et al.*, (2016) demonstrou que o OECL não exibiu citotoxicidade em concentrações abaixo de 0,25% (v/v) em fibroblastos dermais humanos (HDF). Contudo, observou-se uma melhor atividade do composto majoritário do óleo (citrinal), com a viabilidade atingindo 80% quando a concentração de citral



atingiu 0,03% nas células utilizadas. Neste estudo foi obtido um resultado semelhante, onde a viabilidade celular foi maior em concentrações inferiores à 0,25% de OECL em ZF-L. Alguns outros estudos inferem que há uma relação diretamente proporcional entre a concentração de citral e geraniol em OECL e o aumento da citotoxicidade em células eucarióticas (HACKE *et al.*, 2020), sugerindo que há um sinergismo com compostos minoritários que reduzem a citotoxicidade do OECL. Uma alternativa é utilizar formulações como nanoemulsões e OECL em fase gasosa, visando redução da citotoxicidade e para trazer estabilidade em misturas com compostos voláteis (DE GODOI *et al.*, 2017).

4. CONCLUSÕES

Ambos os ensaios utilizados se mostraram eficazes para a determinação da citotoxicidade dos óleos essenciais utilizados. Estes ensaios são uma forma de realizar uma triagem *in vitro* de concentrações de compostos de interesse, que pode revelar qual o caminho a ser seguido no manejo destes, como por exemplo a realização de procedimentos que baixem ou estabilizem a citotoxicidade de um composto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADUKWU, Emmanuel C. et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 9619-9627, 2016.
- AL-GHANAYEM, Abdullah A. Phytochemical analysis of *Cymbopogon flexuosus* (lemongrass) oil, its antifungal activity, and role in inhibiting biofilm formation in *Candida albicans* MTCC854. **Journal of King Saud University-Science**, v. 34, n. 5, p. 102072, 2022.
- ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J. et al. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine**, v. 90, p. 153626, 2021.
- DE GODOI, Samantha Nunes et al. Evaluation of stability and *in vitro* security of nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- GALLARDO, Karina Caballero et al. Photoprotective agents obtained from aromatic plants grown in Colombia: Total phenolic content, antioxidant activity, and assessment of cytotoxic potential in cancer cell lines of *Cymbopogon flexuosus* L. and *Tagetes lucida* Cav. essential oils. **Plants**, v. 11, n. 13, p. 1693, 2022.
- GAO, Kai et al. Transcriptome Analysis Reveals the Anti-Tumor Mechanism of Eucalyptol Treatment on Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. **Neurochemical Research**, p. 1-9, 2022.
- HACKE, Ana Carolina Mendes et al. Cytotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf fractions, essential oil, citral, and geraniol in human leukocytes and erythrocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 291, p. 115147, 2022.
- IVANOV, Marija et al. Camphor and eucalyptol—Anticandidal spectrum, antivirulence effect, efflux pumps interference and cytotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 483, 2021.
- KHAZRAEI, Hajar; SHAMSDIN, Seyedeh Azra; ZAMANI, Mozhdeh. In Vitro cytotoxicity and apoptotic assay of *Eucalyptus globulus* essential oil in colon and liver cancer cell lines. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, p. 1-7, 2021.
- REICHLING, Jürgen. Antiviral and virucidal properties of essential oils and isolated compounds—A scientific approach. **Planta Medica**, 2021.