

# AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CASCA DE MEXERICA (*Citrus reticulata*) SOBRE CÉLULAS NORMAIS EM CULTURA

Thaís Regina Brienza Lataro<sup>1</sup>; Jéssica de Lima Nunes<sup>2</sup>; Carlos Rocha Oliveira<sup>3</sup>;  
Katia Cristina Ugolini Mugnol<sup>4</sup>.

Estudante do Curso de Farmácia; email: tha-brienza@uol.com.br<sup>1</sup>

Estudante do Curso de Biologia; email: je\_lyh3@hotmail.com<sup>2</sup>

Professor da Universidade Anhembi-Morumbi<sup>3</sup>

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; email: katiac@umc.br<sup>4</sup>

Área do Conhecimento: Bioquímica

Palavras-chave: óleo essencial; *Citrus reticulata*; cultura de células

## INTRODUÇÃO –

A morte celular programada é uma forma fisiológica de morte celular que ocorre naturalmente. Proporciona um mecanismo de defesa por meio do qual células lesadas ou potencialmente perigosas podem ser eliminadas. Como mecanismo natural de proteção, os organismos vivos contam com sistemas antioxidantes, cuja finalidade básica é neutralizar o máximo possível as espécies radiculares geradas fisiológica e patologicamente. Entretanto, havendo desequilíbrio entre estes sistemas com predomínio dos agentes pró-oxidantes sobre os antioxidantes tem-se o chamado estresse oxidativo. A busca por antioxidantes em alimentos é uma realidade atual. As frutas têm sido alvo de muitos estudos, especialmente as frutas cítricas, ricas em ácido ascórbico, um reconhecido antioxidante. Para estudar o potencial antioxidante dos componentes presentes em óleo essencial extraído de frutas pode-se empregar experimentos sobre células em cultivo e sistemas biomiméticos de membrana.

## OBJETIVO

Testar o potencial citotóxico e/ou antioxidante do óleo essencial extraído de cascas frescas de *Citrus reticulata* em células normais mantidas em cultura, pós-indução de estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio e sua ação sob sistemas biomiméticos de membrana.

## METODOLOGIA

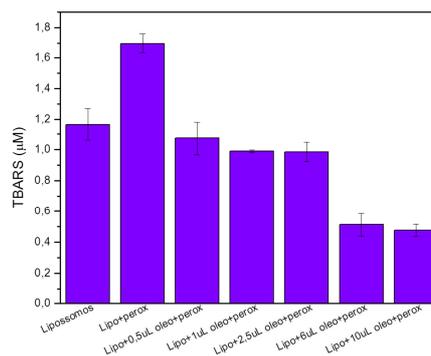
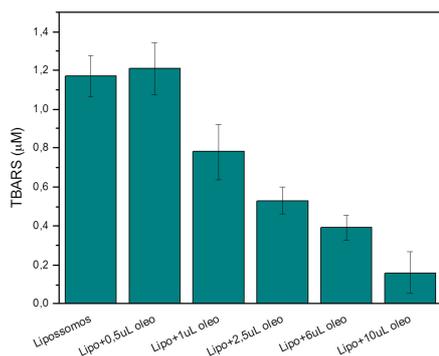
As cascas frescas de mexerica foram removidas manualmente com a utilização de uma faca. A obtenção do óleo essencial foi realizado pelo método de arraste a vapor, utilizando sistema Clevenger. Para estudos de viabilidade celular frente a óleo essencial extraído das cascas frescas de *Citrus reticulata* células de músculo liso de aorta de coelho foram cultivadas em meio DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 40% de soro fetal bovino e pool de antibióticos em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e após sequência de repiques visando obtenção de número adequado de células viáveis foram expostas a diferentes concentrações de óleo essencial puro e previamente diluído em etanol. Foi empregado como agente de verificação do potencial antioxidante do óleo essencial bem como controle positivo dos testes realizados o peróxido de hidrogênio a 50 e 100 µM. As alterações morfológicas e quantitativas pós-interação das células cultivadas e submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial, de peróxido de hidrogênio e da combinação dos dois,

foi realizada por microscopia ótica. A viabilidade celular, por sua vez, em todas as condições testadas, foi determinada pelo método de exclusão de Azul de Tripán. Para determinar a ação do óleo essencial sobre sistema biomimético de membrana foram construídos lipossomos constituídos por cardiolipina, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, na proporção de 50:30:20, respectivamente, o que representa um modelo similar à composição da membrana mitocondrial interna. Os lipossomos foram construídos a partir de um filme lipídico previamente preparado e então colocados em contato com os agentes pró-oxidantes e antioxidantes desejados. A oxidação lipídica decorrente foi medida pela determinação da concentração de malondialdeído (MDA) gerado e avaliada pelo protocolo de de Buege e Aust modificado. Este protocolo se baseia no fato de que quando uma substância promove oxidação lipídica, liberam-se compostos que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA - Thiobarbituric acid-reactive substances), dos quais o mais expressivo é o malondialdeído (MDA). Os compostos gerados são então definidos como TBARs.

## RESULTADOS

A exposição das células de músculo liso de aorta de coelho às diferentes concentrações de óleo essencial extraído de casca fresca de *Citrus reticulata* demonstrou que em altas concentrações o óleo promove alterações morfológicas nas células e promove uma desintegração completa da maioria delas gerando grande quantidade de *debris* no meio de cultura, similar ao que foi observado para o controle positivo em que peróxido de hidrogênio foi adicionado isoladamente às células. A repetição do experimento, porém agora empregando óleo essencial previamente diluído em etanol, e, conseqüentemente em menores concentrações, demonstrou uma taxa menor de morte e desintegração celular, bem como a permanência da estrutura e morfologia das células. Tais resultados demonstraram que o óleo não tem efeito citotóxico quando em baixas concentrações, porém pode promover a morte celular quando puro e em concentrações maiores. Em ambas as condições (óleo puro e previamente diluído) foram realizados testes em que as células foram colocadas em contato com as diferentes concentrações de óleo essencial e também de peróxido de hidrogênio, visando determinar sua capacidade em inibir a ação oxidante deste último. Os resultados obtidos demonstram que em ambas as condições (óleo puro e previamente diluído) o óleo essencial não foi capaz de impedir a ação do peróxido de hidrogênio, que promoveu, assim como na situação controle (célula + peróxido) a morte e desintegração de um grande percentual de células. As observações qualitativas feitas por microscopia ótica e acima relatadas foram reavaliadas utilizando o teste de exclusão de Azul de Tripán. Neste, quantitativo, demonstrou-se que para a condição em que foi utilizado óleo previamente diluído em etanol, as células de fato permaneceram viáveis em quase que sua totalidade, em percentual similar ao encontrado para a amostra controle composta apenas pelas células em cultura (sem adição de óleo e/ou peróxido de hidrogênio). Já na presença do peróxido de hidrogênio, houve uma redução de quase 50% na viabilidade das células, confirmando seu potencial pró-oxidante e as observações feitas pela análise qualitativa microscópica. Nas condições em que o óleo também estava presente não houve preservação das células frente à ação do peróxido, indicando que nas concentrações testadas o óleo não exerceu atividade antioxidante suficiente para preservar a estrutura e a viabilidade celular. Paralelamente aos estudos empregando as células em cultura, foram realizados os testes de lipoperoxidação sob sistema biomimético de membrana. Os resultados obtidos, apresentados nas duas figuras a seguir, permitem inferir que o óleo essencial de casca fresca de *Citrus reticulata* tem potencial antioxidante tanto na ausência quanto na presença de peróxido de hidrogênio sobre sistema modelo de membrana mitocondrial

interna representado pelos lipossomos utilizados nestes experimentos. Nota-se também que os efeitos são concentração-dependente e que na presença de peróxido de hidrogênio como agente indutor de estresse oxidativo a proteção exercida pelo óleo em maiores concentrações é superior ao simples retorno à condição de oxidação promovida pelo ar atmosférico. A figura da esquerda representa a ação do óleo sob o sistema biomimético empregado, demonstrando que a quantidade de TBARS gerado é tão menor quanto maior a concentração de óleo essencial. A figura da direita apresenta o papel do óleo na diminuição da concentração de TBARS gerado quando na presença de peróxido de hidrogênio.



## CONCLUSÃO

Concluimos através deste trabalho que o óleo essencial extraído da casca fresca de *Citrus reticulata* apresenta efeito citotóxico quando em altas concentrações e que não tem poder antioxidante quando da presença de peróxido de hidrogênio nas condições e células testadas. Paralelamente, demonstra capacidade de reduzir os efeitos oxidativos sobre sistema biomimético de membrana mitocondrial na presença e na ausência deste mesmo peróxido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERREIRA, H.; LÚCIO, M.; SIQUET, C.; REIS, S. Utilização de modelos membranares na avaliação da actividade de fármacos. **Química: boletim da Sociedade Portuguesa de Química**. Lisboa, v. 1, n. 99, p. 39-51, 2005.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, Londres, v. 142, n.2, p. 231-255, 2004.

BIANCHI, M. de. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

TAROZZI, A.; HRELIZ, S.; ANGELONI, C.; MORRONI, F.; BIAGI, P.; GUARDIGLI, M.; CANTELLI-FORTI, G.; HRELIA, P. Antioxidant effectiveness of organically and non-organically grown red oranges in cell culture systems. **European Journal of Nutrition**, v.45, n.3, pp. 152-158, 2006.

POULOSE, S.M.; HARRIS, E.D., PATIL, B.S. Citrus Limonoids Induce Apoptosis in Human Neuroblastoma Cells and Have Radical Scavenging Activity<sup>1</sup>. **The Journal of Nutrition**, Texas, v.135, n.4, p. 870-877, 2005.

TUMBAS, VesnaT. *et al.* Antioxidant Activity of Mandarin (*Citrus reticulata*) Pell. **Acta Periodica Technologica**. Novi Sad, v. 40, n.1, p. 195-203, 2010.

CRUZ, M.; ENES, M.; PEREIRA, M.; DOURADO, M.; RIBEIRO, A. B. S. Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, Coimbra, v. 15, n. 4, p. 669-682, 2009.

LIMA, C. A.; SILVA, C. A. M.; COSTA, D. S. O.; SCIENZA, M. R.; SILVA, M. V. C.; SILVA, R. A. M. **Caracterização química do óleo essencial da casca do *Citrus sinensis* obtido por hidrodestilação em aparelho clewenger**. Belém: Universidade Federal do Pará, 2010.