

AVALIAÇÃO DO EFEITO HEMOLÍTICO DOS ÓLEOS VEGETAIS OZONIZADOS DE GIRASSOL (*Helianthus Annuus*) E OLIVA (*Olea Europaea*)

GEOVANA DOMINGUES JARDIM SOARES¹; VITÓRIA XAVIER CABRAL²,
SIMONE ZARICHTA RAKULOSKI³; PEDRO CILON BRUM RODEGHIERO⁴; ANA
RAQUEL MANO MEINERZ⁵; SÉRGIO JORGE⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas, FaVet, Laboratório ClinPet – ge.soares9@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas, FaVet, Laboratório ClinPet – vitoriaxc@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas, IB, Laboratório ClinPet – simonezrakuloski@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas, HCV, Laboratório LPCVet – pedro.cilonbrumr@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas, FaVet, Laboratório LPCVet – rmeinerz@bol.com.br

⁶ Universidade Federal de Pelotas, FaVet, Laboratório ClinPet – sergiojorgevet@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O uso excessivo e inadequado de medicamentos tem se tornado uma ameaça à saúde única, especialmente devido ao aumento da resistência a antibióticos. Na medicina veterinária, o uso de óleos tem se mostrado promissor tanto na prevenção quanto no tratamento de doenças causadas por microrganismos resistentes, contribuindo de forma significativa para a saúde dos animais (CAVALCANTE et al., 2021).

Os óleos de girassol (*Helianthus annuus*) e oliva (*Olea europaea*) ganharam destaque por suas propriedades terapêuticas, sendo utilizados tanto em suas formas vegetais quanto ozonizadas. O óleo de girassol é reconhecido por sua ação cicatrizante, anti-inflamatória e hidratante (LIN; ZHONG; SANTIAGO, 2017). Já o óleo de oliva possui compostos antioxidantes e fenólicos com potente atividade antimicrobiana, além de favorecer a regeneração dos tecidos (DONATO-TRANCOSO; MONTE-ALTO-COSTA; ROMANA-SOUZA, 2016).

A ozonização promove a incorporação do ozônio aos óleos vegetais, um agente com ação germicida, antifúngica e antiviral, o que potencializa sua eficácia. Dessa forma, os óleos de girassol e de oliva ozonizados configuram-se como alternativas promissoras para o tratamento de infecções, inflamações e feridas em animais, proporcionando uma abordagem natural e eficaz, ao mesmo tempo em que contribuem para a redução do uso de medicamentos convencionais (PUXEDDU et al., 2024).

Os testes de hemólise são essenciais para entender se novos materiais ou compostos têm potencial para causar efeitos hemolíticos em organismos vivos. O ensaio de hemólise avalia se o composto é capaz de romper as membranas dos eritrócitos, levando à morte celular. Esse ensaio é bastante utilizado por sua simplicidade, baixo custo e fácil execução. O procedimento consiste na coleta de sangue animal e as hemácias entram em contato com o produto a ser avaliado, e, em casos de hemólise, ocorre a liberação de hemoglobina para o meio extracelular, que pode ser quantificada por espectrofotometria, permitindo estimar o efeito hemolítico do composto (SAEBO et al., 2023). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar

a atividade hemolítica dos óleos de girassol e de oliva, tanto em suas formas vegetais quanto ozonizadas.

2. METODOLOGIA

A metodologia utilizada neste trabalho foi baseada em YU, MALUGIN, GHANDEHARI (2011) e ARANTES et al. (2024) com adaptações. Foi utilizada uma amostra de sangue canino cedida após a análise hematológica pelo Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal de Pelotas (LPCVet-UFPEl). Para o preparo da amostra, foi feita a lavagem aliquotando 500 µL de sangue, e adicionando 1000 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), realizada homogeneização manual e centrifugação a 1700 rpm por cinco minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e foi realizada a segunda lavagem e centrifugado nas mesmas condições.

Na etapa seguinte, adicionaram-se 2000 µL de PBS à amostra, que foi novamente homogeneizada manualmente, e pipetaram-se 250 µL do sobrenadante em microtubos correspondentes aos grupos testados. Os óleos de girassol (OG), girassol ozonizado (OGO), oliva (OO) e oliva ozonizado (OOO) foram testados na concentração de 7000 µg/mL, enquanto o itraconazol foi utilizado a 16µg/mL. Como controles, empregaram-se 250 µL de Triton (controle positivo) e 250µL de PBS (controle negativo). Os tubos foram deixados em repouso em temperatura ambiente por duas horas e 30 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas a 3700 rpm por 3 minutos.

Posteriormente, foram transferidos 300 µL do sobrenadante dos tratamentos e controles para uma placa de 96 poços, em triplicata (100 µL/poço). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro de absorbância (Abs), utilizando filtro de 590 nm. A taxa de hemólise foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{controle negativo}})}{(\text{Abs}_{\text{controle positivo}} - \text{Abs}_{\text{controle negativo}})} \times 100$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio de hemólise diversos protocolos são utilizados. No estudo de SAEBO et al. (2023), são discutidas as principais variáveis desses protocolos, entre eles o tempo de incubação, escolha do detergente utilizado como controle positivo e forma de leitura dos resultados do teste. Nesta pesquisa, optou-se pela leitura por espectrofotometria, conforme sugerido por SILVA et al. (2022).

No presente estudo, o controle positivo (Triton X100) apresentou hemólise intensa (SAEBO et al., 2023) enquanto no controle negativo (PBS) não houve hemólise na amostra, desta maneira serviu como parâmetro eficiente para comparação com os testes, validando os resultados encontrados no teste realizado.

Para interpretar o potencial hemolítico das amostras testadas (Figura 1A), os resultados obtidos neste estudo foram comparados com o trabalho de RIBEIRO et al.

(2020), que consideram valores entre 5 e 10% como indicativos de baixa hemólise e valores acima de 40% como marcador de alta hemólise. Com base nesses critérios, observou-se que os óleos vegetais de girassol e oliva apresentaram baixa atividade hemolítica, com valores de 7,14% e 6,09%, respectivamente. Por outro lado, os óleos ozonizados de girassol e oliva apresentaram valores de 54,34% e 53,99%, caracterizando atividade hemolítica significativa, o que sugere um potencial hemolítico mais elevado dessas formulações (Figura 1B). Esses dados reforçam a necessidade de cautela na utilização de óleos ozonizados.

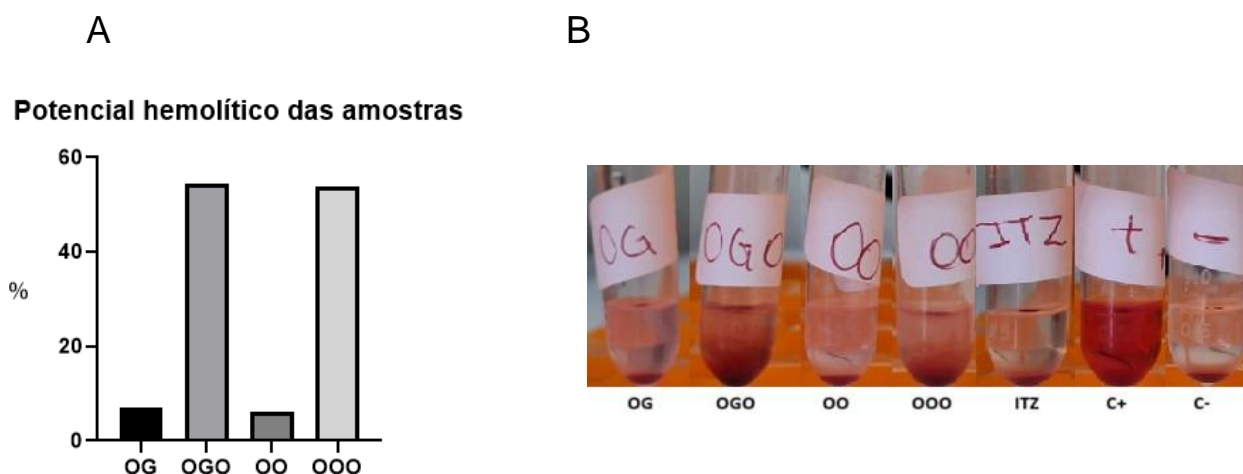


Figura 1: Avaliação do potencial hemolítico das amostras testadas. A: Percentual de hemólise do óleo de Girassol (OG), óleo de Girassol Ozonizado (OGO), óleo de Oliva (OO) e óleo de Oliva Ozonizado (OOO). B: Avaliação visual dos resultados.

Outro fator crítico que pode influenciar significativamente os resultados de ensaios de hemólise é o tempo de incubação entre os eritrócitos e os compostos testados. Embora muitos estudos utilizem 60 minutos como padrão, não há consenso na literatura sobre o tempo ideal, e períodos mais curtos ou mais longos também são adotados por diferentes autores (SAEBO et al., 2023). Por exemplo, para YU, MALUGIN, GHANDEHARI (2011) o tempo de incubação utilizado foi de 4 horas. Para este estudo foi estabelecido um tempo de incubação de duas horas e 30 minutos, em adaptação a protocolos descritos nas referências previamente citadas. Segundo a literatura há uma tendência de aumento da hemólise proporcional ao tempo de incubação (SAEBO et al., 2023), o que pode ter contribuído para os elevados níveis de hemólise observados com os óleos ozonizados. Em contraste, os óleos vegetais apresentaram baixos níveis de hemólise com o mesmo tempo de incubação. Dessa forma, o período adotado mostrou-se adequado para evidenciar diferenças no comportamento hemolítico entre os óleos testados

4. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu avaliar o potencial hemolítico dos óleos de girassol e oliva, em suas formas vegetais e ozonizadas, utilizando o ensaio de hemólise com

sangue canino. Os resultados mostraram que os óleos vegetais apresentaram baixos índices de hemólise. Em contrapartida, os óleos ozonizados demonstraram elevados níveis de hemólise. Esses mesmos óleos demonstraram propriedades terapêuticas potencializadas, reforçando seu valor como alternativas eficazes, toda via sua ação hemolítica deve ser considerada quando for utilizada em formulações veterinárias, ao contrário dos óleos vegetais, que se mostraram seguros neste teste experimental.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVALCANTE, H.T.M. et al. Óleos essenciais no tratamento de dermatozoonoses-revisão de literatura. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 17, p. 2-3, 2021.

DONATO-TRANCOSO, A.; MONTE-ALTO-COSTA, A.; ROMANA-SOUZA, B. Olive oil-induced reduction of oxidative damage and inflammation promotes wound healing of pressure ulcers in mice. **Journal of Dermatological Science**, v. 83, n. 1, p. 60–69, 2016.

LIN, T. K.; ZHONG, L.; SANTIAGO, J. L. Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 70, 2017.

PIMENTEL ARANTES, J.; et al. An approach to combat multidrug-resistant *K. pneumoniae* strain using synergistic effects of *Ocotea diospyrifolia* essential oil in combination with amikacin. **Microbial Pathogenesis**, v. 193, p. 106782, ago. 2024.

PUXEDDU, S; et al. Physico-chemical investigation and antimicrobial efficacy of ozonated oils: the case study of commercial ozonated olive and sunflower seed refined oils. **Molecules**, Basel, v. 29, n. 3, p. 679, fev. 2024.

RIBEIRO, N; et al. Red blood cell hemolytic assay: an alternative to assess cytotoxicity of essential oils. **International Journal of Development Research**, v. 10, n. 3, p. 34565–34569, 2020.

SAEBO, I; BJORÅS, M; FRANTZ, H; HELGESEN, E; BOOTH, James A. Optimization of the hemolysis assay for the assessment of cytotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 24, n. 3, p. 2914, 2023.

SILVA, K et al. Avaliação in vitro da citotoxicidade do extrato de *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) e sua equivalência com compostos quinolínicos e avermectina. **Research Society and Development**, v. 11, n. 15, p. 4, 2022.

YU, T.; MALUGIN, A.; GHANDEHARI, H. Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity. **ACS Nano**, v. 5, n. 7, p. 5717–5728, 2011.