



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

LEONARDO VITORINO COSTA DE AQUINO

**EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DE *Citrus sinensis* NO MEIO DE
MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE OÓCITOS BOVINOS E SEU STATUS
OXIDATIVO**

MOSSORÓ-RN

2022

LEONARDO VITORINO COSTA DE AQUINO

**EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DE *Citrus sinensis* NO MEIO DE
MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE OÓCITOS BOVINOS E SEU STATUS
OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira

Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Medeiros Bertini

MOSSORÓ-RN
2022

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

A581e Aquino, Leonardo Vitorino Costa de.
Efeitos do óleo essencial da casca de Citrus sinensis no meio de maturação *in vitro* sobre oócitos bovinos e seu status oxidativo / Leonardo Vitorino Costa de Aquino. - 2022.
92 f. : il.

Orientadora: Alexsandra Fernandes Pereira.
Coorientadora: Luciana Medeiros Bertini.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2022.

1. Produtos naturais. 2. Casca de laranja. 3. Maturação oocitária. 4. Produção *in vitro* de embriões. I. Pereira, Alexsandra Fernandes, orient. II. Bertini, Luciana Medeiros, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência

Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva

CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da Instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

LEONARDO VITORINO COSTA DE AQUINO

**EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DE *Citrus sinensis* NO MEIO DE
MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE OÓCITOS BOVINOS E SEU STATUS
OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal.

Defendida em: 17/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

Alexsandra Fernandes Pereira

Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira
(UFERSA)
Presidente e Orientadora

Luciana Medeiros Bertini

Profa. Dra. Luciana Medeiros Bertini
(IFRN)
Membro Examinador

Andréia Maria da Silva

Profa. Dra. Andréia Maria da Silva
(IFRN)
Membro Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LEONARDO VITORINO COSTA DE AQUINO – Nascido em Upanema, RN, no dia 10 de fevereiro de 1995, filho de Maria de Fátima Aquino Costa e Reginaldo Vitorino da Costa. Graduou-se em Biotecnologia pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA, 2016–2019). Parte deste período, estagiou no Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA) da UFERSA (Programa de Iniciação Científica Institucional, PICI, 2018–2019). Além disso, foi monitor voluntário da disciplina de Histologia e Embriologia Animal do curso de Biotecnologia da UFERSA durante o período de 2017–2019. Em dezembro de 2019, após ser aprovado no processo seletivo para o mestrado acadêmico em Ciência Animal (PPGCA/UFERSA), iniciou em janeiro de 2020, suas atividades de mestrado no LBA com bolsa de auxílio financeiro pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aos meus queridos pais, Maria de Fátima Aquino Costa e Reginaldo Vitorino da Costa. A minha orientadora, Alexsandra Fernandes Pereira, pelo carinho, dedicação e paciência de sempre. Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) pela formação profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA, responsável: Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira) por permitir a utilização do espaço, equipamentos e reagentes para realização dos experimentos.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte/Apodi (IFRN, responsável: Profa. Dra. Luciana Medeiros Bertini) por permitir a obtenção e análise química do óleo essencial da casca de laranja.

Ao Abatedouro e Frigorífico Industrial de Mossoró S/A (AFIM) por disponibilizar o material biológico para realização deste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora por buscarem contribuir da melhor maneira com o trabalho.

A Deus. Eu gostaria de agradecer a você Deus. Você que sabe tudo que passamos juntos nesse ciclo que não foi fácil para ninguém. Muito obrigado! A dose diária de felicidade, paz e apreço pelo meu futuro foi fundamental para chegarmos aonde estamos hoje. A você, meu carinho e fidelidade de sempre.

A minha “mommy”, Maria de Fátima Aquino Costa, obrigado por não medir esforços para minha felicidade, um dia vou lhe retribuir tudo isso. Obrigado pelo carinho, amor, educação e apoio que sempre tivemos um com o outro. Saiba que você me dá muito orgulho. Afinal, não é todos os dias que se faz uma cirurgia como a senhora fez, e hoje está aí para contar história sem perder o brilho no olhar. Amo muito você!

Ao meu pai, Reginaldo Vitorino da Costa, por me deixar e buscar pacientemente no laboratório todos os dias sem pestanejar em nada. Além disso, obrigado por todas as vezes que lhe fiz esperar porque estive fazendo experimento ou porque você precisaria vir deixar meu almoço. Você é um dos maiores exemplos para minha vida, nunca esqueça disso!

A todos os meus familiares que estiveram diretamente e indiretamente me incentivando a não desistir daquilo que almejo para minha vida, especialmente minhas primas, Fabiana da Silva Farias e Margareth Argemiro de Aquino, que disponibilizaram o carro inúmeras vezes sem nenhum medo para que eu pudesse finalizar meus experimentos. Obrigado sempre por todo apoio!

Aos meus amigos acolhedores que sempre estiveram me fazendo sorrir nos momentos mais cansativos, incentivando-me sempre. Em especial, Bruno Alves da Costa, Felipe Raoni dos Santos Freitas e José Ítalo da Silva Oliveira. Vocês foram essenciais para tudo isso.

A todos do LBA/UFERSA por contribuírem para o andamento dos experimentos e por todas as tardes que estivemos juntos, especialmente a Érika Almeida Praxedes, que além de co-orientadora de graduação, tornou-se uma amiga de pós-graduação, estando sempre presente e disponível nas horas em que necessitei.

Ao meu braço esquerdo de pós-graduação, Lhara Ricarliany Medeiros de Oliveira, por toda convivência, paciência e ensinamentos durante todos os experimentos. Você além de ser uma amiga maravilhosa, foi essencial para alcançarmos o término desse trabalho.

Ao meu braço direito e minha maravilhosa amiga de pós-graduação, Maria Valéria de Oliveira Santos. Nossa, o que falar sobre essa árdua jornada de pós-graduação, hein Val? Muito obrigado sempre por tudo que você fez e faz por mim, estarei sempre aqui para o que você precisar! VOCÊ É INCRÍVEL!! Obrigado por tornar as rotinas da produção *in vitro* de embriões menos exaustivas e mais divertidas com sua mente lhe tapeando, e por estarmos na sexta-feira fazendo uma baladinha com nossos oócitos. Te amo!

Ainda, eu gostaria de agradecer a minha “mãe”, amiga confidente e orientadora, Alexsandra Fernandes Pereira. Deus foi e é muito generoso comigo, pois me deu de presente uma pessoa que não mede esforços para me ajudar. Obrigado, Alê! Obrigado de verdade. Sou eternamente grato por tudo que você já fez e faz sempre por mim. Você me ensina diariamente a me tornar uma pessoa melhor, com muito respeito, dedicação, amor e, acima de tudo, gentileza. Desculpa se em algum momento do experimento lhe desapontei quando não entreguei os resultados que você gostaria de ver, mas saiba que sou eternamente grato por você estar comigo. Amo muito você, nunca esqueça disso!! Você é maravilhosa e é também minha maior inspiração profissional. Eu espero um dia alcançar tudo aquilo que você faz com excelência. Obrigado por ser minha melhor amiga!!!

Finalmente, eu gostaria mais uma vez de agradecer a todos que citei aqui, vocês são muito especiais na minha vida. Nunca esqueçam que estarei sempre aqui para o que precisarem.

“Acima de tudo, nunca pare de acreditar.”

As aventuras de Pi

EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DE *Citrus sinensis* NO MEIO DE MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE OÓCITOS BOVINOS E SEU STATUS OXIDATIVO

AQUINO, Leonardo Vitorino Costa de. EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DE *Citrus sinensis* NO MEIO DE MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE OÓCITOS BOVINOS E SEU STATUS OXIDATIVO. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, 2022.

RESUMO: O uso de antioxidantes naturais em meio de maturação pode ser uma alternativa para reduzir os efeitos negativos do estresse oxidativo produzido durante a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Testes *in vitro* demonstraram a capacidade do óleo essencial da casca de *Citrus sinensis* (OECS) em diminuir as espécies reativas de oxigênio (EROs), indicando que ele pode ser um interessante agente antioxidante durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos. Portanto, o objetivo foi avaliar os efeitos do OECS no meio de MIV sobre complexos *cumulus*-oóbito (CCOs) bovinos e seu status oxidativo, especificamente quanto à expansão e viabilidade das células do *cumulus*, maturação nuclear, maturação citoplasmática, níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e níveis intracelulares de glutationa (GSH). Inicialmente, o OECS foi extraído por hidrodestilação das cascas em aparelho do tipo Clevenger. A composição química do OECS foi realizada por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa. O OECS apresentou como constituintes D-limoneno (48,5%), α -terpineol (40,2%) e outros compostos (11,3%). Oócitos foram maturados nas seguintes suplementações: controle (sem antioxidante), CIS (100 μM de cisteamina), OECS10 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OECS), OECS30 (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OECS) e OECS50 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OECS). Todos os dados foram expressos com média \pm erro padrão e analisados usando o software StatView 5.0 ($P < 0,05$). Um total de 480 ovários foi empregado para adquirir 1877 oócitos imaturos viáveis (3,9 oócitos viáveis/ovário) que foram selecionados e distribuídos em vinte repetições. Embora todos os grupos contendo antioxidante tenham aumentado a viabilidade das células do *cumulus* (CIS: $83,9 \pm 1,6\%$ vs. OECS10: $84,0 \pm 2,0\%$ vs. OECS30: $84,7 \pm 2,2\%$ vs. OECS50: $83,8 \pm 1,6\%$) quando comparados ao controle ($78,9 \pm 1,8\%$), apenas CIS ($99,6 \pm 0,4\%$), OECS10 ($100 \pm 0,0\%$) e OECS30 ($99,1 \pm 0,9\%$) promoveram aumento na expansão dessas células quando comparados ao controle ($96,4 \pm 1,8\%$) e OECS50 ($94,7 \pm 3,0\%$, $P < 0,05$). O OECS10 ($83,2 \pm 3,0\%$) e o OECS30 ($84,6 \pm 2,4\%$) garantiram uma taxa maior de primeiro corpúsculo polar (1CP) quando comparado ao OECS50 ($77,0 \pm 2,8\%$). Nenhuma diferença foi observada para as taxas de metáfase II (MII) com valores variando de $69,1 \pm 5,1\%$ a $75,7 \pm 3,3\%$ entre os grupos contendo antioxidante ($P > 0,05$). Além disso, nenhuma diferença foi observada nas taxas de maturação citoplasmática, com valores variando de $78,7 \pm 4,5\%$ a $86,5 \pm 3,9\%$ entre os grupos contendo antioxidante ($P > 0,05$). Todos os tratamentos antioxidantes resultaram em diminuição de EROS em unidades de fluorescência arbitrária (CIS: $0,39 \pm 0,24$ vs. OECS10: $0,39 \pm 0,18$ vs. OECS30: $0,50 \pm 0,44$ vs. OECS50: $0,60 \pm 0,44$), quando comparado ao controle ($1,00 \pm 0,65$). Nenhuma diferença foi observada para os níveis de $\Delta\Psi_m$ e GSH ($P > 0,05$). Em conclusão, embora todas as concentrações de OECS tenham promovido redução de EROS, as concentrações de 10 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OECS garantiram melhores taxas de qualidade oocitária após a maturação. Portanto, o OECS, em concentrações definidas, adicionado ao meio de MIV, pode ser um interessante substituto de composto sintético para a redução dos danos causados pelo estresse oxidativo em oócitos bovinos.

Palavras-chave: produtos naturais, casca de laranja, maturação oocitária, produção *in vitro* de embriões.

EFFECTS OF *Citrus sinensis* PEEL ESSENTIAL OIL IN THE MEDIUM OF *IN VITRO* MATURATION OF BOVINE OOCYTES AND THEIR OXIDATIVE STATUS
AQUINO, Leonardo Vitorino Costa de. EFFECTS OF *Citrus sinensis* PEEL ESSENTIAL OIL IN THE MEDIUM OF *IN VITRO* MATURATION OF BOVINE OOCYTES AND THEIR OXIDATIVE STATUS. 2022. Dissertation (Master's in Animal Science: Animal Mophophysiology and Biotechnology) – Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), Mossoró, RN, 2022.

ABSTRACT: The use of natural antioxidants in maturation medium can be an alternative to reduce the negative effects of oxidative stress produced during *in vitro* embryo production (IVEP). *In vitro* tests demonstrated the capacity of essential oil of *Citrus sinensis* (EOCS) to decrease reactive oxygen species (ROS), indicating that it may be an interesting antioxidant agent during *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes. Therefore, the aim was to evaluate the effects of EOCS in the IVM medium on bovine *cumulus*-oocyte complexes (COCs) and their oxidative status, specifically regarding the expansion and viability of *cumulus* cells, nuclear maturation, cytoplasmic maturation, levels of ROS, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and intracellular levels of glutathione (GSH). Initially, EOCS was extracted by hydrodistillation of the peels in a Clevenger-type apparatus. The chemical composition of the EOCS was performed by means of gas chromatography coupled with mass spectroscopy. EOCS presented as constituents D-limonene (48.5%), α -terpineol (40.2%) and other compounds (11.3%). Oocytes were matured in the following supplements: control (without antioxidant), CYS (100 μ M cysteamine), EOCS10 (10 μ g/mL of EOCS), EOCS30 (30 μ g/mL of EOCS) and EOCS50 (50 μ g/mL of EOCS). All data were expressed as mean \pm standard error and analyzed using StatView 5.0 software ($P < 0.05$). A total of 480 ovaries were used to acquire 1877 viable immature oocytes (3.9 viable oocytes/ovaries) which were selected and distributed in twenty replicates. Although all groups containing antioxidant increased *cumulus* cell viability (CYS: $83.9 \pm 1.6\%$ vs. EOCS10: $84.0 \pm 2.0\%$ vs. EOCS30: $84.7 \pm 2.2\%$ vs. EOCS50: $83.8 \pm 1.6\%$) when compared to the control ($78.9 \pm 1.8\%$), only CYS ($99.6 \pm 0.4\%$), EOCS10 ($100 \pm 0.0\%$) and EOCS30 ($99.1 \pm 0.9\%$) promoted an increase in the expansion of these cells when compared to the control ($96.4 \pm 1.8\%$) and EOCS50 ($94.7 \pm 3.0\%$, $P < 0.05$). EOCS10 ($83.2 \pm 3.0\%$) and EOCS30 ($84.6 \pm 2.4\%$) guaranteed a higher rate of first polar body (1PB) when compared to the EOCS50 ($77.0 \pm 2.8\%$). No difference was observed for metaphase II (MII) rates with values ranging from $69.1 \pm 5.1\%$ to $75.7 \pm 3.3\%$ among groups containing antioxidant ($P > 0.05$). Moreover, no difference was observed in cytoplasmic maturation rates, with values ranging from $78.7 \pm 4.5\%$ to $86.5 \pm 3.9\%$ among groups containing antioxidant ($P > 0.05$). All antioxidant treatments resulted in decreased ROS in arbitrary fluorescence units (CYS: 0.39 ± 0.24 vs. EOCS10: 0.39 ± 0.18 vs. EOCS30: 0.50 ± 0.44 vs. EOCS50: 0.60 ± 0.44), when compared to the control (1.00 ± 0.65). No difference was observed for $\Delta\Psi_m$ and GSH levels ($P > 0.05$). In conclusion, although all concentrations of EOCS have promoted a reduction of ROS, the concentrations of 10 and 30 μ g/mL of EOCS ensure better oocyte quality rates after maturation. Therefore, EOCS, at defined concentrations, added to the IVM medium, can be an interesting substitute for a synthetic compound to reduce the damage caused by oxidative stress in bovine oocytes.

Keywords: natural products, orange peel, oocyte maturation, *in vitro* embryo production.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Figura 1. Características botânicas de *Citrus sinensis*. **(A)** Exemplar de laranjeira. **(B)** Laranja pêra. **(C)** Laranja valênciia. **(D)** Laranja natal..... 29

Figura 2. Estruturas fisiológicas da laranja..... 30

Figura 3. Representação química dos compostos majoritários do OECS..... 32

CAPÍTULO 3 – ANTIOXIDANT POTENTIAL OF *Citrus sinensis* PEEL ESSENTIAL OIL (OECS) ON BOVINE OOCYTES

Figure 1. Effect of EOCS on bovine oocyte *cumulus* cell expansion. **(A-E)** Representation of immature bovine oocytes under different conditions (control, CYS, 10 µg/mL, 30 µg/mL, and 50 µg/mL of EOCS). **(A'-E')** Representation of bovine oocyte *cumulus* cell expansion after 24 h IVM under different conditions (control, CYS, 10 µg/mL, 30 µg/mL, and 50 µg/mL of EOCS)..... 67

Figure 2. Mitochondrial pattern of bovine oocytes cultured in medium supplemented with EOCS. **(A-B)** Representative image of mitochondria in transition and dispersed in the cytoplasm of bovine oocytes. **(C-D)** Representation of oocytes labeled with MitoTracker Red® showing homogeneity and aggregation of cytoplasmic mitochondria. **(E)** Homogeneous (pattern A) and heterogeneous (pattern B) pattern of the cytoplasm of bovine oocytes after oocyte maturation. Data are shown in percentage. **(F)** Mitochondrial distribution of bovine oocyte cytoplasmic maturation. Scale bars = 50 µm..... 69

Figure 3. Evaluation of the influence of EOCS on the production of ROS in bovine oocytes after *in vitro* maturation. **(A)** Representative image of oocytes labeled with the H₂DCFDA probe. **(B)** Quantification of intracellular levels of ROS. Scale bars = 200 µm. ^{a,b}: *p* < 0.05... 71

Figure 4. Evaluation of the influence of EOCS on the bioenergetic potential of bovine oocytes after *in vitro* maturation. **(A)** Representation of oocytes labeled with the MitoTracker Red® (CMXRos) probe. **(B)** Quantification of the mitochondrial potential of oocytes. Scale bars = 200 µm. *p* > 0.05..... 72

Figure 5. Evaluation of the influence of EOCS on GSH synthesis in bovine oocytes after their *in vitro* maturation. **(A)** Representation of Cell Tracker Blue[®] (CMF₂HC) labeled oocytes. **(B)** Quantification of intracellular GSH levels. Scale bars = 200 μ m. $p > 0.05$ 73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

CAPÍTULO 2 – USE OF FRUIT-DERIVED ESSENTIAL OILS WITH ANTIOXIDANT PROPERTIES IN ANIMAL CELL CULTURES: A REVIEW

Table 1. Results of the use of essential oil derived from different parts of fruits with biotechnological potential..... 51

CAPÍTULO 3 – ANTIOXIDANT POTENTIAL OF *Citrus sinensis* PEEL ESSENTIAL OIL (OECS) ON BOVINE OOCYTES

Table 1. Chemical composition of *Citrus sinensis* peel essential oil..... 63

Table 2. Influence of EOCS during bovine IVM on evaluation of *cumulus* cells and nuclear maturation..... 68

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Quadro 1. Uso de suplementações sintéticas e naturais durante as etapas da PIVE em bovinos..... 25

Quadro 2. Uso de extratos e óleos essenciais durante a PIVE de mamíferos domésticos..... 27

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Percentual
<	Menor
>	Maior
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
1CP	Primeiro corpúsculo polar (<i>IPB: first polar body</i>)
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Catalase
CCOs	Complexos <i>cumulus</i> -oócito (<i>COCs: cumulus-oocyte complexes</i>)
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
CMXRos	Mito Tracker Red®
CO ₂	Dióxido de carbono
CYS	Cisteamina (Cysteamine)
EROs	Espécies reativas de oxigênio (<i>ROS: reactive oxygen species</i>)
et al.	E outros
FBS	Fetal bovine serum (SFB: Soro fetal bovino)
FIV	Fecundação <i>in vitro</i> (IVF: <i>in vitro</i> fertilization)
FSH	Follicle stimulating hormone
g	Grama
G	Gauge
GSH	Glutathione
GTx	Glutationa peroxidase
h	Hora
H ₂ DCFDA	2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
i.e.,	Isto é
kg	Quilo
LBA	Laboratório de Biotecnologia Animal
LH	Luteinizing hormone

Mg	Miligramma
MII	Metaphase plate
Min	Minuto
MIV	Maturação <i>in vitro</i> (IVM: <i>in vitro</i> maturation)
mL	Mililitro
mm	Milímetro
n	Número
NaCl	Cloreto de sódio
OECS	Óleo essencial da casca de <i>Citrus sinensis</i> (EOCS: <i>Citrus sinensis</i> peel essential oil)
OECS10	10 µg/mL de OECS (EOCS10)
OECS30	30 µg/mL de OECS (EOCS30)
OECS50	50 µg/mL de OECS (EOCS50)
ORM	Oocyte recovery medium
P	Valor-P
PBS	Solução tampão fosfato
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões (IVEP: <i>In vitro</i> embryo production)
SCNT	Somatic cell nuclear transfer
SOD	Superóxido dismutase
SOF	Synthetic Oviductal Fluid
TCM199	Tissue culture medium 199
TEC50	Tempo para o estado estacionário da EC50
Vs.	Versus
x	Vezes
ΔΨm	Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
1. INTRODUÇÃO	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1. IMPACTO ECONÔMICO E LIMITAÇÕES DA PIVE EM BOVINOS	21
2.2. EFEITOS DO ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE A PIVE BOVINA	22
2.3. SUPLEMENTAÇÕES EMPREGADAS PARA A REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA PIVE BOVINA.....	24
2.4. SUBSTÂNCIAS NATURAIS COMO SUPLEMENTAÇÕES EM MEIOS DE PIVE BOVINA.....	26
2.5. ASPECTOS BOTÂNICOS E COMERCIAIS DE <i>C. sinensis</i>	28
2.5.1. <i>Propriedade antioxidant da casca de C. sinensis</i>	30
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	35
5. OBJETIVOS	36
5.1. OBJETIVO GERAL	36
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 2 – USE OF FRUIT-DERIVED ESSENTIAL OILS WITH ANTIOXIDANT PROPERTIES IN ANIMAL CELL CULTURES: A REVIEW	46
CAPÍTULO 3 – ANTIOXIDANT POTENTIAL OF <i>Citrus sinensis</i> PEEL ESSENTIAL OIL (OECS) ON BOVINE OOCYTES	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
ANEXOS	86
APÊNDICES	89

1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

2

3 1. INTRODUÇÃO

4

5 Os óleos essenciais são misturas complexas que apresentam em sua composição química
6 fitoquímicos originados a partir do metabolismo secundário das plantas, sendo formados
7 principalmente por monoterpenos, álcoois, fenóis, ésteres e cetonas (FERRONATTO; ROSSI,
8 2018). Para as plantas, os óleos essenciais contribuem para a qualidade organoléptica, nutritiva
9 e reprodutiva (JAHROMI, 2019). Além disso, os óleos vêm despertando o interesse científico,
10 uma vez que podem ser empregadas como antioxidantes em cultivo celular (SANTOS et al.,
11 2018). Isso ocorre em virtude dos fitoquímicos encontrados nos óleos essenciais possuírem ação
12 no controle ou inibição de radicais livres gerados a partir do metabolismo regular das células,
13 que quando em excesso provocam o estresse oxidativo (ZARBAKHSH, 2021).

14 Um sistema de cultivo de células que sofre estresse oxidativo tem sido o oócito durante
15 a maturação *in vitro* (MIV), etapa essencial para a produção *in vitro* de embriões (PIVE)
16 bovinos. Nesta biotécnica, oócitos, células facilmente suscetíveis às espécies reativas de
17 oxigênio (EROs), reduzem sua qualidade por ocasião destas EROS, comprometendo a produção
18 de embriões (KALA et al., 2017). Em geral, as EROS são radicais livres altamente reativos e
19 derivados de moléculas contendo um ou mais oxigênios desemparelhados. Dentre esses
20 radicais, podem ser observados o radical íon superóxido, radical hidroxila, peroxil e o peróxido
21 de hidrogênio (SOTO-HERAS; PARAMIO, 2020). Quando esses radicais se encontram em
22 excesso num sistema *in vitro* é observada uma peroxidação lipídica das membranas celulares,
23 além de agregação e desagregação de proteínas e danos ao DNA, fazendo com que haja uma
24 alteração sobre a morfologia e fisiologia da célula (HALLIWELL, 2012).

25 Neste contexto, buscando reduzir o estresse oxidativo provocado pelas EROS durante a
26 MIV de oócitos bovinos, o emprego de antioxidantes naturais por meio do uso de óleos
27 essenciais tem sido proposto (SOLLECITO et al., 2018). Isso ocorre porque além dessas
28 substâncias naturais serem de fácil obtenção, tem demonstrado resultados similares ou
29 superiores aos compostos sintéticos (SANTOS et al., 2019). Além disso, por meio do uso de
30 óleos essenciais, é possível realizar o isolamento bioguiado dos compostos fitoquímicos
31 (OLIVEIRA et al., 2022). Diversas fontes podem ser utilizadas na preparação de óleos
32 essenciais com ação antioxidante, como os derivados de resíduos industriais. A indústria de
33 suco de laranja (*Citrus sinensis*) é um exemplo disso, e as cascas dessa fruta têm como uso
34 viável a extração de óleo essencial, que pode ser usado comercialmente em alimentos, bebidas,

35 aromas, perfumes, cosméticos, e outras tecnologias, como um antioxidante em sistemas de
36 cultivo de células.

37 Em geral, a indústria de suco de laranja ou citricultura brasileira é uma das atividades
38 econômicas de maiores impactos sobre o mercado nacional e internacional (VIDAL et al.,
39 2021). Isso porque dentro da cadeia produtiva, o Brasil destaca-se como um dos maiores
40 produtores de frutos citros, especialmente a laranja (VIDAL et al., 2019). Dentre os maiores
41 produtores do suco, São Paulo e Minas Gerais destacam-se, uma vez que detém 50% da
42 produção mundial, desencadeando uma receita de 614,9 milhões de dólares, embora nos últimos
43 anos o país tenha sofrido uma redução na sua produção em virtude da baixa estiagem e altas
44 temperaturas (NEVES et al., 2017; LIMA-NETO, 2021). Contudo, com a produção em larga
45 escala do suco de laranja é observado um aumento na geração dos resíduos industriais, como
46 sua casca que podem ocasionar impactos ambientais, já que nem sempre é reaproveitada
47 (FERNANDES et al., 2014), sendo, portanto, uma alternativa a sua utilização para obtenção do
48 óleo essencial.

49 Em estudos anteriores, o óleo essencial da casca de *Citrus sinensis* (OECS) já
50 demonstrou propriedades antioxidantes comprovadas por ensaios bioquímicos. De acordo com
51 Feronatto e Rossi (2018), o OECS inibiu 81,4% de radicais livres no ensaio 1,1-difenil-2-
52 picrihidrazil (método DPPH) e 94,6% de radicais livres no ensaio 2,2-azinobis (3-
53 etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico ou método ABTS), provando ser um forte antioxidante.
54 Posteriormente, Lin et al. (2021) observaram que o OECS apresentou atividade antioxidante de
55 eliminação de radicais livres no método DPPH e ABTS de maneira dose-dependente,
56 respectivamente, de 29,7 mg/mL e 4,2 mg/mL, onde sua atividade biológica pode ter variado
57 em associação ao seu componente majoritário, estágio de maturação e o tipo da fruta.

58 Portanto, sabendo da importância em possuir sistemas de MIV oocitária com menor
59 estresse oxidativo, associado aos efeitos antioxidantes do OECS em testes bioquímicos, o
60 trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do OECS no meio de MIV sobre os complexos
61 *cumulus*-oócito (CCOs) bovinos e seu status oxidativo, especificamente quanto à expansão e
62 viabilidade das células do *cumulus*, maturação nuclear, maturação citoplasmática, níveis de
63 EROs, potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e níveis intracelulares de glutationa (GSH).

64

65

66

67

68 **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

69

70 **2.1. IMPACTO ECONÔMICO E LIMITAÇÕES DA PIVE EM BOVINOS**

71

72 A produção de embriões bovinos tem representado ao longo dos anos uma importante
73 ferramenta de expansão do agronegócio brasileiro com resultados significativos no cenário
74 internacional (GONÇALVES et al., 2019). Além de seu papel como técnica voltada para a
75 multiplicação de animais zootecnicamente importantes (EALY et al., 2019), a PIVE permite
76 ser uma ferramenta voltada para a investigação de processos fisiológicos (TRAVNICKOVA et
77 al., 2021), bem como a conservação animal (HILDEBRANDT et al., 2018).

78 Em geral, a PIVE consiste em diferentes etapas, e em cada uma delas há a mimetização
79 das condições fisiológicas que ocorrem numa fêmea. Como primeira etapa, tem-se a colheita e
80 a seleção dos oócitos imaturos que podem ocorrer por meio de técnicas *in vivo* ou *post-mortem*
81 (*in vitro*), ou seja, animais provenientes de abatedouro. Após essa etapa, é então realizado o
82 processamento dos gametas, onde deverá ocorrer a maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos,
83 fecundação *in vitro* (FIV) realizada a partir dos espermatozoides selecionados e capacitados, e
84 o desenvolvimento embrionário até o seu estágio de pré-implantação (FERRÉ et al., 2019).

85 Segundo o relatório da produção e transferência de embriões (CHAIR, 2019), o número
86 de embriões produzidos por PIVE estabilizou-se em 2019 (1.031.567 vs. 1.029.400 em 2018;
87 +0,2) e o número de embriões transferidos em 2019 aumentou (797.190 [77,3%] vs. 742.908
88 [72,2%]), demonstrando a contribuição da PIVE para a produção de bovinos no país, já que
89 permaneceu acima de um milhão de registros, representando uma taxa de 72,7% de todos os
90 embriões bovinos relatados. Além disso, esse número ainda se mostrou superior ao
91 desenvolvimento *in vivo*, que ao longo dos anos segue uma tendência de redução quando
92 comparado a técnica *in vitro*. Esse aumento paralelo é justificável porque demonstra que ao
93 longo dos anos a PIVE está se tornando cada vez mais eficiente, uma vez que técnicas de
94 criopreservação embrionária têm sido elucidadas, sendo possível utilizar células de boa
95 qualidade, apesar de terem sido congeladas. Além disso, a expansão da PIVE se deve a
96 substituição de técnicas relacionadas à superovulação, já que permite a utilização de animais de
97 abatedouro, favorecendo dessa forma a demanda pelo comércio nacional e internacional quanto
98 ao emprego tecnologia embrionária (SENEDA et al., 2021).

99 Embora a PIVE seja uma técnica que esteja em rápida expansão, sua eficiência é ainda
100 variável em bovinos. Isso ocorre porque durante o seu emprego, apenas 30% dos oócitos
101 imaturos alcançam estágio de blastocisto e 12% conseguem ter crias nascidas (SOTO-HERA;

102 PARAMIO, 2020), demonstrando a necessidade da melhoria desta técnica. O principal fator
103 relacionado a variação da PIVE está na competência oocitária (AGUILA et al., 2020), ou seja,
104 a capacidade desta célula retomar a meiose, clivar após uma fecundação ou ativação artificial e
105 desenvolver até o seu estágio de blastocisto (SIRARD et al., 2006).

106 Dentre as principais razões que podem afetar a competência oocitária, destaca-se o
107 diâmetro folicular (MACHATKOVA et al., 2004), fase da onda folicular (ROMAGUERA et
108 al., 2010), estímulo hormonal, nutrição e idade da doadora (LEONI et al., 2015). Além desses,
109 o ambiente intrínseco relacionado ao sistema de cultivo *in vitro* do oócito, como o meio para
110 transporte e cultivo, temperatura, luz, tensão do oxigênio e ausência de compostos antioxidantes
111 são razões que interferem o oócito durante o seu cultivo (SANTOS et al., 2018). Todas as
112 condições de cultivo *in vitro* anteriormente citadas, associadas ao diâmetro folicular e ao tempo
113 de recuperação oocitário, são parâmetros que contribuem para o surgimento de espécies reativas
114 de oxigênio (EROs). Essas moléculas são produzidas a partir metabolismo regular das células,
115 e quando em excesso provocam alterações significativas sobre o oócito, afetando
116 negativamente as etapas da PIVE, e por isso sendo consideradas o principal fator da qualidade
117 oocitária (SOTO-HERAS; PARAMIO, 2020; OLIVEIRA et al., 2022).

118

119 2.2. EFEITOS DO ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE A PIVE BOVINA

120

121 O estresse oxidativo é gerado a partir do desequilíbrio em sistema redox homeostático
122 das células (MATEO-OTERO et al., 2021). Em geral, oócitos, espermatozoides e embriões sob
123 condições fisiológicas são as principais fontes produtoras de EROs que são radicais livres
124 reativos e produzidos a partir do seu metabolismo celular. Isso ocorre porque estas células
125 utilizam o oxigênio para produzir energia pelas mitocôndrias, por meio da fosforilação
126 oxidativa e na atividade da cadeia de elétrons durante a geração de trifosfato de adenosina
127 (SASAKI et al., 2019).

128 Nesse contexto, EROs pode ser definida como um conjunto ou variedade de moléculas
129 de radicais livres derivados de um oxigênio que possui seus elétrons desemparelhados (SOTO-
130 HERAS; PARAMIO, 2020). Isso ocorre porque o oxigênio molecular em seu estado
131 fundamental é bi-radical, contendo dois elétrons desemparelhado em sua cama externa (shell;
132 ou ainda chamada de estado triplo). Esses dois elétrons possuem o mesmo estado spin,
133 podendo apenas o oxigênio reagir com cada elétron uma vez e ordenadamente (TURRENS,
134 2003). Contudo, quando um desses dois elétrons desemparelhados se encontra excitado e muda

135 sua rotação, a espécie resultante torna-se um forte oxidante, reagindo com outros pares de
136 elétrons, formando ligações duplas do oxigênio reduzido (TURRENS, 2003).

137 Em geral, as moléculas de EROs possuem diferentes efeitos biológicos para os oócitos,
138 espermatozoides e embriões. Em uma situação de equilíbrio, essas moléculas atuam na
139 sinalização química destas células, desempenhando papéis vitais em várias atividades
140 fisiológicas (BUDANI et al., 2020). No oóbito, os níveis adequados de EROs auxiliam nos
141 processos de maturação *in vitro* (MIV), permitindo um adequado desenvolvimento da
142 competência oocitária, garantindo uma maior eficiência durante a fecundação *in vitro* (FIV), e
143 permitindo embriões de qualidade (DALVIT et al., 2005; BUDANI et al., 2020). Já em
144 espermatozoides, os níveis adequados de EROs promovem efeitos sobre a capacitação,
145 hiperativação e reação acrossômica (FANG; ZHONG, 2019). Já em embriões, níveis adequados
146 de EROs auxiliam o seu desenvolvimento inicial, permitindo maiores taxas de clivagem
147 (METO-OTERO et al., 2021) até o seu estágio de blastocisto.

148 Quando os níveis de EROs ultrapassam os limites adequados para o cultivo celular,
149 diferentes danos podem ser observados, embora estas células sejam capazes de sintetizar
150 enzimas capazes de controlar os radicais livres. Dentre os radicais livres anteriormente citados,
151 o ânion superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio podem ser considerados os
152 mais fortes (TURRENS, 2003). Essas três moléculas podem gerar subprodutos durante a reação
153 metabólica que são altamente reativos para oócitos, espermatozoides e embriões, oxidando
154 proteínas, aminoácidos e bases nitrogenadas, induzindo a autofagia das células ou morte celular
155 programada por apoptose (SASAKI et al., 2019).

156 Além disso, altos níveis de EROs ocasionam danos sobre a cadeia respiratória de
157 gametas e embriões. Danos sobre proteínas mitocondriais, modificações sobre enzimas
158 transportadoras de elétrons mitocondriais e danos sobre o DNA mitocondrial são alterações
159 comumente observadas (TORRES-OSORIO et al., 2019). Como resultado excessivo das EROs,
160 é então evidenciado durante a PIVE o estresse oxidativo, que pode ser compreendido como um
161 dos processos deletérios resultantes do desequilíbrio redox de um sistema de cultivo celular,
162 ocasionado em virtude da formação excessiva de moléculas de EROs (FANG; ZHONG, 2019)
163 que promovem danos sobre os oócitos, espermatozoides e embriões, sendo, portanto,
164 considerado o principal fator da baixa eficiência em diferentes etapas da PIVE.

165 Em bovinos, estudos demonstraram taxas variáveis durante a PIVE, onde apesar de
166 vários avanços científicos terem sido alcançados pela técnica, nenhuma melhoria substancial
167 do seu sucesso foi alcançada (SOTO-HERAS; PARAMIO, 2020), pois uma diferença entre 20–
168 30% na eficiência da MIV tem sido observada (SÁ et al., 2019). Além disso, apenas 30% dos

169 oócitos imaturos utilizados na PIVE atingem o estágio de blastocisto e apenas 12% garantem
170 crias nascidas, ou seja, um terço do número de blastocistos transferidos (DALVIT et al., 2005),
171 independente das boas taxas anteriormente observadas nas etapas.

172 Em virtude dessa variação da PIVE, bem como do estresse oxidativo ser considerado
173 um fator determinante na eficiência desta biotécnica reprodutiva, a utilização de substâncias
174 que possam reduzir, controlar ou inibir esse fator tem sido empregada nos últimos anos,
175 especialmente durante a MIV, uma vez que é considerada uma etapa fundamental para o
176 sucesso da PIVE.

177

178 2.3. SUPLEMENTAÇÕES EMPREGADAS PARA A REDUÇÃO DO ESTRESSE 179 OXIDATIVO NA PIVE BOVINA

180

181 Durante as etapas da PIVE, o uso de diferentes tecnologias ou abordagens tem sido
182 empregado visando reduzir o estresse oxidativo ocasionado pelas EROs (LU et al., 2018).
183 Dentre as abordagens iniciais empregadas, tem-se o controle na tensão do oxigênio, luz e calor,
184 bem como a manipulação adequada dos oócitos (BARROS et al., 2019). Esses fatores são
185 essenciais na redução e equilíbrio dos níveis de EROs durante o cultivo oocitário ou
186 embrionário. Em bovinos, já foi observado que garantir as condições adequadas de cultivo
187 celular, ou seja, manipulação e meios empregados, são fatores essenciais para promover uma
188 melhor qualidade oocitária, permitindo uma maior taxa de embriões (LU et al., 2018).

189 Contudo, apesar da implementação das diferentes abordagens visando reduzir o estresse
190 oxidativo, o uso de suplementações nos meios de cultivo oocitária com antioxidantes tem sido
191 a principal ferramenta que busca controlar os níveis intracelulares de EROs (SOTO-HERAS;
192 PARAMIO, 2020). Em condições normais, as células possuem dois mecanismos de defesas
193 contra radicais livres, sendo a defesa primária e secundária, cujas são baseadas em enzimas que
194 realizam o reparo de DNA, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e glutationa
195 peroxidase (GPx) (LU et al., 2018). Quando o número de EROs supera a capacidade
196 neutralizante das células, o estresse oxidativo não é controlado, sendo, portanto, necessário
197 melhorar as condições *in vitro* de cultivo celular.

198 Em sistemas *in vitro*, simular o que ocorre nas condições *in vivo* tem sido essencial para
199 melhorar a técnica. Dois fatores estão continuamente contribuindo para a geração de EROs, os
200 quais são a ausência de mecanismos de defesa endógena dos gametas e embrião e a exposição
201 ao ambiente por longos tempos (TORRES-OSORIO et al., 2018). Atualmente, uma forma de

202 reduzir o estresse oxidativo por meio do controle de EROs é utilizar antioxidantes como
203 suplementos nos meios de cultivo celular.

204 Um antioxidante pode ser definido como uma substância que possui capacidade de
205 promover a remoção ou inativação de radicais livres formados durante as reações celulares por
206 meio da doação de átomos de hidrogênio, impedindo dessa forma a oxidação de moléculas pró-
207 oxidantes (RAMALHO et al., 2006). Em geral, podem ser observadas duas classificações para
208 os antioxidantes, sendo os não-enzimáticos e os enzimáticos.

209 Os antioxidantes enzimáticos são aqueles encontrados naturalmente nas próprias
210 células. Neles estão incluídas as enzimas CAT, peroxirredoxinas, sistema glutationa
211 redutase/peroxidase e a SOD. Por outro lado, os não-enzimáticos, em sua maioria possuem
212 baixo peso molecular, entre os quais incluem os carotenoides, ácido ascórbico (vitamina C), α-
213 tocoferol (vitamina E) e em especial os tióis, sendo evidenciado nesse grupo a cisteamina como
214 principal composto (BARBOSA et al., 2010).

215 Em mamíferos domésticos, a suplementação dos meios de MIV e desenvolvimento *in*
216 *vitro* (DIV) contendo antioxidante sintético ou natural tem sido fundamental para a redução do
217 estresse oxidativo. O **Quadro 1** evidencia alguns estudos demonstrando a ação positiva desses
218 compostos durante o cultivo *in vitro* de gametas e embriões.

219

220 **Quadro 1.** Uso de suplementações sintéticas e naturais durante as etapas da PIVE em bovinos.

	Tipo de Suplementação	Tipo de Fonte	MII (%)	Taxa de blastocisto (%)	Referência
Antioxidante sintético	Cisteamina	Cisteamina	NI	37,4	Sollecito et al. (2019)
		Cisteamina	70,4	30,6	Santos et al. (2019)
		Cisteamina	81,2	34,6	Nikoloff et al. (2020)
		Cisteamina	80,9	24,5	Alsalmi et al. (2020)
		Cisteamina	80,0	30,0	Oliveira et al. (2022)
Antioxidante Natural	Astaxantina	NI		21,7	Ispada et al. (2018)

Resveratrol	NI	28,6	Li et al. (2018)
Anetol	95,7	27,1	Sá et al. (2019)
Oléo essencial de alecrim- Pimenta	95,8	26,0	Sollecito et al. (2019)
Óleo essencial de cravo da Índia	70,4	44,7	Santos et al. (2019)

221 **NI: Valor não informado. (%) Percentual. (MII) Metáfase II.

222

223 Contudo, nos últimos anos a utilização de antioxidantes naturais tem recebido uma
 224 maior atenção quando comparado aos sintéticos. A razão disso é porque antioxidantes naturais
 225 têm apresentado um maior controle dos níveis de EROS, bem como tem auxiliado processos
 226 fisiológicos das células em cultivo, pois promovem a maior síntese de enzimas relacionadas ao
 227 controle do estresse oxidativo, como a glutationa (GSH), CAT e SOD (FORMAN; ZHANG,
 228 2021). Portanto, antioxidantes naturais se tornam uma interessante opção para suplementação
 229 dos meios durante a PIVE.

230

231 **2.4. SUBSTÂNCIAS NATURAIS COMO SUPLEMENTAÇÕES EM MEIOS DE PIVE**
 232 **BOVINA**

233

234 As substâncias antioxidantes obtidas a partir de fontes naturais têm sido uma das
 235 principais ferramentas empregadas na otimização do cultivo *in vitro* de gametas e embriões.
 236 Estes compostos apresentam bioativos que atuam na redução dos níveis de EROS, promovendo
 237 melhores taxas durante a MIV ou no desenvolvimento embrionário. Além do potencial
 238 antioxidante, o uso de substâncias naturais destaca-se porque o baixo custo para obtê-los
 239 representa um fator favorável e alternativo para o seu uso. Por esta razão, o uso de antioxidantes
 240 tem se tornado cada vez mais difundidos na PIVE (SANTOS et al., 2018; SOLLECITO et al.,
 241 2018).

242

243 Dentre as substâncias naturais empregadas na PIVE, duas destas podem ser citadas, o
 244 uso de extratos e/ou óleos essenciais derivados de raízes, troncos, gravetos, folhas, sementes,
 245 botões, flores e frutos (MORÃO et al., 2016). Em geral, extratos e óleos essenciais destacam-
 246 se porque nessas substâncias são observadas moléculas bioativas com propriedades biológicas
 e que servem como modelos para o desenvolvimento de novas tecnologias e produtos, como na

247 produção de fármacos e cosméticos (FERRONATTO; ROSSI, 2018). Além disso, o uso de
 248 extratos e óleos essenciais podem ser utilizados para outras finalidades, como têm ocorrido na
 249 PIVE, onde é possível empregá-los como suplemento em meios de cultivo celular, buscando
 250 melhores condições *in vitro* (GOLKAR-NARENJI et al., 2010; SANTOS et al., 2018).

251 Em cultivo *in vitro*, utilizando oócitos e embriões bovinos e de outros mamíferos
 252 domésticos, já foi possível observar melhorias significativas quando empregado extratos e óleos
 253 essenciais como suplementações (**Quadro 2**).

254

255 **Quadro 2.** Uso de extratos e óleos essenciais durante a PIVE de mamíferos domésticos.

Antioxidante	Taxas da PIVE sem		Taxas da PIVE com		Melhor concentração	Referência
	Natural	antioxidantes (%)	antioxidante (%)	MIV		
		MIV	DIV	MIV	DIV	
Extratos Naturais		84,2	20,0	86,1	38,1	15 µM Wang et al. (2007)
		58	16,4	85,6	39,6	10 mg/mL Eshtiyaghi et al. (2016)
		60,0	22,3	80,9	33,1	5,0 mg/mL Veshkini et al. (2018)
Óleos essenciais		57,9	27,0	88,5	27,2	2,5 µg/mL Pereira (2015)
		95,6	27,6	95,8	26,0	5,0 µg/mL Sollecito et al. (2019)
		69,5	28,6	70,4	44,7	20 µg/mL Santos et al. (2019)

256 **NI: Valor não informado. (%) Percentual.

257

258 Os extratos naturais podem ser definidos como uma variedade de compostos
 259 fitoquímicos com diferentes polaridades (SASIDHARAN et al., 2011). Dentre os principais
 260 compostos constituintes nos extratos vegetais são observados os alcaloides, esteroídes, taninos,
 261 fenóis, flavonoides e outros (INGLE et al., 2017). A combinação desses compostos resulta
 262 normalmente em inúmeros benefícios e, por isso, procedem em seu uso amplo para fins
 263 medicinais ou biotecnológicos (LIENOU et al., 2020). Entre os principais efeitos, sabe-se que
 264 muitos extratos apresentam potenciais antimicrobianos (BILAL et al., 2020), antifúngicos

265 (AKILA; MINI, 2020), radioprotetores (SUMAN et al., 2017) e antioxidantes (MALEKI et al.,
266 2014). Em geral, para a extração desses compostos fitoquímicos, diferentes metodologias
267 podem ser utilizadas, como a maceração, decocção, infusão e percolação, variando de acordo
268 com o solvente utilizado (AZWANIDA, 2015; INGLE et al., 2017).

269 Contudo, é importante ressaltar que durante a utilização de extratos naturais,
270 interferências dos solventes na composição e concentração dos constituintes é evidenciada (EL-
271 MAATI et al., 2016; LIENOU et al., 2020). Diferentemente, quando se utiliza óleos essenciais,
272 que é possível obter uma amostra de maior pureza dos bioativos e com menor interferência dos
273 solventes, mantendo a similaridade com sua fonte vegetal correspondente (BAPTISTA-SILVA
274 et al., 2020) e, portanto, o óleo essencial torna-se mais interessante na PIVE.

275 Nesse contexto, sabe-se que os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias
276 voláteis lipofílicas comumente odoríferas e líquidas (SANTOS et al., 2018). Essas misturas são
277 originadas a partir do metabolismo secundário das plantas e formadas, principalmente, por
278 monoterpenos, álcoois, fenóis, ésteres e cetonas (FERRONATTO; ROSSI, 2018). Sua síntese
279 não depende apenas dos fatores genéticos ou da fase do desenvolvimento da planta, mas
280 também dos fatores extrínsecos que influenciam em suas alterações bioquímicas e fisiológicas
281 (SASIDHARAN et al., 2011).

282 Em geral, os óleos essenciais apresentam-se em forma de líquidos oleosos e são misturas
283 de diferentes compostos, podendo conter inúmeros componentes em variadas concentrações,
284 mas dois ou três correspondem em grandes proporções, sendo denominados como componentes
285 majoritários (SASIDHARAN et al., 2011). Para a obtenção destes óleos, diferentes técnicas
286 podem ser empregadas, como a enfleurage, prensagem a frio, extração com solvestes voláteis,
287 hidrodifusão, hidrodestilação e destilações por arraste a vapor, sendo as duas últimas mais
288 utilizadas (SILVA et al., 2010).

289 Portanto, diante dos inúmeros benefícios obtidos a partir da utilização de óleos
290 essenciais, a árvore frutífera laranjeira-doce se destaca, pois em ensaios bioquímicos e celulares
291 foi demonstrado seu potencial biotecnológico, sendo uma fonte interessante para ser empregada
292 durante a PIVE.

293

294 2.5. ASPECTOS BOTÂNICOS E COMERCIAIS DE *C. sinensis*

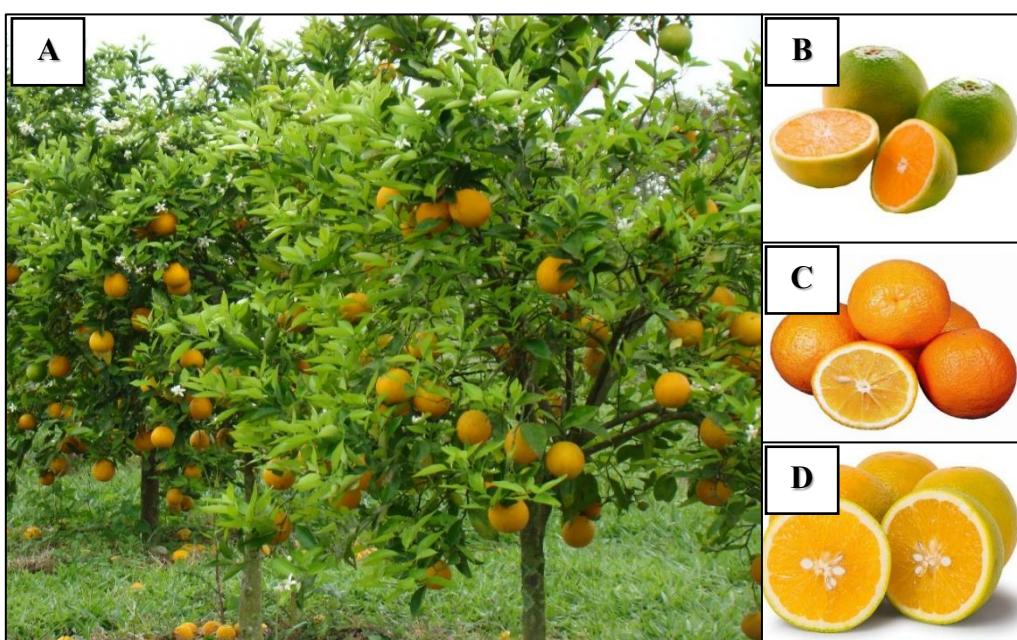
295

296 A laranjeira-doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) refere-se a uma das árvores frutíferas mais
297 conhecidas, cultivadas e estudadas no mundo (**Figura 1A**). Essa planta é nativa da Ásia, apesar
298 de que sua região de origem ainda é motivo de controvérsia (LEMOS et al., 2012), pois o

299 surgimento de sua trajetória pelo mundo é pouco conhecido. Essa planta, pertencente à família
 300 das Rutaceae, é uma árvore de portes médios, que pode atingir de 5 a 10 m de altura (BASTOS
 301 et al., 2014). Seu fruto é a laranja-doce, que pode ser dividida em quatro subgrupos, sendo a
 302 laranja-comum mais utilizada e comercializada no Brasil (BASTOS et al., 2014). As cultivares
 303 desse grupo são compostas principalmente pela laranja pêra, valêncio e a natal (**Figura 1B-D**)
 304 que se diferenciam pelo seu tempo de maturação, podendo variar de precoce à tardia.

305 O amplo cultivo da laranja no Brasil, especialmente em São Paulo, fez com que o país
 306 se tornasse o maior produtor e exportador do complexo agroindustrial de citricultura no mundo,
 307 tendo como principal produto o suco congelado da laranja (NEVES et al., 2017). Além disso,
 308 estima-se que em 2016/2017 a safra de laranja no país tenha sido superior a 15 milhões de
 309 toneladas, sendo responsável por produzir cerca de 60% de todo o suco de laranja consumido
 310 no planeta e por exportar 98% da sua produção.

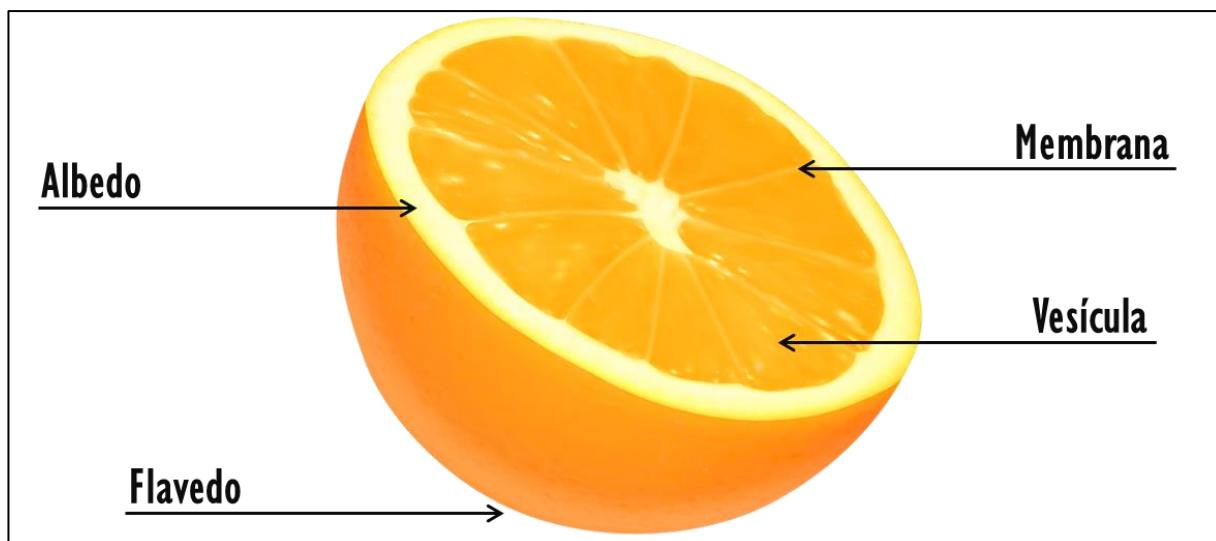
311 Contudo, em decorrência das atividades industriais geradas a partir desse fruto, é
 312 evidenciada a geração de resíduos, por meio da sua casca que com um mau gerenciamento pode
 313 ser considerado um problema para o meio ambiente, bem como para a saúde da população
 314 (FERRONATTO; ROSSI, 2018). Portanto, a utilização alternativa da sua casca para a obtenção
 315 de óleos essenciais como coprodutos para diferentes finalidades, como é o caso da PIVE, torna-
 316 se uma alternativa rentável.



317 **Figura 1.** Características botânicas de *Citrus sinensis*. (A) Exemplar de laranjeira. Fonte: Flickr
 318 (2020). (B) Laranja pêra. Fonte: Flickr (2020). (C) Laranja valêncio. Fonte: Ceagesp (2020).
 319 (D) Laranja natal. Fonte: Mondiniplantas (2020).

320

321 Em geral, uma laranja pode ser dividida em três regiões (**Figura 2**), sendo flavedo (parte
 322 mais externa da casca – epicarpo), albedo (parte interna e branca – mesocarpo) e o endocarpo
 323 constituído pelos gomos do fruto, onde se têm as vesículas de suco, separados pelas membranas
 324 (FERNANDES et al., 2013). A concentração do óleo essencial de frutos cítricos está na região
 325 do flavedo e do albedo, pois estas porções apresentam glândulas superficiais que lhes conferem
 326 aromas característicos, bem como podem estar associados a outras propriedades, como na
 327 defesa contra patógenos (FERNANDES et al., 2014). Dessa forma, esta região é mais
 328 interessante para ser extraído o óleo essencial, o qual pode ser empregado em diferentes
 329 finalidades.



330 **Figura 2.** Estruturas fisiológicas da laranja. Fonte: Imagens e Moldes (2019).

331
 332 *2.5.1. Propriedade antioxidante da casca de C. sinensis*
 333

334 O OECS é uma substância natural que além de ser amplamente empregada pela indústria
 335 alimentícia, têm sido uma fonte promissora nos estudos científicos. Isso ocorre porque o seu
 336 potencial de ação biológico vem sendo constantemente investigado, destacando-se o seu poder
 337 antibacteriano, anti-inflamatório e antioxidante (PATRIL et al., 2009; FERRONATTO; ROSSI,
 338 2018).

339 No que se refere ao papel biológico do OECS, inicialmente destaca-se o uso de extratos
 340 provenientes de sua casca como ação antimicrobiana, onde o estudo realizado por Mehmood et
 341 al. (2015) avaliou o efeito de extratos etéreo, de clorofórmio, etanólico e metanólico da casca
 342 de *C. sinensis*. Nesse estudo, foi observado que os extratos etanólico e metanólico conseguiram
 343 formar um halo de inibição entre 4 e 12 mm, demonstrando ser um potente agente de controle

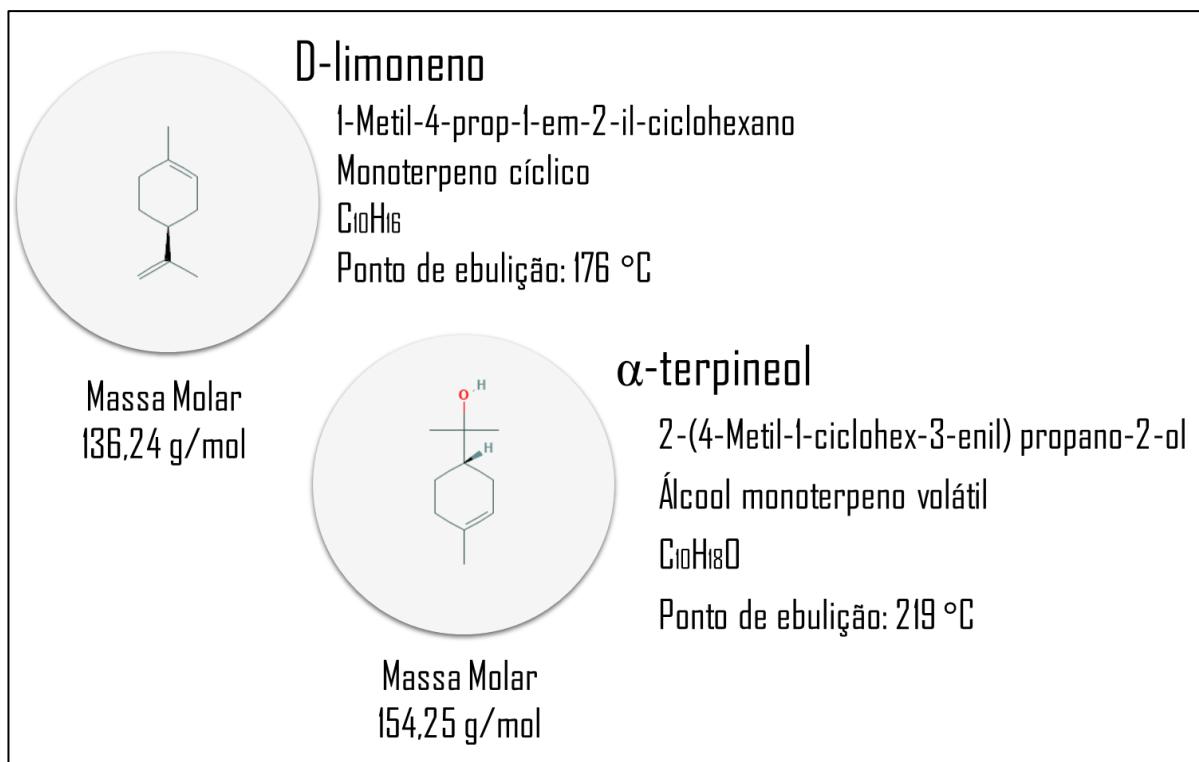
344 microbiano, já que permitiu o controle de bactérias patogênicas, como *Pseudomonas*
345 *aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* e *Escherichia coli*.

346 Posteriormente, Shetty et al. (2016) avaliaram o potencial antimicrobiano da casca de
347 *C. sinensis* sobre bactérias causadoras de cáries dentais em humanos. Nesse estudo, os autores
348 observaram que 25 mg/mL do extrato etanólico da casca de *C. sinensis* foi capaz de formar
349 zonas de inibição de até 12 mm, quando comparado ao extrato aquoso avaliado no estudo.
350 Segundo os autores de ambos os trabalhos, a ação biológica proveniente dos extratos avaliados
351 ocorreu pela presença de taninos, saponinas e compostos fenólicos (MEHMOOD et al., 2015;
352 SHETTY et al., 2016).

353 Além disso, Ferronatto e Rossi (2018) realizaram a extração do óleo essencial de *C.*
354 *sinensis* (OECS), e avaliaram o seu potencial antioxidante na tecnologia de alimentos. Os
355 autores observaram que o óleo essencial foi capaz de inibir 81,4% de radicais livres no ensaio
356 por (2,2- difenil-1-picril-hidrazil) (DPPH) e 94,6% de radicais livres no método 2,2-azinobis
357 (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), provando ser um forte antioxidante natural.
358 Lin et al. (2021) observaram que o OECS apresentou atividade antioxidante de eliminação de
359 radicais livres no método DPPH e ABTS, respectivamente, de maneira dose-dependente, sendo
360 29,7 mg/mL e 4,2 mg/mL, onde sua atividade biológica pode ter variado em virtude de seu
361 componente majoritário, estágio de maturação e o tipo da fruta.

362 No que se refere à sua ação antioxidante, dois majoritários podem estar envolvidos a
363 sua ação. O OECS é constituído por duas frações, podendo apresentar até 200 compostos
364 químicos. A primeira fração, a não-volátil é formada por carotenoides, flavonoides e
365 coumarinas (QIAO et al., 2008). A outra fração é volátil, e pode apresentar até 94 a 98% da
366 composição total do óleo, contendo aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos terpênicos, como o D-
367 limoneno e o α-terpineol (**Figura 3**) que podem representar os componentes majoritários dessa
368 substância (ROBERTO et al., 2009; SINGH et al., 2010; KHALEEL et al., 2018), e que estão
369 associadas as propriedades biológicas do OECS.

370 Nesse contexto, o 1-metil-4-prop-1-em-2-il-ciclohexano ou também conhecido como
371 D-limoneno corresponde ao principal constituinte presente no OECS, podendo sua
372 concentração variar entre 90 a 95% (SINGH et al., 2010; MARTINS et al., 2017). Esse
373 monoterpeno monocíclico faz parte da estrutura de mais de 300 vegetais. Contudo, é mais
374 expressivo em óleos essenciais obtidos a partir de fontes cítricas. Em um estudo *in vitro*
375 utilizando seis metodologias bioquímicas na eliminação de radicais livres, foi evidenciado um
376 potencial antioxidante desse monoterpeno quando esteve em concentrações acima de 100 μM,
377 prevenindo novas reações oxidativas (SHAH et al., 2018).



378 **Figura 3.** Representação química dos compostos majoritários do OECS.

379

380 Além desse estudo bioquímico, outro estudo utilizando o D-limoneno em ensaios *in*
 381 *vitro* já demonstrou sua ação antioxidante. Roberto et al. (2009) observaram que esse
 382 componente em baixas e altas concentrações (5 a 50 µg/mL) pode influenciar positivamente
 383 sobre o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical livre altamente tóxico quando em excesso para
 384 gametas e embriões (SOTO-HERAS et al., 2018). Segundo os autores, o D-limoneno promoveu
 385 um efeito citostático, modulando os radicais livres durante o cultivo de linfócitos murinos, uma
 386 vez que promoveu a síntese de enzimas como a peroxidase, SOD e CAT, transformando o efeito
 387 citotóxico ocasionando pelo H₂O₂. Além de estudos utilizando células somáticas, o uso do D-
 388 limoneno foi possível observar o seu efeito sobre espermatozoides bovinos, uma vez que
 389 promoveu uma melhor linearidade e cinética destas células após a criopreservação numa
 390 concentração de 150 µM, demonstrando o potencial desse componente quando empregado em
 391 estudos *in vitro* (BRANCO et al., 2016).

392

393 Outro componente majoritário que se pode destacar quanto ao seu potencial antioxidante
 394 é o α-terpineol. Esse componente é um álcool monoterpeno volátil, podendo ser observado em
 395 diferentes óleos essenciais. Em geral, cinco tipos de terpineóis podem ser observados, sendo o
 396 alfa, beta, gama, delta e o terpinen-4-oil, variando apenas quanto aos seus isômeros (BASER et
 397 al., 2010). Dentre os diferentes isômeros, o α-terpineol demonstrou ter diferentes propriedades

397 biológicas, tais como no desenvolvimento de anti-hipertensivos, drogas anticâncer,
398 anticonceptivos e antioxidantes (KHALEEL et al., 2018).

399 No que diz respeito à propriedade antioxidante, foi observado que o α -terpineol exerceu
400 funções citostáticas sobre seis linhagens celulares humanas, como de próstata, mamária,
401 pulmão, leucêmica, ovário e cancerígenas (mamário e mieloide crônica). Nesse estudo, os
402 autores verificaram que concentrações entre 180–588 μM tiveram ação na redução de radicais
403 livres, tendo uma atividade protetora sobre as células avaliadas, uma vez que o α -terpineol
404 permitiu um controle de moléculas como radicais peróxil (BICAS et al., 2011).

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430 **3. JUSTIFICATIVA**

431

432 A PIVE é uma técnica de reprodução assistida que garante inúmeras vantagens na
433 produção de bovinos, pois permite uma maior produtividade e qualidade dos rebanhos. Durante
434 a realização de suas etapas, fatores intrínsecos e extrínsecos afetam negativamente a qualidade
435 do cultivo oocitário e embrionário, alterando a fisiologia da célula e reduzindo a eficiência da
436 técnica. Por esta razão, a PIVE depende de um sistema de meios de cultivo *in vitro* que
437 proporcione condições adequadas para garantir uma melhor taxa de sucesso.

438 Neste contexto, a utilização de substâncias antioxidantes naturais, como os óleos
439 essenciais que auxiliam no controle do estresse oxidativo por meio da inibição ou redução de
440 EROS tem sido uma tecnologia essencial para a PIVE. Isso ocorre porque esses coprodutos
441 obtidos a partir das plantas garantem resultados superiores quando comparados aos sintéticos,
442 e auxiliam fisiologicamente as células durante o seu cultivo, permitindo uma maior taxa na
443 obtenção de embriões. Um interessante antioxidante natural é o OECS que é um coproducto
444 obtido a partir de cascas de *C. sinensis*, fonte residual e industrial, que pode ser empregado na
445 PIVE, uma vez que estudos bioquímicos e ensaios *in vitro* demonstraram seu potencial
446 antioxidante no controle de radicais livres causadores do estresse oxidativo.

447 Portanto, considerando o potencial biológico de OECS, bem como na necessidade de
448 melhorar as condições do cultivo *in vitro* de óócitos bovinos, o estudo buscou estabelecer o uso
449 do OECS durante a MIV, visando melhorar as condições do estresse oxidativo, podendo
450 garantir um maior quantitativo dos embriões bovinos produzidos *in vitro*.

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463 **4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS**

464

465 **I** – O OECS promove um efeito antioxidante durante a etapa da MIV, pois permite uma redução
466 nos EROs gerados a partir do metabolismo celular de oócitos bovinos;

467

468 **II** – O OECS na concentração de 30 µg/mL promove efeitos benéficos sobre as taxas de
469 maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496 **5. OBJETIVOS**

497

498 **5.1. OBJETIVO GERAL**

499

500 Avaliar os efeitos do OECS no meio de MIV sobre os complexos *cumulus*-oócito (CCOs)
501 bovinos e seu status oxidativo.

502

503 **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

504

505 - Comparar o efeito antioxidante de diferentes concentrações do OECS durante a MIV de
506 oócitos bovinos, avaliando a expansão e viabilidade das células do *cumulus*, maturação nuclear
507 e citoplasmática de oócitos bovinos;

508

509 - Avaliar diferentes concentrações do OECS durante a MIV sobre o status oxidativo em oócitos
510 bovinos.

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

REFERÊNCIAS

- 529
530
531 AGUILA, L; TREULEN, F; THERRIEN, J; FELMER, R; VALDIVIA, M; SMITH, L.C.
532 Oocyte selection for *in vitro* embryo production in bovine species: Noninvasive approaches for
533 new challenges of oocyte competence. **Animals**, v. 10, 1–24, 2020.
- 534
535 AKILA, R; MINI, M.L. Solvent extraction and antifungal assay of *Lawsonia inermis* Linn.
536 Against the brown spot fungus *Bipolaris oryzae*. **Journal of Pharmacognosy and**
537 **Phytochemistry**, v. 9, p. 5–8, 2020.
- 538
539 ALSALIM, A.H; HABEED, I.A; ABBAS, H.R. The effect of antioxidant cysteamine with
540 ascorbic acid on *in vitro* fertilization in cows. **International Journal of Pharmaceutical**
541 **Research**, v. 12, 1–8, 2020.
- 542
543 AZWANIDA, N.N. A review on the extraction methods uses in medicinal plants, principle,
544 strength and limitation. **Medicinal and Aromatic Plants**, v. 4, p. 196–202, 2015.
- 545
546 BAPTISTA-SILVA, S; BORGES, S; RAMOS, O.L; PINTADO, M; SARMENTO, B. The
547 progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. **Journal of Essential Oil**
548 **Research**, p. 1–18, 2020.
- 549
550 BARBOSA, K.B.F; COSTA, N.M.B; ALFENAS, R.C.G; DE PAULA, S.O; MINIM, V.P.R;
551 BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de**
552 **Nutrição**, v. 23, p. 629–643, 2010.
- 553
554 BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. Handbook of essential oils: Science, Technology, and
555 Applications. 2 ed. **Taylor and Francis**, Nova York, USA, 2010.
- 556
557 BASTOS, D.C; FERREIRA, E.A; PASSOS, O.S; SÁ, J.F; ATAÍDE, E.M. Cultivares copa e
558 porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário**, v. 35, p. 36–45, 2014.
- 559
560 BICAS, J.L; NERI-NUMA, I.A; RUIZ, A.L; CARVALHO, J.E; PASTORE, G.M. Evaluation
561 of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food Chemical Toxicology**, v.
562 49, p. 1610–1615, 2011.

- 563 BILAL, H; ALI, I; UDDIN, S; KHAN, I; SAID, A; RAHMAN, M.U; KHAN, A.M. Biological
564 evaluation of antimicrobial activity of *Colotropis procera* against a range of bacteria. **Journal**
565 **of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, p. 31–35, 2020.
- 566
- 567 BUDANI, M.C; TIBONI, G.M. Effects of supplementation with natural antioxidants on
568 oocytes and preimplantation embryos. **Antioxidants**, v. 9, p. 612, 2020.
- 569
- 570 CHAIR, J.V. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo**
571 **Technology Newsletter**, v. 38, 2019.
- 572
- 573 DALVIT, G.C; CETICA, P.D; PINTOS, L.N; BECONI, M.T. Reactive oxygen species in
574 bovine embryo *in vitro* production. **Biocell**, v. 29, p. 209–212, 2005.
- 575
- 576 EALY, A.D.; WOOLDRIDGE, L.K.; MCCOSKI, S.R. Post-transfer consequences of *in vitro*
577 produced embryos in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 30, p. 2555–2568, 2019.
- 578
- 579 EL-MAATI, M.F.A.; MAHGOUB, S.A.; LABIB, S.M.; AL-GABY, A.M. RAMADAN, M.F.
580 Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial
581 activities. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 8, p. 494–504, 2016.
- 582
- 583 ESHTIYAGHI, M.; DELDAR, H.; PIRSARAEI, Z.A.; SHOHREH, B. Royal jelly may
584 improve the metabolism of glucose and redox state of ovine oocytes matured *in vitro* and
585 embryonic development following *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v. 86, p. 2210–2221,
586 2016.
- 587
- 588 FANG, Y; ZHONG, R. Effects of oxidative stress on spermatozoa and male infertility: An
589 update review. **Free Radical Medicine and Biology**, v. 12, p. 4–18, 2019.
- 590
- 591 FERNANDES, I.J; KIELING, A.G; AGOSTI, A.A; BREHM, F.A. Extraction and
592 characterization of orange essential oil obtained from orange peel residue. **Associação**
593 **Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, p. 1–7, 2014.
- 594

- 595 FERNANDES, I.J; KIELING, A.G; BREHM, F.A; AGOSTI, A. Avaliação da extração do óleo
596 essencial do resíduo casca de laranja. **Fórum Internacional de Resíduos Sólidos**. Porto
597 Alegre, Brasil, 2013.
- 598
- 599 FERRÉ, L.B; KJELLAND, M.E; STOBECH, L.B; HYTTEL, P; MERMILLOD, P; ROSS, P.J.
600 Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology
601 history and methods. **Animal**, v. 14, p. 991–1004, 2019.
- 602
- 603 FERRONATTO, A.N; ROSSI, R.C. Extraction and application of orange peel essential oil as
604 natural ingredient. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 12, p. 78–93, 2018.
- 605
- 606 FORMAN, H.J; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of
607 antioxidant therapy. **Nature Reviews**, v. 20, p. 689–709, 2021.
- 608
- 609 GOLKAR-NARENJI, A; EIMANI, H; SAMADI, F; HASANI, S; SHAHVERDI, A.H. Effect
610 of *Papaver rhoeas* extract on *in vitro* maturation and developmental competence of immature
611 mouse oocytes. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 9, p. 211–215, 2010.
- 612
- 613 GONÇALVES, R.L.R; VIANA, J.H.M. Current status of cattle embryo production in Brazil
614 and in the world. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43. p. 156–159, 2019.
- 615
- 616 HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutrition
617 Reviews**, v. 70, p. 257–265, 2012.
- 618
- 619 HILDEBRANDT, T.B; HERMES, R; COLLEONI, S; DIECKE, S; HOLTZE, S; RENFREE,
620 M.B; STEJSKAL, J; HAYASHI, K; DRUKKER, M; LOI, P; GORITZ, F; LAZZARI, G;
621 GALLI, C. Embryos and embryonic stem cells from the white rhiceros. **Nature
622 Communications**, v. 9, p. 1–9, 2018.
- 623
- 624 INGLE, K.P; DESHMUKH, A.G; PADOLE, D.A; DUDHARE, M.S; MOHARIL, M.P.
625 Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from
626 plant extracts. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, p. 32–36, 2017.
- 627

- 628 ISPADA, J; RODRIGUES, T.A; RISOLIA, P.H.B; LIMA, R.S; GONÇALVES, D.R;
629 RETTORI, D; NICHI, M; FREITOSA, W.B; PAULA-LOPES, F.F. Astaxanthin counteracts
630 the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and**
631 **Development**, v. 30, p. 1169–1180, 2018.
- 632
- 633 JAHROMI, S.G. Extraction techniques of phenolic compounds from plants. **IntechOpen**, p. 1–
634 19, 2019.
- 635
- 636 KALA, M; SHAIKH, M.V; NIVSARKAR, M. Equilibrium between antioxidants and reactive
637 oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. **Reproductive Medicine**
638 **and Biology**, v. 16, p. 28–35, 2017.
- 639
- 640 KHALEEL, C; TABANCA, N; BUCHBAUER, G. α -terpineol, a natural monoterpenone: A
641 review of its biological properties. **Open Chemistry**, v. 16, p. 349–361, 2018.
- 642
- 643 LEMOS, L.M.C; SIQUEIRA, D.L; SALOMÃO, L.C.C; CECON, P.R; LEMOS, J.P. Physical
644 and Chemical characteristics of ‘pêra’ Orange from different positions of the canopy. **Revista**
645 **Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 1001–1097, 2012.
- 646
- 647 LEONI, G.G; PALMERINI, M.G; SATTA, V; SUCCU, S. Differences in the kinetic of the
648 first meiotic division and in active mitochondrial distribution between prepubertal and oocytes
649 mirror differences in their developmental competence in a sheep model. **PloS One**, v. 10, p.
650 e0124911, 2015.
- 651
- 652 LI, C; ZHAO, Y; HAO, H; WANG, H; HUANG, J; LIU, Y; ZHU, H; ZHAO, X. Resveratrol
653 significantly improves the fertilization capacity of bovine sex-sorted semen by inhibiting
654 apoptosis and lipid peroxidation. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1–10, 2018.
- 655
- 656 LIENOU, L.L; TELEFO, P.B; RODRIGUES, G.Q; DONFACK, J.N; ARAÚJO, R.A;
657 BRUNO, J.B. Effect of different extracts and fractions of *Senecio biafrae* (Oliv. & Hiern) J.
658 moore on *in vivo* and *in vitro* parameters of folliculogenesis in experimental animals. **Journal**
659 **of Ethnopharmacology**, v. 251, p. 1–12, 2020.

- 660 LIN, X; CAO, S; SUN, J; LU, D; ZHONG, B; CHUN, J. The chemical compositions, and
661 antibacterial and antioxidant activities of four types of Citrus essential oils. **Molecules**, 26, 1–
662 12, 2021.
- 663
- 664 LU, J; WANG, Z; CAO, J; CHEN, Y; DONG, Y. A novel and compact review on the role of
665 oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, p.
666 1–18, 2018.
- 667
- 668 MACHATKOVA, M; KRAUSOVA, K; JOKESOVA, E; TOMANEK, M. Developmental
669 competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in*
670 *vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 61, p. 329–335, 2004.
- 671
- 672 MALEKI, E.M; EIMANI, H; BIDELI, M.R; NARENJI, A.G; ABEDI, R. Effects of crocin
673 supplementation during *in vitro* maturation of mouse oocytes on glutathione synthesis and
674 cytoplasmic maturation. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 10, p. 53–61,
675 2016.
- 676
- 677 MARTINS, G.S.O; ZAGO, H.B; COSTA, A.V; JUNIOR, L.M.A; CARVALHO, J.R.
678 Chemical composition and toxicity of citrus essential oils on *Dysmicoccus brevipes*
679 (Hemiptera:Pseudococcidae). **Revista Caatinga**, v. 30, p. 811–817, 2017.
- 680
- 681 MATEO-OTERO, Y; YESTE, M; DAMATO, A; GIARETTA, E. Cryopreservation and
682 oxidative stress in porcine oocytes. **Research in Veterinary Science**, v. 135, p. 20–26, 2021.
- 683
- 684 MEHMOOD, B; DAR, K.K; ALI, S; AWAN, U.A; NAYYER, A.Q; GHous, T; ANDLEEB,
685 S. *In vitro* assessment of antioxidant, antibacterial and phytochemical analysis of peel of *Citrus*
686 *sinensis*. **Park Journal Pharmaceutical Science**, v. 28, p. 231–239, 2015.
- 687
- 688 MORÃO, R.P; ALMEIDA, A.C; MARTINS, E.R; PRATES, J.P.B; OLIVEIRA, F.D.
689 Constituent's chemicals and principles pharmacological oil rosemary essential pepper (*Lippia*
690 *origanoides*). **Revista Unimontes Científica**, v. 18, p. 1–8, 2016.
- 691
- 692 NEVES, M.F; TROMBIN, V.G. Anuário da citricultura 2017. 1^a. Edição. São Paulo, BR. 2017.

- 693 NIKOLOFF, N; CAMPAGNA, A; LUCHETTI, C; CARRANZA-MARTÍN, A.C; PASCUA,
694 A.M, ANCHORDOQUY, J.M; LOMBARDO, D.M; FURNUS, C.C. Effects of EPA on bovine
695 oocytes matured *in vitro* with antioxidants: Impact on the lipid content of oocytes and early
696 embryo development. **Theriogenology**, v. 157, 286–296, 2020.
- 697
- 698 OLIVEIRA, L.R.M; AQUINO, L.V.C; SANTOS, M.V.O; FREITAS, V.J.F; BERTINI, L.M;
699 PEREIRA, A.F. Effects of different concentrations of eugenol in maturation medium on bovine
700 oocytes, oxidative status and preimplantation embryos. **Animal Production Science**, v. 62, p.
701 142–151, 2022.
- 702
- 703 PATRIL, J.R; CHIDAMBARA, M.K.N; JAYAPRAKASHA, G.K; CHETTI, M.B. Bioactive
704 compounds from Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) juice induce apoptosis in human
705 pancreatic cells. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, p. 10933–10942, 2009.
- 706
- 707 PEREIRA, E.C.M. Produção de oócitos e embriões bubalinos: Efeitos da época do ano e da
708 adição do óleo essencial de *Lippia origanoides* na maturação *in vitro*. **Tese de Defesa**.
709 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), 2015.
- 710
- 711 ROBERTO, D; MICUCCU, P; SEBASTIAN, T; GRACIELA, F; ANESINI, C. Antioxidant
712 activity of limonene on normal murine lymphocytes: Relation to H₂O₂ modulation and cell
713 proliferation. **Nordic Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacology &**
714 **Toxicology**, v. 106, p. 38–44, 2009.
- 715
- 716 ROMAGUERA, R; CASANOVAS, A; MORATÓ, R; IZQUIERDO, D; CATALÁ, M;
717 JIMENEZ-MACEDO, A.R; MOGAS, T; PARAMIO, M.T. Effect of follicle diameter on
718 oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats.
719 **Theriogenology**, v. 74, p. 364–373, 2010.
- 720
- 721 SÁ, N.A.R; VIEIRA, L.A; MASIDE, C; SOUSA F.G.C; RODRIGUES, A.P.R; LEAL-
722 CARDOSO, J.H; GASTAL, E.L; FIGUEIREDO, J.R. Anethole supplementation during oocyte
723 maturation improves *in vitro* production of bovine embryos. **Reproductive Sciences**, v. 2019,
724 p. 1–7, 2019.
- 725

- 726 SANTOS, M.V.O.; NASCIMENTO, L.E.; PRAXEDES, É.A.; BORGES, A.A.; SILVA, A.R.;
727 BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F. *Syzygium aromaticum* essential oil supplementation during
728 *in vitro* bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development.
729 **Theriogenology**, v. 128, p. 74–80, 2019.
- 730
- 731 SANTOS, M.V.O; BORGES, A.A; QUEIROZ-NETA, L.B; BERTINI, L.M; PEREIRA, A.F.
732 Use of natural antioxidants in *in vitro* mammalian embryo production. **Semina. Ciências**
733 **Agrárias**, v. 39, p. 431–444, 2018.
- 734
- 735 SASAKI, H; HAMATANI, T; KAMIJO, S; IWAI, M; KOBANAWA, M; OGAWA, S;
736 MIYADO, K; TANAKA M. Impact of oxidative stress on age-associated decline in oocyte
737 developmental competence. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 1–7, 2019.
- 738
- 739 SASIDHARAN, S; CHEN, Y; SARAVANAN, D; SUNDRAM, K.M; LATHA, L.Y.
740 Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plant's extracts.
741 **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, p. 1–10,
742 2011.
- 743
- 744 SENEDA, M.M; DELCHIARO, S.B; ZANGIROLAMO, A.F; ALFIERI, A.A; MOROTTI, F.
745 Folliculogenesis, fertility and biotechnology in dairy cattle. **IntechOpen**, p. 1–19, 2021.
- 746
- 747 SHAH, B. SHAIKK, M.V; CHAUDAGAR, K; NIVSARKAR, M. D-limonene possesses
748 cytotoxicity to tumor cells but not to hepatocytes. **Polish Annals of Medicine**, v. 26, p. 1–8,
749 2018.
- 750
- 751 SHAH, B.B; MEHTA, A.A. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of D-limonene. **Asian**
752 **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, p. 883–887, 2018.
- 753
- 754 SHETTY, S.B; ISMAIL, P.M; VARGHESE, S; THOMAS-GEORGE, B; SREEDHAR, S;
755 DEVANG-DIVAKAR, D. Antimicrobial effects of *Citrus sinensis* peel extracts against dental
756 caries bacteria: An *in vitro* study. **Community and Preventive Dentistry**, v. 8, p. e70-e77,
757 2016.
- 758

- 759 SILVA, M.R; XIMENES, R.M; COSTA, J.G.M; LEAL, A.M; LOPES, A.A. Comparative
760 anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winteranus* Jowitt and
761 *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacological**, v. 381,
762 p. 415–426, 2010.
- 763
- 764 SINGH, P.; SHUKLA, R.; PRAKASH, B.; KUMAR, A.; SINGH, S. Chemical profile,
765 antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Berm. and *Citrus*
766 *sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. **Food and**
767 **Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1734–1740, 2010.
- 768
- 769 SIRARD, M.V; RICHARD, F; BLONDIN, P; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to
770 embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126–136, 2006.
- 771
- 772 SOLLECITO, N.V.; PEREIRA, E.C.M.; GRÁZIA, J.G.V.; PARZEWSKI, B.N.; COUTO,
773 B.V.R.; ANDRADE, V.B.; BORGES, A.M. Antioxidant activity of oily extract obtained from
774 *Lippia origanoides* improves the quality of bovine embryos produced *in vitro*. **Arquivo**
775 **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, p. 723–731, 2018.
- 776
- 777 SOTO-HERAS, S; PARAMIO, M. Impact of oxidative stress on oocyte competence for *in vitro*
778 embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, v. 132, 342–350, 2020.
- 779
- 780 SOTO-HERAS, S; ROURA, M; CATALÁ, M.G; BLANCO, I.M; IZQUIERDO, D; NASHTA,
781 A.F; PARAMIO, M.T. Beneficial effects of melatonin on *in vitro* embryo production from
782 juvenile goat oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, 253–261, 2018.
- 783
- 784 TORRES-OSORIO, V; URREGO, R; ECHEVERRI-ZULUAGA, J.J; LÓPEZ-HERRERA, A.
785 Oxidative stress and antioxidant use during *in vitro* mammal embryo production. Review.
786 **Revista Mexicana de Ciências Pecuárias**, v. 10, p. 433–459, 2019.
- 787
- 788 TRAVNICKOVA, I; HULINKA, P; KUBICKOVA, S; HANZALOVA, K; KEMPISTY, B;
789 NEMCOVA, L; MACHATKOVA M. Production of sexed bovine embryos *in vitro* can be
790 improved by selection of sperm treatment and co-culture system. **Reproduction in Domestic**
791 **Animals**, v. 56, p. 864–871, 2021.
- 792

- 793 TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of**
794 **Physiology**, v. 552, p. 335–344, 2003.
- 795
- 796 VESHKINI, A; MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A; GHANEM, N; ABAZARI-KIA,
797 A.H; MOTTAGHI, E; KAMALEDINI, R; DELDAR, H. Oocyte maturation with royal jelly
798 increases embryo development and reduces apoptosis in goats. **Animal Reproduction**, v. 15,
799 p. 124–134, 2018.
- 800
- 801 VIDAL, M.F. Citricultura na área de atuação do bnb. **Caderno Setorial ETENE**, v. 4. p. 1–
802 11, 2019.
- 803
- 804 VIDAL, M.F. Produção comercial de frutas na área de atuação do BNB. **Caderno Setorial**
805 **ETENE**, p. 1–14, 2021.
- 806
- 807 WANG, Z; WANG, W; YU, S; XU, Z. Effects of different activation protocols on preimplantation
808 development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. **Animal Reproduction**
809 **Science**, v. 105, p. 292–301, 2008.
- 810
- 811 ZARBAKHSH, S. Effect of antioxidants on preimplantation embryo development *in vitro*: a
812 review. **Zygote**, v. 29, p. 179–193, 2021.
- 813
- 814
- 815
- 816
- 817
- 818
- 819
- 820
- 821
- 822
- 823
- 824
- 825
- 826

827 **CAPÍTULO 2 – USE OF FRUIT-DERIVED ESSENTIAL OILS WITH ANTIOXIDANT**
828 **PROPERTIES IN ANIMAL CELL CULTURES: A REVIEW**

829

830

831 **Artigo de revisão:** Use of fruit-derived essential oils with antioxidant properties in animal cell
832 cultures: A review

833

834 **Periódico:** Bioscience Journal

835

836 **Qualis Referência:** B1. **Fator de impacto:** 0,38.

837

838

839 **Data de submissão:** 20/01/2022.

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861 **USE OF FRUIT-DERIVED ESSENTIAL OILS WITH ANTIOXIDANT PROPERTIES IN ANIMAL CELL
862 CULTURES: A REVIEW**

863
864 **Leonardo Vitorino Costa de AQUINO¹, Maria Valéria de Oliveira SANTOS¹, Lhara Ricarliany
865 Medeiros de OLIVEIRA¹, Luciana Medeiros BERTINI², Alexsandra Fernandes PEREIRA³**

866
867 ¹. Postgraduate Student in Animal Science, Laboratory of Animal Biotechnology, Federal Rural
868 University of Semi-Arid, Mossoró, RN, Brazil

869 ². Professor, Federal Institute of Rio Grande do Norte, Apodi, RN, Brazil

870 ³. Professor, Laboratory of Animal Biotechnology, Federal Rural University of Semi-Arid,
871 Mossoró, RN, Brazil

872
873 **Corresponding author:**

874 Alexsandra Fernandes Pereira

875 E-mail: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

876
877 **ORCID ID:** L.V.C. Aquino: 0000-0001-7192-7581; M.V.O. Santos: 0000-0002-4293-507X; L.R.M.
878 Oliveira: 0000-0002-7292-6908; L.M. Bertini: 0000-0003-0208-2233; A.F. Pereira: 0000-0003-
879 2137-854X

880
881 **Acknowledgments:** This study was financed in part by the Coordination for the Improvement
882 of Higher Education Personnel, Brazil (CAPES, Financial Code 001) and the National Council for
883 Scientific and Technological Development (CNPq).

884
885 **Authors' Contributions:** AQUINO, L.V.C.: Conception and design, acquisition of data, drafting
886 the manuscript, final approval; SANTOS, M.V.O.: drafting the manuscript, final approval;
887 OLIVEIRA, L.R.M.: drafting the manuscript, final approval; BERTINI, L.M.: drafting the
888 manuscript, final approval; PEREIRA, A.F.: Conception and design, analysis, and interpretation
889 of data, drafting the manuscript, final approval.

890
891 **Conflicts of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

892
893 **ABSTRACT:** The increase in the use of cell culture systems has led to an increase in the
894 research aimed at their optimization. Reducing oxidative stress generated *in vitro* could
895 improve culture conditions and natural substances with antioxidant potential to reduce
896 oxidative stress have emerged. Natural substances with antioxidant potential to reduce
897 oxidative stress have been identified. Different parts of a plant, including fruits, can be
898 processed to obtain essential oils, which can be used as antioxidants. As the raw substrates
899 for processing can be obtained from food industrial wastes, interest in evaluating fruit-derived
900 substances has grown, and its possible application in cell, gamete, and embryo culture is under
901 investigation. This review aims to present the advantages of fruits as a source of essential oils
902 with antioxidant properties, highlight the milestones achieved, and suggest the future study
903 prospects.

904
905 **KEYWORDS:** Antioxidant potential. Essential oil. *In vitro* culture. Phytochemicals

906
907 **1. Introduction**

Natural substances, such as essential oils from roots, trunks, sticks, leaves, flower buds, and fruits, have been widely used in therapeutic practices (Baptista-Silva et al. 2020). Bioactive molecules or phytochemicals synthesized from secondary metabolites, are often used to treat various diseases (Garcia-Salas et al. 2010) and assisted in the development of biotechnologies (Santos et al. 2018). They exhibit antioxidant potential, and they can reduce or control the level of reactive oxygen species (ROS) (Kamana et al. 2018).

ROS are free radicals synthesized by cells during respiration process; at high levels, they can modify oxidative homeostasis and cause damage to the morphology, physiology, and integrity of cells (Turrens 2003). *In vitro* studies using somatic cells (Borges et al. 2020) and gametes (Santos et al. 2019a, 2019b) have shown that excess ROS are harmful and affect cell quality. Therefore, use of essential oils with antioxidant potential has been proposed as a supplement to improve the conditions of cell culture (Swallah et al. 2020).

Since the first extraction of natural substances with biotechnological potential in the 21st century by Paracelso, the use of essential oils from different plant parts has been proposed because of their numerous benefits (Maciel et al. 2007; Angioletta et al. 2018). It is known that phytochemicals with different structural properties, functions, and effects are found in fruits (Garcia-Salas et al. 2010). They are rich in vitamins, such as ascorbic acid, α-tocopherol, and β-carotene and contain abundant phenolic compounds, which help fruits at different stages of maturation (He et al. 2019). All these chemical constituents have an excellent antioxidant potential (Turrens 2003) in addition to antibacterial, antifungal, and insecticidal activities (Saikia et al. 2013; Rosa et al. 2019).

Fruits are important for the production of frozen juice. During processing, approximately 50% of the raw material is discarded, including peels and seeds, which can be used to obtain essential oils (Manuranjan et al. 2019). Additionally, the by-products generated from fruits can be used diversely in the food industry, such as in the production of sweets in syrup, jellies, and functional foods, such as flour (Matias et al. 2005). Alternatively, these by-products can be used as animal feed or fertilizers (Schieber et al. 2001). Therefore, considering the biotechnological importance and application of essential oils derived from fruits, this review aims to present the advantages of fruits as a source of antioxidant agents in systems of *in vitro* culture, emphasizing the advances and the prospects.

2. Methods of obtaining essential oils from fruits

Obtaining essential oils from fruits is a multi-step process. The preliminary step involves the development of appropriate methodologies to identify the bioactive compounds with antioxidant capacity. The concentration of such compounds depends on the technique used for the extraction. The methodologies used to obtain essential oils from fruits are similar to those used for other plant parts (Silveira et al. 2012; Mutalib et al. 2015) including hydrodistillation and steam distillation. These methods are considered the oldest and most versatile (Kosar et al. 2007), as they can be used to obtain essential oils from different plant parts (e.g., seeds, pulps, and peels).

Hydrodistillation involves the distillation of plant material in sufficient water (Shakir and Salih 2015) and is widely used on a laboratory scale to obtain good yield of essential oils (Kosar et al. 2007). Kosar et al. (2007) used hydrodistillation technique for the recovery of bioactive compounds from whole and ground fruits of fennel (*Foeniculum vulgare*), which gave a chemical sample yield of 98% and 99% for the whole and ground fruits, respectively. The duration of plant immersion in water varies and it allows the progression of hydrolytic reactions with bioactive molecules resulting in the formation of alcohols, esters, and

carboxylic acids (Baptista-Silva et al. 2020). This changes the essential oil composition significantly, thereby reducing the quality and biochemical value of the obtained oil, especially when the aim is to obtain biological molecules with antioxidant potential.

Additionally, steam distillation can be used to obtain essential oils. In this technique, extraction is performed by saturating the biological sample with steam (Périno-Issartier et al. 2013). Although this extraction method is widely used on an industrial scale because of its low execution costs (Kosar et al. 2007), limitations similar to those in hydrodistillation are observed, which leads to changes in the quality of the biological sample.

An interesting example of the difficulty faced in steam distillation was observed by Shakir and Salih (2015), who compared this method with microwave distillation. The authors showed that the yield and chemical composition of essential oils from citrus fruits (*Citrus sinensis*, *Citrus limon*, and *Citrus reticulata*) obtained by steam distillation were lower than those by microwave distillation, which resulted in a higher percentage of the main chemical component, D-limonene, in these essential oils. The authors proposed that the time required for the exocarp cells to interact with saturated water in steam distillation is a drawback, unlike the microwave technique. The latter utilizes electromagnetic waves, thereby allowing greater interaction between chemical components and water. Additionally, the temperature increase in microwave distillation is more when compared to steam distillation (Shakir and Salih 2015). Owing to the difficulties associated with conventional techniques, modern techniques have been devised to obtain essential oils derived from fruits.

The modern techniques used to obtain essential oils from fruits are more efficient and provide adequate isolation of bioactive components (Jahromi 2019). The supercritical fluid technique is more popular than other modern techniques associated with ultrasound, microwaves, and pressurized liquid (Santana et al. 2009; Garcia-Salas et al. 2010; Jahromi 2019). This technique is used to develop novel pharmaceuticals (Pereira et al. 2016) as it results in greater purity of the natural substance. This is due to the lack of organic solvent requirement unlike in other modern techniques, and a low operating cost of supercritical fluid technique (Santana et al. 2009). Pereira et al. (2016) compared the efficiency of hydrodistillation and supercritical fluid technique in essential oil extraction from the fruits of myrtle (*Myrtus communis* L.) and observed more potent antioxidant activity of the essential oil obtained from the latter technique.

Another comparative study of conventional solvent, supercritical fluid, and ultrasound revealed that the essential oil of avocado (*Persea americana* W.) obtained using supercritical fluid had greater antioxidant activity as it enabled efficient isolation of the phenolic compounds (Tan et al. 2018). Once the essential oils are obtained, they can be used in several biochemical assays and cell cultures.

3. Applications of fruit-derived essential oils in cell culture

In recent years, the benefits of using plant-derived essential oils have promoted diverse research. The phytochemicals (usually 2–3) present in higher concentrations are called majorities, whereas those present in smaller quantities usually determine the biological function or activity of the natural substance (Shaaban et al. 2012). **Table 1** highlights some studies that explored these natural substances with biotechnological potential. Knowing that fruit-derived essential oils have useful biological properties, they have wide applications in biochemical tests *in vitro*.

With an objective to use these essential oils in biochemical studies, various tests were carried out to determine their biological properties. Identification of these properties expands

1002 the scope of their application, as with thymol, a terpene obtained from oregano (*Origanum*
1003 *vulgare*), which is used as herbal food additive owing to its multiple beneficial properties (El-
1004 hack et al. 2015). Similarly, Ferronato and Rossi (2018) identified the antioxidant properties of
1005 essential oils derived from the peel of orange (*C. sinensis*) and evaluated its potential. The
1006 results demonstrated that this essential oil was capable of scavenging 81.45% and 94.64% of
1007 free radicals when evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-
1008 bis (3-ethylbenzothiazoline) 6-sulfonic acid (ABTS) tests, respectively.

1009 Additionally, fruit-derived essential oils are an important source of antimicrobial agents.
1010 Texeira et al. (2012) evaluated the essential oil obtained from fresh peels versus dried peels
1011 of *Citrumelo swingle* (*Citrus paradisi* × *Poncirus trifoliata*). It was demonstrated that fresh
1012 peel-derived essential oil showed better effect against phytopathogens than those obtained
1013 from dry peels (380–407 mg/mL and 505–528 mg/mL respectively). The study revealed that
1014 the best antimicrobial effect was observed when the combination of fresh and dried peel-
1015 derived essential oils was used, which may be due to the number of phytochemicals present
1016 in each sample as well as the complexity and synergism of each one over the phytopathogens.

1017 Another important application of essential oils is as supplements for *in vitro* culture
1018 media for cells and gametes. They play vital roles in the development of new pharmacological
1019 products, toxicity tests in tumor cells, and control of free radical levels (Herman et al. 2019).
1020 A study by He et al. (2019) highlighted the antioxidant and anti-melanogenic properties of
1021 essential oils derived from grapefruit (*C. maxima*) peel. The antioxidant capacity was
1022 evaluated by DPPH, ABTS, and superoxide anion radical tests. Grapefruit bark essential oil
1023 reduced up to 70% of the free radicals in each trial with varying dose (0.2-1.0 mg/mL).
1024 Additionally, it showed anti-melanogenic effects at 10-50 µg/mL concentration range. It was
1025 able to alter the catalytic reactions of essential enzymes in melanoma cells, such as tyrosinase
1026 associated with melanoma-cancer and neurotoxicity.

1027 Fruit-derived essential oils are used in culturing embryos and gametes. The essential oils
1028 have also been tested in the form of male contraceptives due to their antioxidant activity. The
1029 effect of essential oil from the fruit ajowan (*Trachyspermum ammi*) on the viability and
1030 integrity of the human sperm membrane was evaluated (Paul and Kang 2010). It was observed
1031 that a concentration of 125 µg/mL was sufficient to reduce sperm viability and mitochondrial
1032 activity, possibly due to the essential oil-mediated modifications in sperm morphology and
1033 the metabolic enzymes involved. Studies on the effect of fruit-derived essential oils on female
1034 gametes and embryos are still scarce, and studies on essential oils from other plant parts have
1035 been performed largely.

1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047

1048

Table 1. Results of the use of essential oils derived from different parts of fruits with biotechnological potential.

Purpose of the study	Fruit part	Plant	Biological activity	Best concentration	Principal results	Reference
Assay biochemical	Peel	<i>Citrus maxima</i> (cv. <i>Guan Xi</i>)	Antioxidant effect	70.1 mg/mL	Antioxidant effect in DPPH assay	He et al. (2019)
		<i>Citrus reticulata</i>	Antioxidant effect	2 mg/mL	Antioxidant effect in DPPH assay	Goyal and Kaushal et al. (2018)
	Pulp	<i>Annona muricata</i>	Antioxidant effect	0.512 mg/mL	Antioxidant effect in different chemical test	Gyesi et al. (2019)
		<i>Feronia limonia</i>	Antioxidant effect	0.0413 mg/mL	Antioxidant effect by DPPH assay	Senthilkumar and Venkatesalu (2013)
Cell culture	Seed	<i>Campomanesia adamantium</i>	Anti-inflammatory effect	300 mg/mL	Maximum leukocyte activity reduced when induced by formalin	Viscardi et al. (2017)
		<i>Skimmia aquetilia</i>	Antioxidant effect	20 mg/mL	Antioxidant effect in DPPH and iron sequestration assays	Prakash et al. (2011)
	Peel	<i>Citrus limetta</i>	Toxicity effect	0.01 – 1%	No dose-dependent cytotoxic effect	Maurya et al. (2018)
		<i>Citrus maxima</i> (cv. <i>Guan Xi</i>)	Anti-melanogenic effect	0.1 mg/mL	Regulation of the protein expression levels of B16 cells without altering morphology and viability	He et al. (2019)
	Pulp	<i>Alpinia zerumbet</i>	Anti-inflammatory effect	50 ng/mL	Reduction of synthesis of receptors such as caspase-3 and NF-κB signaling	Ji et al. (2019)

	<i>Cinnamomum insularimontanum</i>	Anti-inflammatory effect	0.02 mg/mL	Inhibition of NF- κ B synthesis from RAW 264.7 line macrophages that are related to inflammation	Lin et al. (2008)
Seed	<i>Anethum Graveolens L.</i>	Anti-cancer	0.2 mg/mL	Alteration of cell cycle of transformed lines (HepG2)	Al-Sheddi et al. (2019)
	<i>Foeniculum vulgare</i>	Anti-cancer	0.01 mg/mL	Toxicity on human breast cancer cells and transformed epithelial cells (HeLA)	Akhbari et al. (2018)

1050 4. Conclusions

1051 Fruit derived essential oils have numerous beneficial properties. However, more studies
1052 on them are required. The use of different processes for extracting essential oils from fruits
1053 can lead to the discovery of different phytochemical components.

1054 Despite this limitation, the use of derived essential oils is still advantageous, and it is
1055 portrayed with their use in biochemical or *in vitro* cellular assays. Therefore, this research
1056 requires a better approach and investigation as these natural substances can be used for
1057 numerous important purposes.

1058 1059 References

1060

1061 AKHBARI, M., et al. Analysis and evaluation of the antimicrobial and anticancer activities of the
1062 essential oil isolated from foeniculum vulgare from Hamedan, Iran. *Natural Product Research*.
1063 2018, **33**, 1629-1632. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1423310>

1064

1065 AL-SHEDDI, E.S., et al. Evaluation of cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptosis induced by
1066 Anethum graveolens L. essential oil in human hepatocellular carcinoma cell line. *Saudi
1067 Pharmaceutical Journal*. 2019, **27**, 1053-1060. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.09.001>

1068

1069 ANGIOLELLA, L., SACCHETTI, G., EFFERTH, T. Antimicrobial and antioxidant activities of natural
1070 compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018, **2018**, 1-4.
1071 <https://doi.org/10.1155/2018/1945179>

1072

1073 BAPTISTA, A., et al. The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review.
1074 *Journal of Essential Oil Research*. 2020, **32**, 279-295.
1075 <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1746698>

1076

1077 BORGES, A.A., et al. Isolation, characterization, and cryopreservation of collared peccary skin-
1078 derived fibroblast cell lines. *PeerJ*. 2020, **8**, e9136, 1-18. <https://doi.org/10.7717/peerj.9136>

1079

1080 EL-HACK, M.E.A., et al. Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of
1081 animals, fish and poultry: A review. *Journal of Essential Oil Research*. 2015, **28**, 365-382.
1082 <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1153002>

1083

1084 FERRONATTO, A.N., and ROSSI, R.C. Extraction and application of orange peel essential oil as a
1085 natural ingredient. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*. 2018, **12**, 78-93.
1086 <https://doi.org/10.4013/ete.2018.122.05>

1087

1088 GARCIA-SALAS, A., et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable
1089 samples. *Molecules*. 2010, **15**, 8813-8826. <https://doi.org/10.3390/molecules15128813>

1090

1091 GOYAL, L., and KAUSHAL, S. Evaluation of chemical composition and antioxidant potential of
1092 essential oil from Citrus reticulata fruit peels. *Advances in Research*. 2018, **15**, 1-9.
1093 <https://doi.org/10.9734/AIR/2018/41981>

1094

1095 GYESI, J.N., OPOKU, R., BORQUAYE, L.S. Chemical composition, total phenolic content, and
1096 antioxidant activities of the essential oils of the leaves and fruit pulp of *Annona muricate* L.

- 1097 (Soursop) from Ghana. *Biochemistry Research International*. 2019, **4164576**, 1-9.
1098 <https://doi.org/10.1155/2019/4164576>
- 1099
- 1100 HE, W., et al. Antioxidant and anti-melanogenic properties of essential oil from peel of pomelo
1101 cv. Guan Xi. *Molecules*. 2019, **24**, 242-255. <https://doi.org/10.3390/molecules24020242>
- 1102
- 1103 HERMAN, R.A., et al. *Essential oils and their applications – A mini review. Advanced in Nutrition*
1104 & *Food Science*. 2019, **4**, 1-13. ISSN 2572-5971
- 1105
- 1106 JAHROMI, S.G. Extraction techniques of phenolic compounds from plants. *IntechOpen*. 2019,
1107 1-19. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84705>
- 1108
- 1109 JI, Y., et al. Essential oil from fructus Alpinia zerumbet (fruit of Alpinia zerumbet (Pers.) Burtt et
1110 Smith) protected against aortic endothelial cell injury and inflammation in vitro and in vivo.
1111 *Journal of Ethnopharmacology*. 2019, **237**, 149-158.
1112 <https://doi.org/10.1101/1016/j.jep.2019.03.011016/j.jep.2019.03.011>
- 1113
- 1114 KOSAR, M., et al. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and hydrodistillation
1115 methods for the fruit essential oils of Foeniculum vulgare. *Journal of Essential Oil Research*.
1116 2007, **19**, 426-429. <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699943>
- 1117
- 1118 LIN, C., et al. Anti-inflammation activity of fruit essential oil from Cinnamomum
1119 insularimontanum hayata. *Bioresourcer Technology*. 2008, **99**, 8783-8787.
1120 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.041>
- 1121
- 1122 MACIEL, M.A.M., et al. Aspects of natural products on the discovery of new antitumoral and
1123 antimutagenic agents. *Revista Fitoterá*. 2007, **3**, 38-59.
1124 <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/18415>
- 1125
- 1126 MANURANJAN, G., et al. Physicochemical, antibacterial and antioxidant properties of fixed and
1127 essential oils extracted from peels of Citrus macroptera fruit. *Indian Journal of Pharmaceutical*
1128 *Sciences*. 2019, **81**, 82-88. <https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000482>
- 1129
- 1130 MATIAS, M.F.O., OLIVEIRA, E.L., MAGALHÃES, M.M.A. Use of fibers obtained from the cashew
1131 (*Anacardium occidentale*, L) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food
1132 products. *Brazilian Arches of Biology and Technology*. 2005, **48**, 143-150.
1133 <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000400018>
- 1134
- 1135 MAURYA, A.K., et al. The essential oil from Citrus limetta Risso peels alleviates skin
1136 inflammatory: in-vitro and in-vivo study. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018, **212**, 86-94.
1137 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.018>
- 1138
- 1139 MUTALIB, L.Y. Comparison between conventional and modern methods for extraction of
1140 Rosmarinus officinalis leaves. *Journal of Medical Sciences*. 2015, **19**, 1029-1034.
1141 <https://doi.org/10.15218/zjms.2015.0027>
- 1142

- 1143 PAUL, S., and KANG, C. Studies on the viability and membrane integrity of human spermatozoa
1144 treated with essential oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turril fruit. *First International*
1145 *Journal of Andrology*. 2010, **44**, 117-125. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01148.x>
- 1146
- 1147 PEREIRA, P., CEBOLA, M., OLIVEIRA, M.C., BERNARDO-GIL, M.G. Supercritical fluid extraction
1148 vs. conventional extraction of myrtle leaves and berries: Comparison of antioxidant activity and
1149 identification of bioactive compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2016, **113**, 1-9.
1150 <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.006>
- 1151
- 1152 PÉRINO-ISSARTIER, S., et al. A comparison of essential oils obtained from lavandin via different
1153 extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and
1154 hydrodistillation. *Journal of Chromatography A*. 2013, **1305**, 41-47.
1155 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.024>
- 1156
- 1157 PRAKASH, O., GONDWAL, M., PANT, A.K. Essential oils composition and antioxidant activity of
1158 water extract from seeds and fruit pulp of *Skimmia aquetilia* N.P. Taylor & Airy Shaw. *Indian*
1159 *Journal of Natural Products and Resources*. 2011, **2**, 435-441. ISSN 0976-0512
- 1160
- 1161 RAMANA, K.V., et al. Therapeutic potential of natural antioxidants. *Oxidative Medicine and*
1162 *Cellular Longevity*. 2018, **2018**, 1-3. <https://doi.org/10.1155/2018/9471051>
- 1163
- 1164 ROSA, A.M., et al. Chemical composition and in vitro bioactivity of essential oil obtained from
1165 the flavedo of 'Pomìa', an ancient Sardinian fruit. *Journal of Essential Oil Research*. 2019, **31**,
1166 390-399. <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1606740>
- 1167
- 1168 SAIKIA, A.K., et al. -Screening of fruit and leaf essential oils of *Litsea cubeba* Pers. From north-
1169 east India – Chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research*.
1170 2013, **25**, 330-338. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.775081>
- 1171
- 1172 SANTANA, C.M., et al. Methodologies for the extraction of phenolic compounds from
1173 environmental samples: New approaches. *Molecules*. 2009, **14**, 298-320.
1174 <https://doi.org/10.3390/molecules14010298>
- 1175
- 1176 SANTOS, M.V.O., et al. Antioxidant effects of the essential oil of *Syzygium aromaticum* on
1177 bovine epididymal spermatozoa. *Andrologia*. 2019b, **51**, 1-8.
1178 <https://doi.org/10.1111/and.13448>
- 1179
- 1180 SANTOS, M.V.O., et al. *Syzygium aromaticum* essential oil supplementation during in vitro
1181 bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development.
1182 *Theriogenology*. 2019a, **128**, 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.031>
- 1183
- 1184 SANTOS, M.V.O., et al. Use of natural antioxidants in in vitro mammalian embryo production.
1185 *Semina: Ciências Agrárias*. 2018, **39**, 431-444. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n1p431>
- 1186
- 1187

- 1188 SCHIEBER, A., STINTZING, F.C., CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of
1189 functional compounds: recent developments. *Trends in Food Science & Technology*. 2001, **12**,
1190 376-380. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00012-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00012-2)
- 1191
- 1192 SENTHILKUMAR, A., and VENKATESALU, V. Chemical constituents, in vitro antioxidant and
1193 antimicrobial activities of essential oil from the fruit pulp of wood apple. *Industrial Crops and*
1194 *Products*. 2013, **46**, 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.018>
- 1195
- 1196 SHAABAN, H.A.E., EL-GHORAB, A.H., SHIBAMOTO, T. Bioactivity of essential oils and their
1197 volatile aroma components: Review. *Journal of Essential Oil Research*. 2012, **24**, 203-212.
1198 <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.659528>
- 1199
- 1200 SHAKIR, I. and SALIH, S.J. Extraction of essential oils from Citrus by-products using microwave
1201 steam distillation. *Iraqi Journal of Chemical and Petroleum Engineering*. 2015, **16**, 11-22. ISSN
1202 1997-4884
- 1203
- 1204 SILVEIRA, J.C., BUSATO, N.V., COSTA, A.O.S., JUNIOR, E.F.C. *Survey, and analysis of methods for*
1205 *the extraction of essential oils*. *Encyclopédia Biosfera*. 2012, **8**, 2038-2052. ISSN 1809-0583
- 1206
- 1207 SWALLAH, M.S., et al. Antioxidant potential overviews of secondary metabolites (polyphenols)
1208 in fruits. *International Journal of Food Science*. 2020, **2020**, 1-8.
1209 <https://doi.org/10.1155/2020/9081686>
- 1210
- 1211 TAN, C.X., et al. Characterization of virgin avocado oil obtained via advanced green techniques.
1212 *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2018, **120**, 1800170.
1213 <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800170>
- 1214
- 1215 TEIXEIRA, M.L., et al. Citrumelo Swingle: Chemical characterization, antioxidant and antifungal
1216 activities of the essential oils from the fresh and dried peels. *Magistra, Cruz das Almas-BA*.
1217 2012, **24**, 194-203. ISSN 2236-4420
- 1218
- 1219 TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*. 2003,
1220 **552**, 335-344. ISSN 1469-7793
- 1221 VISCARDI, D.Z., et al. Seed and peel essential oils obtained from Campomanesia adamantium
1222 fruit inhibit inflammatory and pain parameters in rodents. *Plos One*. 2017, **12**, 1-15.
1223 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157107>
- 1224
- 1225
- 1226
- 1227
- 1228
- 1229
- 1230
- 1231

1232 **CAPÍTULO 3 – ANTIOXIDANT POTENTIAL OF *Citrus sinensis* PEEL ESSENTIAL
1233 OIL (OECS) ON BOVINE OOCYTES**

1234

1235

1236 **Artigo experimental:** Antioxidant potential of *Citrus sinensis* peel essential oil (OECS) on
1237 bovine oocytes

1238

1239 **Periódico:** Reproductive Sciences

1240

1241 **Qualis Referência: A2. Fator de impacto:** 3,060

1242

1243

1244 **Data de submissão:** 04/02/2022.

1245

1246

1247

1248

1249

1250

1251

1252

1253

1254

1255

1256

1257

1258

1259

1260

1261

1262

1263

1264

1265

1266 Antioxidant potential of *Citrus sinensis* peel essential oil (OECS) on bovine oocytes

1267

1268

1269 Leonardo Vitorino Costa de Aquino^a, Maria Valéria de Oliveira Santos^a, Lhara Ricarliany
1270 Medeiros de Oliveira^a, Tassio Lessa do Nascimento^b, Luciana Medeiros Bertini^b and
1271 Alexsandra Fernandes Pereira^{a*}

1272

1273

1274 ^aLaboratory of Animal Biotechnology, Federal Rural University of Semi-Arid, Mossoró, RN,
1275 Brazil

1276 ^bFederal Institute of Rio Grande do Norte, Apodi, RN, Brazil

1277

1278

1279 *Corresponding author: Alexsandra Fernandes Pereira

1280 Laboratory of Animal Biotechnology

1281 Federal Rural University of Semi-Arid

1282 Av. Francisco Mota, 572, Mossoró, RN, 59625-900, Brazil

1283 Phone: +55 84 3317 8361

1284 E-mail address: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

1285

1286

1287

1288 **Word count:** 3400

1289

1290

1291 **ABSTRACT**

1292 Essential oils are a rich source of bioactive antioxidants that can replace synthetic compounds
1293 in cell culture systems. This study aimed to evaluate the antioxidant effects of the *Citrus*
1294 *sinensis* peel essential oil (EOCS) in a bovine oocyte model. Oocytes were divided into five
1295 groups: control, synthetic compound (CYS), and 10 (EOCS10), 30 (EOCS30), and 50 µg/mL
1296 (EOCS50) of EOCS. Oocytes were evaluated for *cumulus* cell expansion, viability, and nuclear
1297 and cytoplasmic maturation. Oxidative status was evaluated using reactive oxygen species
1298 (ROS), mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), and glutathione (GSH). Although all
1299 antioxidant groups had improved viability, only the CYS, EOCS10, and EOCS30 allowed
1300 greater *cumulus* cell expansion. EOCS10 and EOCS30 ensured a higher rate of nuclear
1301 maturation than EOCS50. All groups showed reduced ROS levels compared to that of the
1302 control, but no difference was observed in $\Delta\Psi_m$ and GSH. In summary, EOCS10 and EOCS30
1303 showed better oocyte maturation rates.

1304

1305 **Keywords:** natural antioxidant products; orange peel; *in vitro* oocyte maturation; cattle

1306

1307 **1. Introduction**

1308 Essential oils are characterized as volatile and lipophilic mixtures synthesized from the
1309 secondary metabolites of plants (1). These substances are obtained from different parts of the
1310 plant, comprising 5% of its dry matter (2), and are considered safe for human and animal use
1311 (3). They have a chemical constitution rich in substances with different purposes, such as
1312 antiviral, insecticidal, antibacterial, and antioxidant activities (4). Specifically, the use of
1313 natural compounds with antioxidant potential has been proposed as an interesting alternative
1314 for cell culture systems, which suffer from variations in reactive oxygen species (ROS) (5,6).

1315 Oocytes experience oxidative stress during *in vitro* maturation (IVM), which is an
1316 essential step for *in vitro* embryo production (IVEP). In this system, oocytes are cultured to
1317 acquire meiotic developmental competence, a fundamental parameter for this cell to support
1318 the subsequent stages of embryo production. One of the main reasons of oocyte damage during
1319 development *in vitro* is the imbalance between ROS generation and neutralization (7). Excess
1320 ROS synthesized from the regular metabolism of cells impairs cell quality and efficiency (8),
1321 resulting in 30% of the immature oocytes reaching the blastocyst stage (7).

1322 During IVM, variation in factors such as the cellular environment, media composition,
1323 presence of sperm, light, and temperature cause excessive ROS production (9,10). With excess
1324 ROS, oocyte competence is affected at different levels, especially in nuclear and cytoplasmic
1325 maturation (11). Moreover, ROS induce cell apoptosis, changing the morphology and lowering
1326 the embryonic rates (12). Routinely, synthetic compounds, such as cysteamine, have been used
1327 as antioxidants in oocyte IVM media (13,14). Nevertheless, variations in success rates have
1328 aroused interest in other agents with antioxidant activity, including those from natural sources
1329 (15). These natural agents promote enzyme synthesis that improve the physiological state of
1330 the cells during *in vitro* culture, thereby ensuring promising results (10,15–16).

1331 Several sources can be used to prepare essential oils with antioxidant action, such as
1332 those derived from industrial waste (17). Parallel to this, the increase in the amount of solid,
1333 urban, and industrial waste has aroused interest in this waste as a by-product of commercial
1334 interest (18). For example, the orange (*Citrus sinensis*) juice industry generates fruit peel, and
1335 the essential oil extracted from it can be used commercially in foods, beverages, flavorings,
1336 perfumes, and cosmetics (19). It can be utilized in other processing technologies, as reported
1337 by Toscano-Garibary et al. (20) who demonstrated by using the essential oil of *Citrus sinensis*
1338 (EOCS) in cell culture systems.

1339 Previous studies have shown that EOCS has antioxidant properties, through biochemical
1340 tests. According to Ferronatto and Rossi (21), EOCS inhibited free radicals by 81.45% in a 1,1-
1341 diphenyl-2-picrylhydrazyl assay (DPPH method) assay and 94.64% in a 2,2'-Azino-bis-(3-
1342 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) assay (ABTS method), proving to be a strong natural
1343 antioxidant. Posteriorly, Lin et al. (22) observed that EOCS exhibited antioxidant activity by
1344 scavenging DPPH and ABTS free radicals in a dose-dependent manner, at 29.70 mg/mL and
1345 4.17 mg/mL, respectively, varying according to the stage of maturation and fruit type.
1346 Additionally, EOCS reduced late apoptosis (from 70% to 22%) and superoxide radical
1347 generation in cell lines (20).

1348 Therefore, considering these positive effects of EOCS, in this study, we aimed to
1349 evaluate the antioxidant effects of EOCS peel in a bovine oocyte model. We assessed the effects
1350 of different EOCS concentrations in bovine oocytes on IVM and oxidative status.

1351

1352 **2. Material and methods**

1353 This research was conducted in accordance with the Animal Ethics Committee of the
1354 Federal Rural University of Semi-Arid (no. 23091.002360/2016-17). Except where indicated,
1355 we purchased all chemicals from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

1356

1357 **2.1. Peel material and essential oil extraction**

1358 Sweet and organic oranges were obtained from Jaguarauna, CE ($4^{\circ}50'02''S$,
1359 $37^{\circ}46'51''W$), northeastern Brazil. The fruits were processed, and their peels were milled and
1360 kept in a dry environment for seven days. EOCS was extracted by hydrodistillation using a
1361 Clevenger-type adapter coupled to a 5 L round-bottomed flask associated with a heating mantle
1362 (23). Briefly, *C. sinensis* husks (371 g) were transferred to a flask containing distilled water,
1363 and the system was heated to 100 °C. After 6 h, the essential oil was recovered and dried through

1364 percolation with anhydrous Na₂SO₄. Subsequently, the samples were stored at 4–8 °C and
1365 protected from light. Finally, the density and oil yield (% m/m) were obtained at 0.84 g/mL and
1366 2.9%, respectively.

1367

1368 **2.2. Essential oil analysis and constituent identification**

1369 Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) was performed using a
1370 Shimadzu QP-2010 Plus instrument (Kyoto, Japan) under the following conditions: column:
1371 SH-Rtx-5 (5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane) fused silica capillary column (30 m
1372 length × 0.25 mm diameter × 0.25 µm film diameter); carrier gas: He (1.78 mL/min, in constant
1373 linear velocity mode); injector temperature: 250 °C, in split mode (1:10); detector temperature:
1374 250 °C; column temperature programming: 40–180 °C at 4 °C/min, 180–280 °C at 20 °C/min,
1375 and then 280 °C for 10 min; mass spectra: electron impact 70 eV. The injected sample volume
1376 was 1 µL (1.0 mg of oil in 1000 µL of 99.9% pure dichloromethane).

1377 The chemical constituents were identified by their gas chromatography retention times
1378 relative to those of known compounds. The gas chromatography retention times were expressed
1379 as Kovat's indices (KI) and calculated by linear regression and comparing their mass spectra
1380 with published spectra (24). Only two compounds were identified (Table 1). D-Limonene
1381 (48.5%) and α-Terpineol (40.2%) were the main constituents, with 11.3% unidentified
1382 components.

1383

1384

1385

1386

1387

1388

1389 **Table 1.** Chemical composition of *Citrus sinensis* peel essential oil.

Compounds	KI	Relative %*	Molecular form ¹³⁹⁰
D-Limonene	1059	48.5	C ₁₀ H ₁₆ 1391
α-Terpineol	1188	40.2	C ₁₀ H ₁₈ O 1392
Other	--	11.2	-- 1393

1395 KI: Kovat's indices calculated by linear regression. *The % composition is the % peak area
 1396 related to the total EOCS components.

1397

1398 **2.3. Obtaining the cumulus-oocyte complex (COC) and IVM**

1399 Bovine ovaries were collected from a slaughterhouse and transported to the laboratory
 1400 in a saline solution (NaCl, 0.9%) supplemented with 0.05 mg/mL penicillin at 35–37 °C within
 1401 1 h of slaughter. In the laboratory, all visible follicles with a 2–8 mm diameter were aspirated
 1402 for oocyte recovery using a 21 G needle attached to a 5.0 mL syringe containing oocyte recovery
 1403 medium (ORM), consisting of TCM-199 (Gibco-BRL, Carlsbad, CA, USA) supplemented with
 1404 0.2 mM sodium pyruvate, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL), and 1% antibiotic–
 1405 antimycotic solution.

1406 Oocytes were classified using a stereomicroscope (SZT-LED; Bel, Piracicaba, Brazil),
 1407 and only COCs with more than one layer of *cumulus* cells and homogeneous cytoplasm were
 1408 used for IVM. The COCs were divided into drops (20–30 COCs per 100 μL) covered with
 1409 mineral oil and incubated for 24 h at 38.5 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The
 1410 IVM medium consisted of ORM and 20 μg/mL FSH/LH (Pluset®, Hertape-Calier, Barcelona,
 1411 Spain). For the treatments, the IVM medium was supplemented with different antioxidants: 100
 1412 μM cysteamine (synthetic compound, CYS), or 10 μg/mL (EOCS10), 30 μg/mL (EOCS30), or
 1413 50 μg/mL (EOCS50) of EOCS. The control group consisted of oocytes matured in the absence
 1414 of antioxidants. EOCS dilutions were performed with up to 0.5% DMSO in IVM media (25).

1415 The EOCS concentrations were based on a previous study in which the authors observed
1416 that d-Limonene showed antioxidant activity in lymphocytes (26). In this study, 10–50 µg/mL
1417 concentrations of d-Limonene efficiently reduced the deleterious effects of ROS and stimulated
1418 the synthesis of enzymes, such as catalase and peroxidase, which are related to the antioxidant
1419 action in cells. In addition, these concentrations showed greater activity when the DPPH assay
1420 was performed. From this, higher (50 µg/mL), intermediate (30 µg/mL), and lower (10 µg/mL)
1421 EOCS concentrations were defined for evaluation in the present study.

1422

1423 **2.4. EOCS effects on bovine oocyte IVM**

1424 After IVM, oocytes were evaluated for *cumulus* cell expansion and viability in a total
1425 of 20 replicates. COCs were initially observed for *cumulus* expansion under a
1426 stereomicroscope. Cells with high expansion were considered as matured. Moreover, the cells
1427 were removed by successive pipetting with 0.1% hyaluronidase and stained with trypan blue in
1428 an exclusion assay (0.2%) to determine their viability rates. Viable (colorless) and non-viable
1429 (blue) cells were counted in the four outer quadrants of the Neubauer chamber (16).

1430 Meiotic competence was measured by visualizing the first polar body (1PB) and the
1431 nuclear stage (MII) in a total of 20 and 10 repetitions, respectively. When extrusion of the 1PB
1432 was evident, the cells were considered as matured. Moreover, the MII was evaluated with fixed
1433 oocytes (4% paraformaldehyde for 15 min) stained with Hoechst 33342 (10 µg/mL) for 15 min.
1434 A fluorescent microscope (Olympus BX51TF, Tokyo, Japan) was used to observe nuclei in
1435 metaphase II (370 nm) that were considered mature oocytes, while those in other nuclear phases
1436 were considered immature (27).

1437 The cytoplasmic maturation was evaluated using 500 nM MitoTracker Red[®] (CMXRos,
1438 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (28) for a total of four repetitions. After 30 min of incubation,
1439 the images were captured using a fluorescence microscope (560 nm). Oocytes were classified

1440 as peripheral (immature oocytes) or dispersed (mature oocytes) (29). Furthermore,
1441 mitochondrial organization patterns were classified as previously reported (27): pattern A:
1442 homogeneous fine, with small granulations spread throughout the cytoplasm; pattern B:
1443 heterogeneous clustered, with large granulations spread throughout the cytoplasm or located in
1444 specific cytoplasmic domains. The presence of pattern B correlated with better maturation rates.

1445

1446 **2.5. EOCS effects on bovine oocyte oxidative status**

1447 After IVM, mature oocytes were labeled with different fluorescent probes: H₂DCFDA
1448 to measure ROS levels, MitoTracker Red[®] to measure mitochondrial membrane potential
1449 ($\Delta\Psi_m$), and CellTracker Blue[®] to measure glutathione (GSH) levels. Four replicates were made
1450 for which the probe and each individually stained oocyte functioned as the experimental unit
1451 for each group.

1452 Denuded oocytes were incubated with the probes for 30 min at 38.5 °C in 5% CO₂. The
1453 oocytes were then placed on a glass slide, and images were captured with a fluorescence
1454 microscope. The fluorescence intensity (pixels) was estimated using ImageJ software
1455 ((National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA). The background intensity was subtracted
1456 from the values obtained from the structures. The relative expression levels (arbitrary
1457 fluorescence units) were measured as described by Santos et al. (16).

1458 ROS were analyzed with 10 μM H₂DCFDA and observed at 460 nm (30). For $\Delta\Psi_m$,
1459 oocytes were stained with 500 nM MitoTracker Red[®] (CMXRos, Invitrogen) and observed at
1460 560 nm (28). Finally, GSH was measured using 10 μM 4-chloromethyl-6,8-difluoro-7-
1461 hydroxycoumarin (C12881; Cell Tracker Blue[®]; CMF₂HC; Thermo Fisher Scientific,
1462 Waltham, MA, USA) at 370 nm (30).

1463

1464

1465 **2.6. Statistical analysis**

1466 All data are expressed as mean \pm standard error and analyzed using StatView 5.0 (SAS
1467 Institute Inc., Cary, NC, USA). For all results, the Shapiro-Wilk test was performed for
1468 normality standards, and Levene's test was used for homoscedasticity. The ROS, $\Delta\Psi_m$, and
1469 GSH analysis data were altered to the arcsine function and analyzed by an analysis of variance
1470 (ANOVA) followed by Tukey's test. Other data were compared using a chi-square test.
1471 Differences were considered significant when $p < 0.05$.

1472

1473 **3. Results**

1474 We used 480 ovaries to acquire, select, and distribute 1877 viable immature oocytes
1475 (3.9 viable oocytes/ovary) for all analyses.

1476

1477 **3.1. Effects of EOCS on bovine oocyte IVM**

1478 Table 2 shows the evaluated *cumulus* cells and nuclear maturation data. Although all
1479 groups containing antioxidants had increased *cumulus* cell viability compared to that of the
1480 control, only CYS, EOCS10, and EOCS30 groups promoted an increase in the expansion of
1481 these cells (Figure 1, Table 2). EOCS10 and EOCS30 ensured a higher 1PB rate compared to
1482 EOCS50 (Table 2), demonstrating better meiotic progression. No difference was observed in
1483 the MII rates among the groups (Table 2).

1484 Figure 2 displays the cytoplasmic maturation and organization of bovine oocyte
1485 mitochondria after IVM in the absence and presence of antioxidants. For both evaluations, no
1486 significant differences were observed among the groups for each evaluated oocyte (Figure 2).

1487

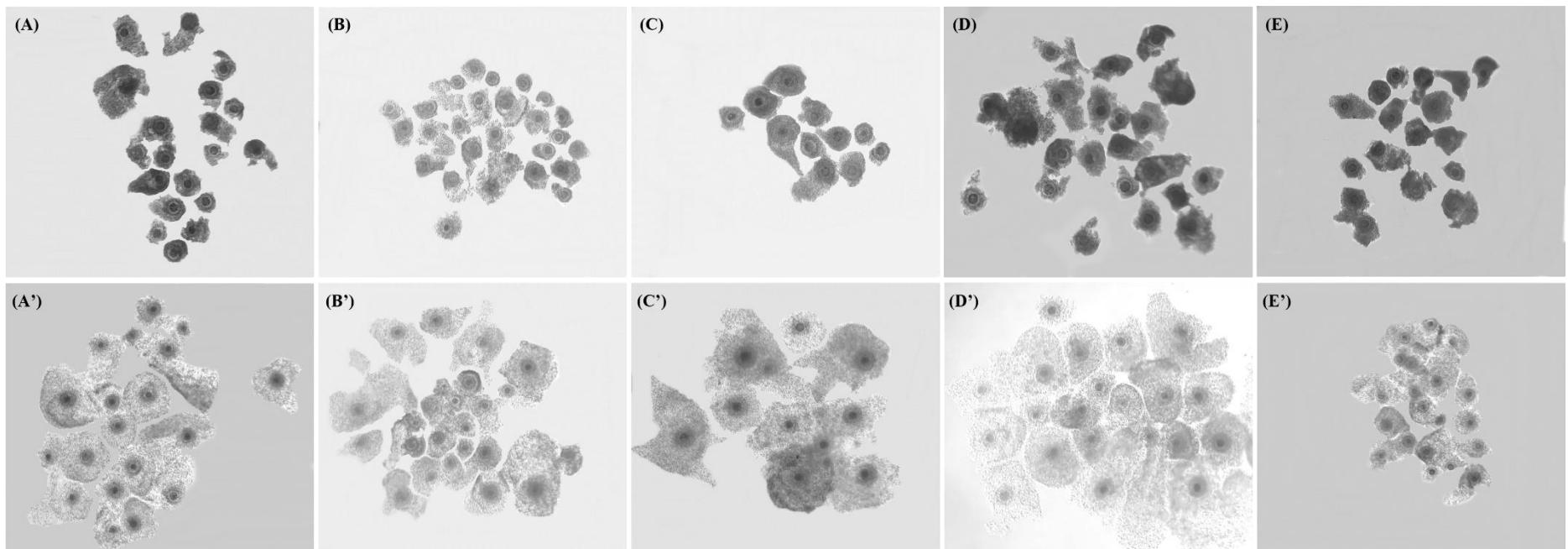
1488

1489

1490

1491

1492

1493 **Figure 1.** Effect of EOCS on bovine oocyte *cumulus* cell expansion. (A-E) Representation of immature bovine oocytes under different conditions1494 (control, CYS, 10 µg/mL, 30 µg/mL, and 50 µg/mL of EOCS). (A'-E') Representation of bovine oocyte *cumulus* cell expansion after 24 h IVM

1495 under different conditions (control, CYS, 10 µg/mL, 30 µg/mL, and 50 µg/mL of EOCS).

1496

1497 **Table 2.** Influence of EOCS during bovine IVM on evaluation of *cumulus* cells and nuclear
 1498 maturation.

Groups	Evaluation of <i>cumulus</i> cells		Evaluation of oocyte nuclear maturation	
	Expansion (%)	Viability (%)	1PB (%)	MII (%)
Control	96.4 ± 1.8 ^b (359/373)	78.9 ± 1.8 ^b (16568/21119)	78.4 ± 2.9 ^{ab} (265/332)	67.0 ± 9.2 ^a (115/157)
CYS	99.6 ± 0.4 ^a (374/375)	83.9 ± 1.6 ^a (18397/22164)	81.6 ± 3.2 ^{ab} (279/337)	75.5 ± 6.8 ^a (127/163)
EOCS10	100 ± 0.0 ^a (342/342)	84.0 ± 2.0 ^a (16131/19420)	83.2 ± 3.0 ^a (259/307)	75.7 ± 3.3 ^a (112/146)
EOCS30	99.1 ± 0.9 ^a (363/365)	84.7 ± 2.2 ^a (18353/22127)	84.6 ± 2.4 ^a (270/319)	74.2 ± 4.0 ^a (108/143)
EOCS50	94.7 ± 3.0 ^b (354/368)	83.8 ± 1.6 ^a (14944/18239)	77.0 ± 2.8 ^b (242/313)	69.1 ± 5.1 ^a (106/145)

1499 ^{a,b}: Values with different superscript letters within columns are significantly different ($p < 0.05$).

1500 1PB, first polar body, MII, metaphase II.

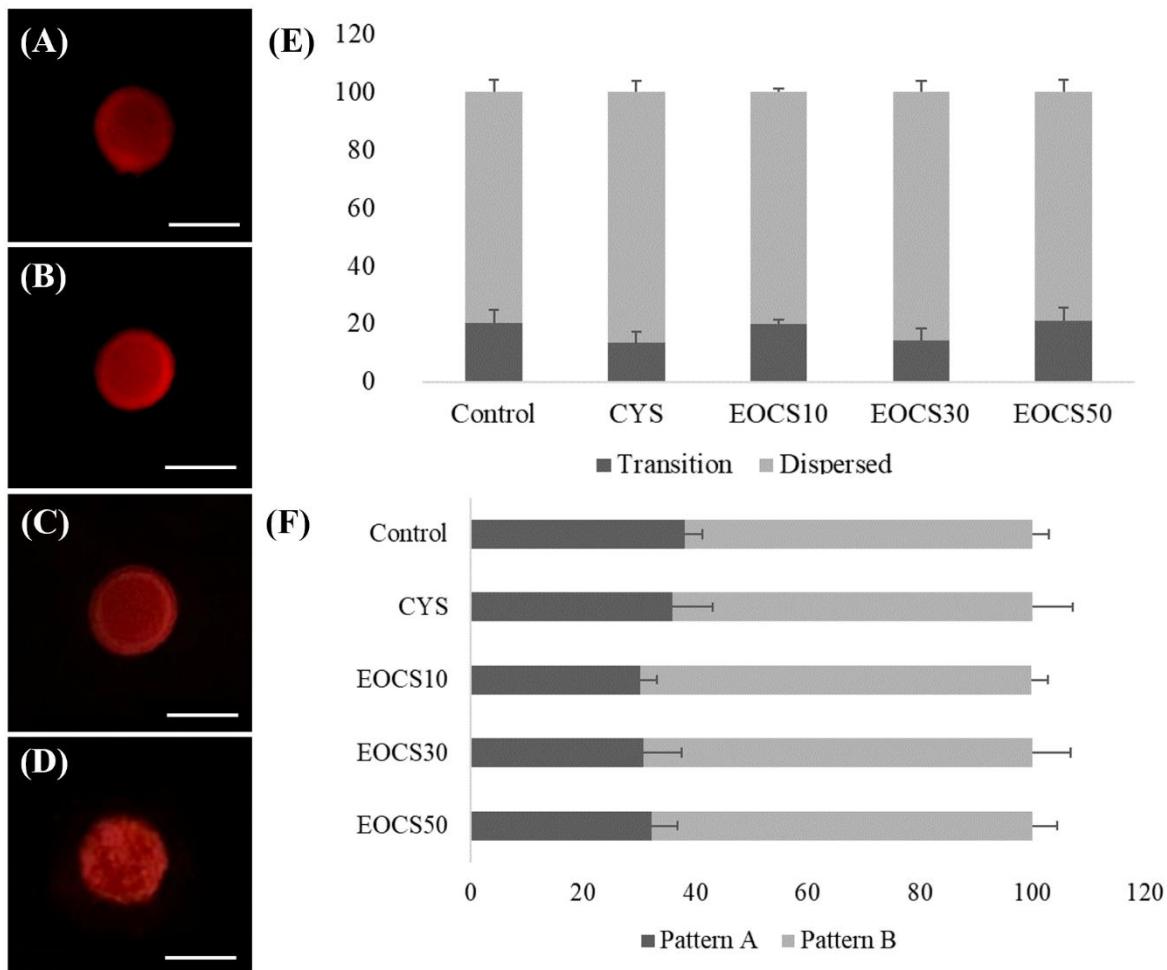
1501

1502

1503

1504

1505



1506

1507 **Figure 2.** Mitochondrial pattern of bovine oocytes cultured in medium supplemented with
 1508 EOCS. **(A-B)** Representative image of mitochondria in transition and dispersed in the
 1509 cytoplasm of bovine oocytes. **(C-D)** Representation of oocytes labeled with MitoTracker Red[®]
 1510 showing homogeneity and aggregation of cytoplasmic mitochondria. **(E)** Homogeneous
 1511 (pattern A) and heterogeneous (pattern B) pattern of the cytoplasm of bovine oocytes after
 1512 oocyte maturation. Data are shown in percentage. **(F)** Mitochondrial distribution of bovine
 1513 oocyte cytoplasmic maturation. Scale bars = 50 µm.

1514

1515 **3.2. Effects of EOCS on bovine oocyte oxidative status**

1516 All antioxidant treatments (CYS: 0.39 ± 0.24 ; EOCS10: 0.39 ± 0.18 ; EOCS30: $0.5 \pm$
 1517 0.44 ; EOCS50: 0.60 ± 0.44) showed a decrease in ROS compared to that in the control ($1.0 \pm$

1518 0.65; Figure 3; $p < 0.05$), allowing a better balance of free radicals. Nevertheless, no difference
1519 was observed in the $\Delta\Psi_m$ (Figure 4) or intracellular GSH levels (Figure 5).

1520

1521

1522

1523

1524

1525

1526

1527

1528

1529

1530

1531

1532

1533

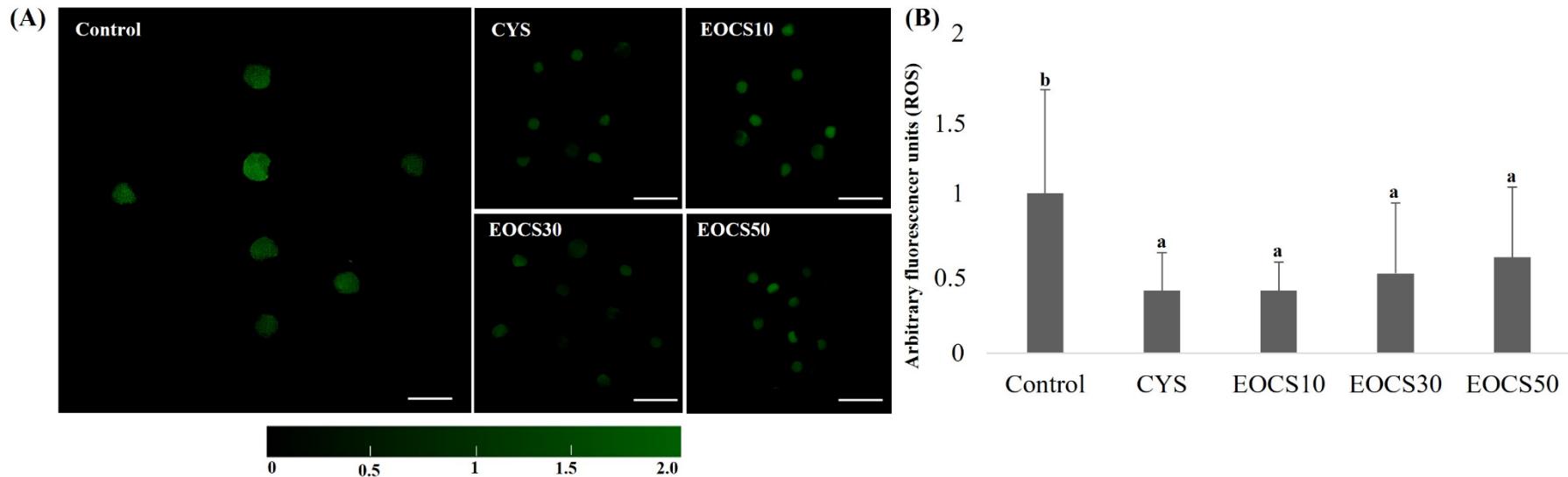
1534

1535

1536

1537

1538



1539 **Figure 3.** Evaluation of the influence of EOCS on the production of ROS in bovine oocytes after *in vitro* maturation. (A) Representative image of
 1540 oocytes labeled with the H₂DCFDA probe. (B) Quantification of intracellular levels of ROS. Scale bars = 200 µm. ^{a,b}: $p < 0.05$.

1541

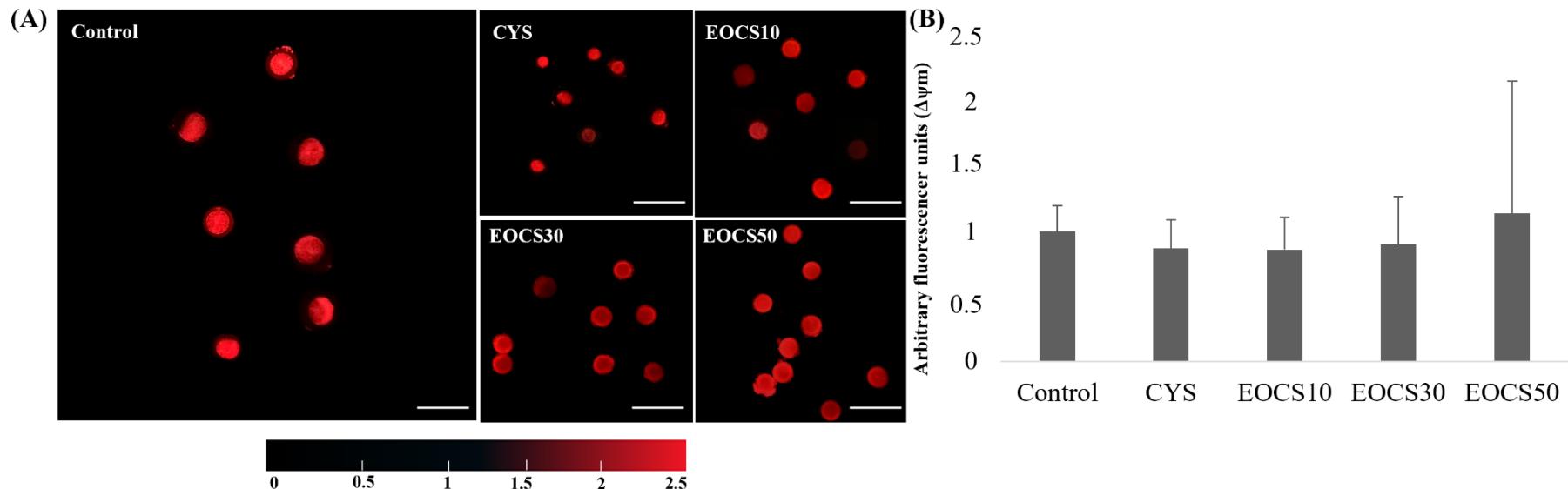
1542

1543

1544

1545

1546



1547 **Figure 4.** Evaluation of the influence of EOCS on the bioenergetic potential of bovine oocytes after *in vitro* maturation. **(A)** Representation of
 1548 oocytes labeled with the MitoTracker Red[®] (CMXRos) probe. **(B)** Quantification of the mitochondrial potential of oocytes. Scale bars = 200 μm .
 1549 $p > 0.05$.

1550

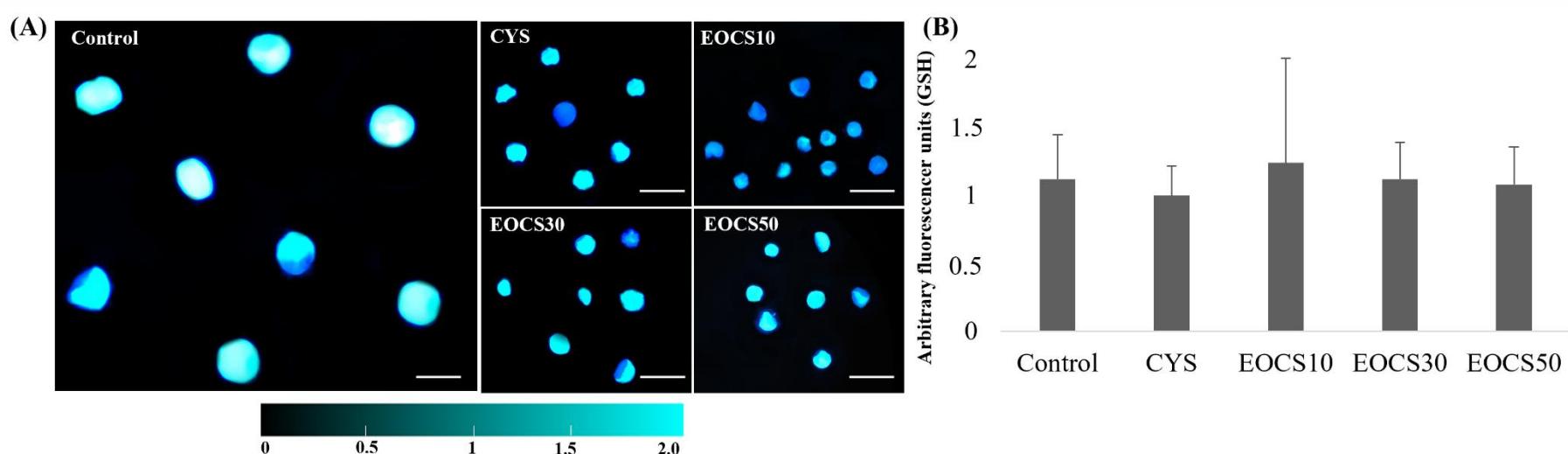
1551

1552

1553

1554

1555



1556 **Figure 5.** Evaluation of the influence of EOCS on GSH synthesis in bovine oocytes after their *in vitro* maturation. (A) Representation of Cell
1557 Tracker Blue[®] (CMF₂HC) labeled oocytes. (B) Quantification of intracellular GSH levels. Scale bars = 200 μm. $p > 0.05$.

1558 **4. Discussion**

1559 For the first time, we demonstrated that IVM using a medium supplemented with EOCS
1560 significantly reduced ROS levels in matured bovine oocytes compared to those without EOCS.
1561 Moreover, EOCS10 and EOCS30 exhibited better oocyte viability rates after maturation,
1562 similar to those obtained with CYS, which is currently the most used IVM antioxidant agent
1563 (14). Therefore, considering the reduction in oxidative stress, our study identified EOCS as an
1564 effective antioxidant in bovine oocytes. Oxidative stress is an imbalance of pro-oxidant
1565 molecules in cell culture systems. This phenomenon is one of the main causes of the low
1566 efficiency observed in oocyte IVM (7,31).

1567 During IVEP, ROS molecule production is inevitable since these compounds are
1568 generated from regular metabolism and are critical in the proper development of the oocyte and
1569 embryo (32). Nevertheless, when ROS molecules become excessive, they cause structural
1570 changes leading to a regression in the meiotic capacity of the oocyte, consequently reducing the
1571 rate of embryonic development or even causing cell death (14). Therefore, our study
1572 demonstrated that EOCS could reduce oxidative stress by inhibiting or regulating ROS
1573 molecules, thus ensuring a better quality of cultured cells.

1574 In general, the antioxidant effect of EOCS on ROS molecules during bovine oocyte
1575 culture may be related to its chemical constituents. Studies have shown that major EOCS
1576 components, such as d-Limonene, have a positive effect on the sequestration of molecules that
1577 cause oxidative stress (21,33). According to Roberto et al. (26), during lymphocyte culture, d-
1578 Limonene could reduce the oxidative stress caused by hydrogen peroxide, one of the free
1579 radicals that cause oocyte and embryo degeneration (14). In this study, we showed that d-
1580 Limonene could stimulate the synthesis of peroxidase and catalase, which are responsible for
1581 regulating hydrogen peroxide. Therefore, it is possible that during bovine oocyte IVM, d-
1582 Limonene positively controlled these molecules and reduced oxidative stress.

1583 Another chemical constituent that may be related to the antioxidant effect of EOCS on
1584 ROS molecules during bovine oocyte culture is α -Terpineol. This volatile monoterpenoid has
1585 antimutagenic and anti-inflammatory effects and can be a potent inhibitor of superoxide
1586 production (34). An oxygen radical absorbance capacity test by Bicas et al. (35) demonstrated
1587 that 2.72 μM α -Terpineol had a positive effect on free radical scavenging.

1588 The $\Delta\Psi_m$ analysis determines the bioenergetic function of the oocyte. That is, it reveals
1589 whether the EOCS morphologically and functionally alters the meiotic progression of the cell
1590 during its maturation (36). Studies have demonstrated that high ROS levels generated from
1591 adenosine triphosphate (ATP) production cause oxidative damage to mitochondrial DNA,
1592 thereby reducing the oocyte quality (37–38). Therefore, this parameter shows that although the
1593 EOCS did not lower $\Delta\Psi_m$ levels, EOCS did not have any toxic effect on the oocytes as high
1594 oocyte maturation rates were observed.

1595 EOCS did not stimulate GSH synthesis because it required a higher concentration of the
1596 essential oil than what was used in this study. We suggest this because Roberto et al. (26), using
1597 high concentrations of d-Limonene (100–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), observed its effect on the catalytic cycle
1598 of GSH, as it stimulated the synthesis of superoxide dismutase (39). However, in our study, the
1599 concentration of d-Limonene ranged between 4.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 24.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

1600 Furthermore, we observed that oocytes cultured in a medium supplemented with
1601 EOCS10 or EOCS30 presented a higher *cumulus* cell expansion rate compared to the CYS,
1602 control, and EOCS50 groups. This suggests that EOCS at a concentration above 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ can
1603 alter the balance of the redox system of cultured oocytes. ROS at adequate levels is essential
1604 for oocyte maturation (40), as they help the initial processes of proper oocyte development.

1605 It is known that *cumulus* cell expansion is essential for oocyte growth and competence
1606 (41), as these cells communicate directly with the female gamete, allowing the exchange of
1607 small molecules and nutrients necessary for cellular physiology (42). These cells expand as a

1608 signal of hyaluronic acid synthesis and are considered important indicators in determining
1609 proper oocyte meiotic progression (42). This suggests that the medium containing antioxidants
1610 influenced ROS molecule reduction, ensuring less oxidative stress and favoring the
1611 microenvironment of bovine oocyte IVM. In sheep, supplementing the IVM medium with
1612 natural antioxidants, such as resveratrol (0.25 µM and 0.5 µM), promoted high *cumulus* cell
1613 expansion rates, an essential factor ensuring better cell culture conditions (43).

1614 In addition to the benefits promoted by *cumulus* cell expansion, using different EOCS
1615 concentrations ensured superior viability compared to the control and similar to the CYS group.
1616 In general, oocytes depend on the viability of *cumulus* cells for proper development and
1617 competence because their presence protects oocytes against morphological damage to the
1618 microtubules and chromosomes (43). Thus, in microenvironments with greater exposure to
1619 ROS, it is possible to observe lower *cumulus* cell viability rates, as evidenced by previous
1620 studies using bovine oocytes. They found that cells grown in a medium without an antioxidant
1621 had lower viability rates than cells treated with antioxidants (16,30).

1622 Another determining pattern of oocyte quality in IVM is its competence to reach the
1623 final development stage to guarantee embryonic development (44). Thus, evaluating the nuclear
1624 and cytoplasmic competence of bovine oocytes is fundamental for determining the quality of
1625 the analyzed cells (7). In this context, EOCS50 had a lower 1PB extrusion rate. EOCS10 and
1626 EOCS30 guaranteed rates above 80%, values similar to those of the control and CYS.
1627 According to Kala et al. (45), *in vitro* redox balance is essential, especially for hydrogen
1628 peroxide, which is associated with the resumption of meiosis in bovine oocytes (32,46). As a
1629 result, EOCS50 caused a reduction of these molecules, resulting in late maturation of the bovine
1630 oocytes evaluated, although this concentration was not toxic when compared to that of EOCS10
1631 and EOCS30. This was justified as there was no difference in the MII formation in the evaluated
1632 oocytes among the examined groups.

1633 In addition to nuclear maturation, no significant difference was observed among the
1634 groups in the mitochondrial distribution and organization of the evaluated oocytes. Generally,
1635 oocytes undergo different morphological and physiological changes to acquire competence
1636 during IVM (47). As a result of this development, the organelles are repositioned and
1637 redistributed. Although we observed no difference among the groups evaluated, this
1638 demonstrates that EOCS did not act as a toxic component, as it did not interfere with the final
1639 development of these cells. In bovine oocytes, compromising cytoplasmic redistribution
1640 processes lowers cell quality, triggering cell apoptosis (36). Therefore, a well-controlled *in vitro*
1641 system increases the chance of acquiring cultured oocytes of higher quality.

1642

1643 **5. Conclusion**

1644 Although all EOCS concentrations promoted a reduction in ROS, 10 µg/mL and 30
1645 µg/mL EOCS resulted in better oocyte viability rates after maturation. Therefore, EOCS, at
1646 defined concentrations, added to the IVM medium could be an effective synthetic compound
1647 substitute to reduce the damage caused by oxidative stress in bovine oocytes. In terms of
1648 antioxidant potential, this low EOCS concentration improved *cumulus* cell expansion and
1649 viability and reduced the ROS levels. Finally, this is the first study demonstrating the efficiency
1650 of EOCS in *in vitro* bovine gamete culture systems, establishing an important alternative that
1651 can positively influence IVEP.

1652

1653 **Acknowledgments**

1654 The authors thank the slaughterhouse and industrial refrigerator of Mossoró (RN, Brazil) for
1655 providing the biological material for the experiments.

1656

1657 **Disclosure statement**

1658 No potential conflict of interest was reported by the authors.

1659

1660 **Funding**

1661 This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

1662 – Brazil (CAPES, Financial Code 001).

1663

1664 **ORCID ID:** L.V.C. Aquino: 0000-0001-7192-7581; M.V.O. Santos: 0000-0002-4293-507X;

1665 L.R.M. Oliveira: 0000-0002-7292-6908; T.L. Nascimento: 0000-0002-5250-314X; L.M.

1666 Bertini: 0000-0003-0208-2233; A.F. Pereira: 0000-0003-2137-854X.

1667 **References**

1668 1. Q. Zhang, L. Lin and W. Ye, *Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review*. Chinese Medicine, **13**, 1–26 (2018). doi: 10.1186/s13020-018-0177-x.

1671 2. S. Baptista-Silva, S. Borges, O.L. Ramos, M. Pintado and B. Sarmento, *The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review*. Journal of Essential Oil Research, **32**, 279–295 (2020). doi: 10.1080/10412905.2020.1746698.

1674 3. M. Vázquez-Briones, L. Hernández and J. Guerrero-Beltrán, *Physicochemical and antioxidant properties of Cymbopogon citratus essential oil*. Journal of Food Research, **4**, 36–45 (2015). doi: 10.5539/jfr.v4n3p36.

1677 4. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar, *Biological effects of essential oils – A review*. Food and Chemical Toxicology, **46**, 446–475 (2008). doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.

1680 5. S. Catalani, F. Palma, S. Battistelli and S. Benedetti, *Oxidative stress and apoptosis induction in human thyroid carcinoma cells exposed to the essential oil from Pistacia lentiscus aerial parts*. Plos One, **12**, 1–15 (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0172138

- 1683 6. H.A. Ahmed, A.M. Aboul-Enein, F. Abou-Elella, S.H. Salem, H.F. Aly, A. Nassrallah and
1684 Z.A. Salama, *Nano-Formulations of hesperidin and essential oil extracted from sweet*
1685 *orange peel: Chemical properties and biological activities.* Egyptian Journal of Chemistry,
1686 **64**, 5373–5385 (2021). doi: 10.21608/EJCHEM.2021.84783.4139.
- 1687 7. S. Soto-Heras and M. Paramio, *Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro*
1688 *embryo production programs.* Research in Veterinary Science, **132**, 342–350 (2020). doi:
1689 10.1016/j.rvsc.2020.07.013.
- 1690 8. C. Budani and M. Tiboni, *Effects of supplementation with natural antioxidants on oocytes*
1691 *and preimplantation embryos.* Antioxidants, **9**, 612–637 (2020). doi:
1692 10.3390/antiox9070612.
- 1693 9. S. Zarbakhsh. *Effect of antioxidants on preimplantation embryo development in vitro: a*
1694 *review.* Zygote, **29**, 179–193 (2021). doi: 10.1017/S0967199420000660.
- 1695 10. M.V.O. Santos, A.M. Silva, E.A. Praxedes, A.A. Borges, A.C.A. Teles Filho, J.B.F. Souza-
1696 Junior, L.M. Bertini, A.R. Silva and A.F. Pereira, *Antioxidant effects of the essential oil of*
1697 *Syzygium aromaticum on bovine epididymal spermatozoa.* Andrologia, **51**, e13448 (2019a).
1698 doi: 10.1111/and.13448.
- 1699 11. M.V.O. Santos, A.A. Borges, L.B. Queiroz Neta, L.M. Bertini and A.F. Pereira, *Use of*
1700 *natural antioxidants in in vitro mammalian embryo production.* Semina: Ciências Agrárias,
1701 **39**, 431–444 (2018). doi: 10.5433/1679-0359.2018v39n1p431.
- 1702 12. F. Barros, P. Adona, S. Guemra and B. Damião, *Oxidative homeostasis in oocyte*
1703 *competence for in vitro embryo development.* Animal Science Journal, **90**, 1343–1349
1704 (2019). doi: 10.1111/asj.13256.
- 1705 13. N. Nikoloff, A. Campagna, C. Luchetti, A.C. Carranza-Martín, A.M. Pascua, J.M.
1706 Anchordoquy, J.P. Anchordoquy, D.M. Lombardo, A. Seoane and C.C. Furnus, *Effects of*
1707 *EPA on bovine oocytes matured in vitro with antioxidants: Impact on the lipid content of*

- 1708 *oocytes and early embryo development*. Theriogenology, **146**, 152–161 (2020). doi:
1709 10.1016/j.theriogenology.2019.11.028.
- 1710 14. H.A. Alsalim, I.A. Habeeb and H.R. Abbas, *The effect of antioxidant cysteamine with*
1711 *ascorbic acid on in vitro fertilization in cows*. International Journal of Pharmaceutical
1712 Research, **12**, 1–9 (2020). doi: 10.31838/ijpr/2020.SP2.459.
- 1713 15. N.V. Sollecito, E.C.M. Pereira, J.G.V. Grázia, B.P. Neves, B.V.R. Couto, V.B. Andrade,
1714 M.S. Miranda, J.K.R. Silva and A.M. Borges, *Antioxidant activity of oily extract obtained*
1715 *from Lippia origanoides improves the quality of bovine embryos produced in vitro*. Arquivo
1716 Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, **71**(3), 723–731 (2019). doi: 10.1590/1678-
1717 4162-10323.
- 1718 16. M.V.O. Santos, L.E. Nascimento, E.A. Praxedes, A.A. Borges, A.R. Silva, L.M. Bertini and
1719 A.F. Pereira, *Syzygium aromaticum essential oil supplementation during in vitro bovine*
1720 *oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development*. Theriogenology, **128**,
1721 74–80 (2019b). doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.01.031.
- 1722 17. T.C.M. Pires, M.G.T.C. Ribeiro and A.A.S.C Machado, *Extraction of R-(+)-limonene from*
1723 *orange peels: Assessment and optimization of the greenness of traditional extraction*
1724 *processes*. Química Nova, **41**, 355–365 (2018).
- 1725 18. K. Ramadan, S. Nader and A. Ibrahim, *Evaluation of sequential extraction of some*
1726 *biological materials from orange fruits peel (Citrus sinensis)*. Bulgarian Journal of
1727 Agricultural Science, **24**, 1129–1136 (2018).
- 1728 19. Y. Qiao, B. Xie, Y. Zhang, Y. Zhang, G. Fan, X. Lin and S. Pan, *Characterization of aroma*
1729 *active compounds in fruit juice and peel oil of jichen sweet orange fruit (C. sinensis (L.)*
1730 *osbeck) by GC-MS and GC-O*. Molecules, **13**, 1333–1344. doi: 10.3390/molecules13061333
- 1731 20. J.D. Toscano-Garibay, M. Arriaga-Alba, J. Sánchez-Navarrete, M. Mendonza-García, J.J.
1732 Flores-Estrada, M.A. Moreno-Eutimio, J.J. Espinosa-Aguirre, M. González-Ávila and N.J.

- 1733 Ruiz-Pérez, *Antimutagenic and antioxidant activity of the essential oils of Citrus sinensis*
1734 and *Citrus latifolia*. *Scientific Reports*, **7**, 1–9 (2017).
- 1735 21. A.N. Ferronatto and R.C. Rossi, *Extraction and application of orange peel essential oil as*
1736 *a natural ingredient*. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*, **12**, 78–93 (2018). doi:
1737 10.4013/ete.2018.122.05.
- 1738 22. X. Lin, S. Cao, J. Sun, D. Lu, B. Zhong and J. Chun, *The chemical compositions, and*
1739 *antibacterial and antioxidant activities of four types of Citrus essential oils*. *Molecules*, **26**,
1740 1–12 (2021). doi: 10.3390/molecules26113412.
- 1741 23. A.A. Craveiro, F.J.A. Matos and J.W. Alencar, *Simple and inexpensive steam-generator for*
1742 *essential oils extraction*. *Journal of Chemical Education*, **53**, 562 (1976). doi:
1743 10.1021/ed053p652.
- 1744 24. R.P. Adams, *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole*
1745 *mass spectroscopy*. Allured Publishing Corporation: Carol Stream (2001).
- 1746 25. A.E. Ynsaurralde-Rivolta, M. Suvá, C.G. Luchetti, R.J. Bevacqua, S. Munilla, L.
1747 Rodriguez-Alvarez, A. Velasquez, A. Briski, D. Lombardo and D. Salamone, *DMSO*
1748 *supplementation during in vitro maturation of bovine oocytes improves blastocyst rate and*
1749 *quality*. *Theriogenology*, **148**, 140–148 (2020). doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.02.045.
- 1750 26. D. Roberto, P. Micucci, T. Sebastian, F. Graciela and C. Anesini, *Antioxidant activity of*
1751 *limonene on normal murine lymphocytes: Relation to H₂O₂ modulation and cell*
1752 *proliferation*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **106**, 38–44 (2009). doi:
1753 10.1111/j.1742-7843.2009.00467.x.
- 1754 27. A. Piras, I. Menéndez-Blanco, S. Soto-Heras, M. Catalá, D. Izquierdo, L. Bogliolo and M.
1755 *Paramio, Resveratrol supplementation during in vitro maturation improves embryo*
1756 *development of prepubertal goat oocytes selected by brilliant cresyl blue staining*. *Journal*
1757 *of Reproduction and Development*, **65**, 113–120 (2019). doi: 10.1262/jrd.2018-077.

- 1758 28. M. Ambrogi, P.C. Dall'Acqua, N.A.S. Rocha-Frigoni, B.C.S. Leão and G.Z. Mingoti,
1759 *Transporting bovine oocytes in a medium supplemented with different macromolecules and*
1760 *antioxidants: effects on nuclear and cytoplasmic maturation and embryonic development in*
1761 *vitro*. Reproduction in Domestic Animals **52**, 409–421 (2017). doi: 10.1111/rda.12923.
- 1762 29. N.A. Sá, L.A. Vieira, A.C.A. Ferreira, J. Cadenas, J.B. Bruno, C. Maside and J.R.
1763 Figueiredo, *Anethole supplementation during oocyte maturation improves in vitro*
1764 *production of bovine embryos*. Reproductive Sciences, **26**, 1933719119831783 (2019). doi:
1765 10.1177/1933719119831783.
- 1766 30. L.R.M. Oliveira, L.V.C. Aquino, M.V.O. Santos, V.J.F. Freitas, L.M. Bertini and A.F.
1767 Pereira, *Effects of different concentrations of eugenol in maturation medium on bovine*
1768 *oocytes, oxidative status, and preimplantation embryos*. Animal Production Science, **62**,
1769 142–152 (2022). doi: 10.1071/AN21197.
- 1770 31. J.F. Turrens, *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. Journal of Physiology,
1771 **552**, 335–344 (2003). doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478.
- 1772 32. A. Tripathi, S. Khatun, A.N. Pandey, S.K. Mishra, R. Chaube, T.G. Srivastav and S.K.
1773 Chaube, *Intracellular levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in oocytes at various*
1774 *stages of meiotic cell cycle and apoptosis*. Free Radical Research, **43**, 287–294 (2009). doi:
1775 10.1080/10715760802695985.
- 1776 33. M.G. Manuele, G. Ferraro and C. Anesini, *Effect of *Tilia x viridis* flower extract on the*
1777 *proliferation of a lymphoma cell line and on normal murine lymphocytes: Contribution of*
1778 *monoterpenes, especially limonene*. Phytotherapy Research, **22**, 1520–1526 (2008). doi:
1779 10.1002/ptr.2524.
- 1780 34. C. Khaleel, N. Tabanca and G. Buchbauer, *α-terpineol, a natural monoterpenone: A review*
1781 *of its biological properties*. Open Chemistry, **16**, 349–361 (2018). doi: 10.1515/chem-2018-
1782 0040.

- 1783 35. J.L. Bicas, I.A. Neri-Numa, A. Ruiz, J. Carvalho and G. Pastore, *Evaluation of the*
1784 *antioxidant and antiproliferative potential of bioflavons*. Food and Chemical Toxicology,
1785 **49**, 1610–1615 (2011). doi: 10.1016/j.fct.2011.04.012.
- 1786 36. W. Jiang, Y. Li, Y. Zhao, Q. Gao, Q. Jin, C. Yan and Y. Xu, *L-carnitine supplementation*
1787 *during in vitro culture regulates oxidative stress in embryos from bovine aged oocytes*.
1788 Theriogenology, **143**, 64–73 (2020). doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.11.036.
- 1789 37. M. Chiaratti, B. Garcia, K. Carvalho, C.H. Macabelli, F.K.S. Ribeiro, M. Seneda, F.
1790 Meirelles, F.E.G. Guimarães and T. Machado, *Oocyte mitochondria: Role on fertility and*
1791 *disease transmission*. Animal Production, **15**, 231–238. doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-
1792 0069.
- 1793 38. A. Almansa-Ordonez, R. Bellido, R. Vassena, M. Barragan and F. Zambelli, *Oxidative*
1794 *stress in reproduction: A mitochondrial perspective*. Biology, **9**, 269–291 (2020). doi:
1795 10.3390/biology9090269.
- 1796 39. P.C. Huber, W.P. Almeida and A. Fátima, *Glutathione and related enzymes: Biological*
1797 *roles and importance in pathological processes*. Química Nova, **32**, 1170–1179 (2008). doi:
1798 10.1590/S0100-40422008000500046.
- 1799 40. B. Turathum, E. Gao and R. Chian, *The function of cumulus cells in oocyte growth and*
1800 *maturity and in subsequent ovulation and fertilization*. Cells, **10**, 2292–2310 (2021). doi:
1801 10.3390/cells10092292.
- 1802 41. A.V. Soom, S. Tanghe, I.D. Pauw, D. Maes, A. Kruif, *Function of the cumulus oophorus*
1803 *before and during mammalian fertilization*. Reproduction in Domestic Animals, **37**, 144–
1804 151 (2002). doi: 10.1046/j.1439-0531.2002.00345.x.
- 1805 42. J. Nevoral, M. Orsák, P. Klein, J. Petr, M. Dvorakova, I. Weingartová, A. Vyskocilova, K.
1806 Zámostná, T. Krejcova, F. Jilek, *Cumulus cell expansion, its role in oocyte biology and*

- 1807 *perspectives of measurement: A review.* Scientia Agriculturae Bohemica, **45**, 212–225
1808 (2014). doi: 10.1515/sab-2015-0002.
- 1809 43. A. Zabihi, H.K. Shabankareh, H. Hajarian, S. Foroutanifar, *In vitro maturation médium*
1810 *supplementation with resveratrol improves cumulus cell expansion and developmental*
1811 *competence of Sanjabi sheep oocytes.* Livestock Science, **243**, 104378 (2021). doi:
1812 10.1016/j.livsci.2020.104378.
- 1813 44. M.C. Sirard, F. Richard, P. Blondin and C. Robert, *Contribution of the oocyte to embryo*
1814 *quality.* Theriogenology, **65**, 126–136 (2006). doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.020.
- 1815 45. M. Kala, M.V. Shaikh and M. Nivsarkar, *Equilibrium between antioxidants and reactive*
1816 *oxygen species: A requisite for oocyte development and maturation.* Reproductive Medicine
1817 and Biology, **16**, 28–35 (2017). doi: 10.1002/rmb2.12013.
- 1818 46. S.K. Chaube, P.V. Prasad, C. Thakur and T.G. Srivastav, *Hydrogen peroxide modulates*
1819 *meiotic cell cycle and induces morphological features characteristic of apoptosis in rat*
1820 *oocytes cultured in vitro.* Apoptosis, **10**, 863–874 (2005). doi: 10.1007/s10495-005-0367-8.
- 1821 47. H. Choi, J. Lee, J.D. Yoon, S. Hwang, L. Cai, M. Kim, G. Kim, D. Oh, E. Kim and S. Hyun,
1822 *The effect of copper supplementation on in vitro maturation of porcine cumulus-oocyte*
1823 *complex and subsequent developmental competence after parthenogenetic activation.*
1824 Theriogenology, **164**, 84–92 (2021). doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.01.009.
- 1825
- 1826
- 1827
- 1828
- 1829
- 1830
- 1831
- 1832
- 1833
- 1834

1835 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

1836

1837 O presente estudo foi o primeiro relato descrevendo o potencial antioxidante do óleo
1838 essencial da casca de *Citrus sinensis* (OECS) como antioxidante natural durante a maturação *in*
1839 *vitro* (MIV) de oócitos bovinos. A adição deste suplemento promoveu melhorias significativas
1840 sobre os oócitos bovinos após a MIV. Contudo, a suplementação, nas concentrações 10 e 30
1841 µg/mL do OECS, promoveu uma melhor eficiência, já que além de garantir uma redução no
1842 estresse oxidativo, melhorou a viabilidade dos oócitos de acordo com os diferentes parâmetros
1843 avaliados após a MIV

1844 Portanto, a suplementação do OECS durante a MIV de oócitos bovinos pode ser uma
1845 fonte promissora e alternativa aos antioxidantes sintéticos, uma vez que é um resíduo industrial
1846 de fácil obtenção, que pode ser utilizado para obter novos coprodutos, como o óleo essencial,
1847 podendo ser empregado na produção *in vitro* de embriões (PIVE). Finalmente, novos estudos
1848 devem ser conduzidos visando avaliar o potencial dessa suplementação durante o
1849 desenvolvimento embrionário, bem como na identificação do bioativo com maior ação
1850 biológica acerca da redução do estresse oxidativo.

1851

1852

1853

1854

1855

1856

1857

1858

1859

1860

1861

1862

1863

1864

1865

1866

1867

1868

1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902

ANEXOS

1903 ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO DE REVISÃO: USE O
1904 FRUIT-DERIVED ESSENTIAL OILS WITH ANTIOXIDANT PROPERTIES IN ANIMAL
1905 CELL CULTURES: A REVIEW. REVISTA: BIOSCIENCE JOURNAL – 20 DE JANEIRO
1906 DE 2022.

1907

1908

1909

1910

1911

1912

[Biosci. J.] Submission Acknowledgement



portaldeperiodicos@dirbi.ufu.br <portaldeperiodicos@dirbi.ufu.br> em nome de Bioscience Journal <biosciencej@ufu.br>

20/01/2022 15:40



Para: Leonardo; Maria Valéria; Lhara; Luciana

Hello,

Alexsandra Fernandes Pereira has submitted the manuscript, "USE OF FRUIT-DERIVED ESSENTIAL OILS WITH ANTIOXIDANT PROPERTIES IN ANIMAL CELL CULTURES: A REVIEW: ANTIOXIDANTS IN ANIMAL CELL CULTURES" to Bioscience Journal .

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Bioscience Journal

Bioscience Journal
Av. Para, 1720 – Campus Umuarama
Uberlândia – MG – Brazil
biosciencej@ufu.br

1913

1914

1915

1916

1917

1918

1919

1920

1921

1922

1923 ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO EXPERIMENTAL:
1924 ANTIOXIDANT POTENTIAL OF *Citrus sinensis* PEEL ESSENTIAL OIL (OECS) ON
1925 BOVINE OOCYTES – 04 DE FEVEREIRO DE 2022.

1926

 Reproductive Sciences - Editorial Office <em@editorialmanager.com>↶ ↷ → ...
Sex, 04/02/2022 13:59

Para: Você

Dear Sr. V C Aquino,

Thank you for submitting your manuscript,
"Antioxidant potential of Citrus sinensis peel essential oil (OECS) on bovine oocytes", to Reproductive Sciences

The submission id is: RESC-D-22-00145
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal's web site.

Your username is: lvcaquino
If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at
<https://www.editorialmanager.com/resc/>.

With kind regards,

Journals Editorial Office RESC
Springer

1927

1928

1929

1930

1931

1932

1933

1934

1935

1936

1937

1938

1939

1940

1941

1942

1943

1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975

APÊNDICES

1976 APÊNDICE A: RESUMO CIENTÍFICO APRESENTADO NO CONGRESSO VIII
 1977 INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION,
 1978 REALIZADO REMOTAMENTE, DE 19 A 22 DE OUTUBRO DE 2021

Effects of supplementation of *Citrus sinensis* essential oil in maturation medium on bovine oocytes and oxidative status

L.V.C. Aquino^{1*}, L.R.M. Oliveira¹, M.V.O. Santos¹, T.L. Nascimento², L.M. Bertini², A.F. Pereira¹

¹Laboratory of Animal Biotechnology, UFERSA, Mossoró, RN, Brazil; ²Federal Institute of Rio Grande do Norte, Apodi, RN, Brazil

The use of natural antioxidants in maturation medium can be an alternative to reduce the negative effects of oxidative stress produced during *in vitro* embryo production (IVEP). *In vitro* tests have demonstrated the ability of essential oil from *Citrus sinensis* (EOCS) to decrease reactive oxygen species (ROS) and could be an interesting antioxidant agent during *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes. Therefore, we aimed to evaluate the antioxidant effect of the EOCS on bovine IVM, and levels of ROS. Initially, EOCS was extracted by hydrodistillation of the peels using a Clevenger-type apparatus. The chemical composition of EOCS was performed using a gas chromatography coupled to mass spectroscopy. EOCS presented as constituents D-limonene (48.5%), α -terpineol (40.2%) and other compounds (11.3%). Then, viable oocytes derived from slaughterhouse individuals were matured *in vitro* under three sets of conditions: EOCS0 (without antioxidants), EOCS30 (30 μ g/mL of EOCS), and CYS (100 μ M of cysteamine). The concentration of 30 μ g/mL of EOCS was defined according to biochemical studies of the major constituents of EOCS. After IVM, oocytes were evaluated to determine their IVM according to the expansion of *cumulus* cells, and presence of the first polar body (1PB). Moreover, oocytes were assessed to verify their oxidative status based on the levels of ROS using H₂DCFDA probe. All data are expressed as the mean \pm standard error and analyzed using the StatView 5.0 software ($P < 0.05$). ROS levels were altered with arcsine and analyzed by ANOVA followed by a Tukey test. All other data were compared with a chi-squared test. A total of 287 ovaries were used to acquire 1113 viable immature oocytes (3.9 viable oocytes/ovary) that were selected and distributed in twenty repetitions. Initially, for *cumulus* cell expansion, EOCS30 (99.4% \pm 0.9; 363/365) and CYS (99.7% \pm 0.4; 374/375) were increase to that of EOCS0 (96.2% \pm 3.0; 359/373). No difference was observed in the IVM rates obtained from 1PB among EOCS30 (84.6% \pm 2.4; 270/319), EOCS0 (79.8% \pm 2.9; 265/332), and CYS (82.8% \pm 3.2; 279/337). Additionally, oocytes derived from the EOCS30 (0.50 \pm 0.14), and CYS (0.39 \pm 0.24) groups showed significantly lower ROS compared to the EOCS0 group (1.00 \pm 0.65). These results demonstrate the antioxidant potential of EOCS in controlling oxidative stress, which may be acting on the synthesis of ROS regulatory enzymes. In summary, IVM medium supplementation with 30 μ g/mL of EOCS improves the expansion of *cumulus* cells, possibly through antioxidant effects due to the decreased oocyte ROS. The results for EOSA30 are comparable to those with cysteamine in terms of parameters evaluated. Therefore, EOCS, added to the IVM medium, could be an interesting alternative for the reduction of damage caused by the oxidative stress in bovine oocytes during IVEP.

Acknowledgements: CAPES, CNPq

*E-mail: leonardovt@live.com

1979
 1980
 1981
 1982
 1983
 1984
 1985
 1986

- 1987 APÊNDICE B: DOCUMENTO CERTIFICADO DE EDIÇÃO DE LINGUAGEM E
 1988 GRAMÁTICA DO ARTIGO DE REVISÃO: USE O FRUIT-DERIVED ESSENTIAL OILS
 1989 WITH ANTIOXIDANT PROPERTIES IN ANIMAL CELL CULTURES: A REVIEW.
 1990 REVISTA: BIOSCIENCE JOURNAL – 15 DE JANEIRO DE 2022.



editage

Editage, a brand of Cactus Communications, offers professional English language editing and publication support services to authors engaged in over 300 areas of research. Through its community of experienced editors, which includes doctors, engineers, published scientists, and researchers with peer review experience, Editage has successfully helped authors get published in internationally reputed journals. Authors who work with Editage are guaranteed excellent language quality and timely delivery.

GLOBAL : +1(833) 979-0061 request@editage.com	BRAZIL : 08000474773 contato@editage.com
---	--

CACTUS

 Impact.science	
 researcher.life	
CACTUS	lifesciences.cactusglobal.com

editage.com | editage.co.kr | editage.jp | editage.cn | editage.com.br | editage.com.tw | editage.de

1992 APÊNDICE C: DOCUMENTO CERTIFICADO DE EDIÇÃO DE LINGUAGEM E
 1993 GRAMÁTICA DO ARTIGO EXPERIMENTAL: ANTIOXIDANT POTENTIAL OF *Citrus*
 1994 *sinensis* PEEL ESSENTIAL OIL (OECS) ON BOVINE OOCYTES – 04 DE FEVEREIRO DE
 1995 2022.



editage

Editage, a brand of Cactus Communications, offers professional English language editing and publication support services to authors engaged in over 1300 areas of research. Through its community of experienced editors, which includes doctors, engineers, published scientists, and researchers with peer review experience, Editage has successfully helped authors get published in internationally reputed journals. Authors who work with Editage are guaranteed excellent language quality and timely delivery.

GLOBAL :

+1(833) 979-0061 | request@editage.com

BRAZIL :

08000474773 | contato@editage.com

CACTUS

editage.com | editage.co.kr | editage.jp | editage.cn | editage.com.br | editage.com.tw | editage.de