

PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÓLEO ESSENCEIAL DE *Cyperus scariosus* E SUA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

**RAFAELY PICCIONI ROSADO¹; LUÍZE GARCIA BLOTTA DE MELO²; MILENA
MATTES CERVEIRA³; JOSIANE DIAS PIRES⁴; JANICE LUEHRING GIONGO⁵;
RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER⁶**

¹Universidade Federal de UFPel – rafaelypiccioni@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – UFPel – luizegarmel@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – UFPel – cerveiramm@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – UFPel – jospel@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal do Rio Grande - FURG janicegiongo@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas - UFPel - rodvaucher@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OE) são misturas complexas de metabólitos secundários associados ao metabolismo de defesa das plantas (AHMAD *et al.*, 2021). São substâncias voláteis e instáveis na presença de calor e umidade (TUREK; STINTZING, 2013), sintetizadas em diversos órgãos vegetais (BAKKALI *et al.*, 2008). Esses compostos são responsáveis por suas propriedades terapêuticas, incluindo atividades antiparasitárias, antifúngicas, antibacterianas, antivirais, antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e neuroprotetoras (DE SOUSA *et al.*, 2023; SATTAYAKHOM *et al.*, 2023).

A aplicação clínica dos óleos essenciais (OE) enfrenta limitações devido à baixa solubilidade em água, reduzida biodisponibilidade, permeabilidade limitada, volatilidade e instabilidade a longo prazo (BARRADAS E SILVA, 2021). Uma estratégia promissora para superar essas barreiras é o uso de nanoestruturas, que atuam como carreadores e aumentam a permeabilidade dos compostos.

A utilização de nanoemulsões representa uma alternativa eficaz para superar os desafios dos OE, melhorando a biodisponibilidade e a eficácia de substâncias pouco solúveis em água ou hidrofóbicas (KUO *et al.*, 2008). A nanoencapsulação oferece vantagens como maior estabilidade, melhor armazenamento e modulação da liberação do agente ao longo do tempo (ASBAHANI *et al.*, 2015). Essas melhorias são fundamentais, especialmente quando se considera a aplicação terapêutica de óleos essenciais, que muitas vezes são limitadas por sua toxicidade em altas concentrações.

A avaliação da atividade hemolítica do OE é crucial para garantir sua segurança e biocompatibilidade em aplicações terapêuticas, já que a hemólise pode indicar toxicidade celular e afetar a viabilidade celular, sendo um parâmetro importante para avaliar a segurança dos OE. Um exemplo, é o *Cyperus scariosus*, pertencente à família Cyperacene, é uma planta conhecida por conter diversos compostos bioativos como cipereno, ciperotundona e outros, que conferem propriedades farmacológicas ao seu extrato (CLERY; CASON; ZELENAY, 2016; CHAURE *et al.*, 2023). Assim, este estudo tem como objetivo o preparo de uma nanoemulsão contendo o óleo essencial de *Cyperus scariosus* (OECS) e a avaliação da atividade hemolítica do óleo puro e de sua nanoemulsão.

2. METODOLOGIA

O óleo essencial de *Cyperus scariosus* foi adquirido comercialmente da empresa Ferquima. O método de extração realizado pela empresa foi através da destilação a vapor das raízes.

A nanoemulsão contendo óleo de *Cyperus scariosus* (OE-NECS) foi preparada seguindo o método a frio de inversão de fases com modificações, conforme Giongo et al. (2016), utilizando o equipamento Ultra Turrax. A fase oleosa consistiu no óleo essencial de *Cyperus scariosus* e monooleato de sorbitano (Span 80), enquanto a fase aquosa foi composta por polissorbato 80 (Tween 80) e água ultra-pura. Ambas as fases foram homogeneizadas a 75°C, e a fase aquosa foi injetada na fase oleosa sob agitação até totalizar 50 mL. O Ultra Turrax foi utilizado com banho de gelo a 10.000 rpm durante a adição da fase aquosa, seguido de aumento da velocidade para 17.000 rpm por 12 minutos e redução para 15.000 rpm por mais 10 minutos. Para comparação, uma nanoemulsão branca foi preparada utilizando a mesma técnica, substituindo o OECS por triglicerídeos de cadeia média (TCM). As formulações foram armazenadas sob proteção da luz e refrigeradas.

As amostras de nanoemulsão foram analisadas quanto ao diâmetro médio das partículas, índice de polidispersidade e potencial zeta utilizando um Zetasizer Lab (Malvern Instruments). As medições foram feitas a 25°C, após a diluição das amostras em água ultrapura na proporção de 1:200, e realizadas em triplicata. Os resultados obtidos representam a média das medições, acompanhados do desvio padrão. Os experimentos foram conduzidos no Núcleo de Análises e Pesquisas Orgânicas (NAPO) da Universidade Federal de Santa Maria.

O ensaio hemolítico foi realizado em eritrócitos de carneiro, conforme descrito por Cerveira et al. (2021). Utilizou-se sangue de carneiro desfibrinado, que foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. Após o descarte do plasma, os eritrócitos foram ressuspensos em PBS, formando uma solução de 4% (v/v). Foram adicionados 2 mL dessa solução em microtubos, com as concentrações de OECS variando de 121,41 a 0,47 mg/mL e as de NE-OECS de 0,242 a 0,03 mg/mL. O Triton X-100 foi usado como controle positivo e PBS como controle negativo. As amostras foram incubadas a 37 °C por 1 hora, seguidas de centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços, e a absorbância foi medida a 405 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados de tamanho de partícula e desvio padrão de duas amostras de nanoemulsões, ambas classificadas como estáveis, com tamanhos abaixo de 200 nm, favorecendo a permeabilidade e absorção de fármacos. O índice de polidispersidade (IPD) foi semelhante em ambas, indicando uma distribuição homogênea das gotas, com valores próximos do ideal de 0,3. Além disso, os sistemas mostraram excelentes potenciais zeta (-34,61 mV para a nanoemulsão com óleo essencial e -38,02 mV para a nanoemulsão branca), sugerindo boa estabilidade e baixa tendência à aglomeração.

Tabela 1. Tamanho médio de partícula (nm), IPD e potencial zeta das nanoemulsões contendo OECS e TCM

Nanoemulsões	Tamanho médio de partícula (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)

NE-OECS	115 ± 9,928	0,307 ± 0,329	-34,61 ± 1,782
NE-B	80 ± 0,378	0,408 ± 0,378	-38,02 ± 1,003

O ensaio hemolítico avaliou a citotoxicidade do óleo essencial de *Cyperus scariosus* (OECS) através da lise de eritrócitos de sangue de carneiro desfibrinados, com concentrações variando de 121,4 mg/mL a 0,47 mg/mL. A partir de 30,35 mg/mL, observou-se diferença estatística em relação ao controle positivo, com redução gradual da hemólise conforme a concentração diminuía. A toxicidade hemolítica foi dose-dependente, com 50% de viabilidade celular a 7,58 mg/mL e IC₅₀ de 4,58 mg/mL. A nanoemulsão de OECS (NE-OECS) apresentou menor toxicidade, especialmente em concentrações de 0,06 e 0,03 mg/mL, corroborando com estudos prévios, como o de Khan *et al.* (2016), que também observaram citotoxicidade em concentrações mais altas do extrato de *Cyperus scariosus*.

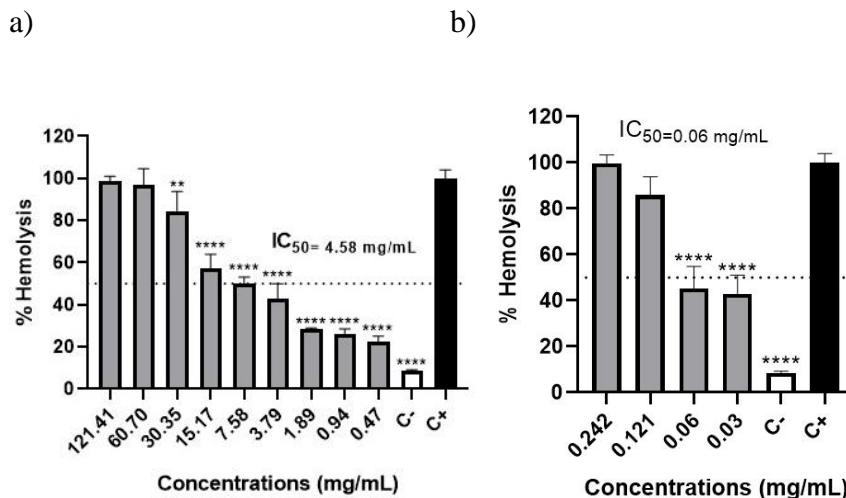


Figura 1. Atividade hemolítica do OECS (a) e da NE-OECS. Os dados são expressos como média ± desvio padrão (SD). Os dados foram analisados através do teste One way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Dunnett, onde ***p<0.0001 e **p<0,01 em comparação com o controle positivo (CP) para ambos os testes.

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam que a nanoemulsão do óleo essencial de *Cyperus scariosus* (NE-OECS) possui características físicas favoráveis, como boa estabilidade e baixa tendência à aglomeração, essenciais para aplicações farmacêuticas. A avaliação hemolítica revelou que a toxicidade do óleo essencial é dependente da concentração, e a nanoemulsão reduziu significativamente a toxicidade hemolítica em comparação ao óleo puro, especialmente em concentrações mais baixas. Isso sugere que a encapsulação em nanoestruturas não apenas preserva as propriedades bioativas do OECS, mas também diminui seus efeitos tóxicos. Estudos futuros são recomendados para investigar outras atividades do OECS e validar sua segurança e eficácia em modelos *in vivo*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, A. et al. Volatile phenolics: a comprehensive review of the anti-infective properties of an important class of essential oil constituents. **Phytochemistry**, v. 190, p. 112864, 2021. doi:10.1016/j.phytochem.2021.112864.
- ASBAHANI, A. EL et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food Chemistry and Toxicology**, 2008; 46(2): 446-75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- BARRADAS, T. N.; DE HOLANDA E SILVA, K. G. Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, p. 1153–1171, 2021. doi:10.1007/s10311-020-01142-2.
- CERVEIRA, Milena Mattes et al. Bioprospection of novel synthetic monocurcuminoids: Antioxidant, antimicrobial, and in vitro cytotoxic activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 111052, 2021.
- CHAURE, A. et al. Validation of broth macrodilution volatilization method for testing of essential oils in liquid and vapor phase: chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial effect of Indian medicinal plants against pneumonia-causing pathogens. **Molecules**, 2023 Jun 7; 28(12):4625. DOI: 10.3390/molecules28124625. PMID: 37375180; PMCID: PMC10304056.
- CLERY, R. A.; CASON, J. R.; ZELENAY, V. Constituents of Cyperus scariosus R.Br.): N-containing molecules and key aroma components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016 Jun 8; 64(22): 4566-4573. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b00680. Epub 2016 May 24. PMID: 27219519.
- DE SOUSA, D. P. et al. Essential oils: chemistry and pharmacological activities. **Biomolecules**, 2023;13(7):1144. DOI: 10.3390/biom13071144. PMID: 37509180; PMCID: PMC10377445.
- Giongo, J. L. et al. Development of nanoemulsion containing *Pelargonium graveolens* oil: characterization and stability study. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, vol. 8, no. 12, Dec. 2016, pp. 271-6, doi:10.22159/ijpps.2016v8i12.15108.
- KAVAZ, D.; IDRIS, M.; ONYEBUCHI, C. Physiochemical characterization, antioxidative, anticancer cells proliferation and food pathogens antibacterial activity of chitosan nanoparticles loaded with *Cyperus articulatus* rhizome essential oils. **Int. Journal of Biological Macromolecules**, 2019; 123:837-845. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.177. PMID: 30465833.
- KHAN, W. U. et al. Pharmacological evaluation of methanolic extract of *Cyperus scariosus*. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 1-6, 2016. DOI: 10.3329/bjp.v11i2.23611
- KUO F, SUBRAMANIAN B. et al. Nanoemulsions of an anti-oxidant synergy formulation containing gamma tocopherol have enhanced bioavailability and anti-inflammatory properties. **International Journal of Pharmacy**. Nov 3;363(1-2):206-13, 2008.
- SATTAYAKHOM, A.; WICHIT, S.; KOOMHIN, P. The effects of essential oils on the nervous system: A scoping review. **Molecules**, v. 28, n. 9, p. 3771, 2023. DOI: 10.3390/molecules28093771. PMID: 37175176; PMCID: PMC10180368.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40–53, 2013. DOI: 10.1111/1541-4337.12006