



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO- DOM DELGADO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DOUTORADO EM QUÍMICA  
ASSOCIATIVO UFMA-IFMA- PPGDQUIM UFMA

GUSTAVO OLIVEIRA EVERTON

**PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO ANTIOXIDANTE E  
ANTICANCERÍGENO DE NANOEMULSÕES (O/A) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
*Citrus limon* (L.) Burn, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck**

SÃO LUÍS-MA

2025

GUSTAVO OLIVEIRA EVERTON

**PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO ANTIOXIDANTE E  
ANTICANCERÍGENO DE NANOEMULSÕES (O/A) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
*Citrus limon* (L.) Burn, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação Doutorado em Química Associativo  
UFMA-IFMA da Universidade Federal do  
Maranhão como requisito para obtenção do título de  
Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro

SÃO LUÍS-MA

2025

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Everton, Gustavo Oliveira.

PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO ANTIOXIDANTE  
E ANTICANCERÍGENO DE NANOEMULSÕES O/A DOS ÓLEOS ESSENCIAIS  
DE Citrus limon L. Burn, Cymbopogon citratus DC Stapf,  
Citrus sinensis L. Osbeck / Gustavo Oliveira Everton. -  
2023.

92 f.

Orientador(a): Odair dos Santos Monteiro.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação Doutorado  
em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São  
Luís, 2023.

1. Células. 2. Compostos químicos. 3. Radicais  
Livres. I. Monteiro, Odair dos Santos. II. Título.

GUSTAVO OLIVEIRA EVERTON

**PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO ANTIOXIDANTE E  
ANTICANCERÍGENO DE NANOEMULSÕES (O/A) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
*Citrus limon* (L.) Burn, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação Doutorado em Química Associativo  
UFMA-IFMA da Universidade Federal do  
Maranhão como requisito para obtenção do título de  
Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro

Aprovado em: \_\_/\_\_/\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho  
(Examinador Externo)

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Gimar Silverio da Silva  
(Examinador Interno)

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Maria da Glória Almeida  
Bandeira  
(Examinadora Externa)

---

Prof. Dr. Gilvan Pereira de Figueiredo  
(Examinador Interno)

São Luís-MA

2025



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por todo foco, força e fé depositada em mim ao decorrer de toda minha trajetória acadêmica.

Agradeço a toda minha família, em especial a minha avó Maria de Lourdes Leal Oliveira e minha mãe Noraney Leal Oliveira, por serem exemplos de pessoas fortes na minha vida, sempre me inspirando a continuar.

Agradeço ao Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro por aceitar a orientação deste trabalho e a mim como seu orientado no Programa de Doutorado em Química (DQUIM-UFMA).

Agradeço ao Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (LOEPAV/UFMA) por proporcionar, gentilmente, a realização in loco de todas as análises referentes a este estudo, bem como suas parcerias colaborativas por todo território nacional e por todo meu desenvolvimento acadêmico e profissional no mesmo no decorrer de toda minha pós-graduação.

Agradeço aos professores Dr.<sup>a</sup> Maria da Glória Almeida Bandeira e Dr. Victor Elias Mouchrek Filho, por toda força, bons conselhos e magnitude de inspiração acadêmica para mim, durante todos estes anos.

Obrigado a todos que me contribuíram até aqui!!!

## SÚMULA CURRICULAR

### Dados Pessoais

Nome: Gustavo Oliveira Everton

Naturalidade: São Luís-MA

Nacionalidade: Brasileira

### Formação acadêmica

Bacharelado em Química Industrial pela Universidade Federal do Maranhão.

Bacharelado em Engenharia Química pela Universidade Federal do Maranhão.

### Pós-Graduação:

Mestrado em Saúde e Ambiente – Biotecnologia aplicada a saúde (PPGSA-UFMA) pela Universidade Federal do Maranhão.

### TRABALHOS CIENTÍFICOS:

#### Artigos científicos:

EVERTON, G. O.; PEREIRA, A. P. M.; MOUCHREK FILHO, V. E.; MONTEIRO, O. S. Constituintes químicos, atividade antioxidante e anticancer do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e sua nanoemulsão. **Scientia Plena**. 2024.

**Qualis:** A4

**Status:** PUBLICADO

EVERTON, G. O.; SOUSA, B. A.; MOUCHREK FILHO, V. E.; MONTEIRO, O. S. Anticancer activity of *Citrus limon* (L.) Burm. f. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil and their nanoemulsions. **Ciência e Natura**. 2025.

**Qualis:** A3

**Status:** ACEITO COM PUBLICAÇÃO AGENDADA

***“O meu caminho é tão distante. Mas, eu não caminhei o bastante, durante a noite. Eu vivo em guerra constante, por isso que eu sigo avante, levante e cante “A Guerra é um bom sinal”***

***(Projota – A Guerra)***

## RESUMO

Este estudo apresenta o perfil químico, atividade antioxidante e anticâncer *in vitro* do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, *Citrus sinensis* e *Citrus limon* e suas nanoemulsões. As folhas de *C. citratus*, folhas de *C. sinensis* e cascas de *C. limon* foram coletadas no estado do Maranhão e seus óleos essenciais (OEs) foram extraídos por hidrodestilação. As nanoemulsões (NEOs) dos OEs foram formuladas por método de inversão de fases. Os compostos presentes nos OEs e NEOs foram identificados e quantificados por CG-EM-DIC. A atividade antioxidante foi realizada para os OEs e NEOs pelos ensaios de eliminação de radicais ABTS, DPPH, hidroxila, superóxido e peróxido de hidrogênio. A atividade anticancer *in vitro* foi avaliada também para os OEs e NEOs frente a células cancerígenas de tecido humano: cólon, pulmão, fígado, colo do útero, próstata, oral e neuroblastoma. O rendimento obtido para os OEs de *C. citratus*, *C. sinensis* e *C. limon* foi de 0,92%; 1,55%; 1,01%, respectivamente. Os compostos majoritários identificados em *C. citratus* foram geranial e neral, e o limoneno para *C. sinensis* em 85,28% e para *C. limon* em 75,12%, identificados através do ensaio de CG-EM. As NOEs obtidas dos OEs foram caracterizadas com tamanho de gota variando de 57,00-71,66 nm, potencial zeta -21,15 a -20,11 mV, índice de polidispersão de 0,21 a 0,28 e pH 4,12-4,77. Os EOs e NOEs apresentaram atividade antioxidante forte com IC<sub>50</sub> variando de 6,23 a 84,58 µg/mL. Eles também apresentaram atividade citotóxica significativa frente a todas as linhagens celulares utilizadas no estudo, sendo os maiores efeitos frente a linhagem celular 502713 (cólon), IMR-32 (neuroblastoma), Hep-2 (fígado) e SiHa (colo do útero) com valores de IC<sub>50</sub> de 1,00; 1,10; 1,20 e 1,60 µg/mL, respectivamente. Estas descobertas sugerem que os EOs e NEOs de *C. citratus*, *C. sinensis* e *C. limon* podem ser alternativas para terapias inovadoras.

**Palavras-chave:** Câncer, Citotoxicidade, Linhagens celulares.

## ABSTRACT

This study characterizes the chemical profile, antioxidant activity, and in vitro anticancer properties of essential oils (EOs) from *Cymbopogon citratus*, *Citrus sinensis*, and *Citrus limon*, along with their nanoemulsions. Leaves of *C. citratus* and *C. sinensis*, along with *C. limon* peels, were collected in Maranhão state, Brazil, with EOs extracted by hydrodistillation. Nanoemulsions (NEOs) were prepared using phase inversion methodology. Chemical composition of EOs and NEOs was determined by GC-MS-FID analysis. Antioxidant activity was evaluated through radical scavenging assays (ABTS, DPPH, hydroxyl, superoxide, and hydrogen peroxide). In vitro anticancer activity was assessed against human cancer cell lines from colon, lung, liver, cervical, prostate, oral, and neuroblastoma tissues. Extraction yields were 0.92% for *C. citratus*, 1.55% for *C. sinensis*, and 1.01% for *C. limon* EOs. GC-MS analysis identified geranial and neral as major components in *C. citratus*, while limonene predominated in *C. sinensis* (85.28%) and *C. limon* (75.12%). The NEOs exhibited droplet sizes of 57.00-71.66 nm, zeta potentials ranging from -21.15 to -20.11 mV, polydispersity indices of 0.21-0.28, and pH values between 4.12-4.77. Both EOs and NEOs demonstrated potent antioxidant activity ( $IC_{50}$ : 6.23-84.58  $\mu\text{g/mL}$ ). Significant cytotoxicity was observed against all tested cell lines, with particularly strong effects against 502713 (colon;  $IC_{50}$ =1.00  $\mu\text{g/mL}$ ), IMR-32 (neuroblastoma; 1.10  $\mu\text{g/mL}$ ), Hep-2 (liver; 1.20  $\mu\text{g/mL}$ ), and SiHa (cervical; 1.60  $\mu\text{g/mL}$ ). These findings suggest that EOs and NEOs from *C. citratus*, *C. sinensis*, and *C. limon* show promise as potential candidates for innovative therapeutic applications.

**Keywords:** Cancer, Cytotoxicity, Cell lines.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Tipos de nanoemulsões: OW-óleo-em-água e WO-água-em-óleo .....	16
Figura 2 – Esquema representativo do método de nanoemulsificação espontânea.....	18
Figura 3 – Representação ilustrativa do método de inversão de fases .....	19
Figura 4 - Esquema representativo do método de homogeneização de alta pressão.....	21
Figura 5 - Misturador do tipo Silverson rotativo L5M-A .....	22
Figura 6 - <i>Cymbopogon citratus</i> .....	26

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES**

<b>OE</b>	Óleo essencial
<b>NOE</b>	Nanoemulsão de óleo essencial
<b>DPPH</b>	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>ABTS</b>	ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
<b>CG-EM</b>	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
<b>O/A</b>	Óleo em Água
<b>IC50</b>	Concentração Inibitória 50%
<b>502713</b>	Linhagem celular de cólon
<b>IMR-32</b>	Linhagem celular de neuroblastoma
<b>Hep-2</b>	Linhagem celular de fígado
<b>SiHa</b>	Linhagem celular de colo do útero
<b>LNCaP</b>	Linhagem celular de câncer de próstata
<b>A-549</b>	Linhagem celular de câncer de pulmão
<b>MCF-7</b>	Linhagem celular de câncer de mama
<b>HT-29</b>	Linhagem celular de cólon
<b>HCT-15</b>	Linhagem celular de cólon
<b>SW-620</b>	Linhagem celular de cólon
<b>DU-145</b>	Linhagem celular de próstata
<b>KB</b>	Linhagem celular oral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1. Nanoemulsões.....	16
2.1.1. Métodos de baixa energia para formulação de nanoemulsões.....	18
2.1.2. Métodos de alta energia para formulação de nanoemulsões.....	20
2.2. Óleos essenciais .....	23
2.2.1. <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Staf .....	25
2.2.2. <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.....	27
2.2.3. <i>Citrus limon</i> (L.) Burn .....	30
2.3. Câncer .....	31
2.3.1. Conceitos gerais .....	31
2.3.2. Contextualização sobre quimioterápicos .....	33
2.3.3. Efeitos antioxidantes.....	35
2.3.4. Efeito anticancerígeno de plantas medicinais .....	36
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
3.1. Objetivo Geral.....	39
3.2. Objetivos específicos .....	39
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>40</b>
4.1. Coleta e identificação do material vegetal.....	40
4.2. Extração dos óleos essenciais .....	40
4.3. Análise CG-FID-EM e identificação de compostos bioativos.....	40
4.4. Preparo, formulação e caracterização das nanoemulsões .....	41
4.5. Atividade antioxidante dos óleos essenciais e nanoemulsões .....	42
4.5.1. Atividade antioxidante de eliminação de radicais DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) .....	42



4.5.2. Atividade antioxidante de eliminação de radicais ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) .....	42
4.5.3. Atividade sequestradora de radicais hidroxila .....	42
4.5.4. Atividade de inibição do radical superóxido .....	43
4.5.5. Atividade sequestradora de peróxido de hidrogênio.....	43
4.6. Atividade anticâncer .....	43
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1. CAPÍTULO I – ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>45</b>
<b>5.2. CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>59</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>78</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia possui uma ampla gama de aplicações em diversos campos, como medicina, agricultura, eletrônica, energia, restauração e tratamento de água (Hasanin *et al.*, 2021; Ali *et al.*, 2022; Hashem *et al.*, 2022). A nanoemulsão de óleo essencial (OE) é um sistema de distribuição baseado em nanotecnologia que encapsula e fornece OEs de maneira eficaz. Trata-se de misturas estáveis, transparentes e homogêneas de óleo, água e emulsificantes, com tamanhos de gotículas normalmente variando de 10 a 500 nm (Sharma *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2022).

As nanoemulsões aumentam a área de superfície dos OEs e reduzem o tamanho das gotas, tornando-os mais facilmente absorvidos e consumidos pelo organismo. Isso permite que sejam utilizados em diversas aplicações nas áreas alimentícia, cosmética e médica (Atanase *et al.*, 2017; Ashaolu *et al.*, 2021; Mushtaq *et al.*, 2023).

Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse em estudar as propriedades anticancerígenas de nanoemulsões de fragrâncias, devido às suas características favoráveis, como maior biodisponibilidade e estabilidade (Nirmala *et al.*, 2020). Sendo a nanotecnologia uma técnica eficaz para o tratamento do câncer, os investigadores têm concentrado seus esforços no tratamento de uma variedade de linhagens celulares (Shehabeldine *et al.*, 2023).

Embora o mundo tenha avançado significativamente em ciência e tecnologia, a quimioterapia permanece como uma opção promissora no tratamento do câncer (Falzone *et al.*, 2018). A quimioterapia convencional contribuiu de maneira significativa para a redução das taxas de mortalidade relacionadas a vários tipos de câncer agressivos. No entanto, seu maior desafio é a destruição tanto de células cancerosas quanto de células saudáveis, o que pode resultar em efeitos colaterais severos, como perda de cabelo, depressão da medula óssea e outros efeitos tóxicos indesejados (Senapati *et al.*, 2018).

Em decorrência disso, uma proporção considerável de pesquisas sobre o câncer nas últimas décadas tem se dedicado ao desenvolvimento de medicamentos que possam direcionar-se de forma mais precisa às células tumorais, poupando assim as células normais (Zitvogel *et al.*, 2008). Esses esforços surgem como resposta às limitações das terapias convencionais, como cirurgia, quimioterapia e radioterapia, especialmente no tratamento de tumores sólidos, cuja eficácia é frequentemente prejudicada pelos efeitos colaterais significativos associados e pela crescente preocupação com a resistência a múltiplos medicamentos (Kaminski *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas eficazes, que apresentem, além de uma elevada eficácia, um nível reduzido de toxicidade e um menor risco de efeitos colaterais adversos, é uma necessidade urgente. Os efeitos colaterais associados a drogas sintéticas, ou

mesmo à quimioterapia, podem ser atenuados pelos OEs e fitoquímicos. A natureza lipofílica dos OEs permite-lhes penetrar facilmente na membrana celular (Mitoshi *et al.*, 2012; Russo *et al.*, 2015; Swamy *et al.*, 2016).

Em destaque, as espécies produtoras de OEs, como *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (capim-limão), *Citrus limon* (L.) Burn. f. (limão siciliano) e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja doce var. bahia), são alvos deste estudo. O OE de *C. citratus*, comumente conhecido como capim-limão, é um exemplo notável, apresentando propriedades antibacterianas e potencial anticancerígeno (Silva *et al.*, 2010; Duncan *et al.*, 2004). Por outro lado, os OEs de *C. sinensis* e *C. limon* não só possuem propriedades bioativas intrínsecas às suas composições químicas, mas também têm se mostrado promissores na indução de apoptose em células tumorais e na promoção do bem-estar geral devido às suas propriedades aromáticas e terapêuticas (Murthy *et al.*, 2012; Nair *et al.*, 2018).

A utilização de nanoemulsões para a entrega eficaz de OEs tem o potencial de transformar a abordagem do tratamento de doenças, especialmente o câncer. O desenvolvimento de novas fórmulas, a otimização de métodos de extração e a exploração das propriedades bioativas dessas substâncias representam fronteiras promissoras que podem resultar em tratamentos mais eficazes e menos tóxicos. Desta forma, este estudo apresenta de forma inédita o perfil biotecnológico de nanoemulsões formuladas por método de baixa energia OEs de *C. citratus*, *C. limon* e *C. sinensis* visando atividades químicas e biológicas como atividade antioxidante e anticancerígena.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Nanoemulsões

As nanoemulsões, também conhecidas como miniemulsões, emulsões submicrométricas ou emulsões ultrafinas, apresentam um tamanho que varia de 5 a 500 nm (SHARMA *et al.*, 2010). Essas estruturas podem ser personalizadas para atender às necessidades de diversas aplicações. Existem três tipos principais de nanoemulsões: óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) (conforme ilustrado na Figura 1) e bicontínua. Neste último caso, o sistema é formado quando as fases oleosa e aquosa são separadas por uma camada de surfactante. As nanoemulsões são compostas por três componentes principais: óleo, surfactante e água. As duas fases imiscíveis (fase oleosa ou orgânica e fase aquosa) presentes nos sistemas nanoemulsionados são separadas pela tensão interfacial criada pelos surfactantes (Devarajan *et al.*, 2011).

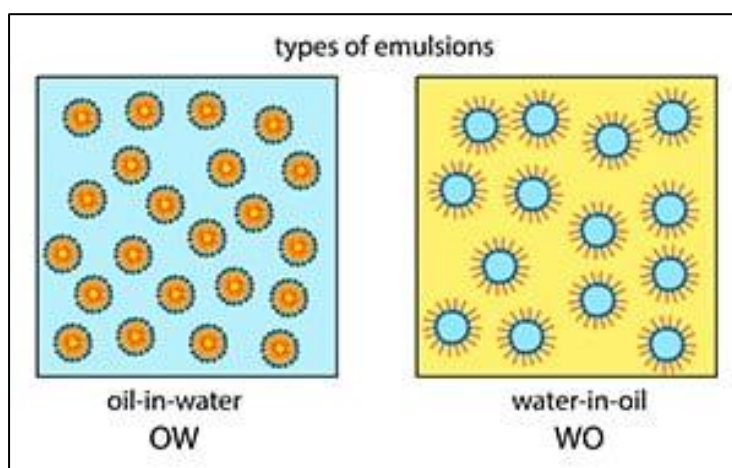


Figura 1 – Tipos de nanoemulsões: OW-óleo-em-água e WO-água-em-óleo

Fonte: <https://www.beei.com/blog/the-basics-of-nanoemulsions>

Um dos componentes importantes das nanoemulsões são os surfactantes, também conhecidos como emulsificantes. Existem quatro tipos de surfactantes: catiônicos, aniônicos, anfotéricos e não iônicos (menos afetados pelo pH e pela força iônica). Este componente pode influenciar a estabilidade e o tamanho da nanoemulsão, resultante da coesão entre o surfactante aniônico e a solução (Silva Júnior *et al.*, 2013).

A incorporação de surfactantes geralmente varia entre 1,5% e 10%, sendo 5% a quantidade mais comumente reportada como apropriada e suficiente para a produção de nanoemulsões. Acredita-se que o uso de surfactantes altere a carga eletrostática na nanoemulsão, resultando em baixa agregação (Feng *et al.*, 2016). A concentração ideal de

surfactante pode proporcionar o tamanho de partícula desejado, estabilidade, propriedades de viscosidade e atividades antimicrobianas que são necessárias para aplicações específicas. No entanto, em concentrações elevadas, o excesso de surfactante pode acarretar efeitos tóxicos (Zhao *et al.*, 2017).

Outro componente essencial é a seleção adequada do óleo como fase oleosa para a formação da nanoemulsão, uma vez que afeta a solubilidade do princípio ativo e facilita sua formulação para os fins desejados. A escolha deste componente deve ser feita com cuidado, pois impacta a seleção de outros ingredientes nas nanoemulsões, especialmente em sistemas de nanoemulsão em óleo/água (Amin *et al.*, 2019).

Vários métodos foram desenvolvidos e adaptados para produzir estruturas de nanoemulsão estáveis, visando atender aplicações específicas. O uso generalizado de nanoemulsões como transportadores de óleos essenciais (OEs) é amplamente documentado, pois elas reduzem a volatilização dos mesmos, aumentam a bioatividade e minimizam processos de degradação, como oxidação, isomerização e polimerização (Flores *et al.*, 2011; Pavoni *et al.*, 2020).

A dissolução de OEs em nanoemulsões pode aumentar a citotoxicidade, genotoxicidade e atividade antimicrobiana contra patógenos, considerando que os constituintes dos OEs são ricos em propriedades biológicas. Diferentes composições fitoquímicas em OEs influenciarão o comportamento biológico em relação aos patógenos (Caputo *et al.*, 2020).

A formulação de nanoemulsões requer energia. Vários pesquisadores descobriram técnicas para preparar nanoemulsões utilizando métodos de alta e baixa energia. Os métodos de alta energia são técnicas nas quais há a aplicação de energia de forma significativa, como sonicação e agitação de alto cisalhamento. Essa energia é utilizada para gerar nanogotículas. Em contrapartida, os métodos de baixa energia não exigem pressão externa, mas envolvem alterações químicas internas ou mudanças de temperatura que resultam na formação de nanopartículas. Exemplos incluem o método de temperatura de inversão de fase e o método de composição de inversão de fase (Kumar *et al.*, 2019).

As nanoemulsões são caracterizadas como a melhor emulsão, quando há ausência da fase interna, a formação de creme da emulsão é interrompida levando assim a uma boa formulação. Não deve haver qualquer deterioração causada por microrganismos, não deve afetar as propriedades físico-químicas da emulsão - cor, aparência, odor e consistência (Mukerjee *et al.*, 2019).

O índice de polidispersão (IPD/PDI) determina a uniformidade da nanoemulsão, afirma que se o PDI estiver na faixa de 0,08–0,3 então é uma distribuição estreita, principalmente a

partícula monodispersa tem PDI como 0,08. PDI maior que 0,3 indica ampla distribuição de tamanho (DANAEI *et al.*, 2018). Se o motivo é preparar partículas do tipo submícron, então é necessária uma grande quantidade de energia. Ao realizar o processo de homogeneização de alta pressão, esta energia aumentada e temperaturas elevadas podem eventualmente causar a deterioração dos componentes, especialmente compostos termolábeis, como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos, podem ser danificados (Azmi *et al.*, 2019).

### 2.1.1. Métodos de baixa energia para formulação de nanoemulsões

Os métodos de baixa energia são designados como a interação interna de componentes em sistemas que dependem do comportamento dos surfactantes durante o processo de emulsificação. Existem muitos estudos em que essa técnica foi adotada para a preparação de nanoemulsões (Duarte *et al.*, 2015; Dhivya *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2019). Esse método inclui a inversão de fase e métodos autoemulsionantes (Solans *et al.*, 2012).

Na nanoemulsificação espontânea (Figura 2), a macroemulsão A/O é preparada à temperatura ambiente e, em seguida, diluída lentamente com água. Durante este processo de diluição, o sistema passa por um ponto de inversão onde ocorre a transformação da emulsão A/O em O/A. Neste ponto de inversão, a tensão interfacial da interface óleo-água é muito baixa e, portanto, pequenas gotas podem ser formadas sem uma penalidade significativa de energia. Esse método de emulsificação espontânea foi relatado pela primeira vez em 1873 (Spooner, Li, & Sridhar, 2017).

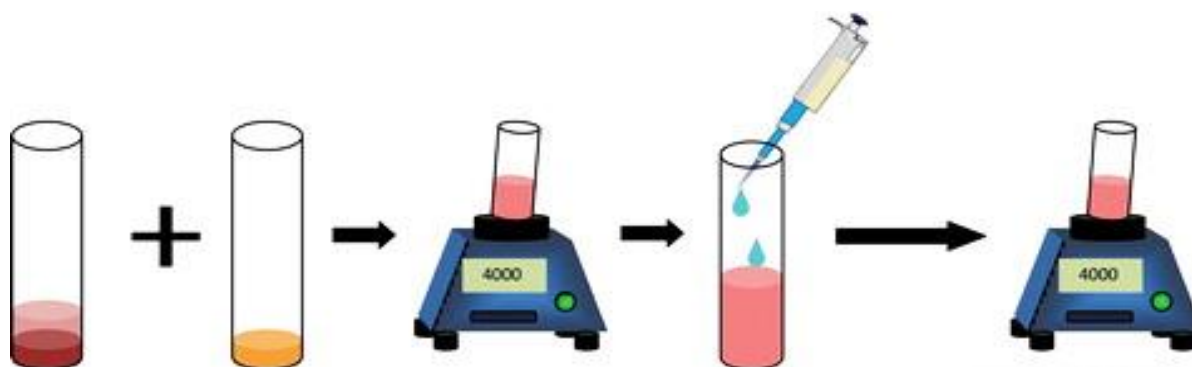


Figura 2 – Esquema representativo do método de nanoemulsificação espontânea

Fonte: [www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/adt.2022.058?journalCode=adt](http://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/adt.2022.058?journalCode=adt)

Além disso, com este método, as nanoemulsões são geradas à temperatura ambiente, sem o uso de forças externas. Fatores como tensão interfacial, viscosidade interfacial, volume, região de transição de fase, estrutura do surfactante e concentração do surfactante influenciam este processo. Outro nome para este método é sistemas autoemulsificantes de administração de medicamentos (SEDDES) ou sistemas auto-nano-emulsificantes de administração de

medicamentos (SNEDDS). Quando uma fase dispersa, como a fase oleosa, é combinada com um componente solúvel em água, gotículas de óleo são produzidas espontaneamente (Syukri *et al.*, 2018).

Já no método de inversão de fase (Figura 3), a macroemulsão A/O é preparada a uma temperatura superior à temperatura de inversão de fase da mistura (Jintapattanakit, 2018). Quando a mistura óleo-água-surfactante é resfriada até a temperatura ambiente, ela passa pela temperatura de inversão, onde ocorre a transformação da mistura de uma emulsão A/O para uma emulsão O/A (Borrin *et al.*, 2016). Esse método recebe esse nome, pois sugere a inversão de fase quando há mudança de temperatura. Quando a nanoemulsão do tipo O/A é convertida em nanoemulsão do tipo água em óleo com a mudança ou inversão de fase (Ren *et al.*, 2019).

Alguns dos surfactantes não iônicos, como os surfactantes polietoxilados, têm sua solubilidade ligada a condições específicas de temperatura. Quando as afinidades do surfactante com a água e o óleo são alteradas pela temperatura, a emulsão é formada (Mohamed *et al.*, 2017). Quando este surfactante polietoxilado é aquecido, ele se torna hidrofóbico devido à desidratação dos grupos polioxietileno. O equilíbrio hidrófilo-lipófilo (HLB) é importante para preparar nanoemulsões usando o método de temperatura de inversão de fase. Este método promove a emulsificação beneficiando-se das tensões interfaciais extremamente baixas na temperatura HLB. No entanto, foi observado que, embora a emulsificação seja espontânea na temperatura HLB, a taxa de coalescência é muito rápida e as emulsões são altamente instáveis (Pavoni *et al.*, 2020).

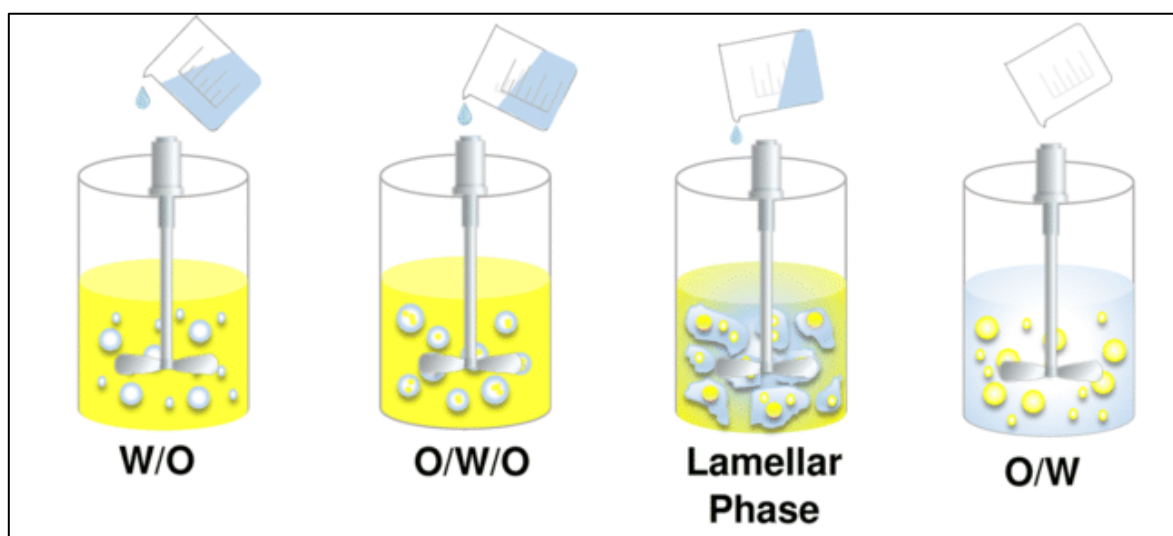


Figura 3 – Representação ilustrativa do método de inversão de fases

Fonte: [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-view-of-emulsion-phase-inversion-EPI-and-phase-inversion-temperature-PIT\\_fig2\\_336989438](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-view-of-emulsion-phase-inversion-EPI-and-phase-inversion-temperature-PIT_fig2_336989438)

Um método descrito é o de composição de inversão de fase, no qual a composição das fases é alterada, levando à inversão de fases. Neste método, a escolha adequada da mistura é um passo crucial para a obtenção de nanoemulsões com pequenas gotículas, especialmente quando o óleo livre restante é encontrado juntamente com a fase chave de cristal líquido formada durante o processo de emulsificação. Quando água ou óleo são misturados consistentemente com óleo-surfactante ou água-surfactante, formam-se nanoemulsões. Além disso, esse processo transforma o HLB (Hidrófilo-Lipofílico Balanceado) a uma temperatura constante, adicionando um novo componente. É considerado um dos melhores métodos para formulações em larga escala, uma vez que é mais simples, pois apenas a composição é alterada pela adição de qualquer componente (Perazzo, Preziosi, & Guido, 2015).

### **2.1.2. Métodos de alta energia para formulação de nanoemulsões**

As técnicas de alta energia são o principal método para formular uma nanoemulsão. A energia é transferida na forma de uma fonte mecânica, que leva à quebra da fase dispersa em um meio de dispersão, gerando uma formulação em escala nanométrica. Homogeneizadores de alta pressão, agitação de alto cisalhamento e geradores de ultrassom são utilizados como forças externas para o desenvolvimento da nanoemulsão (Che Marzuki, Wahab, & Abdul, 2019). A densidade de energia de entrada nesse método varia de cerca de  $10^8$  a  $10^{10}$  W/kg (Gupta *et al.*, 2016). Além disso, essa energia é fornecida em um curto período para alcançar partículas nanométricas utilizando um homogeneizador de alta pressão (Peng *et al.*, 2015).

A homogeneização de alta pressão (Figura 4) é um dos métodos mais conhecidos para o desenvolvimento de nanoemulsões e é o método mais popular para produzir nanoemulsões. Este método se beneficia do homogeneizador de alta pressão ou do homogeneizador de pistão para formular nanoemulsões com tamanho de gotícula de até 1 nm (Gurpreet & Singh, 2018). Nesse processo, a macroemulsão é forçada a passar a uma pressão que varia de 500 a 5.000 psi através de um pequeno orifício (Kale & Deore, 2017). Como as nanoemulsões são formadas quando diferentes forças externas atuam sobre elas, como cisalhamento hidráulico, turbulência intensa e cavitação, essas forças atuam conjuntamente para formar nanogotículas com o tamanho de partícula desejado.



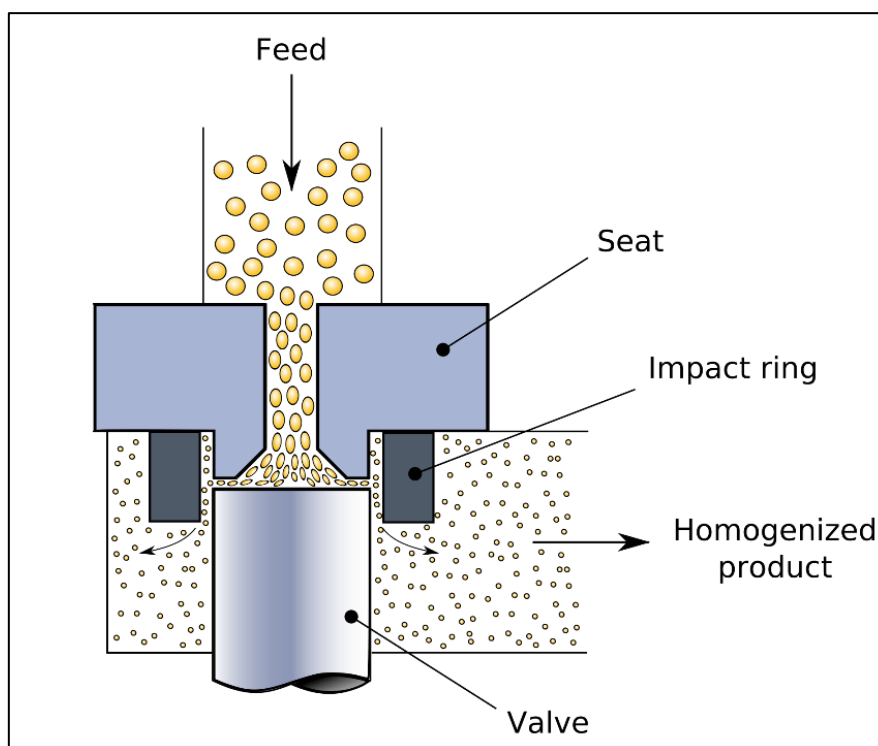


Figura 4 - Esquema representativo do método de homogeneização de alta pressão

Fonte: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=5679>

A técnica de agitação de alto cisalhamento envolve o uso de misturadores de alta energia e sistemas rotor-estator para formular uma nanoemulsão. O tamanho da nanogotícula da fase interna pode ser reduzido maximizando a intensidade desses dispositivos. Contudo, desenvolver emulsões com tamanho médio de gotícula inferior a 200–300 nm é considerado uma tarefa difícil (Håkansson, 2018).

Os misturadores de fluxo Silverson (Figura 5) são frequentemente usados para formular nanoemulsões. Rotores e estatores são configurados de forma a otimizar a emulsificação. Os componentes necessários para a preparação da emulsão são sugados na unidade rotor-estator; quando a velocidade do rotor é mantida alta, a alta refração é gerada dentro da cabeça desintegradora (Yu *et al.*, 2017). Sob essa condição, uma força centrífuga atua, resultando na dispersão intensa da emulsão, que é então transportada em alta velocidade até o orifício externo e coletada. Se a emulsão for feita utilizando um meio viscoso, a eficiência da agitação de alto cisalhamento diminui, e as emulsões são formadas com um tamanho de gota superior a 1 mm (Hidajat *et al.*, 2020). O tempo de agitação sob agitador magnético deve ser mantido em torno de 30 minutos, e o pH é ajustado com solução tampão fosfato (Bolla *et al.*, 2020).



Figura 5 - Misturador do tipo Silverson rotativo L5M-A

Fonte: <https://www.medicalexpo.com/pt/prod/silverson-machines/product-119201-947635.html>

A técnica de emulsificação ultrassônica envolve dois mecanismos principais. Ela se baseia principalmente no campo acústico que desenvolve uma onda interfacial, formando a fase oleosa para se dispersar no sistema de dispersão na forma de gotículas. O outro mecanismo é a utilização de ultrassom, que potencializa a cavitação acústica, levando à formação e colapso de microbolhas como resultado de flutuações na pressão devido a uma única onda sonora. Da mesma forma, diferentes faixas de turbulência altamente localizada são criadas, gerando microimplosões que, por fim, levam à ruptura de gotículas de grande tamanho em tamanhos submicrométricos (Kentish *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2018).

Normalmente, nesta técnica, a agitação de uma macroemulsão pré-misturada é realizada utilizando uma superfície sólida vibratória a 29 kHz ou frequências superiores. Para criar o efeito ultrassônico, chifres de foco e pontas pontiagudas — que são dispositivos ultrassônicos — criam cisalhamento e cavitação extremos, resultando na quebra de gotículas (Gupta *et al.*, 2019). Os pesquisadores descobriram que o campo sonoro emitido não é homogêneo na maioria dos sistemas ultrassônicos. Por essa razão, todas as gotículas devem experimentar a maior taxa de cisalhamento, e a recirculação da emulsão através da região de alta potência deve ser providenciada. Além disso, ao realizar esse tipo de recirculação com frequência, é possível

obter emulsões com tamanho de gota uniforme em concentrações diluídas (Zhang, Peppard, & Reinecciuis, 2015). Contudo, existem alguns problemas enfrentados pelos métodos, pois há a possibilidade de induzir a desnaturação de proteínas, a despolimerização de polissacarídeos e a oxidação lipídica.

O método de membrana microfluídica é o mais amplamente preferido e empregado na indústria farmacêutica para adquirir emulsões finas. Neste método, utiliza-se um dispositivo denominado microfluidizador, que fornece altas pressões. Durante o processo, a alta pressão força a macroemulsão a passar para a câmara de interação e, assim, nanoemulsões com partículas submicrométricas podem ser produzidas. A produção uniforme de nanoemulsão pode ser alcançada repetindo-se o processo diversas vezes e variando a pressão operacional para obter o tamanho de partícula desejado (Prasad, Mohanta, & Sudhakar, 2019).

## 2.2.Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são amplamente utilizados na fabricação de nanoemulsões devido às suas propriedades ambientalmente benéficas (Tripathi *et al.*, 2021). O diminuto tamanho das gotículas favorece sua rápida deposição em substratos, enquanto a baixa tensão superficial e interfacial permite uma distribuição uniforme. Além disso, a redução do tamanho das gotículas e a flexibilidade retardam a coalescência e o contato superficial (Chime *et al.*, 2014). Graças à sua extensa área de superfície, as nanoemulsões podem melhorar a absorção de medicamentos quando aplicadas em técnicas de administração. Elas se destacam por serem aplicáveis em uma variedade de setores, como alimentação, cosméticos, farmacêuticos e administração de medicamentos (Azmi *et al.*, 2019).

Além de suas propriedades ambientalmente benéficas, os OEs são ricos em compostos bioativos que apresentam propriedades farmacológicas, como terpenoides e fenólicos, os quais possuem atividades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes. A combinação de OEs com tecnologia de nanoemulsão potencializa a solubilidade e biodisponibilidade desses compostos ativos, além de promover uma liberação controlada. Essa sinergia pode otimizar a entrega e a eficácia de tratamentos fitoterápicos, tornando os OEs particularmente valiosos em aplicações terapêuticas.

Os fitoterápicos têm sido utilizados na medicina tradicional há milênios (Atanasov *et al.*, 2021). Diferentes partes das plantas podem ser usadas terapeuticamente, seja na forma de extratos complexos ou componentes isolados (Khan *et al.*, 2022). Compósitos eficazes resultam de um metabolismo específico, pertencendo aos chamados metabólitos secundários, que incluem sacarídeos, glicosídeos, OEs, esteroides, lipídios, alcaloides, taninos, flavonoides,

pigmentos, compostos hormonais, proteínas, peptídeos e vitaminas (Dewick, 2002; Osburn & Lanzotti, 2009). Essa é uma vasta gama de moléculas estruturalmente diversas, com diferentes vias biossintéticas, mecanismos de ação e atividades (Sarker & Nahar, 2020).

Os OEs são sistemas multicomponentes naturais, compostos predominantemente por terpenos e hidrocarbonetos voláteis (Huang *et al.*, 2019). Eles são definidos como metabólitos secundários de plantas, caracterizados por um odor distintivo (Bakkali *et al.*, 2008; Bakry *et al.*, 2016; Baptista-Silva *et al.*, 2020). O perfil químico dos OEs varia não apenas em relação às quantidades de moléculas presentes, mas também em termos das categorias estereoquímicas extraídas (Paul *et al.*, 2020).

Além disso, os OEs geralmente são líquidos solúveis em solventes orgânicos e lipídios; alguns são incolores, enquanto outros variam do amarelo-claro ao laranja-avermelhado, como os óleos de capim-limão, canela e sândalo. De maneira geral, os OEs possuem densidade inferior à da água, como é o caso dos óleos de citronela, limão e laranja, embora existam exceções, como o óleo de pimenta da Jamaica, canela, cravo e alho, que são mais densos que a água. Estima-se que apenas 10% dos cerca de 3.000 OEs conhecidos sejam utilizados comercialmente (Bakkali *et al.*, 2008; Bakry *et al.*, 2016).

Os OEs podem conter mais de 20 compostos em diferentes concentrações. Terpenos, terpenoides e componentes aromáticos e alifáticos são os constituintes principais. Os compostos majoritários podem representar entre 20% e 70% da concentração total, enquanto os compostos minoritários compõem o restante. A proporção relativa desses compostos principais é determinante nas propriedades biológicas dos OEs (Bakkali *et al.*, 2008; Bakry *et al.*, 2016).

Esses OEs são reconhecidos por suas diversas atividades biológicas, incluindo propriedades bactericidas, antivirais e antifúngicas. Por suas múltiplas aplicações, eles se mostram adequados para substituir aditivos químicos na conservação de alimentos, além de atuarem como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, agentes espasmolíticos e anestésicos locais (El-Saber Batiha *et al.*, 2020). Historicamente, OEs derivados de plantas aromáticas e medicinais têm sido associados a efeitos benéficos à saúde (Pandey *et al.*, 2017; Mutlu-Ingok *et al.*, 2019).

Os OEs demonstram propriedades antimicrobianas que inibem o crescimento de microorganismos (Tariq *et al.*, 2019). A atividade antibacteriana pode ser avaliada utilizando técnicas como difusão em ágar, micro/macrodiluição em caldo ou diluição em ágar. A eficácia antibacteriana dos OEs é majoritariamente influenciada por sua composição química e os componentes vegetais. É importante destacar que as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentam diferentes níveis de suscetibilidade aos OEs (Amor *et al.*, 2019). Diversos estudos

avaliaram a atividade bactericida de diferentes OEs contra espécies Gram-positivas (como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, e *Listeria monocytogenes*) e patógenos Gram-negativos (como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Campylobacter spp.*) (Ksouda *et al.*, 2019).

A composição e o rendimento na extração de OEs são influenciados por diversos fatores, incluindo a espécie da planta, composição do solo, órgão da planta (partes aéreas, inflorescências ou raízes), idade, estágio do ciclo de vida e o método de extração escolhido, bem como as condições empregadas (Wei, Xiao, & Yang, 2016; Frohlich *et al.*, 2019; Yang, Wei, & Hong, 2014).

Os OEs são comumente extraídos de matérias-primas vegetais utilizando métodos convencionais, como prensagem a frio, hidrodestilação e destilação a vapor. Adicionalmente, técnicas inovadoras, como hidrodestilação assistida por micro-ondas, destilação a vapor assistida por micro-ondas e hidrodestilação assistida por aquecimento ôhmico, também são utilizadas. Embora os perfis dos compostos voláteis obtidos sejam semelhantes entre os métodos, a concentração de cada composto varia (Guan *et al.*, 2007). Entretanto, é fundamental controlar cuidadosamente os parâmetros de extração, pois a exposição a condições inadequadas pode alterar a composição química dos OEs (Wei *et al.*, 2016; Golmakani, Zare, & Razzaghi, 2017).

São escassas as investigações na literatura sobre nanoemulsões e características biotecnológicas de OEs provenientes de *Cymbopogon citratus*, *Citrus sinensis* e *Citrus limon*.

### **2.2.1. *Cymbopogon citratus* (DC) Staf**

*Cymbopogon citratus* (DC) Staf, (Figura 6) comumente conhecido como capim-limão, é uma erva pertencente à família Poaceae e é amplamente utilizada em países tropicais, especialmente no Sudeste Asiático (Shah *et al.*, 2011). Geralmente é consumido em diversas formas, como caril, sopa ou até mesmo chá, em diversas cozinhas ao redor do mundo, incluindo Vietnã, Tailândia e Sudeste Asiático (Nambiar & Matela, 2012).

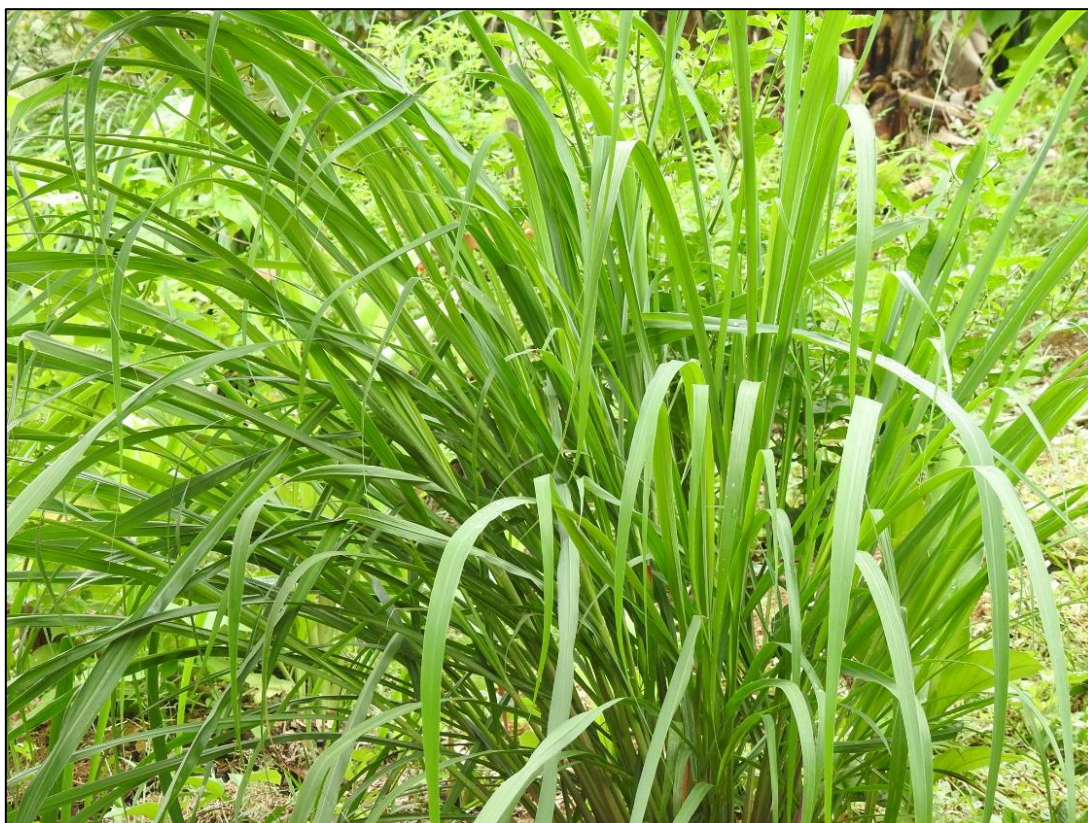


Figura 6 - *Cymbopogon citratus*

Fonte: <https://www.biodiversity4all.org/taxa/123728-Cymbopogon-citratus>

As folhas de *Cymbopogon citratus* Stapf têm sido amplamente consumidas como infusões na medicina popular brasileira para tratar enfermidades, devido às propriedades antiespasmódicas, analgésicas, anti-inflamatórias, antipiréticas, diuréticas e sedativas desta espécie (Santoro *et al.*, 2007; Santin *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2009; Nonviho *et al.*, 2010; Sinthusiri & Soonwera, 2013).

O óleo essencial de *C. citratus* possui imenso valor comercial como conservante de alimentos, agente aromatizante e ingrediente em fragrâncias e cosméticos (Ganjewala & Luthra, 2010). Além disso, várias atividades farmacológicas *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial de *C. citratus* foram descritas, incluindo atividades ansiolíticas e anticonvulsivantes (Silva *et al.*, 2010), bem como propriedades antibacterianas, antifúngicas e antiprotozoárias (Oliveira *et al.*, 2009).

Vários quimiotipos do óleo essencial de *C. citratus* foram descritos de acordo com os compostos majoritários: geranial, neral,  $\beta$ -pineno e cis-geraniol (Kpoviessi *et al.*, 2014); geranial (48,1%), neral (34,6%) e mirceno (11,0%) (Bassolé *et al.*, 2011); citral (47%) e 1,8-cineol (7,5%) (Kumar *et al.*, 2013). Estudos anteriores demonstraram atividades antimutagênicas e antioxidantes de extratos de *C. citratus*, ou de seus compostos específicos

(ou seja, citral,  $\beta$ -mirceno e geraniol) em diferentes sistemas in vitro e in vivo (Tapia *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009). Além disso, descobriu-se que o geraniol reduz a atividade proliferativa das linhas celulares de câncer de mama humano Caco-2 do cólon humano e MCF-7 (Duncan *et al.*, 2004).

Ademais, o extrato etanoico de *C. citratus* administrado por via oral a ratos Fischer 344 machos inibiu o desenvolvimento de focos positivos tanto no cólon quanto nos focos de criptas aberrantes do cólon (ACF), induzidos pelos carcinógenos azoximetano e dietilnitrosamina, respectivamente (Puatanachokchai *et al.*, 2002). É relatado que o óleo essencial de *C. citratus* tem atividade anticancerígena significativa e leva à perda da viabilidade das células tumorais (Murakami *et al.*, 1995; McGuffin *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2009). A atividade anticancerígena do óleo de capim-limão foi demonstrada pela indução de Glutathione S-Transferase (GST), sugerindo que o GST aumenta a capacidade do hospedeiro de desintoxicar xenobióticos, incluindo carcinógenos. Publicações recentes referem-se à atividade antitumoral dos extratos de capim-limão contra carcinomas de próstata, fígado, ovário, cólon e mama (Halabi *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2021).

Esta erva tropical é encontrada originalmente em zonas tropicais e semitropicais da Ásia, América do Sul e Central e África, contendo 55 espécies conhecidas (Tayeboon *et al.*, 2013). Vários extratos desse gênero têm sido amplamente utilizados na medicina tradicional, incluindo óleo essencial contra furúnculos, dores de estômago e dor de dente, bem como decocção aquosa para falcização e doenças celulares ou para acalmar crises epiléticas (Sahouo *et al.*, 2003; Noudogbessi *et al.*, 2013).

### **2.2.2. *Citrus sinensis* (L.) Osbeck**

*Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce - variação Bahia), apresentada na Figura 7, consiste em cultivares de frutas cítricas de polpa vermelha, amplamente reconhecidas por seu alto teor de antocianinas, que raramente são encontradas entre outras frutas cítricas (Habibi *et al.*, 2020; Carmona *et al.*, 2017).





Figura 7 - *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Fonte: <https://www.viveiroculturaecologica.com.br/frutiferas/muda-de-laranja-sanguinea-com-90cm>

As antocianinas conferem às laranjas doces grande qualidade sensorial e potenciais de promoção da saúde, como proteção contra câncer, inflamação e doenças cardiovasculares (Gross *et al.*, 2013; Fallico *et al.*, 2017). Assim, os níveis de antocianinas tornaram-se um dos importantes índices de qualidade que afetam a aceitação do consumidor e a comercialização das *laranjas sanguíneas* (Lado, Gambetta, & Zacarias, 2018).

O óleo essencial de *C. sinensis* é um dos subprodutos mais valiosos após o processamento de frutas cítricas. É amplamente utilizado em alimentos, bebidas, cosméticos e outras indústrias, além de ser empregado em aromaterapia e como agentes medicinais (Dosoky & Setzer, 2018). Os efeitos farmacológicos desse óleo essencial foram estudados, incluindo efeitos antimicrobianos, inseticidas, antioxidantes e anticancerígenos, bem como alívio da dor, supressão da hepatocarcinogênese, preservação de alimentos, tratamento da acne, relaxamento e função ansiolítica (Rimini, Petracci, & Smith, 2014; El-Akhal, Lalami, & Guemmouh, 2015; Torres-Alvarez *et al.*, 2017).

Este OE é rico em monoterpenos, sendo o constituinte principal o d-limoneno (Figura 8). Pesquisas recentes mostram que o limoneno é geralmente considerado seguro e de baixa toxicidade, sem causar risco teratogênico, carcinogênico ou mutagênico aos seres humanos (Chebab, Mekircha, & Leghouchi, 2017). Além disso, o limoneno demonstrou ter múltiplos



efeitos biológicos benéficos, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antinociceptivos, antialérgicos, antivirais, antitumorais e antiestresse (Vieira *et al.*, 2018).

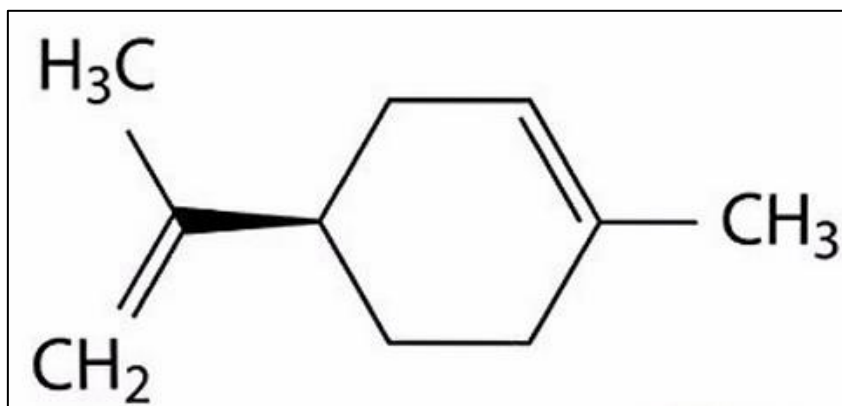


Figura 8 - D-limoneno

Fonte: <https://www.apotecariosdafloresta.com/post/d-limoneno-a-mol%C3%A9cula-dos-c%C3%ADtricos>

Esse OE também mostrou um efeito inibitório no crescimento e promoveu a morte de células cancerígenas do cólon em cultura (Murthy *et al.*, 2012). Vale ressaltar que, em outro estudo, foi relatado que esse mesmo OE de *C. sinensis* inibiu o crescimento de linhagens celulares de câncer de pulmão e próstata em cultura in vitro (Yang *et al.*, 2017). Foi relatado que o OE também exibe um efeito citotóxico contra células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, suprimindo a taxa de seu crescimento por um mecanismo bastante semelhante ao da morte celular apoptótica e necrótica (Beliocchi *et al.*, 2011; Navarra *et al.*, 2015).

Em um estudo diferente, o OE de *C. sinensis* estimulou a autofagia em células de neuroblastoma SH-SY5Y em um ensaio de refluxo autofágico (Russo *et al.*, 2014). O OE suprime notavelmente a proliferação de células de câncer de próstata humano (LNCaP), induzindo a apoptose (Jayaprakasha *et al.*, 2012). O OE também exibiu efeito citotóxico contra células humanas de câncer de próstata e pulmão in vitro (Zu *et al.*, 2010).

Além disso, o OE também mostrou um efeito citotóxico contra células cancerígenas PC-3 e A-549, que são células cancerosas de próstata e de pulmão, respectivamente (Rabi *et al.*, 2009). O D-limoneno, que é comumente encontrado na maioria dos óleos de casca de frutas cítricas, também suprimiu o crescimento de várias células cancerígenas (Nair *et al.*, 2018; Acheampong *et al.*, 2019).

Além disso, o efeito anticancerígeno de *C. sinensis* foi confirmado, pois induziu apoptose em células HL-60, com a atividade marcada pela presença de compostos citral, decanal e octanal no OE (Hata *et al.*, 2003). É possível extrair o OE de *C. sinensis* das cascas e folhas dessas plantas. Os óleos essenciais cítricos têm se tornado foco de diversos estudos por

possuírem amplas atividades biológicas que resultam de suas composições químicas. Porém, existem poucos estudos a respeito do OE de *C. sinensis* extraído das folhas.

### 2.2.3. *Citrus limon* (L.) Burn

*Citrus limon* (L.) Burn, conhecido como limão siciliano (ver Figura 9), é o fruto de uma pequena árvore que pode atingir até 6 metros de altura. Esta planta possui ramos pequenos e espinhos robustos, e se desenvolve bem em regiões subtropicais e tropicais, sendo mais sensível ao frio do que outras espécies cítricas, como as laranjas e as toranjas (Matheyambath, Padmanabhan, & Paliyath, 2016).



Figura 9 - *Citrus limon* (L.) Burn

Fonte: <https://www.chaskihortasurbanas.com.br/muda-de-limao-siciliano-enxertada>

Os principais componentes do OE de *C. limon* são os monoterpenoides. Entre eles, quantitativamente dominantes no OE obtido do pericarpo estão: limoneno (69,9%),  $\beta$ -pineno (11,2%),  $\gamma$ -terpineno (8,21%), sabineno (3,9%), mirceno (3,1 %), geranial (E-citral, 2,9%), neral (Z-citral, 1,5%), linalol (1,41%). Além dos terpenoides, o OE também contém furanocumarinas lineares (psoralenos) e flavonas polimetoxiladas (Gonzalez-Molina *et al.*, 2010; Russo *et al.*, 2015; Kaskoos, 2019).

Outros monoterpenoides identificados como característicos de *C. limon* foram: sabineno (0,28%),  $\alpha$ -terpineno (0,22%), trans-muurolo-4(14), 5-dieno (0,18%), eucaliptol

(0,12%), acetato de octanol (0,03%),  $\beta$ -curcumeno (0,03%), zonareno (0,03%), 7-epi-sesquitujeno (0,02%), acetato de citronelila (0,02%),  $\alpha$ -farneseno (0,01%). O modelo de perfil baseado em metabólitos mostrado pode ser usado para discriminar claramente as espécies básicas de *Citrus*. Limoneno,  $\alpha$ -pineno, sabineno e  $\alpha$ -terpineno foram os principais componentes característicos dos metabolomas analisados dos genótipos de *Citrus* que contribuíram para sua taxonomia (Jing *et al.*, 2015).

O OE da folha de *C. limon* difere em composição do óleo obtido do pericarpo. Seus principais compostos incluem: limoneno (31,5%), sabineno (15,9%), citronelal (11,6%), linalol (4,6%), neral (4,5%), geranial (4,5%), (E)- $\beta$ -ocimeno (3,9 %), mirceno (2,9%), citronelol (2,3%),  $\beta$ -cariofileno (1,7%), terpne-4-ol (1,4%), geraniol (1,3%) e  $\alpha$ -pineno (1,2%) (Jing *et al.*, 2015; Masson *et al.*, 2016; Owolabi *et al.*, 2018). De acordo com Mehl *et al.* (2014), a identificação de metabólitos voláteis e não voláteis no óleo essencial de *C. limon* depende da origem geográfica e dos métodos analíticos utilizados.

## 2.3.Câncer

### 2.3.1. Conceitos gerais

O câncer é atualmente a segunda principal causa de morte em todo o mundo, com 9,6 milhões de óbitos atribuídos à doença em 2018, configurando-se como um grave problema de saúde global (Siegel, Miller, & Jemal, 2020). Essa enfermidade é uma das mais letais, resultante principalmente de mutações genéticas, que são potencializadas por agentes carcinogênicos. Essas mutações e agentes externos alteram as funções celulares e o metabolismo, levando à replicação descontrolada e à disseminação de células cancerosas. Assim, as células malignas se multiplicam rapidamente, comprometendo a integridade das células normais (Hassanpour *et al.*, 2017).

Além disso, as células cancerígenas atacam e consomem células saudáveis, uma vez que demandam grandes quantidades de biomateriais para sua multiplicação. Por essa razão, a perda drástica de peso, associada a nódulos nas áreas afetadas, é frequentemente observada em pacientes oncológicos (Kotecha, Takami, & Espinoza, 2016). Em 2020, foram registrados 15 milhões de casos de câncer globalmente. O número de homens afetados (51%) ligeiramente supera o de mulheres (49%). Os cânceres de pulmão, próstata e colorretal representam 46% dos casos em homens, enquanto os cânceres de pulmão, mama e colorretal correspondem a 50% em mulheres (Siegel, Miller, & Jemal, 2020). No ano de 2021, aproximadamente 1,9 milhão de novos casos de câncer foram identificados nos Estados Unidos, resultando em cerca de 600 mil

mortes, o que representa uma taxa de mortalidade alarmante de um em cada três pacientes diagnosticados. O número de casos e de mortalidade continua a crescer, com previsões indicando que os casos de câncer no mundo podem aumentar para 23,6 milhões até 2030 (Siegel, Miller, & Jemal, 2021).

Os tumores representam um crescimento anormal de células que podem ser benignos ou malignos. Cientistas acreditam que o câncer é uma condição multifatorial, com múltiplas etapas, que pode originar-se de diversos tipos de células e órgãos. Além dos danos físicos, o câncer provoca complicações que afetam a saúde mental dos pacientes, comprometendo sua qualidade de vida. Dados recentes da carga global do câncer, divulgados pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde em 2020, revelaram um aumento significativo na taxa de incidência e mortalidade em todo o mundo (Kurniawan *et al.*, 2021).

Os tipos de câncer mais comuns entre mulheres incluem mama, colo do útero, pulmão, tireoide e colorretal; enquanto entre os homens, os mais frequentes são esôfago, pulmão, colorretal, fígado e gástrico (Sung *et al.*, 2021). Estima-se que aproximadamente 90% a 95% dos casos de câncer estão relacionados a hábitos insalubres e carcinógenos químicos ou físicos presentes no ambiente, com apenas 5% a 10% atribuídos a fatores genéticos (Shabnam *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2020; Anand *et al.*, 2013; Plummer *et al.*, 2016).

Os fatores de risco associados ao câncer incluem tabagismo, consumo excessivo de álcool, radiação, sedentarismo, histórico familiar de câncer, contaminação da água potável, estresse, dieta inadequada, obesidade, infecções sexualmente transmissíveis e poluição ambiental (Bukowski *et al.*, 2020). O tratamento do câncer tem como objetivo eliminar as células tumorais sem causar danos às células normais. Atualmente, os pesquisadores buscam melhorar essa eficácia através do aumento da letalidade dos medicamentos, aprimoramento da sua direção e redução da imunossupressão e da resistência (Ju *et al.*, 2023).

As terapias que visam o sistema imunológico incluem imunoterapias e vacinas contra o câncer. A imunoterapia é um tratamento que modula a função imunológica do corpo, buscando potencializar o sistema imune para combater as células cancerosas (Chen *et al.*, 2021). Nos últimos anos, novas abordagens, como medicamentos "específicos" e terapias direcionadas, têm demonstrado progresso significativo nas taxas de sobrevivência de pacientes. Por exemplo, uma descoberta recente no MD Anderson Cancer Center da Universidade do Texas sobre um novo mecanismo de morte celular, denominado dissulfidptose, sugere novas estratégias para o tratamento do câncer, pois muitas células malignas conseguem escapar da apoptose induzida por tratamentos convencionais (Liu *et al.*, 2023).

Além disso, os nanomedicamentos têm se mostrado uma forma eficiente de entregar terapias diretamente aos tumores, melhorando a eficácia do tratamento e a qualidade de vida dos pacientes. No entanto, desafios como o vazamento precoce de medicamentos e a resistência a eles ainda persistem. Os nanomedicamentos supramoleculares, que combinam as vantagens da nanotecnologia com a química supramolecular, apresentaram avanços promissores. Esses nanomedicamentos utilizam interações não covalentes para transportar moléculas terapêuticas e diagnósticas, liberando-as de forma precisa em ambientes tumorais e respondendo a estímulos externos, possibilitando assim estratégias de terapia sinérgicas e superando a resistência ao tratamento.

### **2.3.2. Contextualização sobre quimioterápicos**

A quimioterapia é um dos tratamentos mais utilizados para doenças malignas, sendo administrada principalmente por meio de infusões intravenosas de medicamentos. O objetivo desse tratamento é inibir o crescimento tumoral, evitar a disseminação grave ou metástase de células cancerígenas em um curto período, além de amenizar os sintomas clínicos associados aos tumores malignos. Esses efeitos podem, por sua vez, prolongar a sobrevida dos pacientes. Contudo, os agentes quimioterápicos apresentam limitações significativas, incluindo a baixa seletividade, o que resulta na morte de células normais juntamente com as células tumorais, comprometendo a função do sistema imunológico e a função das células-tronco hematopoiéticas da medula óssea, além de favorecer o desenvolvimento de resistência aos medicamentos (Andren-Sandberg, 2011; Blanchard *et al.*, 2015; Sirohi *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2021).

Em comparação com a quimioterapia, a terapia direcionada apresenta a vantagem de melhorar o enfoque no tratamento das células tumorais, permitindo uma morte celular mais precisa. No entanto, uma desvantagem desta abordagem é a baixa taxa de resposta observada na população de pacientes e o surgimento concomitante de resistência ao tratamento, fatores que contribuem para a falha terapêutica. Com base nessas limitações, há uma necessidade urgente de desenvolvimento de medicamentos de segunda e terceira gerações (Joerger & Ang, 2013). A terapia hormonal, que tem como foco principal o câncer de mama, ovário e próstata, bem como a terapia biológica, que envolve a administração de vírus ou células-tronco, também representam alternativas promissoras, embora a terapia biológica ainda não seja considerada o tratamento principal. Estudos demonstram que os vírus utilizados nessas terapias podem atacar diretamente as células tumorais, além de estimular uma resposta do sistema imunológico do

paciente. Contudo, essa resposta imunológica pode ser excessiva e não suportada por alguns pacientes (Brennan *et al.*, 2013).

Os polissacarídeos, substâncias de origem natural, têm mostrado atividade anticancerígena significativa e efeitos colaterais relativamente baixos, o que os torna uma alternativa viável em comparação aos quimioterápicos convencionais, que frequentemente causam danos severos às células saudáveis (Talib & Mahasneh, 2010). Além das propriedades anticancerígenas, foi evidenciado que os polissacarídeos possuem atividades antimicrobianas (Talib & Mahasneh, 2010), anti-hiperglicêmicas (Gong *et al.*, 2021, 2022), antiglicação, imunomoduladoras e antifadiga (Rout & Banerjee, 2007; Jing *et al.*, 2014; Chi *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2017).

Os medicamentos quimioterápicos tradicionais, por sua natureza não seletiva, causam efeitos colaterais severos, afetando tanto células cancerígenas como saudáveis. Pacientes que passam por tratamentos quimioterápicos frequentemente enfrentam dificuldades em lidar com a toxicidade associada, enquanto os tumores podem desenvolver resistência, limitando assim a eficácia do tratamento. No entanto, as vulnerabilidades oxidativas e mitocondriais específicas das células cancerígenas, como sua maior dependência da glicólise aeróbica (efeito Warburg), podem ser exploradas para o desenvolvimento de novas terapias que minimizem os efeitos colaterais (Schumacker, 2006; Schieber & Chandel, 2014; Pignanelli *et al.*, 2017).

Além disso, a suscetibilidade seletiva das mitocôndrias cancerígenas a certos compostos confirma a existência de vulnerabilidades específicas nessas células (Baig *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2017). As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produtos naturais de várias reações metabólicas celulares, produzidas, por exemplo, durante a fosforilação oxidativa na respiração celular. A acumulação de ERO ocorre quando os sistemas de eliminação de radicais estão sobrecarregados, caracterizando o estresse oxidativo, que pode resultar em danos celulares significativos e, em casos extremos, levar à apoptose (Schumacker, 2006; Schieber & Chandel, 2014).

A apoptose pode ser desencadeada por duas vias principais: a intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca é ativada por estressores intracelulares e resulta na abertura dos poros da membrana mitocondrial, levando à liberação de fatores apoptogênicos, como o citocromo c (Baig *et al.*, 2016). A ativação do citocromo c inicia a cascata de ativação da caspase-9, que subsequentemente ativa a caspase-3, resultando na degradação dos componentes celulares e na indução da apoptose. A via extrínseca é iniciada pela interação entre um receptor de morte e seu ligante, como TNFR1/TNF-alfa e Fas/FasL, que ativam cascatas de sinalização intracelular que culminam na ativação da caspase-8 e, finalmente, da caspase-3 (Fulda & Debatin, 2006).

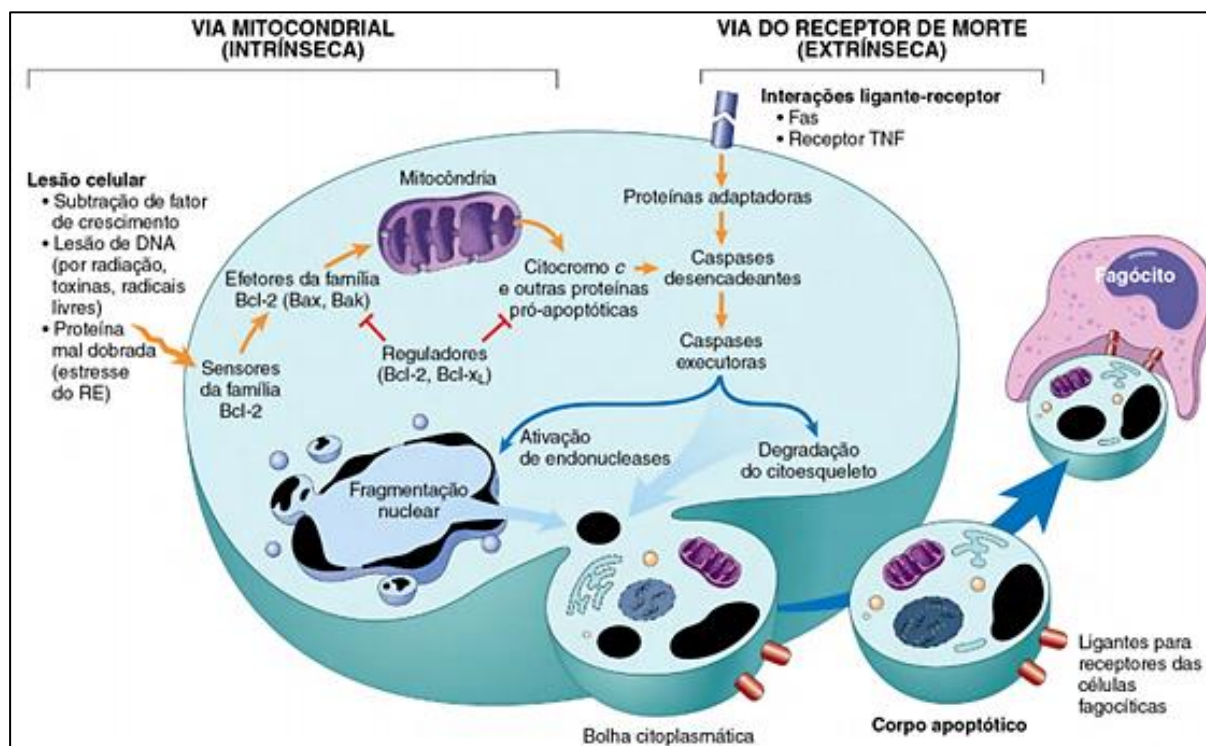


Figura 10 - Apoptose via intrínseca e extrínseca

Fonte: <https://www.sanarmed.com/apoptose-destrinchando-a-morte-celular-programada-colunistas>

A diversidade de tipos de câncer e as limitações dos tratamentos existentes aumentam a necessidade de novos medicamentos e terapias. Como resultado, os pesquisadores estão procurando maneiras mais eficazes de matar muitos tipos de células cancerígenas.

### 2.3.3. Efeitos antioxidantes

Baseando-se no mecanismo de terminação radical, os métodos de medição da capacidade antioxidante podem ser categorizados em dois grupos principais: (i) transferência de átomo de hidrogênio (HAT) e (ii) transferência de elétron único (SET). O método HAT se concentra na eliminação de radicais livres por meio da doação de hidrogênio, enquanto o método SET avalia a capacidade de um antioxidante em transferir um ou mais elétrons para reduzir metais oxidados, carbonilas e radicais livres (Wright, Johnson, & DiLabio, 2001).

Os ensaios antioxidantes que envolvem a doação de hidrogênio incluem a capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), o parâmetro total de captura de radicais antioxidantes (TRAP) e a inibição da oxidação induzida de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). De modo semelhante, os ensaios que lidam com a doação de elétrons englobam a capacidade antioxidante de equivalente de trolox (TEAC), o poder redutor de íons férricos



(FRAP) e o ensaio utilizando o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Embora o DPPH seja classificado como uma reação SET, o radical indicador pode ser neutralizado tanto pela redução direta por transferência de elétrons quanto pela terminação radical via doação de átomo de hidrogênio (Jiménez *et al.*, 2004).

Outros ensaios químicos que avaliam a capacidade de eliminação dos antioxidantes incluem a eliminação do radical superóxido, a remoção de peróxido de hidrogênio e a extinção de oxigênio singlete (Wang *et al.*, 2016). Embora o mecanismo antioxidante subjacente ainda não esteja completamente elucidado, descobriu-se que características de polissacarídeos naturais, como solubilidade em água, peso molecular, composição de monossacarídeos, estrutura, conformação, polaridade e ligações de hidrogênio intramoleculares, estão correlacionadas à sua atividade antioxidante (Jia *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). As seções seguintes resumem, portanto, o entendimento atual sobre os possíveis mecanismos antioxidantes relacionados ao efeito anticancerígeno de produtos de origem vegetal.

Um pró-oxidante é capaz de induzir estresse oxidativo, promovendo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou interferindo na maquinaria antioxidante celular. Os antioxidantes atuam como a principal defesa das células contra o estresse oxidativo. Por exemplo, a luteolina, ao funcionar como um pró-oxidante, sensibilizou células de câncer de pulmão à apoptose induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF). A apoptose induzida pelo TNF é inibida pelo fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B), o qual é ativado em resposta ao TNF. O tratamento com luteolina aumentou a morte celular induzida por TNF em células de câncer de pulmão, promovendo o acúmulo de ROS por meio da supressão da atividade da superóxido dismutase (SOD). Esse aumento na produção de ROS, por sua vez, reprimiu a atividade do NF- $\kappa$ B, enquanto potenciava a quinase N-terminal c-Jun (JNK) (Ju *et al.*, 2007). Assim, conclui-se que a apoptose em células cancerígenas do pulmão induzida pelo TNF é potencializada de forma sinérgica pela luteolina, devido à supressão do NF- $\kappa$ B mediada por ROS e ao aumento da atividade da JNK.

#### **2.3.4. Efeito anticancerígeno de plantas medicinais**

As plantas superiores têm proporcionado quatro classes principais e bem estabelecidas de medicamentos quimioterápicos aprovados para o tratamento do câncer. Essas classes incluem compostos de origem biótica, como os alcaloides bisindol e camptotecina, terpenoides taxano, e lignanas derivadas da podofilotoxina, além de novos compostos como a cefalotaxina e o mepesuccinato de omacetaxina, que foram introduzidos clinicamente mais recentemente (Cragg, Kingston, & Newman, 2005; Butler, Robertson, & Cooper, 2014).



Os produtos naturais provenientes de micro e macroorganismos, tanto terrestres quanto marinhos, continuam a desempenhar um papel crucial na descoberta de novos medicamentos, especialmente na busca por agentes oncológicos. De fato, cerca de 50% das 175 pequenas moléculas aprovadas como medicamentos anticâncer na medicina ocidental entre 1940 e 2014 foram obtidas diretamente de microrganismos ou derivadas sinteticamente de soluções naturais (Newman & Cragg, 2016).

Os triterpenoides, um vasto grupo de mais de 20.000 produtos naturais derivados de precursores C30, incluem mais de 100 esqueletos de carbono distintos, caracterizados como tetracíclicos ou pentacíclicos (Xu, Fazio, & Matsuda, 2004). A ocorrência de triterpenoides em diferentes organismos tem sido objeto de frequentes revisões, resultando na descrição de centenas de novos compostos anualmente (Hill & Connolly, 2017). Embora os triterpenoides naturais e semissintéticos ainda não tenham uma aplicação consolidada como agentes anticancerígenos na medicina ocidental, a bardoxolona metil, um triterpenoide sintético do tipo oleanano, alcançou ensaios clínicos para avaliação de seu potencial tratamento do câncer (Hong *et al.*, 2012).

A morte de células tumorais por meio de diversas estratégias anticâncer é frequentemente associada à ativação de vias de transdução de sinal de apoptose em células malignas, envolvendo tanto vias intrínsecas quanto extrínsecas. Estas vias podem ser ativadas através de sinais mitocondriais ou de receptores de superfície celular. A via apoptótica intrínseca, mediada por mitocôndrias, é ativada pelo sinal de morte proveniente desta organela, resultando na expressão de genes mitocondriais como bax, bcl-2, p53 e cox-2, levando à liberação de citocromo c do espaço intermembranar da mitocôndria para o citosol. O citocromo c então se liga ao Apaf-1, ativando a pró-caspase 9, o que resulta na ativação da caspase 3 e de outras caspases efetoras. Além disso, o p53 atua como um transativador ou repressor de um conjunto de genes pró ou anti-apoptóticos. O dano ao DNA, um evento comum, desencadeia a ativação de mecanismos de reparo e apoptose, onde a proteína supressora de tumor p53 estabelece uma ligação vital entre esses processos (Zhao *et al.*, 2013).

A triagem fitoquímica, tanto qualitativa quanto quantitativa, de espécies vegetais pode revelar importantes compostos químicos bioativos, os quais estão associados à eficácia terapêutica das plantas (Oladeji, Odelade, & Oloke, 2020). Os compostos químicos mais significativos identificados na literatura incluem óleos essenciais e flavonoides, que contribuíram para as marcantes atividades farmacológicas e terapêuticas das plantas (Roriz *et al.*, 2014; Zannou *et al.*, 2015).

Derivados de limão, extraídos de cascas e polpas, têm demonstrado induzir apoptose mediada por estresse oxidativo em células MCF-7 de câncer de mama, através da inibição de proteínas reguladas pela via de sinalização STAT3, prevenindo assim a expressão de Bcl-x e Bcl-2, além de ativar as caspases 7, 8 e 9 e a Bax (Yuan *et al.*, 2022). A eriocitrina, por sua vez, tem sido relacionada à indução de apoptose mediada por mitocôndrias no carcinoma hepatocelular e à supressão da proliferação celular ao interromper o ciclo celular na fase S, regulando positivamente p53, ciclina A, ciclina D3 e CDK6 (Wang *et al.*, 2016).

O OE de *C. sinensis* demonstrou induzir apoptose em células de câncer de cólon humano (Murthy *et al.*, 2012) e em células HL-60 (Hata *et al.*, 2003), além de suprimir angiogênese e metástase (Murthy *et al.*, 2012). Similarmente, o óleo essencial de *C. limon* induziu apoptose em células HL-60 (Hata *et al.*, 2003) e apresentou citotoxicidade contra células humanas de câncer de mama, pulmão e próstata (Zu *et al.*, 2010).

O uso de agentes naturais, tanto isoladamente quanto em combinação com compostos sintéticos, demonstra-se promissor para a prevenção, retardamento, interrupção ou reversão da carcinogênese. As cascas de cítricos emergem como fontes ricas de flavonoides polimetoxilados, cujas propriedades anticancerígenas têm atraído considerável atenção na pesquisa. Nos estudos com células SiHa de câncer cervical humano, a hesperetina induziu a interrupção da fase G2/M e elevou a expressão de p53, Bax e das caspases 3, 8 e 9, além do receptor de morte Fas e sua proteína adaptadora FADD (Alshatwi *et al.*, 2013).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1.Objetivo Geral

- Avaliar o perfil químico e potencial biotecnológico de nanoemulsões óleo-em-água (O/A) incorporadas com óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (capim-limão), *Citrus limon* (L.) Burn. (limão siciliano) e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja doce var. bahia).

#### 3.2.Objetivos específicos

- Formular nanoemulsões (O/A) estáveis dos óleos essenciais extraídos de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (capim-limão), *Citrus limon* (L.) Burn. (limão siciliano) e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja doce var. bahia);
- Identificar os constituintes químicos dos óleos essenciais extraídos de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (capim-limão), *Citrus limon* (L.) Burn. (limão siciliano) e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja doce var. bahia) e suas nanoemulsões por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM);
- Determinar in vitro a atividade antioxidante dos óleos essenciais extraídos de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (capim-limão), *Citrus limon* (L.) Burn. (limão siciliano) e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja doce var. bahia) e suas nanoemulsões.
- Determinar in vitro a atividade anticâncer dos óleos essenciais extraídos de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (capim-limão), *Citrus limon* (L.) Burn. (limão siciliano) e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja doce var. bahia) e suas nanoemulsões.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Coleta e identificação do material vegetal

Folhas de *C. citratus*, cascas de *C. limon* e folhas de *C. sinensis* foram coletadas em São Luís – MA, Brasil, em julho de 2022, turno matutino. Todas as espécies foram identificadas pelo Herbário do Maranhão (UFMA), sob o nº 12114, 12116 e 12119, respectivamente e cadastro no SISGEN e SISBIO (AE4048A e 4522-2). Os materiais vegetais foram transportados para o Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (LOEPAV/UFMA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Posteriormente, foram triturados e sua massa medida para cálculos de rendimento (Farmacopeia, 2019).

### 4.2. Extração dos óleos essenciais

Para extração dos OEs foi utilizada a técnica de hidrodestilação com um extrator de Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo acondicionado em manta elétrica como fonte geradora de calor, utilizando-se água destilada como solvente (1:10). A hidrodestilação foi conduzida a 100°C por 2h30 recolhendo-se o óleo essencial extraído, sendo seco por percolação com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e centrifugado. As amostras serão armazenadas em vials de vidro âmbar sob refrigeração a 4°C (Farmacopeia, 2019). Ensaios em triplicata.

### 4.3. Análise CG-FID-EM e identificação de compostos bioativos

A identificação dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) de acordo com Everton *et al.* (2020) utilizando um instrumento modelo QP 2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) operando em uma coluna capilar de sílica fundida (30 m × 0,25 mm) e DB-5 fase ligada (espessura do filme, 0,25 µm).

Hélio foi utilizado como gás de arraste com vazão de 1,0 ml/min. As temperaturas do injetor e do detector foram 220 e 20 °C. O volume de injeção da amostra foi de 0,5 µL, diluído com hexano (1%) e o split do volume de injeção (split) foi de 1:100. A rampa de temperatura iniciou em 60 °C e aumentou a uma taxa de 3 °C/min até 20 °C, seguida por um aumento de 10 °C min<sup>-1</sup> até atingir 300 °C, e a temperatura final foi mantida por 7 min. A pressão da coluna foi de aproximadamente 71,0 kPa.

O espectrômetro de massa foi utilizado com potencial de ionização de 70 eV e temperatura da fonte de íons de 200 °C. A análise de massa foi realizada no modo de varredura

completa, com intervalo de 5-500 Da, taxa de varredura de 1000 Da/s e intervalo de varredura de 0,5 fragmentos/s. Os dados foram coletados e processados utilizando o software Lab Solutions LC/GC Workstation 2.72 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

O índice de retenção dos compostos foi calculado para a série homóloga de n-alcanos (nC9-nC18) utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (1963). A identificação dos compostos foi feita comparando os índices de retenção calculados com os descritos na literatura (Adams, 2017). Os espectros de massa obtidos também foram comparados com os espectros das bibliotecas FFNSC 1.2, NIST107 e NIST21.

A análise quantitativa foi realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) utilizando instrumento modelo GC-2010 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), e as condições experimentais foram as mesmas da análise qualitativa, exceto pela temperatura do detector que era de 300°C. As porcentagens relativas de cada item foram obtidas pelo método de normalização de área.

#### **4.4.Preparo, formulação e caracterização das nanoemulsões**

Nanoemulsões óleo em água (O/A) foram preparadas de acordo com método adaptado descrito por Sugumar *et al.* (2014), utilizando uma abordagem de inversão de fase de baixa energia. A nanoemulsão é formulada com OEs, surfactantes não iônicos e água. Uma composição estável contendo OEs na faixa de 2%-5%, tensoativos ativos (Tween 20 e Tween 80) na faixa de 1%-3% e água destilada foi obtida através de planejamento fatorial, no total foram realizadas 156 formulações para cada óleo essencial (n=468).

A homogeneização final foi realizada mantendo a formulação com agitação constante a 6.000 rpm até a temperatura cair para 25°C ± 2°C (sonicação por 10 min). Para demonstrar estabilidade, a formulação foi submetida a diferentes testes de estresse: centrifugação, ciclos de aquecimento-resfriamento e pressão de congelamento-descongelamento de acordo com o método descrito por Shafiq *et al.* (2007).

As distribuições de tamanho de partícula e os índices de polidispersidade das nanoemulsões foram medidos usando um instrumento de dispersão de luz dinâmica (Zetasizer Nano ZS). Este instrumento determina o tamanho da partícula a partir das flutuações intensidade-tempo de um feixe de laser (632,8 nm) espalhado por uma amostra em um ângulo de 90°. Cada medição individual teve uma média de 13 execuções. Para evitar múltiplos efeitos de dispersão, as amostras foram diluídas com água destilada (1:100) antes das medições. As medições foram fornecidas regularmente: imediatamente após a síntese da emulsão e após 14, 21 e 28 dias de armazenamento.

#### **4.5. Atividade antioxidante dos óleos essenciais e nanoemulsões**

##### **4.5.1. Atividade antioxidante de eliminação de radicais DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)**

O método utilizado para determinar a capacidade antioxidante de OEs e nanoemulsões foi adaptado de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). 50 µL de soluções de óleo essencial e nanoemulsões foram misturadas com 950 µL de etanol e 2 mL de solução de radical DPPH para obter mL de etanol e depois homogeneizadas. A mistura foi deixada reagir no escuro durante 30 minutos. A absorvância das amostras foi registrada com espectrofotômetro UV-Vis a 517 nm. A eliminação do radical DPPH foi expressa em porcentagem, e a concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) capaz de impedir a eliminação de 50% foi expressa em µg/mL.

##### **4.5.2. Atividade antioxidante de eliminação de radicais ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)**

A determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS [ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] foi adaptado de Re *et al.* (1999). Com base nas concentrações de OEs e nanoemulsões (5-150 µg/mL), a mistura reacional foi preparada com cátion radical ABTS. Em ambiente escuro, uma alíquota de 30 µL contendo 3,0 ml de cátion radical ABTS foi transferida de cada concentração de amostra e homogeneizada em tubo agitador, e após 6 minutos a absorvância da mistura reacional foi lida junto com um espectrofotômetro. 760nm. Os testes foram realizados em triplicado. A eliminação do radical ABTS foi expressa em porcentagem e a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) capaz de impedir a eliminação de 50% foi expressa em µg/mL.

##### **4.5.3. Atividade sequestradora de radicais hidroxila**

A atividade sequestradora de radicais hidroxila dos OEs e NEOs foi realizada medindo-se os radicais hidroxila gerados a partir do sistema Fe<sup>3+</sup>/ascorbato/EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (KUNCHANDY&RAO, 1990). O ataque do radical hidroxila à desoxirribose leva à formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Concentrações dos OEs e NEOs de 5-150 µg/mL (em n-hexeno) foram adicionadas a uma mistura reacional contendo 3,0 mM de desoxirribose, 0,1 mM de FeCl<sub>3</sub>, 0,1 mM de EDTA, 0,1 mM de ácido ascórbico, 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tampão fosfato 20 mM (pH 7,4), em um volume final de 3,0 mL. A mistura reacional foi incubada a 37 °C por 1 h. Em seguida, 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA, 1%) e 1,0 ml de ácido tricloroacético (TCA, 2,8%) foram adicionados aos tubos de ensaio, onde foram incubados a 100 °C por 20 min. Após o resfriamento das misturas,

a absorbância foi medida a 532 nm. A atividade sequestradora de radicais hidroxila foi expressa em percentagem e a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) capaz de impedir a eliminação de 50% foi expressa em ug/mL.

#### **4.5.4. Atividade de inibição do radical superóxido**

A atividade de inibição do radical superóxido dos OEs e NEOS foi realizada a partir da geração do radical superóxido pelo sistema xantina/xantina oxidase, determinada espectrofotometricamente pelo monitoramento da produção de azul de nitrotetrazólio (NBT) (ROBAK; GRYGLEWSKI, 1988). Concentrações dos OEs e NOEs de 5-150 µg/mL (em n-hexeno) foram adicionadas a uma mistura reacional contendo 2 nM de xantina, 12 nM de NBT, 1,0 U mL<sup>-1</sup> de xantina oxidase e 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,4), perfazendo um volume final de 2,0 ml. Após a incubação da mistura a 25 °C por 10 min, a absorbância foi lida a 560 nm e comparada com as amostras controle nas quais a enzima não foi incluída.

#### **4.5.5. Atividade sequestradora de peróxido de hidrogênio**

A capacidade dos OEs e NEOS de sequestrar peróxido de hidrogênio foi determinada espectrofotometricamente como descrito por Ruch (1989). Para isto, uma solução de peróxido de hidrogênio (2 mM) foi preparada em tampão fosfato 0,17 M (pH 7,4). Várias concentrações das amostras (em metanol) foram adicionadas à mistura reacional contendo 2 mM de peróxido de hidrogênio. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi lida contra um branco a 230 nm.

#### **4.6. Atividade anticâncer**

As linhagens celulares de câncer humano utilizadas neste estudo foram: cólon (HT-29, HCT-15, SW-620, 502713), pulmão (A549, HOP-62, H-226), células cervicais (SiHa), células orais (KB) e próstata (DU-145), cultivadas e mantidas em meio RPMI-1640 (pH 7,4), enquanto MEM para neuroblastoma (IMR-32) e fígado (Hep-g-2) o meio foi suplementado com 10% de soro fetal de vitelo, glutamina (2 mM), penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As culturas celulares foram cultivadas numa incubadora de CO<sub>2</sub> (Heraeus, GmbH, Alemanha) a 37°C, 90% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> como descrito (SAMANTA *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2009).

Uma solução estoque de EOCC (10%, v/v) foi preparada em DMSO e as nanoemulsões foram diluídas serialmente em meio de cultura para obter a concentração desejada. A citotoxicidade em concentrações variando de 0,89 a 890 µg/mL foi determinada por um ensaio

semiautomático (SKEHAN, 1990) utilizando sulforodamina-B (SRB) como descrito anteriormente (SAMANTA *et al.*, 2005). As culturas de controle não tratadas receberam apenas veículo (DMSO, <0,1%). Os resultados são relatados como valores IC<sub>50</sub>.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CAPÍTULO I – ARTIGO CIENTÍFICO

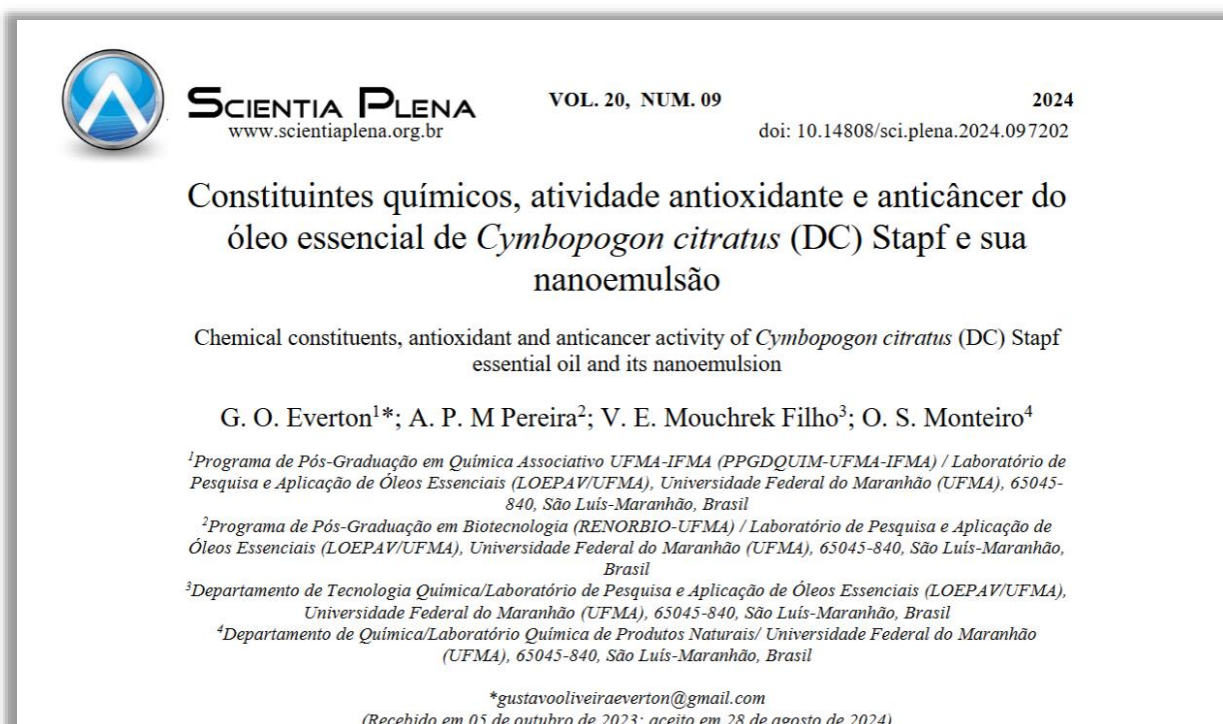
#### DADOS DE SUBMISSÃO:

**Nome do Periódico:** Scientia Plena

**Qualis CAPES (2017-2020):** A4

**Status:** PUBLICADO

**Título do artigo:** Constituintes químicos, atividade antioxidante e anticâncer do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e sua nanoemulsão



- O artigo mencionado encontra-se em sua forma integral submetida na próxima página.



## Constituintes químicos, atividade antioxidante e anticâncer do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e sua nanoemulsão

Chemical constituents, antioxidant and anticancer activity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf essential oil and its nanoemulsion

G. O. Everton<sup>1\*</sup>; A. P. M Pereira<sup>2</sup>; V. E. Mouchrek Filho<sup>3</sup>; O. S. Monteiro<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Química Associativo UFMA-IFMA (PPGDQUIM-UFMA-IFMA) / Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (LOEPAV/UFMA), Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 65045-840, São Luís-Maranhão, Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO-UFMA) / Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (LOEPAV/UFMA), Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 65045-840, São Luís-Maranhão, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Tecnologia Química/Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (LOEPAV/UFMA), Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 65045-840, São Luís-Maranhão, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Química/Laboratório Química de Produtos Naturais/ Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 65045-840, São Luís-Maranhão, Brasil

\*gustavooliveiraeverton@gmail.com

(Recebido em 05 de outubro de 2023; aceito em 28 de agosto de 2024)

Este artigo apresenta o efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (EOCC) e sua nanoemulsão na atividade antioxidante e anticâncer *in vitro*. As folhas de *C. citratus* foram coletadas no estado do Maranhão e seu óleo essencial foi extraído por hidrodestilação. Os compostos presentes no EOCC foram identificados e quantificados por CG-EM com detector de ionização de chama. A nanoemulsão do EOCC foi formulada por método de inversão de fases. A atividade antioxidante foi realizada para o EOCC e NEOCC pelos ensaios de eliminação de radicais ABTS e DPPH. A atividade anticâncer *in vitro* foi avaliada também para o EOCC e NEOCC frente a células de tecido: cólon, pulmão, fígado, colo do útero, próstata, oral e neuroblastoma. O rendimento obtido foi de 0,92%, sendo geranial e neral identificados como majoritários dessa composição através do ensaio de CG-EM. A nanoemulsão obtida foi estável com tamanho de gota de 57 nm, potencial zeta -21,15 mV, índice de polidispersão de 0,21 e pH 4,77. O EOCC e NEOCC apresentaram atividade antioxidante forte com IC<sub>50</sub> variando de 14,84 a 38,36 µg/mL. O EOCC e NEOCC apresentaram atividade citotóxica significativa frente a todas as linhagens celulares utilizadas no estudo, sendo os maiores efeitos frente a linhagem celular 502713 (cólon), IMR-32 (neuroblastoma), Hep-2 (fígado) e SiHa (colo do útero) com valores de IC<sub>50</sub> de 1,96; 2,20; 2,24 e 3,04 µg/mL, respectivamente. Estas descobertas sugerem que o EOCC e NEOCC podem ser alternativas para terapias inovadoras. Palavras-chave: bioatividade, células, geranial.

This article presents the effect of *Cymbopogon citratus* essential oil (EOCC) and its nanoemulsion on antioxidant and anticancer activity *in vitro*. The leaves of *C. citratus* were collected in the state of Maranhão and its essential oil was extracted by hydrodistillation. The compounds present in the EOCC were identified and quantified by GC-MS with flame ionization detector. The EOCC nanoemulsion was formulated by phase inversion method. The antioxidant activity was performed for EOCC and NEOCC by the ABTS and DPPH root elimination assays. The *in vitro* anticancer activity was also evaluated for EOCC and NEOCC against tissue cells: colon, lung, liver, cervix, prostate, oral and neuroblastoma. The yield obtained was 0.92%, being geranial and neral identified as the majority of this composition through the GC-MS assay. The nanoemulsion obtained was stable with droplet size of 57 nm, zeta potential -21.15 mV, polydispersity index of 0.21 and pH 4.77. The EOCC and NEOCC showed strong antioxidant activity with IC<sub>50</sub> ranging from 14.84 to 38.36 µg/mL. The EOCC and NEOCC showed significant cytotoxic activity against all cell lines used in the study, with the greatest effects against the cell line 502713 (colon), IMR-32 (neuroblastoma), Hep-2 (liver) and SiHa (cervix) with IC<sub>50</sub> values of 1.96; 2.20; 2.24 and 3.04 µg/mL, respectively. These findings suggest that EOCC and NEOCC may be alternatives to innovative therapies. Palavras-chave: bioactivity, cells, geranial.

## 1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é um campo emergente de pesquisa que floresceu recentemente no processamento de vários produtos alimentares humanos. Elas têm propriedades únicas, como tamanho em nanoescala, entrega direcionada e alta eficiência, que atraíram pesquisadores para explorá-las como nanomedicamentos [1]. Essa área lida com numerosos problemas relacionados com doenças e distúrbios à escala nanométrica, como o câncer [2], que contribui como a principal causa de morte em todo o mundo, entre os quais o câncer de pulmão é responsável por um quarto da taxa de mortalidade [3], sendo a taxa de sobrevivência de apenas cerca de 17,8% [4].

Em resposta a isso, ao longo das últimas décadas, esforços crescentes de pesquisa concentraram-se na investigação de nanoemulsões, bem como nos processos de formulação envolvidos na nanoemulsificação [5-7]. Uma nanoemulsão é uma dispersão coloidal de dois líquidos imiscíveis que é isotrópica e cineticamente estável devido à presença de um surfactante. Sua faixa de tamanho de gota de 20–200 nm indica aplicações industriais promissoras e excelente estabilidade por meses [8]. A baixa complexidade destes sistemas, bem como os seus procedimentos de formulação fáceis, o potencial de expansão industrial, a falta de toxicidade e as aplicações biomédicas ou nanomédicas promissoras são as principais razões para isto. Nanoemulsões são feitas de gotículas de óleo muito pequenas que são mantidas em ambientes aquosos por surfactantes [9].

Como destaque das formulações de nanopreparações estão os óleos essenciais (OEs) extraídos de espécies aromáticas. O foco está nos OEs extraídos das folhas de *Cymbopogon citratus*, que são úteis tanto na área alimentar quanto na área da saúde devido às suas diversas atividades biológicas (efeitos inibitórios e hipotensores de tumores, antioxidantes, hipolipidêmicos, estimuladores do sistema imunológico, antiateroscleróticos), e podem ser usados para tratar doenças hepáticas, doenças cardiovasculares e inflamação dos tecidos. Além disso, eles regulam os níveis de colesterol e açúcar no sangue. Estudos dão ênfase no potencial que pode fornecer essa espécie em uma variedade de benefícios à saúde [10]. Possui também propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas devido à presença de componentes citrais e geraniais [11].

O citral mostrou efeito antitumoral em linhagens celulares de câncer de mama, como MDA-MB-231 e MCF-7, neste caso com parada do ciclo da fase G2/M e indução de apoptose [12]; da mesma forma, foi um inibidor eficaz da aldeído desidrogenase 1A3 (ALDH1A3) e capaz de bloquear o crescimento do tumor de mama mediado por ALDH1A3, bloqueando potencialmente sua formação de colônias e atividade de regulação da expressão gênica [13], mas também inibiu o crescimento da mama 4T1 tumores em camundongos Balb / c, embora o geranial (citral A) tenha tido um efeito significativo em camundongos induzidos com linhagem celular 4T1 de câncer de mama [14]. Além disso, o citral apresentou atividade citotóxica em outros tipos de câncer, como a linhagem celular HepG2, células de câncer colorretal humano HCT116 e HT29, onde induziu apoptose mediada por mitocôndrias via aumento de ROS intracelulares, induziu a fosforilação da proteína p53 e a expressão Bax ao mesmo tempo que diminui a expressão de Bcl-2 e Bcl-xL, o que promoveu a clivagem da caspase-3 [15].

Desta forma, de acordo com os potenciais observados, este artigo teve por objetivo avaliar a composição química, atividade antioxidante e anticâncer *in vitro* do óleo essencial de *C. citratus* e sua nanoemulsão.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *Cymbopogon citratus* foram coletadas no Herbário do Maranhão da Universidade Federal do Maranhão, São Luís – MA, Brasil, em julho de 2022. O material vegetal foi identificado pelo Herbário do Maranhão (UFMA), sob o nº 12114, cadastro no SISBIO e transportados para o Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (LOEPAV/UFMA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

## 2.2 Extração dos óleos essenciais, análise GC-FID-MS e identificação de compostos bioativos

Para extração dos OEs foi utilizada a técnica de hidrodestilação com um extrator de Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo acondicionado em manta elétrica como fonte geradora de calor, utilizando-se água destilada como solvente (1:10). A hidrodestilação foi conduzida a 100°C por 2h30 recolhendo-se o OE extraído, sendo seco por percolação com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e centrifugado. As amostras serão armazenadas em vials de vidro âmbar sob refrigeração a 4°C e os ensaios realizados em triplicata.

A identificação dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) utilizando um instrumento modelo QP 2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) operando em uma coluna capilar de sílica fundida (30 m  $\times$  0,25 mm) e DB-5 fase ligada (espessura do filme, 0,25  $\mu\text{m}$ ). Hélio foi utilizado como gás de arraste com vazão de 1,0 ml min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e do detector foram 220 e 20 °C. O volume de injeção da amostra foi de 0,5  $\mu\text{L}$ , diluído com hexano (1%) e o split do volume de injeção (split) foi de 1:100. A rampa de temperatura iniciou em 60 °C e aumentou a uma taxa de 3 °C min<sup>-1</sup> até 20 °C, seguida por um aumento de 10 °C min<sup>-1</sup> até atingir 300 °C, e a temperatura final foi mantida por 7 min. A pressão da coluna foi de aproximadamente 71,0 kPa.

O espectrômetro de massa foi utilizado com potencial de ionização de 70 eV e temperatura da fonte de íons de 200 °C. A análise de massa foi realizada no modo de varredura completa, com intervalo de 5-500 Da, taxa de varredura de 1000 Da s<sup>-1</sup> e intervalo de varredura de 0,5 fragmentos s<sup>-1</sup>. Os dados foram coletados e processados utilizando o software Lab Solutions LC/GC Workstation 2.72 (Shimadzu, Kyoto, Japão). O índice de retenção dos compostos foi calculado para a série homóloga de n-alcenos (nC9-nC18) utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (1963) [16]. A identificação dos compostos foi feita comparando os índices de retenção calculados com os descritos por Adams (2017) [17]. Os espectros de massa obtidos também foram comparados com os espectros das bibliotecas FFNSC 1.2, NIST107 e NIST21. A análise quantitativa foi realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) utilizando instrumento modelo GC-2010 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), e as condições experimentais foram as mesmas da análise qualitativa, exceto pela temperatura do detector que era de 300°C. As porcentagens relativas de cada item foram obtidas pelo método de normalização de área.

## 2.3 Preparo e caracterização do tamanho de gota das nanoemulsões

Nanoemulsões óleo em água (O/A) foram preparadas de acordo com método adaptado descrito por Sugumar et al. (2014) [18], utilizando uma abordagem de inversão de fase de baixa energia. A nanoemulsão é formulada com OES, surfactantes não iônicos e água. Uma composição contendo OES na faixa de 2%-5%, tensoativos ativos (Tween 20 e Tween 80) na faixa de 1%-3% e água destilada. A homogeneização final foi realizada mantendo a formulação com agitação constante a 6.000 rpm até a temperatura cair para 25°C  $\pm$  2°C (sonicação por 10 min). Para demonstrar estabilidade, a formulação foi submetida a diferentes testes de estresse: centrifugação, ciclos de aquecimento-resfriamento e pressão de congelamento-descongelamento de acordo com o método descrito por Shafiq et al. (2007) [19]. As distribuições de tamanho de partícula e os índices de polidispersidade da nanoemulsão NEOCC foram medidos usando um instrumento de dispersão de luz dinâmica (Zetasizer Nano ZS). Este instrumento determina o tamanho da partícula a partir das flutuações intensidade-tempo de um feixe de laser (632,8 nm) espalhado por uma amostra em um ângulo de 90°. Cada medição individual teve uma média de 13 execuções. Para evitar múltiplos efeitos de dispersão, as amostras foram diluídas com água destilada (1:100) antes das medições. As medições foram fornecidas regularmente: imediatamente após a síntese da emulsão e após 14, 21 e 28 dias de armazenamento.

#### 2.4 Atividade antioxidante de eliminação de radicais DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

O método utilizado para determinar a capacidade antioxidante de OEs e nanoemulsões foi adaptado de Brand-Williams et al. (1995) [20]. 50  $\mu$ L de soluções de OE e nanoemulsões foram misturadas com 950  $\mu$ L de etanol e 3 mL de solução de radical DPPH. A mistura foi deixada reagir no escuro durante 30 minutos. A absorbância das amostras foi registrada com espectrofotômetro UV-Vis a 540 nm. A eliminação do radical DPPH foi expressa em porcentagem, e a concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) capaz de impedir a eliminação de 50% foi expressa em  $\mu$ g/mL.

#### 2.5 Atividade antioxidante de eliminação de radicais ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

A determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS [ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] foi adaptado de Re et al. (1999) [21]. Com base nas concentrações de OEs e nanoemulsões (5-150  $\mu$ g/mL), a mistura reacional foi preparada com cátion radical ABTS. Em ambiente escuro, uma alíquota de 30  $\mu$ L contendo 3,0 mL de cátion radical ABTS foi transferida de cada concentração de amostra e homogeneizada em tubo agitador, e após 6 minutos a absorbância da mistura reacional foi lida junto com um espectrofotômetro. 760 nm. Os testes foram realizados em triplicado. A eliminação do radical ABTS foi expressa em porcentagem e a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) capaz de impedir a eliminação de 50% foi expressa em  $\mu$ g/mL.

#### 2.6 Atividade anticâncer

As linhagens celulares de câncer humano utilizadas neste estudo foram: cólon (HT-29, HCT-15, SW-620, 502713), pulmão (A549, HOP-62, H-226), células cervicais (SiHa), células orais (KB), próstata (DU-145) e leucemia promielocítica (HL-60), cultivadas e mantidas em meio RPMI-1640 (pH 7,4), enquanto MEM para neuroblastoma (IMR-32) e fígado (Hep-g-2). O meio foi suplementado com 10% de soro fetal de vitelo, glutamina (2 mM), penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100  $\mu$ g/mL). As culturas celulares foram cultivadas numa incubadora de CO<sub>2</sub> (Heraeus, GmbH, Alemanha) a 37°C, 90% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> como descrito [22, 23].

Uma solução estoque de EOCC (10%, v/v) foi preparada em DMSO e as nanoemulsões foram diluídas serialmente em meio de cultura para obter a concentração desejada. A citotoxicidade em concentrações variando de 0,89 a 890  $\mu$ g/mL foi determinada por um ensaio semiautomático [24] utilizando sulforodamina-B (SRB) como descrito anteriormente por Samanta et al. (2005) [22]. As culturas de controle não tratadas receberam apenas veículo (DMSO, < 0,1%). Os resultados são relatados como valores IC<sub>50</sub>.

As células HL-60 foram incubadas com 22,2 e 44,5  $\mu$ g/mL (0,025 e 0,05  $\mu$ L/mL) de óleo e nanoemulsões durante 12 h, e a apoptose foi avaliada por microscopia óptica. As células foram centrifugadas em lâminas. Esfregaços secos ao ar foram fixados em metanol absoluto por um minuto e corados com corante Giemsa modificado. A porcentagem de células submetidas a apoptose foi determinada após caracterização de 200 células por lâmina usando critérios morfológicos padrão, como condensação da cromatina nuclear, vacuolização citoplasmática, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos [25].

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Extração do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e constituintes químicos

O óleo essencial de *C. citratus* (EOCC) extraído apresentou rendimento percentual de extração (% v/m) em  $0,92 \pm 0,08\%$  (v/v). Em contraste com o nosso estudo, Zaman et al. (2022) [26]



relataram rendimento de extração de 0,217% (v/m) de folhas frescas de *C. citratus* da Malasia. Anggraeni et al. (2018) [27] relataram um rendimento de 0,24% a partir de folhas de *C. citratus* de Cileles Jatinangor. Boukhatem et al. (2014) [28] relataram o rendimento de extração de 0,60% de folhas frescas de *C. citratus* cultivadas na Argélia. Já no estudo de Sawadogo et al. (2022) [29], o rendimento de extração de folhas frescas de *C. citratus* coletadas em Ouagadougou (Burkina Faso) pelo período matutino, foi de  $0,82 \pm 0,14\%$  (p/p). A quantidade total de óleo essencial obtido das folhas varia de 0,28 a 1,4% dependendo das condições de cultivo, sendo o maior rendimento de OE de capim-limão produzido (2,63%) obtido a partir de caules secos de capim-limão [30].

A Tabela 1 apresenta os constituintes químicos identificados no EOCC através das análises CG-FID-EM.

Tabela 1: Constituintes químicos identificados por CG-FID-EM no EOCC.

n	Constituintes químicos	Índice de retenção (experimental)	Índice de retenção (calculado)	Teor EOCC (%)	Teor NEOCC (%)
1	$\alpha$ - pineno	939	917	1,66	0,92
2	$\beta$ - pineno	943	932	0,18	0,59
3	1,3,4-trimetil-3-ciclohexenil-1-carboxialdeído	948	946	0,01	-
4	6-methyl-5-hepten-2-one	983	981	0,33	-
5	Myrcene	989	988	12,25	10,95
6	2-careno	1018	1002	0,55	0,16
7	p-cimeno	1033	1020	0,35	0,76
8	$\beta$ -ocimeno	1035	1032	0,17	0,58
9	4-isopropiltolueno	1042	1024	0,02	-
10	Linalool	1099	1095	1,42	0,95
11	citronelal	1125	1124	0,12	0,53
12	canfora	1146	1148	0,01	-
13	citronelol	1179	1175	0,37	0,78
14	cis-carveol	1206	1206	0,21	0,62
15	Neral	1238	1235	35,22	29,74
16	Geraniol	1251	1249	1,4	0,72
17	Geranial	1268	1264	43,66	50,25
18	terpineol	1282	1285	0,1	0,51
19	neryl acetato	1361	1366	0,8	0,52
20	geranil acetato	1379	1385	0,78	0,21
21	cariofileno	1494	1491	0,25	0,66
22	cariofileno óxido	1582	1576	0,14	0,55

Foram identificados 22 compostos no EOCC, sendo geranial e neral como compostos majoritários (Tabela 1). Os resultados da análise cromatográfica do EOCC confirmaram os dados obtidos por Madi et al. (2021) [31], que descreveram o citral como principal componente do EOCC. Corroborando a esta descoberta, Plata-Rueda et al. (2020) [32] avaliaram a composição química do EOCC cultivado em diferentes regiões do estado de Minas Gerais e identificaram o neral e o citral como os componentes mais abundantes. Assim como Alves et al. (2019) [33] ao encontrarem na composição principalmente neral (34,1%) e geranial (46,83%), que são isômeros citrais. Os dados obtidos no estudo de Valková et al. (2022) [34] sobre a composição química dos do EOCC revelaram também a presença de geranial (34,4%) e neral (27,1%) como compostos majoritários, correspondendo a 61,5% da composição por citral, estando em consonância com nosso estudo.

O citral é o composto mais encontrado no EOCC como observado nos estudos acima. Este, por sua vez, é um aldeído monoterpene, representado por uma mistura de isômeros trans e isômeros cis, chamados geranial e neral, respectivamente, a sua presença confere ao seu OE, aparência amarelo claro, com odor semelhante ao do limão [35]. As diferenças no rendimento e composição química são atribuídas a diferenças nos genótipos, localização geográfica, tempo de amostragem e condições ambientais, que podem causar variação no rendimento da extração [36].

### 3.2 Tamanho de gota, índice de polidispersão, potencial Zeta e pH da nanoemulsão

A Tabela 2 apresenta a caracterização da nanoemulsão do óleo essencial de *C. citratus* através dos dados de tamanho de gota, potencial zeta e índice de polidispersão.

Tabela 2: Caracterização da nanoemulsão do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

	NEOCC
Tamanho de gota (nm)	57,00 ± 0,25
Potencial zeta (mV)	-21,15 ± 0,01
Índice de Polidispersão	0,21 ± 0,02
pH	4,77 ± 0,51

As formulações apresentaram potencial zeta negativo e pH ácido. Valores de potencial Zeta diferentes de zero são necessários para evitar forças de repulsão entre as gotículas e o caráter negativo pode estar relacionado à presença do surfactante não iônico [37]. É amplamente assumido que valores de potencial zeta de -30 mV e acima caracterizam um sistema estável [38].

A carga superficial é frequentemente fornecida pelos surfactantes, especialmente os surfactantes naturais, como biopolímeros com atividade superficial como proteínas, polissacarídeos, que podem estabelecer interações intermoleculares eletrostáticas dependendo de sua concentração, pH e ponto isoelétrico, e força iônica da solução [39].

Quanto ao tamanho de gota, a nanoemulsão apresentou 57,00 ± 0,25 nm. Tamanhos de gota maiores foram relatados por Bezerra et al. (2023) [40], ao encontrarem um tamanho de 221,0 ± 1,3 nm. Gago et al. (2019) [41] a partir de emulsões grosseiras submetidas à microfluidização e na presença do surfactante Tween 80, obtiveram formulações de *C. citratus*, que alcançaram tamanho médio de gota variando de 14,38 ± 0,29 a 220,51 ± 26,84 nm, submetidas a diferentes concentrações, tempo e temperaturas, permanecendo abaixo de 100 nm, após 4 meses. Enquanto que Velho et al. (2021) [42], prepararam nanoemulsões a partir do óleo essencial de *C. citratus*, pelo método de alta energia e apresentaram tamanho de gotícula menor que 125 nm, índice de polidispersidade de 0,2, pH ácido e morfologia esférica.

A redução no tamanho das partículas depende da eficácia e funcionalidade do surfactante, promovendo assim a formulação de emulsões óleo em água. O índice de polidispersidade (PDI) serve como métrica para avaliar a uniformidade e consistência da distribuição do tamanho das gotas em nanoemulsões. Normalmente, o índice de polidispersidade (PDI) fica dentro do intervalo numérico de 0 a 1. O sistema de nanoemulsão exibiu uma distribuição de tamanho estreita e alta uniformidade, conforme indicado pelo PDI abaixo de 0,3. Quando o PDI excede um limite de 0,4, o sistema exibe uma ampla gama de tamanhos de partículas, aumentando assim a probabilidade de coalescência [43].

Os surfactantes não iônicos também podem fornecer estabilização estérica, particularmente polímeros não iônicos anfífilos, que podem formar filmes interfaciais volumosos em torno de gotículas capazes de impedir a coalescência. É vantajoso uma vez que são necessárias menos quantidades de surfactantes para estabilizar as gotículas. Por outro lado, em alguns casos, os surfactantes macromoleculares podem ter difusão lenta em direção à interface das gotículas devido ao seu tamanho e mobilidade molecular [44, 45].

As diferenças no tamanho das gotas observadas no presente trabalho e em outros estudos da nanoemulsão podem ser atribuídas à sua estrutura molecular, concentração de compostos voláteis,

tensão interfacial ou afinidade do surfactante com cada tipo de OE ou seus compostos principais, bem como o método de obtenção dessas formulações [46].

### 3.3 Análise da atividade antioxidante in vitro

Os compostos antioxidantes são essenciais para proteger e promover a saúde humana, protegendo o corpo dos radicais livres nocivos que contribuem para muitas doenças relacionadas com a idade. Observou-se que o EOCC e o NEOCC para todos os ensaios antioxidantes (ensaios DPPH e ABTS) seguiram um padrão dose-dependente (Figura 1).

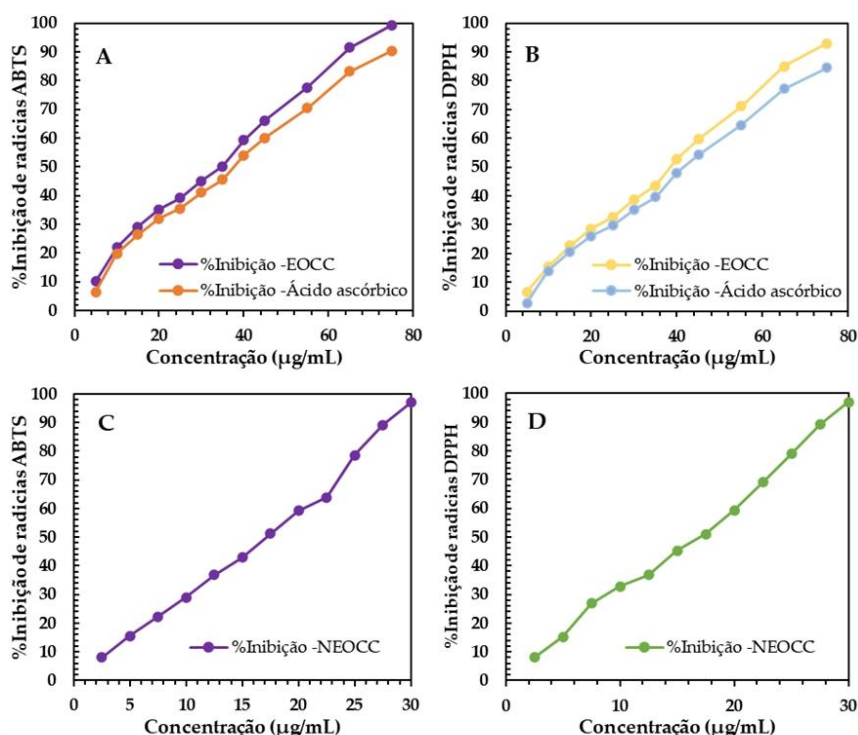


Figura 1: Atividade antioxidante dependente da concentração do EOCC usando ensaio de eliminação de radicais DPPH (A), atividade de eliminação de radicais ABTS (B), eliminação de radicais DPPH para NEOCC (C) e eliminação de radicais ABTS para NEOCC (D). O ácido ascórbico foi utilizado como controle em todos os ensaios.

A  $IC_{50}$  do EOCC foi de  $42,52 \pm 3,45$  µg/mL e  $37,53 \pm 2,22$  µg/mL, e para NEOCC foi de  $14,84 \pm 2,99$  µg/mL e  $16,01 \pm 3,14$  µg/mL para o ensaio DPPH e ABTS, respectivamente. Entre todos os ensaios antioxidantes, a NEOCC apresentou maior sensibilidade com o ensaio de eliminação de radicais ABTS em comparação com o ensaio DPPH. O ácido ascórbico apresentou valor de  $IC_{50}$  de  $38,36 \pm 3,88$  µg/mL e  $34,60 \pm 3,01$  µg/mL, pelos métodos DPPH e ABTS, respectivamente, conforme a Tabela 3.



Tabela 3: Metade da concentração inibitória máxima ( $IC_{50}$ ) do EOCC e NEOCC. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo.

Ensaio	Concentração Inibitória 50% ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	EOCC	NEOCC	Ácido ascórbico
ABTS	34,60 $\pm$ 3,01	14,84 $\pm$ 2,99	37,53 $\pm$ 2,22
DPPH	38,36 $\pm$ 3,88	16,01 $\pm$ 3,14	42,52 $\pm$ 3,45

Diferentemente do nosso estudo, Guerrini et al. (2023) [47] relataram baixa capacidade antioxidante do óleo essencial de *C. citratus* com ensaio DPPH com  $IC_{50}$  de 2,270 mg/mL e ABTS com  $IC_{50}$  de 4,322 mg/mL. Fatunmibi et al. (2023) [48] mostraram poder redutor significativo e atividade antioxidante no óleo essencial de *C. citratus* na concentração de 4 mg/mL que foi comparável ao ácido ascórbico de mesma concentração com DPPH (71,82  $\mu\text{g/mL}$ ), ensaio de poder antioxidante redutor de ferro (10208,16  $\mu\text{g/mL}$ ), ensaio de peroxidação lipídica (94,25  $\mu\text{g/mL}$ ) e atividade sequestradora de óxido nítrico (24,9  $\mu\text{g/mL}$ ). A atividade antioxidante observada para o EOCC pode ser devida à presença de compostos químicos identificados na CG-EM, segundo Kulisic et al. (2004) [49].

O metabolismo do oxigênio produz radicais livres, que estão associados ao aparecimento e progressão de doenças como câncer e doenças cardíacas. Em níveis elevados, esses radicais livres induzem estresse oxidativo potencialmente citotóxico, resultando na destruição de macromoléculas como DNA, proteínas e lipídios.

O elevado aumento da atividade antioxidante da nanoemulsão de *C. citratus* em relação ao seu óleo essencial pode ser atribuído a uma encapsulação mais seletiva e melhor dos compostos ativo Zanotto et al. (2023) [50]. Devido à distribuição parcial de partículas nanométricas, a atividade biológica das nanoemulsões é aprimorada pela excelente reatividade e transmissão suave das membranas externas das moléculas [51]. Os OEs são incorporados em sistemas de nanoemulsão e utilizados para aplicações como antioxidantes naturais apresentam-se como solução para reduzir os problemas relacionados à estabilidade oxidativa e para aumentar a atividade antioxidante do sistema [52].

### 3.4 Citotoxicidade in vitro contra linhagens celulares de câncer humano

O EOCC e NEOCC apresentaram atividade citotóxica significativa frente a todas as linhagens celulares utilizadas no estudo. O EOCC e NEOCC apresentaram maiores efeitos frente a linhagem celular 502713 (cólon), IMR-32 (neuroblastoma), Hep-2 (fígado) e SiHa (colo do útero) com valores de  $IC_{50}$  de 1,96; 2,20; 2,24 e 3,04  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, conforme a Tabela 4.

Tabela 4: Influência do EOCC e NEOCC na proliferação de várias linhas celulares de câncer humano.

Tecido	Linhagem celular	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		EOCC	NEOCC
Cólon	HT-29	19,81 $\pm$ 0,05	10,3 $\pm$ 0,03
	HCT-15	28,13 $\pm$ 0,07	14,6 $\pm$ 0,04
	SW-620	13,13 $\pm$ 0,03	6,8 $\pm$ 0,02
	502713	1,96 $\pm$ 0,01	1,0 $\pm$ 0,01
Pulmão	H-226	28,69 $\pm$ 0,07	14,9 $\pm$ 0,04
	A-549	23,22 $\pm$ 0,06	12,1 $\pm$ 0,03
	Hep-2	36,92 $\pm$ 0,09	19,2 $\pm$ 0,05
Fígado	Hep-2	2,24 $\pm$ 0,01	1,2 $\pm$ 0,02
Colo do útero	SiHa	3,04 $\pm$ 0,01	1,6 $\pm$ 0,01
Próstata	DU-145	19,35 $\pm$ 0,05	10,1 $\pm$ 0,03
Oral	KB	23,74 $\pm$ 0,06	12,3 $\pm$ 0,03
Neuroblastoma	IMR-32	2,20 $\pm$ 0,01	1,1 $\pm$ 0,02

Entre as linhagens celulares de câncer humano analisadas, o tratamento com EOCC e NEOCC mostrou uma inibição significativa do crescimento celular dependente da concentração. Os valores de  $IC_{50}$  para EOCC variaram de 1,96 a 36,92  $\mu\text{g/mL}$ , e dependendo da linhagem celular, os valores de  $IC_{50}$  variaram de 1,1 a 14,9  $\mu\text{g/mL}$  para a NEOCC. Isto sugere diferenças na sensibilidade das linhagens celulares de câncer às substâncias contidas nos EOCCs. Isto também pode ser devido às diferentes características moleculares destas células. Além disso, a citotoxicidade diferencial do EOCC contra diferentes linhagens celulares de câncer humano sugere que a sua utilização contra diferentes tipos de câncer pode produzir resultados positivos. Essas descobertas confirmam as de Pan et al. (2022) [53] e Chen et al. (2019) [54].

A incubação de células HL-60 com diferentes concentrações do EOCC e NEOCC durante 12h resultou num aumento dependente da dose no ensaio de quantificação de apoptose. A percentagem de apoptose em concentrações de 20,0 e 35,0  $\mu\text{g/mL}$  por esfregaços corados de células HL-60 foi de 17,2%; 38,49% para o EOCC e 21,5%; 41,22% para a NEOCC, respectivamente ( $p < 0,001$ ), conforme a Figura 2.

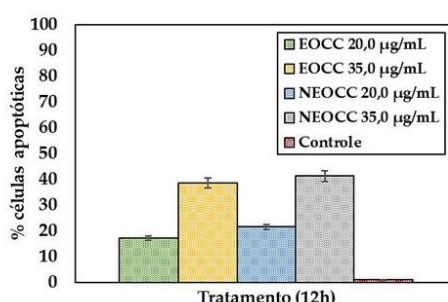


Figura 2: Efeito do EOCC e NEOCC no ensaio de quantificação de apoptose em células HL-60.

Os resultados mostram que o EOCC e NEOCC tem potente potencial citotóxico e anticancerígeno e induziu apoptose em células HL-60 *in vitro*. As culturas de controle não tratadas receberam apenas veículo (DMSO, <0,1%).

Correlacionando aos dados obtidos, os OEs de capim-limão apresentaram o maior potencial anticancerígeno contra HCT116 ( $IC_{50} = 77,413 \mu\text{g/mL}$ ) e inibiram efetivamente o crescimento da linhagem de células cancerígenas HCT116, apontado no estudo de Abdel-Gwad et al. (2022) [55].

Da mesma forma, o extrato etanoico de capim-limão foi relatado por Ruvinov et al. (2019) [56] com efeitos anticancerígenos em modelos de câncer colorretal, principalmente sua interação com FOLFOX e paclitaxel. Induz ainda a apoptose em células cancerígenas do cólon de uma forma dependente do tempo e da dose, sem danificar as células saudáveis *in vitro*. A administração oral do extrato foi bem tolerada e inibiu efetivamente o crescimento de xenoinxertos de câncer de cólon em camundongos. Aumentou a eficácia anticancerígena do FOLFOX e, curiosamente, inibiu a perda de peso associada ao FOLFOX em animais tratados com a combinação.

Diversos fatores intervêm na citotoxicidade dos OEs quando encapsulados em nanoemulsões, incluindo a composição dos OEs, o comportamento nas interfaces e na fase contínua dos emulsificantes, e os diferentes tipos de possíveis interações dos OEs com as células (por exemplo, entrega direta ou entrega mediada por micelas de surfactante ou emulsificante em direção às membranas celulares, interações eletrostáticas ou por afinidade de manchas carregadas de membrana com gotículas de nanoemulsão) [57].

Em alguns casos, o emulsificante/estabilizador pode ter um papel ativo na indução de um efeito citotóxico, como no caso dos polissorbatos (ou Tween) 20, 60 e 80. Em particular, surfactantes de baixo peso molecular, como os polissorbatos, podem causar uma redistribuição de junções proteicas que aumentam a permeabilidade extracelular na monocamada celular, promovendo um efeito sinérgico com OEs que podem penetrar melhor nas monocamadas celulares e, em última análise, resultar em vazamento do conteúdo citoplasmático [58].

A ação observada é atribuída ao citral, presente na composição química analisada. Este exibe efeitos antitumorais em diferentes linhagens de câncer [59-61] inibindo o crescimento celular [62]. Também foi relatado como bloqueador do ciclo celular (fase G2/M) e indutor de apoptose em células MCF-7. Além disso, houve inibição da atividade da ciclooxigenase-2 (COX-2) nas células tratadas com citral. A COX-2 desempenha um papel tanto na inflamação quanto no controle do crescimento celular, sendo um alvo importante para quimioprevenção ou terapia antiinflamatória [63].

A indução de apoptose em células tumorais tem sido a principal estratégia terapêutica para o tratamento de diversos tipos de câncer. Esta via de morte celular pode ser mediada pela via extrínseca (receptor de morte) ou pela via intrínseca (via mitocondrial), que em última análise promovem a ativação da via das caspases. Há um desequilíbrio entre os níveis de proteína anti-apoptose (Bcl-2 e Bcl-XL) e proteína pró-apoptótica (Bax, Bak e Bid) durante o processo apoptótico, com esta última formando heterodímeros na membrana externa da mitocôndria, permitindo assim que fatores apoptogênicos saiam do citosol, como citocromo c, fator indutor de apoptose (AIF) e Smac/DIABLO, enquanto outra consequência do aumento da permeabilidade é o colapso de  $\Delta\psi_m$ . A indução da apoptose pode ser caracterizada por vários marcadores bioquímicos, um dos quais é a externalização da fosfatidilserina, que é exportada para o meio extracelular da membrana plasmática durante a apoptose inicial [12].

#### 4. CONCLUSÃO

Em conclusão, observamos que o EOCC foi obtido com rendimento significativo. Os compostos presentes identificados estão descritos e confirmados na literatura para a espécie em estudo. A NEOCC apresentou efeito maior do que o EOCC individualmente, sendo sua caracterização afirmando sua estabilidade. A atividade antioxidante para o EOCC e NEOCC foi devidamente observada com efeitos ativos para ambos os casos, confirmando o princípio de dose-dependência. Por fim, os dados indicaram que o EOCC induziu citotoxicidade diferencial *in vitro* em 12 linhagens celulares de câncer humano, causou aumento dependente da dose na apoptose em células HL-60. Estas descobertas sugerem que o EOCC e NEOCC podem ser bons candidatos para terapias inovadoras.

#### 5. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA, ao Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais e a Universidade Federal do Maranhão.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Matteis V, Rinaldi R. Toxicity assessment in the nanoparticle era. *Adv Exp Med Biol*. 2018 Feb;1048:1-9. doi: 10.1007/978-3-319-72041-8\_1
2. Ovais M, Khalil AT, Raza A, Islam NU, Ayaz M, Saravanan M, et al. Multifunctional theranostic applications of biocompatible green-synthesized colloidal nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018 Mar;102:4393-408. doi: 10.1007/s00253-018-8928-2
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics CA-Cancer. *J Clin*. 2014 Jan-Feb;64(1):9-29. doi: 10.3322/caac.21208
4. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlader N, Horner MJ, et al. SEER cancer statistics review, 1975–2005. Bethesda (MD): NCI, 2999; 2008.
5. Hassan KA, Mujtaba MA. Antibacterial efficacy of garlic oil nano-emulsion. *AIMS Agric Food*. 2019 Mar;4(1):194-205. doi: 10.3934/agrfood.2019.1.194
6. Akram S, Anton N, Omran Z, Vandamme T. Water-in-oil nano-emulsions prepared by spontaneous emulsification: New insights on the formulation process. *Pharmaceutics*. 2021 Jul;13(7):1030. doi: 10.3390/pharmaceutics13071030

7. Rodrigues ABL, Martins RL, Rabelo EDM, Tomazi R, Santos LL, Brandão LB, et al. Development of nano-emulsions based on *Ayapana triplinervis* essential oil for the control of *Aedes aegypti* larvae. PloS one. 2021 Jul;16(7):e0254225. doi: 10.3390/pharmaceutics13071030
8. Barradas TN, de Holanda e Silva KG. Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review. Environm Chem Lett. 2021 Nov;19(2):1153-71. doi: 10.1007/s10311-020-01142-2
9. Anton N, Saulnier P. Adhesive water-in-oil nano-emulsions generated by the phase inversion temperature method. Soft Matter. 2013 May;9(28):6465-74. doi: 10.1039/C3SM51064F
10. Balakrishnan B, Paramasivam S, Arulkumar A. Evaluation of the lemongrass plant (*Cymbopogon citratus*) extracted in different solvents for antioxidant and antibacterial activity against human pathogens. Asian Pacific J Trop Dis. 2014 Feb;4(1):S134-9. doi: 10.1016/S2222-1808(14)60428-X
11. Zielińska A, Martins-Gomes C, Ferreira NR, Silva AM, Nowak I, Souto EB. Anti-inflammatory and anti-cancer activity of citral: Optimization of citral-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) using experimental factorial design and LUMiSizer®. Int J Pharm. 2018 Dec;553(1-2):428-40. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.065
12. Chaouki W, Leger DY, Liagre B, Beneytout JL, Hmamouchi M. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. Fundam Clin Pharmacol. 2009 Sep;23(5):549-56. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00738.x
13. Thomas ML, Antueno R, Coyle KM, Sultan M, Cruickshank BM, Giacomantonio MA, et al. Citral reduces breast tumor growth by inhibiting the cancer stem cell marker ALDH1A3. Mol Oncol. 2016 Nov;10(9):1485-96. doi: 10.1016/j.molonc.2016.08.004
14. Nordin N, Yeap SK, Rahman HS, Zambari NR, Abu N, Mohamad NE, et al. In vitro cytotoxicity and anticancer effects of citral nanostructured lipid carrier on MDA MBA-231 human breast cancer cells. Sci Rep. 2019 Feb;9(1):1614. doi: 10.1038/s41598-018-38214-x
15. Sheikh BY, Sarker MMR, Kamarudin MNA, Mohan G. Antiproliferative and apoptosis inducing effects of citral via p53 and ROS-induced mitochondrial-mediated apoptosis in human colorectal HCT116 and HT29 cell lines. Biomed Pharmacother. 2017 Dec;96:834-46. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.038
16. Van den Dool HA, Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J Chromatogr. A. 1963 Dec;11:463-47. doi: 10.1016/S0021-9673(01)80947-X
17. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. Gruver (US): Texensis Publishing; 2017.
18. Sugumar S, Clarke SK, Nirmala MJ, Tyagi BK, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. Bull Entomol Res. 2014 Jun;104(3):393-402. doi: 10.1017/S0007485313000710
19. Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK, Ali M. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. Eur. J Pharm Biopharm. 2007 May 1;66(2):227-43. doi: 10.1016/j.ejpb.2006.10.014
20. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT. 1995 Jan;28(1):25-30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5
21. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. FRBM. 1999 Jun;26(9-10):1231-7. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
22. Samanta S, Pain A, Dutta S, Saxena AK, Shanmugavel M, Pandita RM, et al. Antitumor activity of Nitronaphthal-NU, a novel mixed-function agent. JETO. 2005 Mar;5(1):15-22. doi: 16416597/pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
23. Sharma PR, Mondhe DM, Muthiah S, Pal HC, Shahi AK, Saxena AK, et al. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. Chem Biol Interact. 2009 May;179(2-3):160-8. doi: 10.1016/j.cbi.2008.12.004
24. Shekan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McHahon J, Vis-Tica D, et al. New colometric assay for anticancer drug screening. J Nat Cancer Inst. 1990 Jul;82(13):107-12. doi: 10.1093/jnci/82.13.1107
25. Washo-Stultz D, Crowley-Weber CL, Dvorakova K, Bernstein C, Bernstein H, Kunke K, et al. Role of mitochondrial complexes I and II, reactive oxygen species and arachidonic acid metabolism in deoxycholate-induced apoptosis. Cancer Lett. 2002 Mar;177(2):129-44. doi: 10.1016/S0304-3835(01)00786-8
26. Zaman FQ, Jaffel K, Abdelmageed AH. The effects of post-harvest drying period on the yield and chemical composition of leaf essential oil from *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Essent. Oil-Bear Plants. 2022 May;25(3):571-80. doi: 10.1080/0972060X.2022.2084349

27. Anggraeni NI, Hidayat IW, Rachman SD, Ersanda E. Bioactivity of essential oil from lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) as antioxidant agent. InAIP. 2018 Feb;1927(1):0300071-5. doi: 10.1063/1.5021200
28. Boukhatem MN, Ferhat MA, Kameli A, Saidi F, Kebir HT. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. LJM. 2014 Oct;9(1):1-10. doi: 10.3402/ljm.v9.25431
29. Sawadogo I, Paré A, Kaboré D, Montet D, Durand N, Bouajila J, et al. Antifungal and antiaflatoxinogenic effects of *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, and *Cymbopogon schoenanthus* essential oils alone and in combination. J Fungi. 2022 Jan;8(2):117. doi: 10.3390/jof8020117
30. Kiełtyka-Dadasiewicz A, Esteban J, Jabłońska-Trypuc A. Antiviral, antibacterial, antifungal, and anticancer activity of plant materials derived from *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf species. Pharmaceuticals. 2024 May;17(6):705. doi: 10.3390/ph17060705
31. Madi YF, Choucry MA, Meselhy MR, El-Kashoury ES. Essential oil of *Cymbopogon citratus* cultivated in Egypt: Seasonal variation in chemical composition and anticholinesterase activity. Nat Prod Res. 2021 Nov;35(21):4063-7. doi: 10.1080/14786419.2020.1713125
32. Plata-Rueda A, Martínez LC, da Silva Rolim G, Coelho RP, Santos MH, de Souza Tavares W, et al. Insecticidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoids (citral and geranyl acetate) against *Ulmoides dermestoides*. Crop Prot. 2020 Nov;137(1):105299. doi: 10.1016/j.cropro.2020.105299
33. Alves M, Campos IM, de Brito DD, Cardoso CM, Pontes EG, de Souza MA. Efficacy of lemongrass essential oil and citral in controlling *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae), a post-harvest cowpea insect pest. Crop Prot. 2019 May;119:191-6. doi: 10.1016/j.cropro.2019.02.007
34. Valková V, Ďuranová H, Galovičová L, Borotová P, Vukovic NL, Vukic M, et al. *Cymbopogon citratus* essential oil: Its application as an antimicrobial agent in food preservation. Agronomy. 2022 Jan;12(1):155. doi: 10.3390/agronomy12010155
35. Lalko J, API AM. Citral: Identifying a threshold for induction of dermal sensitization. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2008 Oct;52(1):62-73. doi: 10.1016/j.yrtph.2008.01.006
36. Kumar S, Yadav M, Yadav A, Yadav JP. Impact of spatial and climatic conditions on phytochemical diversity and *in vitro* antioxidant activity of Indian *Aloe vera* (L.) Burm. f. S Afr J Bot. 2017 Jul;111:50-9. doi: 10.1016/j.sajb.2017.03.012
37. Ferreira LM, Sari MH, Cervi VF, Gehrcke M, Barbieri AV, Zborowski VA, et al. Pomegranate seed oil nanoemulsions improve the photostability and *in vivo* antinociceptive effect of a non-steroidal anti-inflammatory drug. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2016 Aug;144:214-21. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.04.008
38. Jennings V, Lippacher A, Gohla SH. Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization. J Microencapsul. 2002 Jan;19(1):1-10. doi: 10.1080/713817583
39. Cardoso-Ugarte GA, López-Malo A, Jiménez-Munguía MT. Application of nanoemulsion technology for encapsulation and release of lipophilic bioactive compounds in food. In Emulsions. Academic Press. 2016 Jun; 227-55. doi: 10.1016/B978-0-12-804306-6.00007-6
40. Bezerra DC, Oliveira AE, Silva LE, Amaral W, Nascimento YM, Tavares JF, et al. Surfactant-free nano-emulsions from two lemongrass essential oils: Investigation of temperature ramp influence. Food Chem Adv. 2023 Nov;3:100537. doi: 10.1016/j.focha.2023.100537
41. Gago CML, Artiga-Artigas M, Antunes MDC, Faleiro ML, Miguel MG, Martín-Belloso, O. Effective ness of nanoemulsions of clove and lemongrass essential oils and their major components against *Escherichia coli* and *Botrytis cinerea*. JFST. 2019 Apr;56:2721-36. doi: 10.1007/s13197-019-03762-1
42. Velho MC, Cossetin LF, Godoi SND, Santos RCV, Gündel A, Monteiro SG, et al. Nanobiopesticides: Development and insecticidal activity of nanoemulsions containing lemongrass or eucalyptus oils. Nat Prod Res. 2021 Dec;35(24):6210-5. doi: 10.1080/14786419.2020.1837809
43. Pongsumpun P, Iwamoto S, Siripatrawan U. Response surface methodology for optimization of cinnamon essential oil nanoemulsion with improved stability and antifungal activity. Ultrasonics Sonochemistry. 2020 Jan;60:104604. doi: 10.1016/j.ultsonch.2019.05.021
44. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. Adv Colloid Interface Sci. 2004 May 20;108-109:303-18. doi: 10.1016/j.cis.2003.10.023
45. Qian C, McClements DJ. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. Food Hydrocoll. 2011 Jul;25(5):1000-8. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.09.017
46. Coelho JA, Rosa MF, Prochnau IS. Avaliação *in vitro* das propriedades farmacológicas do extrato metanólico das cascas da jabuticaba e obtenção de nanoemulsão. Open Science Research VIII. Editora Científica Digital. 2022;8:310-26.



47. Guerrini A, Tacchini M, Chiochio I, Grandini A, Radice M, Maresca I, et al. A comparative study on chemical compositions and biological activities of four amazonian ecuador essential oils: *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, (Poaceae), *Ocimum campechianum* Mill. (Lamiaceae), and *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). *Antibiotics*. 2023 Jan;12(1):177. doi: 10.3390/antibiotics12010177
48. Fatunmibi OO, Njoku IS, Asekun OT, Ogah JO. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil from the leaves of *Cymbopogon citratus*. *Am J Essent Oil*. 2023 Jul;1(1):27-33. doi: 10.58985/jpam.2023.v01i01.04
49. Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem*. 2004 May;85(4):633-40. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.07.024
50. Zanotto AW, Kanamaru MYS, Souza FG, Duarte MCT, Andrade CJ, Pastore GM. Enhanced antimicrobial and antioxidant capacity of *Thymus vulgaris*, *Lippia sidoides*, and *Cymbopogon citratus* emulsions when combined with mannosylerythritol a lipid biosurfactant. *Food Res Int*. 2023 Jan;163:112213. doi: 10.1016/j.foodres.2022.112213
51. Salvia-Trujillo L, Rojas-Grati A, Soliva-Fortuny R, Martin-Belloso O. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocoll*. 2015 Jan;43:547-56. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.07.012
52. Rashed MM, You L, Ghaleb AD, Du Y. Two-phase extraction processes, physicochemical characteristics, and autoxidation inhibition of the essential oil nanoemulsion of citrus reticulata blanco (tangerine) leaves. *Foods*. 2022 Dec;12(1):57. doi: 10.3390/foods12010057
53. Pan D, Machado L, Bica CG, Machado AK, Steffani JA, Cadoná FC. *In vitro* evaluation of antioxidant and anticancer activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). *Nutr Cancer*. 2022 Apr;74(4):1474-88. doi: 10.1080/01635581.2021.1952456
54. Chen Z, Ye X, Qingkui G, Wenliang Q, Wen Z, Ning W. Anticancer activity of green synthesised AgNPs from *Cymbopogon citratus* (LG) against lung carcinoma cell line A549. *IET Nanobiotechnol*. 2019 Apr;13(2):178-82. doi: 10.1049/iet-nbt.2018.5145
55. Abdel-Gwad NM, Mahmoud EA, Al-Askalany SA, Hanafy EA. Antioxidant, antibacterial and cytotoxic effect of *Cymbopogon citratus*, *Mentha longifolia*, and *Artemisia absinthium* essential oils. *Egypt J Chem*. 2022 Feb;65(2):287-96. doi: 10.21608/ejchem.2021.86171.4174
56. Ruvinov I, Nguyen C, Scaria B, Vegh C, Zaitoon O, Baskaran K, et al. Lemongrass extract possesses potent anticancer activity against human colon cancers, inhibits tumorigenesis, enhances efficacy of FOLFOX, and reduces its adverse effects. *Integr. Cancer Ther*. 2019 Jan-Dec;18:1-13. doi: 10.1177/1534735419889150
57. Donsi F, Ferrari G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *J Biotechnol*. 2016 Sep;233:106-20. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.005
58. Nirmala MJ, Durai L, Gopakumar V, Nagarajan R. Anticancer and antibacterial effects of a clove bud essential oil-based nanoscale emulsion system. *Int J Nanomedicine*. 2019 Aug;6439-50. doi: 10.2147/IJN.S211047
59. Bayala B, Bassole IH, Maqdas S, Baron S, Simpo J, Lobaccaro JMA. *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils have cytotoxic effects on tumor cell cultures. Identification of citral as a new putative anti-proliferative molecule. *Biochimie*. 2018 Oct;153:162-70. doi: 10.1016/j.biochi.2018.02.013
60. Yang C, Chen H, Chen H, Zhong B, Luo X, Chum J. Antioxidant and anticancer activities of essential oil from Gannan navel orange peel. *Molecules*. 2017 Aug;22(8):1391. doi: 10.3390/molecules22081391
61. Gaonkar R, Shiralgi Y, Lakkappa DB, Hegde G. Essential oil from *Cymbopogon flexuosus* as the potential inhibitor for HSP90. *Toxicol Rep*. 2018 Apr;5:489-96. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.03.014
62. Zielińska A, Martins-Gomes C, Ferreira NR, Silva AM, Nowak I, Souto EB. Anti-inflammatory and anti-cancer activity of citral: Optimization of citral-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) using experimental factorial design and LUMiSizer®. *Int J Pharm*. 2018 Dec;553(1-2):428-40. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.065
63. Sheikh BY, Sarker MMR, Kamarudin MNA, Mohan G. Antiproliferative and apoptosis inducing effects of citral via p53 and ROS-induced mitochondrial-mediated apoptosis in human colorectal HCT116 and HT29 cell lines. *Biomed Pharmacother*. 2017 Dec;96:834-46. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.038

## 5.2.CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO

### DADOS DE SUBMISSÃO:

**Nome do Periódico:** Ciência e Natura

**Qualis CAPES (2017-2020):** A3

**Status:** PUBLICADO

**Título do artigo:** Atividade anticancer e antidiabética do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, *Citrus limon* (L.) Burn. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e suas nanoemulsões



- O artigo mencionado foi SUBMETIDO no idioma inglês. Este encontra-se em sua forma integral na próxima página.



## Chemistry

### Anticancer activity of *Citrus limon* (L.) Burm. f. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil and their nanoemulsions

Atividade anticancer do óleo essencial de *Citrus limon* (L.) Burm. f. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e suas nanoemulsões

#### ABSTRACT

This article presents the chemical composition, antioxidant and anticancer activity in vitro of *Citrus sinensis* and *Citrus limon* essential oil and their nanoemulsions (NEOs). Leaves of *C. sinensis* and bark of *C. limon* were collected in the state of Maranhão and their essential oils were extracted by hydrodistillation. The compounds present in the EOs and NEOs were identified and quantified by GC-MS. The NEOs were formulated by the phase inversion method. The antioxidant activity was performed by the elimination assays of radicals ABTS, DPPH, superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl. The anticancer activity in vitro was evaluated against tissue cells: colon, lung, liver, cervix, prostate, oral and neuroblastoma. In the EO of *C. sinensis*, limonene was identified as the major compound and in the EO of *C. limon* also through the GC-MS assay. The NEOs of *C. sinensis* and *C. limon* obtained were stable, respectively, with droplet size of 69.12; 71.66 nm, zeta potential -20.11; -21.55 mV, polydispersion index of 0.26; 0.28 and pH 4.88; 4.12. EOs and NEOs showed strong antioxidant activity with IC<sub>50</sub> ranging from 6.23 to 159.02 µg/mL. They also showed significant cytotoxic activity against all cell lines used in the study, with the greatest effects against the cell line 502713 (colon), IMR-32 (neuroblastoma), Hep-2 (liver) and SiHa (cervix) with IC<sub>50</sub> values of 1.59; 1.75; 1.91 and 2.54 µg/mL, respectively. These findings suggest that the EOs and NEOs of *C. sinensis* and *C. limon* may be alternatives for innovative therapies.

**Keywords:** Cells; Chemical compounds; Free Radicals.

#### RESUMO

Este artigo apresenta a composição química, atividade antioxidante e anticâncer in vitro do óleo essencial de *Citrus sinensis* e *Citrus limon* e suas nanoemulsões (NOEs). Folhas de *C. sinensis* e cascas de *C. limon* foram coletadas no estado do Maranhão e seus óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação. Os compostos presentes nos OEs e NOEs foram identificados e quantificados por CG-EM. As NOEs foram formuladas por método de inversão de fases. A atividade antioxidante foi executada pelos ensaios de eliminação de radicais ABTS, DPPH, superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila. A atividade anticâncer in vitro foi avaliada frente a células de tecido: cólon, pulmão, fígado, colo do útero, próstata, oral e neuroblastoma. No OE de *C. sinensis* foi identificado o limoneno como composto majoritário e no OE de *C. limon* também através do ensaio de CG-EM. As NOEs de *C. sinensis* e *C. limon* obtidas foram estáveis, respectivamente, com tamanho de gota de 69,12; 71,66 nm, potencial zeta -20,11; -21,55 mV, índice de polidispersão de 0,26; 0,28 e pH 4,88; 4,12. Os OEs e NOEs apresentaram atividade antioxidante forte com IC<sub>50</sub> variando de 6,23 a 159,02 µg/mL. Eles também apresentaram atividade citotóxica significativa frente a todas as linhagens celulares utilizadas no estudo, sendo os maiores efeitos frente a linhagem celular 502713 (cólon), IMR-32 (neuroblastoma), Hep-2 (fígado) e SiHa (colo do útero) com valores de IC<sub>50</sub> de 1,59; 1,75; 1,91 e 2,54 µg/mL, respectivamente. Estas descobertas sugerem que os OEs e NOEs de *C. sinensis* e *C. limon* podem ser alternativas para terapias inovadoras.

**Palavras-chave:** Células; Compostos químicos; Radicais Livres.





## 1 INTRODUCTION

Cancer is the second leading cause of death worldwide, accounting for 9.6 million deaths in 2018, making it a significant health concern worldwide (Siegel *et al.*, 2020). As one of the world's deadliest diseases, cancer arises primarily from genetic mutations, which can be exacerbated by other carcinogens. These genetic and cancerous mutations disrupt cellular functions and metabolism, leading to uncontrolled replication and spread of cancer cells. Cancer cells grow and multiply rapidly, forming clumps that invade surrounding normal cells (Hassanpour *et al.*, 2017).

The primary goal of cancer treatment is to selectively target and kill tumor cells while sparing normal cells. To achieve this, researchers focus on increasing drug efficacy, improving target specificity, and reducing immunosuppression and drug resistance. Cancer treatments can be broadly categorized into two approaches: directly targeting tumor cells and targeting immune cells (Ju *et al.*, 2023).

Natural products of various terrestrial and marine microorganisms and macroorganisms continue to play a crucial role in drug discovery, including the development of new oncological agents. Notably, approximately 50% of the 175 small molecule anticancer drugs approved in Western medicine between 1940 and 2014 were derived directly from micro- and macroorganisms or synthesized from natural molecules (Newman & Cragg, 2016).

Phytochemical screening of plant species revealed important bioactive compounds that contribute to their therapeutic potential. Essential oils and flavonoids are among the most significant compounds, exhibiting pronounced therapeutic and pharmacological activities (Roriz *et al.*, 2014; Zannou *et al.*, 2015). Qualitative and quantitative analysis of these compounds can provide valuable insights into the therapeutic potency of the plant (Oladeji, Odelade, & Oloke, 2020). Frutas cítricas, incluindo laranjas doces e limões, têm atividade anticancerígena (Chidambara Murthy *et al.*, 2012).

Driven by consumer demand for their health benefits, refreshing aroma, and appealing taste (Vashisth and Kadyampakeni, 2020), citrus fruits are now cultivated in over 80 countries according to the Food and Agriculture Organization of the United Nations. The most prevalent variety is *Citrus sinensis* – the sweet orange – which accounts for about 70% of all citrus production (Favela-Hernández *et al.*, 2016). *Citrus limon*, the lemon, is third in terms of cultivation and is a common ingredient in both food

and beverages for flavoring, and also for its preservative qualities (Di Matteo *et al.*, 2021).

Naturally-derived antioxidants from plant sources offer significant health benefits by mitigating the damage caused by oxidative species (Guo *et al.*, 2020). While synthetic antioxidants were favored for a period due to their greater availability, lower cost, and improved stability and performance, the long-term consumption of these synthetic compounds has been associated with health concerns. These include an elevated risk of cancer, gastrointestinal issues, and skin allergies. Furthermore, the environmental impact of these synthetic chemicals remains poorly understood (Loureño *et al.*, 2019). As a result, the exploration of natural antioxidant sources has become a focus of considerable research.

This study offers a novel examination of the biotechnological profile of nanoemulsions formulated using the low-energy method with essential oils from *C. limon* and *C. sinensis*, focusing on their chemical and biological activities, including antioxidant and anticancer properties.

## 2 METHODOLOGY

### Collection and identification of plant material

Bark from *C. limon* and leaves from *C. sinensis* were collected in São Luís, MA, Brazil, during the morning shift in July 2022. All species were identified by the Herbarium of Maranhão (UFMA). The plant materials were then transported to the Laboratory for Research and Application of Essential Oils (LOEPAV/UFMA) at the Federal University of Maranhão (UFMA). Subsequently, they were crushed, and their mass was measured for yield calculations (Farmacopeia, 2019).

### Extraction of essential oils

Hydrodistillation was employed to extract the essential oil using a glass Clevenger extractor connected to a round-bottom flask, which was heated with an electric blanket. Distilled water was used as the solvent in a 1:10 ratio. The hydrodistillation was carried out at 100°C for 2 hours and 30 minutes. The extracted essential oil was then collected, dried using anhydrous sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) through percolation, and centrifuged. The samples will be stored in amber glass vials in a refrigerator at 4°C (Farmacopeia, 2019). Triplicate assays were conducted.

**GC-FID-MS analysis and identification of bioactive compounds**

Chemical constituents were identified using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) with a QP 2010 Plus instrument (Shimadzu, Kyoto, Japan) on a fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm) with a DB-5 phase (0.25 µm thickness). Helium served as carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. The injector and detector were set at 220°C and 20°C, respectively. The sample injection volume was 0.5 µL, diluted in hexane (1%), with a split ratio of 1:100. The temperature ramp started at 60°C, increasing 3°C/min to 20°C, then 10°C/min until reaching 300°C, held for 7 minutes. Column pressure was about 71.0 kPa.

The mass spectrometer operated at 70 eV ionization potential and 200°C ion source temperature. Mass analysis was conducted in full scan mode (5-500 Da) with a scan rate of 1000 Da/s and 0.5 fragments/s interval. Data were processed using Lab Solutions LC/GC Workstation 2.72 (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Retention indices for the compounds were calculated based on n-alkanes (nC9-nC18) using the Van den Dool and Kratz (1963) equation. Compound identification was based on calculated retention rates compared to literature values (Adams, 2017) and mass spectra compared with libraries FFNSC 1.2, NIST107, and NIST21.

Quantitative analysis was performed using Gas Chromatography with a Flame Ionization Detector (GC-FID) on a GC-2010 instrument (Shimadzu, Kyoto, Japan), maintaining the same conditions as the qualitative analysis, except for a detector temperature of 300°C. Relative percentages of each compound were determined by the area normalization method.

**Preparation and characterization of the droplet size of nanoemulsions**

Oil-in-water (O/W) nanoemulsions were prepared using an adapted method based on the work of Sugumar *et al.* (2014), Costa *et al.* (2014), and Rodrigues *et al.* (2014), employing a low-energy phase inversion technique. The formulations comprised essential oils (EOs), nonionic surfactants, and distilled water. A stable composition was achieved, containing EOs at concentrations of 2-5% and active surfactants (Tween 20 and Tween 80) at 1-3%, through a factorial design resulting in a total of 156 formulations for each essential oil.

Final homogenization was conducted under constant agitation at 6,000 rpm until the temperature decreased to 25°C ± 2°C (with sonication for 10 minutes). To assess



stability, the formulations underwent various stress tests, including centrifugation, thermal cycling, and freeze-thaw cycles, in accordance with the method established by Shafiq *et al.* (2007).

The particle size distributions and polydispersity indices of the nanoemulsions were analyzed using a dynamic light scattering instrument (Zetasizer Nano ZS). This device determines particle size by measuring intensity fluctuations of a 632.8 nm laser beam scattered at a 90° angle across the sample. Each measurement was an average of 13 individual runs. To minimize multiple scattering effects, samples were diluted with distilled water in a 1:100 ratio prior to analysis. Measurements were conducted at regular intervals: immediately following emulsion synthesis and again after 14, 21, and 28 days of storage.

#### **DPPH Radical Scavenging Antioxidant Activity (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)**

The method used to evaluate the antioxidant capacity of essential oils (EOs) and NEOs was adapted from the protocol established by Brand-Williams, Cuvelier and Berset (1995). Specifically, 50 µL of essential oil solutions and nanoemulsions were combined with 950 µL of ethanol and 2 mL of DPPH radical solution, resulting in a total volume of 3 mL. This mixture was homogenized and allowed to react in the dark for 30 minutes. The absorbance of the samples was subsequently measured using a UV-Vis spectrophotometer at 540 nm. The reduction of the DPPH radical was expressed as a percentage, and the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>), indicating the concentration required to inhibit 50% of the radical, was reported in µg/mL.

#### **ABTS Radical Scavenging Antioxidant Activity (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)**

The determination of antioxidant activity by the ABTS method [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] was adapted from Re *et al.* (1999). Based on the concentrations of EOs and NEOs (5-150 µg/mL), the reaction mixture was prepared with ABTS radical cation. In a dark environment, a 30 µL aliquot containing 3.0 mL of ABTS radical cation was transferred from each sample concentration and homogenized in a stirrer tube, and after 6 minutes the absorbance of the reaction mixture was read together with a spectrophotometer. 760nm. Tests were performed in triplicate. The elimination of the ABTS radical was expressed as a percentage and the inhibitory

concentration of 50% ( $IC_{50}$ ) capable of preventing the elimination of 50% was expressed in  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **Hydroxyl radical scavenging activity**

The hydroxyl radical scavenging activity of EOs and NEOs was performed by measuring the hydroxyl radicals generated from the  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbate/EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$  system (Kunchandy&Rao, 1990). The attack of the hydroxyl radical on deoxyribose leads to the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Ohkawa; Ohishi; Yagi, 1979). Concentrations of EOs and NOEs of 5-150  $\mu\text{g/mL}$  (in n-hexene) were added to a reaction mixture containing 3.0 mM deoxyribose, 0.1 mM  $\text{FeCl}_3$ , 0.1 mM EDTA, 0.1 mM ascorbic acid, 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 20 mM phosphate buffer (pH 7.4), in a final volume of 3.0 mL. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 1h. Then, 1 mL of thiobarbituric acid (TBA, 1%) and 1.0 mL of trichloroacetic acid (TCA, 2.8%) were added to the test tubes, where they were incubated at 100 °C for 20 min. After cooling the mixtures, absorbance was measured at 532 nm. The scavenging activity of hydroxyl radicals was expressed as a percentage and the inhibitory concentration of 50% ( $IC_{50}$ ) capable of preventing the elimination of 50% was expressed in  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **Superoxide radical inhibition activity**

The superoxide radical inhibition activity of EOs and NEOS was carried out from the generation of the superoxide radical by the xanthine/xanthine oxidase system, determined spectrophotometrically by monitoring the production of nitroterazolium blue (NBT) (Robak; Gryglewski, 1988). Concentrations of EOs and NOEs of 5-150  $\mu\text{g/mL}$  (in n-hexene) were added to a reaction mixture containing 2 nM xanthine, 12 nM NBT, 1.0  $\mu\text{g/mL}$  xanthine oxidase and 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), making a final volume of 2.0 mL. After incubation of the mixture at 25 °C for 10 min, the absorbance was read at 560 nm and compared with the control samples in which the enzyme was not included.

#### **Hydrogen peroxide scavenging activity**

The ability of EOs and NEOS to sequester hydrogen peroxide has been determined spectrophotometrically as described by Ruch (1989). For this, a hydrogen peroxide solution (2 mM) was prepared in 0.17 M phosphate buffer (pH 7.4). Various concentrations of the samples (in methanol) were added to the reaction mixture

containing 2 mM hydrogen peroxide. After 10 min of incubation at room temperature, the absorbance was read against a blank at 230 nm.

#### **Anticancer activity**

The human cancer cell lines used in this study were: colon (HT-29, HCT-15, SW-620, 502713), lung (A549, HOP-62, H-226), cervical cells (SiHa) and oral cells (KB), prostate (DU-145), cultured and maintained in RPMI-1640 medium (pH 7.4), while MEM for neuroblastoma (IMR-32) and liver (Hep-g-2). The medium was supplemented with 10% fetal calf serum, glutamine (2 mM), penicillin (100 units/mL) and streptomycin (100 µg/mL). Cell cultures were grown in a CO<sub>2</sub> incubator (Heraeus, GmbH, Germany) at 37°C, 90% moisture and 5% CO<sub>2</sub> as described (Samanta *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2009).

A stock solution of the essential oils (10%, v/v) was prepared in DMSO and the nanoemulsions were serially diluted in culture medium to obtain the desired concentration. Cytotoxicity at concentrations ranging from 0.89 to 890 µg/mL was determined by a semi-automated assay (Skehan, 1990) using sulforodamine-B (SRB) as previously described (Samanta *et al.*, 2005). Untreated control cultures received only vehicle (DMSO, <0.1%). Results are reported as IC<sub>50</sub> values.

### **3 RESULTS AND DISCUSSION**

Table 1 presents the chemical constituents identified by GC-FID-MS in the EO of *C. sinensis* and its nanoemulsion.

According to Table 1, 20 components were identified in the EO of *C. sinensis* and 15 components in its nanoemulsion. Significant amounts of monoterpene hydrocarbons were found in *C. sinensis* EO and its nanoemulsion. Limonene was obtained as the major component of the composition of the essential oil and its nanoemulsion.

Table 1 – Chemical constituents identified by GC-FID-MS in the essential oil of *C. sinensis* and its nanoemulsion.

n	Chemical constituents	Rlexp	Rlcalc	EO <i>C. sinensis</i> (%)	NEO <i>C. sinensis</i> (%)
1	$\alpha$ -Thujene	924	921	0,46	-
2	$\alpha$ -Pinene	930	932	1,18	0,89
3	Sabinene	971	973	0,91	0,59
4	$\beta$ -Myrcene	991	993	2,30	1,59
5	Octanal	1004	1006	0,76	0,74
6	Limonene	1007	1009	85,28	90,82
7	$\beta$ -Ocimene	1053	1051	0,68	0,66
8	$\gamma$ -Terpinene	1063	1065	1,63	1,61
9	Terpinolene	1089	1093	0,50	0,04
10	Linalool	1104	1106	1,34	1,32
11	Nonanal	1106	1110	0,50	0,01
12	Citronellal	1159	1159	0,48	0,34
13	$\alpha$ -Terpineol	1199	1203	0,49	0,14
14	Decanal	1208	1206	0,63	0,49
15	Neral	1244	1248	0,48	0,24
16	Geranial	1273	1271	0,53	0,51
17	Neryl acetate	1365	1367	0,44	-
18	$\alpha$ -Copaene	1377	1374	0,46	-
19	Dodecanal	1417	1419	0,45	-
20	Germacrene D	1482	1486	0,50	-

Note: Rlexp- Retention time experimental; Rlcalc; Retention time calculated; Source: Authorship (2025)

Similar to the results of Ferronato & Rossi (2018), who identified 12 components, the *C. sinensis* essential oil was found to be predominantly composed of limonene (91.4%), followed by  $\beta$ -myrcene (2.47%) and linalool (1.58%). Matuka *et al.* (2020) identified sabinene (20.4%), terpinen-4-ol (13.2%), linalool (7.6%), limonene (7.5%) and  $\delta$ -3-Carene (7.5%) as the most abundant components in essential oils collected in South Africa.

Kammoun *et al.* (2021) reported differing results, finding forty-seven compounds in their study. Their study suggests differences in essential oil composition, with results varying based on the *Citrus sinensis* cultivars used. The study noted that the main monoterpene hydrocarbons identified include sabinene (8.25%–28.81%), 2-carene (11.25%–16.72%), cis- $\beta$ -ocimene (10.22%–13.93%), d-limonene (6.52%–11.99%) and  $\gamma$ -terpinene (2%–4.54%). They found  $\beta$ -citronellal (0.28%–7.70%), terpinen-4-ol (2.99%–6.63%),  $\beta$ -myrcene (3.37–5.6%), and linalool (0.17–5.29%) as the main oxygenated monoterpenes.



Table 2 presents the chemical constituents identified by GC-FID-MS in the essential oil of *C. limon* and its nanoemulsion.

Table 2 – Chemical constituents identified by GC-FID-MS in the essential oil of *C. limon* and its nanoemulsion.

n	Chemical constituents	RI exp	RI calc	Content EO <i>C. limon</i> (%)	Content NEO <i>C. limon</i> (%)
1	$\alpha$ -Thujene	931	934	0,28	-
2	$\alpha$ -Pinene	938	941	0,76	-
3	Sabinene	973	976	0,35	-
4	$\beta$ -Pinene	980	983	5,90	3,22
5	Myrcene	993	996	1,06	1,41
6	$\alpha$ -Terpinene	1012	1015	0,33	-
7	Limonene	1032	1035	65,12	70,20
8	$\beta$ -Ocimene	1038	1036	0,25	0,60
9	$\gamma$ -Terpinene	1057	1055	19,17	17,11
10	Terpinolene	1086	1084	0,39	0,74
11	Linalool	1098	1096	0,31	0,66
12	Citronelal	1148	1146	0,32	0,67
13	Terpinen-4-ol	1178	1176	0,50	-
14	$\alpha$ -Terpineol	1189	1191	0,49	0,84
15	Citronellol	1229	1231	0,45	-
16	Nerol	1236	1238	0,29	0,64
17	Neral	1242	1244	0,43	0,78
18	Geraniol	1255	1257	0,31	0,66
19	Geranial	1275	1277	0,74	0,88
20	Perilla alcohol	1297	1299	0,35	-
21	Neryl acetate	1370	1372	1,49	0,90
22	Geranyl acetate	1388	1390	0,78	0,72

Note: R<sub>lexp</sub>- Retention time experimental; R<sub>lcalc</sub>; Retention time calculated; Source: Authorship (2025)

The composition of the *C. limon* essential oil and its nanoemulsion analyzed in this study contains only monoterpene hydrocarbons and oxygenated monoterpenes. In the composition of the essential oil and nanoemulsion, limonene was detected as the major component.

As shown in Table 2, 22 compounds were identified in the EO de *C. limon* and 15 compounds in this nanoemulsion. Chromatographic analysis of the EO of *C. limon* revealed limonene,  $\gamma$ -terpinene and  $\beta$ -pinene, confirming the data obtained by Benoudjit *et al.*, (2020), who also described limonene (64.75%),  $\gamma$ -terpinene (11.72%)



and  $\beta$ -pinene (11.24%) as the main components of the EO of *C. limon* grown in northern Algeria.

Jaradat *et al.* (2024) reported inconsistent findings when quantifying thirty-six molecules, representing 100% of the total oil. Their analysis revealed that geranial and neral, a mixture of cis and trans isomers of citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal), along with limonene in smaller quantities, constituted the majority of the chemical composition. Furthermore, oxygenated monoterpenoids and hydrocarbon monoterpenes were identified as the primary phytochemical groups in *C. limon*, accounting for 80.14% and 15.75%, respectively.

Table 3 presents the characterization of the essential oil nanoemulsion of *C. sinensis* and *C. limon*.

Table 3 – Characterization of the essential oil nanoemulsion of *C. sinensis* and *C. limon*.

	NEO <i>C. sinensis</i>	NEO <i>C. limon</i>
<b>Droplet size (nm)</b>	69,12 $\pm$ 0,22	71,66 $\pm$ 0,24
<b>Zeta potential (mV)</b>	-20,11 $\pm$ 0,02	-21,55 $\pm$ 0,02
<b>Polydispersion Index</b>	0,26 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,02
<b>pH</b>	4,88 $\pm$ 0,45	4,12 $\pm$ 0,48

Source: Authorship (2025)

The formulations showed stability for 30, 90 and 120 days, slightly negative zeta potential and acidic pH.

The nanoemulsions exhibited an average droplet size of 69.12 nm for *C. sinensis* and 71.66 nm for *C. limon*. The small droplet size observed likely resulted from the high surfactant content in the formulations, consistent with previous research showing that nanoemulsion droplet size decreases with a lower oil-to-surfactant ratio (Wang *et al.*, 2009; Saberi *et al.*, 2013; Gulotta *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017). Furthermore, the sonication process likely contributed significantly to these small droplet sizes, as it is known to reduce both droplet size and PDI (Donsì and Ferrari, 2016). Specifically, brief ultrasonication (e.g., 3 minutes) has been shown to substantially decrease droplet size (Lee *et al.*, 2019).

Non-zero Zeta potential values are required to avoid repulsion forces between droplets and the negative character may be related to the presence of the nonionic surfactant (Ferreira *et al.*, 2016). It is widely assumed that zeta potential values of -30 mV a + 30 mV characterize a stable system (Jenning *et al.*, 2002).

The nanoemulsions exhibited a negative surface charge, which is consistent with EO-based nanoemulsions prepared using nonionic surfactants. These surfactants are known to impart a negative charge, likely due to their influence on the dispersed phase surface (Acedo-Carrillo *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2014; Salvia-Trujillo *et al.*, 2015; Hashem *et al.*, 2018; Giunti *et al.*, 2019).

The affinity between the surfactant and the oil may also contribute, as the absorption of negative ions ( $-OH$ ) at the oil-water interface can vary, leading to differing zeta potentials (Zhao *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016; Salvia-Trujillo *et al.*, 2015). Consequently, the zeta potentials, like particle size, differed depending on the plant species used, as seen in the *C. sinensis* formulation.

Table 4 shows the antioxidant activity of essential oils and nanoemulsions of *C. limon* and *C. sinensis*.

Table 4 – Antioxidant activity

	Method	IC <sub>50</sub> µg/mL	IC <sub>90</sub> µg/mL	R <sup>2</sup>
<b>EO <i>C. sinensis</i></b>	ABTS	55.01	103.59	0.9999
	DPPH	60.99	109.95	0.9999
	Superoxide	19.43	36.53	0.9999
	Hydrogen peroxide	67.13	126.20	0.9997
	Hydroxyl	24.25	45.59	0.9999
<b>NEO <i>C. sinensis</i></b>	ABTS	17.63	33.20	0.9999
	DPPH	19.55	35.24	0.9999
	Superoxide	6.23	11.71	0.9999
	Hydrogen peroxide	21.52	40.45	0.9999
	Hydroxyl	7.77	14.61	0.9991
<b>EO <i>C. limon</i></b>	ABTS	69.32	130.52	0.9999
	DPPH	76.85	138.54	0.9999
	Superoxide	24.48	46.03	0.9999
	Hydrogen peroxide	84.58	159.02	0.9999
	Hydroxyl	30.55	57.44	0.9995
<b>NEO <i>C. limon</i></b>	ABTS	41.02	77.23	0.9999
	DPPH	45.47	81.97	0.9999
	Superoxide	14.49	27.23	0.9996
	Hydrogen peroxide	50.05	94.09	0.9999
	Hydroxyl	18.08	33.99	0.9999

Source: Authorship (2025)

Although all the samples studied showed a good reducing capacity, the nanoemulsions exhibited a higher sensitivity to all antioxidant assays. Mainly for the superoxide and hydroxyl radical scavenging assay, being 19.43 µg/mL and 24.25 µg/mL, respectively, for *C. sinensis* NEO, and 6.23 µg/mL and 7.77 µg/mL for NEO, *C. sinensis*. For *C. limon* EO at IC<sub>50</sub> of 19.43 µg/mL and 24.25 µg/mL, and for NEO *C. limon* at 14.49 µg/mL and 18.08 µg/mL for the superoxide and hydroxyl assay, respectively.

Unlike our study, Othman *et al.*, (2022) reported a low antioxidant capacity of *C. limon* essential oil with an IC<sub>50</sub> of 29.14 mg/mL for the DPPH assay. Farahmandfar *et al.*, (2019) also evaluated the oil from the fresh peels of *C. sinensis* and found an IC<sub>50</sub> of 7.86 mg/mL for the DPPH assay. According to Denkova-Kostova *et al.* (2021), these activities can be attributed to the beta-pinene and limonene present in the essential oil.

Table 5 presents the influence of essential oils and nanoemulsions under analysis in this study on the proliferation of several human cancer cell lines.

Table 5 – Influence of essential oils and nanoemulsions on the proliferation of various human cancer cell lines.

Tissue/ Cell Line	IC <sub>50</sub> µg/mL <i>C. sinensis</i>		IC <sub>50</sub> µg/mL <i>C. limon</i>	
	OE	NEO	OE	NEO
Colon HT-29	31.48±0.04	16.38±0.02	48.28±0.09	25.11±0.07
Colon HCT-15	44.73±0.06	23.21±0.03	68.59±0.11	35.60±0.08
Colon SW-620	20.88±0.02	10.81±0.01	32.01±0.07	16.58±0.06
Colon 502713	3.12±0.01	1.59±0.01	4.78±0.01	2.44±0.01
Colon H-226	45.62±0.06	23.69±0.03	69.95±0.11	36.33±0.08
Lung A-549	36.92±0.05	19.24±0.02	56.62±0.10	29.50±0.07
Lung Hop-62	58.70±0.08	30.53±0.04	90.02±0.13	46.82±0.09
Liver Hep-2	3.56±0.01	1.91±0.01	5.46±0.06	2.93±0.06
Cervix SiHa	4.83±0.01	2.54±0.01	7.41±0.01	3.90±0.01
Prostate DU-145	30.77±0.04	16.06±0.02	47.18±0.09	24.63±0.07
Oral KB	37.75±0.05	19.56±0.02	57.89±0.10	29.99±0.07
Neuroblastoma IMR-32	3.50±0.01	1.75±0.01	5.36±0.06	2.68±0.06

Source: Authorship (2025)

Among the human cancer cell lines analyzed, treatment showed a significant concentration-dependent inhibition of cell growth. The IC<sub>50</sub> values for EOs and NEOs ranged from 1.59 to 69.95 µg/mL.

The observed carcinogenic activity is attributed to the presence of limonene, as it is a key molecule in the activation of the apoptotic pathway in the tumor animal model and tumor cell lines (JIA *et al.*, 2013; HAFIDH *et al.*, 2018; YE *et al.*, 2020). These results help establish limonene as a potent pro-apoptotic agent, making it an important therapeutic target.

Oral administration of limonene in humans is well tolerated at a low dose (lethal dose is estimated to be 0.5-5 g/kg) (VIGUSHIN *et al.*, 1998) supporting its investigation as a potential bioactive for cancer prevention at pharmacological doses, despite a risk of metabolite allergy (MUKHTAR *et al.*, 2018). Limonene has been shown to interfere with apoptosis pathways, cell cycle/proliferation, angiogenesis, and DNA damage repair (HAFIDH *et al.*, 2018), suggesting a pleiotropic pharmacological activity targeting several signaling pathways.

#### 4 CONCLUSIONS

In conclusion, the compounds identified are described and confirmed in the literature for the species under study. The NEOs showed a greater effect than their individual EOs, and their characterization affirmed their stability. Antioxidant activity was duly observed with active effects for both cases. Finally, the data indicated induced differential cytotoxicity in vitro in 12 human cancer cell lines. These findings suggest that EOs and NEOs of *C. sinensis* and *C. limon* may be strong alternatives for innovative therapies.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Federal University of Maranhão, the Laboratory for Research and Application of Essential Oils (LOEPAV/UFMA) and FAPEMA.

#### REFERENCES

- Acedo-Carrillo, J. I., Rosas-Durazo, A., Herrera-Urbina, R., Rinaudo, M., Goycoolea, F. M., & Valdez, M. A. (2006). Zeta potential and drop growth of oil in water emulsions stabilized with mesquite gum. *Carbohydrate Polymers*, 65(3), 327-336.
- Adams, R. P. (2017). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. *Gruver, TX USA: Texensis Publishing*.



Benoudjit, F., Maameri, L., & Ouared, K. (2020). Evaluation of the quality and composition of lemon (*Citrus limon*) peel essential oil from an Algerian fruit juice industry. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*, 6(4).

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2013). Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(37), 8906-8913.

Costa I. C., Rodrigues R. F., Almeida F. B., Favacho H. A., Falcão D. Q., Ferreira A. M., Vilhena J. C. E., Florentino A. C., Carvalho J. C. T., & Fernandes C. P. (2014). Development of jojoba oil (*Simmondsia chinensis* (Link) CK Schneid.) based nanoemulsions. *Lat. Am. J. Pharm*, 33(3), 459-63.

Denkova-Kostova, R., Teneva, D., Tomova, T., Goranov, B., Denkova, Z., Shopska, V., ... & Hristova-Ivanova, Y. (2021). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.), lemon (*Citrus lemon* L.) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 76(5-6), 175-185.

Di Matteo, A., Simeone, G. D. R., Cirillo, A., Rao, M. A., & Di Vaio, C. (2021). Morphological characteristics, ascorbic acid and antioxidant activity during fruit ripening of four lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 276, 109741.

Donsì, F., & Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of biotechnology*, 233, 106-120.

Farhat, I., Hammami, M., Cherif, M., & Nasraoui, B. (2020). Chemometric analysis of geographic origins and compositions of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var 'Maltaise demi sanguine' essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 32(3), 216-226.

Farmacopeia, C. (2019). *Farmacopeia Brasileira: volume 1: 6ª edição*.

Favela-Hernández, J. M. J., González-Santiago, O., Ramírez-Cabrera, M. A., Esquivel-Ferriño, P. C., & Camacho-Corona, M. D. R. (2016). Chemistry and pharmacology of *Citrus sinensis*. *Molecules*, 21(2), 247.

Fernandes, C. P., de Almeida, F. B., Silveira, A. N., Gonzalez, M. S., Mello, C. B., Feder, D., ... & Falcão, D. Q. (2014). Development of an insecticidal nanoemulsion with *Manilkara subsericea* (Sapotaceae) extract. *Journal of Nanobiotechnology*, 12, 1-9.

Ferreira, L. M., Sari, M. H. M., Cervi, V. F., Gehrcke, M., Barbieri, A. V., Zborowski, V. A., ... & Cruz, L. (2016). Pomegranate seed oil nanoemulsions improve the photostability and in vivo antinociceptive effect of a non-steroidal anti-inflammatory drug. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 144, 214-221.

- Giunti, G., Palermo, D., Laudani, F., Algeri, G. M., Campolo, O., & Palmeri, V. (2019). Repellence and acute toxicity of a nano-emulsion of sweet orange essential oil toward two major stored grain insect pests. *Industrial Crops and Products*, 142, 111869.
- Gulotta, A., Saberli, A. H., Nicoli, M. C., & McClements, D. J. (2014). Nanoemulsion-based delivery systems for polyunsaturated ( $\omega$ -3) oils: formation using a spontaneous emulsification method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(7), 1720-1725.
- Guo, C., Shan, Y., Yang, Z., Zhang, L., Ling, W., Liang, Y., ... & Zhang, J. (2020). Chemical composition, antioxidant, antibacterial, and tyrosinase inhibition activity of extracts from Newhall navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Newhall) peel. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2664-2674.
- Hafidh, R. R., Hussein, S. Z., MalAllah, M. Q., Abdulmir, A. S., & Abu Bakar, F. (2018). A high-throughput quantitative expression analysis of cancer-related genes in human HepG2 cells in response to limonene, a potential anticancer agent. *Current cancer drug targets*, 18(8), 807-815.
- Hashem, A. S., Awadalla, S. S., Zayed, G. M., Maggi, F., & Benelli, G. (2018). Pimpinella anisum essential oil nanoemulsions against *Tribolium castaneum*—insecticidal activity and mode of action. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 18802-18812.
- Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of cancer research and practice*, 4(4), 127-129.
- Jaradat, N., Hawash, M., Abualhasan, M., Al-Maharik, N., Qadi, M., Qabaha, R., ... & Sattarov, A. (2024). Chemical analysis and bioactivity evaluation of citrus limon leaves volatile oil from palestine: investigating phytochemical, anti-inflammatory, antimicrobial, and cytotoxic properties. *Journal of Herbal Medicine*, 48, 100954.
- Jenning, V., Lippacher, A., & Gohla, S. H. (2002). Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization. *Journal of microencapsulation*, 19(1), 1-10.
- Jia, S. S., Xi, G. P., Zhang, M., Chen, Y. B., Lei, B. O., Dong, X. S., & Yang, Y. M. (2013). Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells. *Oncology reports*, 29(1), 349-354.
- Ju, H., Yu, C., Zhang, X. D., Liu, W., Wu, Y. C., Gong, P. X., ... & Li, H. J. (2023). Recent trends in anti-cancer activities of terrestrial plants-based polysaccharides: A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 100341.
- Kammoun, A. K., Altyar, A. E., & Gad, H. A. (2021). Comparative metabolic study of *Citrus sinensis* leaves cultivars based on GC-MS and their cytotoxic activity. *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis*, 198, 113991.
- Kunchandy, E., & Rao, M. N. A. (1990). Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International journal of pharmaceutics*, 58(3), 237-240.
- Lee, J. Y., Garcia, C. V., Shin, G. H., & Kim, J. T. (2019). Antibacterial and antioxidant properties of hydroxypropyl methylcellulose-based active composite films incorporating oregano essential oil nanoemulsions. *Lwt*, 106, 164-171.

Li, J., Chang, J. W., Saenger, M., & Deering, A. (2017). Thymol nanoemulsions formed via spontaneous emulsification: Physical and antimicrobial properties. *Food chemistry*, 232, 191-197.

Li, X., Qin, Y., Liu, C., Jiang, S., Xiong, L., & Sun, Q. (2016). Size-controlled starch nanoparticles prepared by self-assembly with different green surfactant: The effect of electrostatic repulsion or steric hindrance. *Food chemistry*, 199, 356-363.

Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*, 24(22), 4132.

Manzur, M., Luciardi, M. C., Blázquez, M. A., Alberto, M. R., Cartagena, E., & Arena, M. E. (2023). Citrus sinensis essential oils an innovative antioxidant and antipathogenic dual strategy in food preservation against spoilage bacteria. *Antioxidants*, 12(2), 246.

Martins, S., Tho, I., Souto, E., Ferreira, D., & Brandl, M. (2012). Multivariate design for the evaluation of lipid and surfactant composition effect for optimisation of lipid nanoparticles. *European journal of pharmaceutical sciences*, 45(5), 613-623.

Matuka, T., Oyediji, O., Gondwe, M., & Oyediji, A. (2020). Chemical composition and in vivo anti-inflammatory activity of essential oils from Citrus sinensis (L.) osbeck growing in South Africa. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(4), 638-647.

Mukhtar, Y. M., Adu-Frimpong, M., Xu, X., & Yu, J. (2018). Biochemical significance of limonene and its metabolites: future prospects for designing and developing highly potent anticancer drugs. *Bioscience Reports*, 38(6), BSR20181253.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, 79(3), 629-661.

Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.

Oladeji, O. S., Odelade, K. A., & Oloke, J. K. (2020). Phytochemical screening and antimicrobial investigation of Moringa oleifera leaf extracts. *African Journal of Science, Technology, Innovation and Development*, 12(1), 79-84.

Othman, H. I. A., Alkatib, H. H., Zaid, A., Sasidharan, S., Rahiman, S. S. F., Lee, T. P., ... & Wong, Y. F. (2022). Phytochemical composition, antioxidant and antiproliferative activities of Citrus hystrix, Citrus limon, Citrus pyriformis, and Citrus microcarpa leaf essential oils against human cervical cancer cell line. *Plants*, 12(1), 134.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Robak, J., & Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical pharmacology*, 37(5), 837-841.



Rodrigues, E. D. C., Ferreira, A. M., Vilhena, J. C., Almeida, F. B., Cruz, R. A., Florentino, A. C., ... & Fernandes, C. P. (2014). Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, 699-705.

Roriz, C. L., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2014). *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. *Food research international*, 62, 684-693.

Ruch, R. J., Cheng, S. J., & Klaunig, J. E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10(6), 1003-1008.

Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D. J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of colloid and interface science*, 391, 95-102.

Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2015). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food hydrocolloids*, 43, 547-556.

Samanta, S., Pain, A., Dutta, S., Saxena, A. K., Shanmugavel, M., Pandita, R. M., ... & Sanyal, U. (2005). Antitumor activity of Nitronaphthal-NU, a novel mixed-function agent. *Journal of Experimental Therapeutics & Oncology*, 5(1).

Shafiq, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ahmad, F. J., Khar, R. K., & Ali, M. (2007). Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 66(2), 227-243.

Sharma, P. R., Mondhe, D. M., Muthiah, S., Pal, H. C., Shahi, A. K., Saxena, A. K., & Qazi, G. N. (2009). Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *Chemico-biological interactions*, 179(2-3), 160-168.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., ... & Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107-1112.

Sugumar, S., Clarke, S. K., Nirmala, M. J., Tyagi, B. K., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2014). Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. *Bulletin of entomological research*, 104(3), 393-402.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.

Van Den Dool, H. A. N. D., & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of chromatography*.

Vashisth, T., & Kadyampakeni, D. (2020). Diagnosis and management of nutrient constraints in citrus. In *Fruit crops* (pp. 723-737). Elsevier.



Vigushin, D. M., Poon, G. K., Boddy, A., English, J., Halbert, G. W., Pagonis, C., ... & Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. (1998). Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 42, 111-117.

Wang, L., Dong, J., Chen, J., Eastoe, J., & Li, X. (2009). Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. *Journal of colloid and interface science*, 330(2), 443-448.

Wang, L., Dong, J., Chen, J., Eastoe, J., & Li, X. (2009). Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. *Journal of colloid and interface science*, 330(2), 443-448.

Ye, Z., Liang, Z., Mi, Q., & Guo, Y. (2020). Limonene terpenoid obstructs human bladder cancer cell (T24 cell line) growth by inducing cellular apoptosis, caspase activation, G2/M phase cell cycle arrest and stops cancer metastasis. *J. BUON*, 25, 280-285.

Zannou, A., Konfo, T. R. C., Gbaguidi, A. N. M., & Ahoussi-Dahouenon, E. (2015). Antimicrobial activity of extracts from *Cymbopogon citratus* L. and of *Mentha spicata* L. against fungal and bacterial strains isolated from peuhl's cheese (Waragashi) produced in Benin. *Int J. Adv Res*, 3(10), 1684-1695.

Zhao, Y., Wang, C., Chow, A. H., Ren, K., Gong, T., Zhang, Z., & Zheng, Y. (2010). Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: formulation and bioavailability studies. *International journal of pharmaceutics*, 383(1-2), 170-177.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Formulou-se nanoemulsões (O/A) estáveis dos óleos essenciais extraídos de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (capim-limão), *Citrus limon* (L.) Burn. (limão siciliano) e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja doce var. bahia) com tamanhos de gota abaixo de 100 nm;
- Identificou-se os constituintes químicos dos óleos essenciais extraídos, sendo geranial e neral, compostos majoritários de *Cymbopogon citratus*, e limoneno presente na composição majoritária de *Citrus limon* e *Citrus sinensis* e suas nanoemulsões por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM); Os compostos presentes identificados estão descritos e confirmados na literatura para as espécies em estudo.
- Ambos os OEs e NEOs apresentaram potencial antioxidante ativo, com citotoxicidade diferencial in vitro em 12 linhagens celulares de câncer humano. Estas descobertas sugerem que os OEs e NEOs podem ser alternativas significativas para terapias inovadoras.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHEAMPONG, D. O. *et al.* Histoprotective effect of essential oil from *Citrus aurantifolia* in testosterone-induced benign prostatic hyperplasia rat. **Advances in Urology**, v. 2019.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. **Gruver, TX USA: Texensis Publishing**, 2017.

ALSHATWI, A. A. *et al.* The apoptotic effect of hesperetin on human cervical cancer cells is mediated through cell cycle arrest, death receptor, and mitochondrial pathways. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 581-592, 2013.

AMOR, G. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba-alba* and *Origanum majorana* essential oils from Morocco. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4021, 2019.

ANAND, P. *et al.* Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical research**, v. 25, p. 2097-2116, 2008.

ANDRÉN-SANDBERG, Å. Pancreatic cancer: chemotherapy and radiotherapy. **North American journal of medical sciences**, v. 3, n. 1, p. 1, 2011.

ARUL, D.; SUBRAMANIAN, P. Naringenin (citrus flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. **Pathology & Oncology Research**, v. 19, p. 763-770, 2013.

ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. **Nature reviews Drug discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021.

AZMI, N. A. N. *et al.* Nanoemulsions: Factory for food, pharmaceutical and cosmetics. **Processes**, v. 7, n. 9, p. 617, 2019.

BAIG, S. *et al.* Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand?. **Cell death & disease**, v. 7, n. 1, p. e2058-e2058, 2016.

BAKKALI, F *et al.* Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BAKRY, A. M. *et al.* Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 15, n. 1, p. 143-182, 2016.

BAPTISTA-SILVA, S. *et al.* The progress of essential oils as potential therapeutic agents: A review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 4, p. 279-295, 2020.

BASSOLÉ, I. H. N. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1070-1074, 2011.

BERLIOCCI, L. *et al.* Toxic profile of bergamot essential oil on survival and proliferation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2780-2792, 2011.

BLANCHARD, P. *et al.* Chemotherapy and radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma: an update of the MAC-NPC meta-analysis. **The lancet oncology**, v. 16, n. 6, p. 645-655, 2015.

BLANCO, M. M. *et al.* Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2-3, p. 265-270, 2009.

BOLLA, P. K. *et al.* Evaluation of formulation parameters on permeation of ibuprofen from topical formulations using Strat-M® membrane. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 151, 2020.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2020.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural product reports**, v. 31, n. 11, p. 1612-1661, 2014.

CARMONA, L. *et al.* Anthocyanin biosynthesis and accumulation in blood oranges during postharvest storage at different low temperatures. **Food chemistry**, v. 237, p. 7-14, 2017.

CHE MARZUKI, N. H.; WAHAB, R. A.; ABDUL HAMID, M. An overview of nanoemulsion: Concepts of development and cosmeceutical applications. **Biotechnology & biotechnological equipment**, v. 33, n. 1, p. 779-797, 2019.

CHEBAB, S.; MEKIRCHA, F.; LEGHOUCHI, E. Potential protective effect of Pistacia lentiscus oil against chlorpyrifos-induced hormonal changes and oxidative damage in ovaries and thyroid of female rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1310-1316, 2017.

CHEN, S. J.; WANG, S. C.; CHEN, Y. C. The immunotherapy for colorectal cancer, lung cancer and pancreatic cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12836, 2021.

CHI, A. *et al.* Anti-fatigue activity of a novel polysaccharide conjugates from Ziyang green tea. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 566-572, 2015.

CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. **Anticancer agents from natural products**. CRC press, 2005.

DANAEI, M. *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.

DOSOKY, N. S.; SETZER, W. N. Biological activities and safety of Citrus spp. essential oils. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 7, p. 1966, 2018.

DUNCAN, R. E. *et al.* Geraniol and  $\beta$ -ionone inhibit proliferation, cell cycle progression, and cyclin-dependent kinase 2 activity in MCF-7 breast cancer cells independent of effects on HMG-CoA reductase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 68, n. 9, p. 1739-1747, 2004.

EL-AKHAL, F.; LALAMI, A. E. O.; GUEMMOUH, R. Larvicidal activity of essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* (Rutaceae) cultivated in Morocco against the malaria vector *Anopheles labranchiae* (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 6, p. 458-462, 2015.

EL-SABER BATIHA, G. *et al.* *Syzygium aromaticum* L.(Myrtaceae): traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 202, 2020.

EVERTON, G. O. *et al.* Óleo essencial das cascas descartadas do fruto de *Hymenaea courbaril* L. como larvicida frente *Aedes aegypti*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e1389108437-e1389108437, 2020.

FALLICO, B. *et al.* Bioactive compounds in blood oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck): Level and intake. **Food chemistry**, v. 215, p. 67-75, 2017.

FARMACOPEIA, C. *et al.* Farmacopeia Brasileira: volume 1: 6ª edição. 2019.

FROHLICH, P. C. *et al.* Evaluation of the effects of temperature and pressure on the extraction of eugenol from clove (*Syzygium aromaticum*) leaves using supercritical CO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 143, p. 313-320, 2019.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798-4811, 2006.

GANJEWALA, D.; LUTHRA, R. Essential oil biosynthesis and regulation in the genus *Cymbopogon*. **Natural product communications**, v. 5, n. 1, p. 1934578X1000500137, 2010.

GOLMAKANI, M. T.; ZARE, M.; RAZZAGHI, S. Eugenol enrichment of clove bud essential oil using different microwave-assisted distillation methods. **Food Science and Technology Research**, v. 23, n. 3, p. 385-394, 2017.

GOMES, L. F. *et al.* Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) presents antitumoral effect and improves chemotherapy activity in prostate cancer cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 21, n. 17, p. 2337-2350, 2021.

GONG, P. X. *et al.* Structural elucidation and antidiabetic activity of fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 262, p. 117969, 2021.

GONZÁLEZ-MOLINA, E. *et al.* Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 51, n. 2, p. 327-345, 2010.

GROSSO, G. *et al.* Red orange: experimental models and epidemiological evidence of its benefits on human health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

GUAN, W. *et al.* Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1558-1564, 2007.

GUO, Y. *et al.* Anti-hyperglycemic activity of polysaccharides from calyx of *Physalis alkekengi* var. *franchetii* Makino on alloxan-induced mice. **International journal of biological macromolecules**, v. 99, p. 249-257, 2017.

GUPTA, A. *et al.* Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft matter**, v. 12, n. 11, p. 2826-2841, 2016.

GUPTA, P. K. *et al.* An update on nanoemulsions using nanosized liquid in liquid colloidal systems. **Nanoemulsions-Properties, Fabrications and Applications**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2019.

GURPREET, K.; SINGH, S. K. Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 5, 2018.

HABIBI, F. *et al.* Postharvest application of 24-epibrassinolide reduces chilling injury symptoms and enhances bioactive compounds content and antioxidant activity of blood orange fruit. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 629733, 2021.

HÅKANSSON, A. Rotor-stator mixers: from batch to continuous mode of operation—a review. **Processes**, v. 6, n. 4, p. 32, 2018.

HALABI, M. F. *et al.* Anti-proliferative effect and phytochemical analysis of *Cymbopogon citratus* extract. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

HATA, T. *et al.* Induction of apoptosis by *Citrus paradisi* essential oil in human leukemic (HL-60) cells. **In Vivo (Athens, Greece)**, v. 17, n. 6, p. 553-559, 2003.

HIDAJAT, M. J. *et al.* Effective droplet size reduction and excellent stability of limonene nanoemulsion formed by high-pressure homogenizer. **Colloids and interfaces**, v. 4, n. 1, p. 5, 2020.

HONG, D. S. *et al.* A phase I first-in-human trial of bardoxolone methyl in patients with advanced solid tumors and lymphomas. **Clinical cancer research**, v. 18, n. 12, p. 3396-3406, 2012.

HUANG, H. *et al.* A novel W/O/W double emulsion co-delivering brassinolide and cinnamon essential oil delayed the senescence of broccoli via regulating chlorophyll degradation and energy metabolism. **Food Chemistry**, v. 356, p. 129704, 2021.

JAYAPRAKASHA, G. K. *et al.* Inhibition of prostate cancer (LNCaP) cell proliferation by volatile components from Nagami kumquats. **Planta medica**, v. 78, n. 10, p. 974-980, 2012.

JIA, S. *et al.* Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murrill. **International journal of biological macromolecules**, v. 62, p. 66-69, 2013.



JING, L. *et al.* Metabolite profiles of essential oils in citrus peels and their taxonomic implications. **Metabolomics**, v. 11, p. 952-963, 2015.

JING, Y. *et al.* Structural characterization of a novel polysaccharide from pulp tissues of Litchi chinensis and its immunomodulatory activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 902-911, 2014.

JU, H. *et al.* Recent trends in anti-cancer activities of terrestrial plants-based polysaccharides: A review. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, p. 100341, 2023.

JU, W. *et al.* A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor- $\kappa$ B pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells. **Molecular pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 1381-1388, 2007.

KALE, S. N.; DEORE, S. L. Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 8, n. 1, p. 39, 2017.

KASKOOS, R. A. Essential oil analysis by GC-MS and analgesic activity of Lippia citriodora and Citrus limon. **Journal of essential oil bearing plants**, v. 22, n. 1, p. 273-281, 2019.

KENTISH, S. *et al.* The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 170-175, 2008.

KHAN, A. W. *et al.* Role of plant-derived active constituents in cancer treatment and their mechanisms of action. **Cells**, v. 11, n. 8, p. 1326, 2022.

KHAN, W. *et al.* Nanoemulsion: A Droplet Nanocarrier System for Enhancing Bioavailability of Poorly Water Soluble Drugs. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 11, n. 11, p. 5191-5196, 2018.

KPOVIESSI, S. *et al.* Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four Cymbopogon species from Benin. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 652-659, 2014.

KSOUDA, G. *et al.* Composition, antibacterial and antioxidant activities of *Pimpinella saxifraga* essential oil and application to cheese preservation as coating additive. **Food chemistry**, v. 288, p. 47-56, 2019.

KUMAR, P. *et al.* Housefly (*Musca domestica* L.) control potential of *Cymbopogon citratus* Stapf.(Poales: Poaceae) essential oil and monoterpenes (citral and 1, 8-cineole). **Parasitology research**, v. 112, p. 69-76, 2013.

KURNIAWAN, Y. S. *et al.* An update on the anticancer activity of xanthone derivatives: A review. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 11, p. 1144, 2021.

LADO, J.; GAMBETTA, G.; ZACARIAS, L. Key determinants of citrus fruit quality: Metabolites and main changes during maturation. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 238-248, 2018.

LIU, B. *et al.* Anti-gastric cancer activity of cultivated *Dendrobium huoshanense* stem polysaccharide in tumor-bearing mice: Effects of molecular weight and O-acetyl group. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 590-599, 2021.

LIU, X. *et al.* Actin cytoskeleton vulnerability to disulfide stress mediates disulfidptosis. **Nature cell biology**, v. 25, n. 3, p. 404-414, 2023.

LORENZO, J. M. *et al.* Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: General aspects and overall description. In: **Innovative technologies for food preservation**. Academic Press, 2018. p. 53-107.

MA, D. *et al.* Cancer cell mitochondria targeting by pancratistatin analogs is dependent on functional complex II and III. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-21, 2017.

MA, L. *et al.* Anti-cancer potential of polysaccharide extracted from hawthorn (*Crataegus*.) on human colon cancer cell line HCT116 via cell cycle arrest and apoptosis. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 103677, 2020.

MASSON, J. *et al.* Oxygenated heterocyclic compounds to differentiate *Citrus* spp. essential oils through metabolomic strategies. **Food Chemistry**, v. 206, p. 223-233, 2016.

MATHEYAMBATH, A. C.; PADMANABHAN, P.; PALIYATH, G. Citrus fruits. 2016.

MCGUFFIN, Michael (Ed.). **Botanical safety handbook**. CRC press, 1997.

MEHL, F. *et al.* Differentiation of lemon essential oil based on volatile and non-volatile fractions with various analytical techniques: a metabolomic approach. **Food chemistry**, v. 143, p. 325-335, 2014.

MUKERJEE, A. *et al.* Development, characterization and evaluation of cinnamon oil and usnic acid blended nanoemulsion to attenuate skin carcinogenicity in swiss albino mice. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101227, 2019.

MURAKAMI, A. *et al.* Glyceroglycolipids from Citrus hystrix, a traditional herb in Thailand, potently inhibit the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 2779-2783, 1995.

MURTHY, K. N. C.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. D-limonene rich volatile oil from blood oranges inhibits angiogenesis, metastasis and cell death in human colon cancer cells. **Life Sciences**, v. 91, n. 11-12, p. 429-439, 2012.

MURTHY, K. N. *et al.* Citrus monoterpenes: potential source of phytochemicals for cancer prevention. In: **Emerging trends in dietary components for preventing and combating disease**. American Chemical Society, 2012. p. 545-558.

MUTLU-INGOK, A. *et al.* Evaluation of the single and combined antibacterial efficiency of essential oils for controlling Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and mixed cultures. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 34, n. 4, p. 280-287, 2019.

NAIR, A. *et al.* Citrus peels prevent cancer. **Phytochemistry**, v. 50, p. 231-237, 2018.

NAVARRA, M. *et al.* Effects of bergamot essential oil and its extractive fractions on SH-SY5Y human neuroblastoma cell growth. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 8, p. 1042-1053, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NONVIHO, G. *et al.* Insecticidal activities of essential oils extracted from three species of Poaceae on *Anopheles gambiae* spp, major vector of malaria. **St. Cerc. St. CICBIA**, v. 11, n. 4, p. 411-420, 2010.

NOUDOGBESSI, J. P. *et al.* Chemical compositions and physico-chemical properties of three varieties essential oils of *cymbopogon giganteus* growing to the spontaneous state in Benin. **Orient. J. Chem**, v. 29, n. 1, p. 59-67, 2013.

OLADEJI, O. S.; ODELADE, K. A.; OLOKE, J. K. Phytochemical screening and antimicrobial investigation of *Moringa oleifera* leaf extracts. **African Journal of Science, Technology, Innovation and Development**, v. 12, n. 1, p. 79-84, 2020.

OLIVEIRA, V. C. S. *et al.* Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology research**, v. 104, p. 1053-1059, 2009.

OSBOURN, A. E.; LANZOTTI, V. **Plant-derived natural products**. Dordrecht, The Netherlands:: Springer, 2009.

OWOLABI, M. S. *et al.* Chemical composition of *Citrus limon* (L.) Osbeck growing in Southwestern Nigeria: Essential oil chemotypes of both peel and leaf of lemon. **Am. J. Essent. Oils Nat. Prod**, v. 6, p. 36-40, 2018.

PANDEY, A. K. *et al.* Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2161, 2017.

PAUL, S.; HMAR, J. H.; ZOTHANTLUANGA, H. K. S. Essential oils: A review on their salient biological activities and major delivery strategies. **microcirculation**, v. 5, p. 9, 2020.

PENG, J. *et al.* Effect of high-pressure homogenization preparation on mean globule size and large-diameter tail of oil-in-water injectable emulsions. **journal of food and drug analysis**, v. 23, n. 4, p. 828-835, 2015.

PEREIRA, R. P. *et al.* Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. **Neurochemical research**, v. 34, p. 973-983, 2009.

PIGNANELLI, C. *et al.* Selective targeting of cancer cells by oxidative vulnerabilities with novel curcumin analogs. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1105, 2017.

PLUMMER, M. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **The Lancet Global Health**, v. 4, n. 9, p. e609-e616, 2016.

PRASAD, D.; MOHANTA, G. P.; SUDHAKAR, M. A review on preparation and evaluation of nanoemulsions. **International Journal of Pharma Research and Health Sciences**, v. 7, n. 1, p. 2915-22, 2019.

PUATANACHOKCHAI, R. *et al.* Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. **Cancer letters**, v. 183, n. 1, p. 9-15, 2002.

RABI, T.; BISHAYEE, A. Terpenoids and breast cancer chemoprevention. **Breast cancer research and treatment**, v. 115, p. 223-239, 2009.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RIMINI, S.; PETRACCI, M.; SMITH, D. P. The use of thyme and orange essential oils blend to improve quality traits of marinated chicken meat. **Poultry Science**, v. 93, n. 8, p. 2096-2102, 2014.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoidsA review. **Analyst**, v. 122, n. 2, p. 11R-34R, 1997.

RORIZ, C. L. *et al.* Pterospartum tridentatum, Gomphrena globosa and Cymbopogon citratus: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. **Food research international**, v. 62, p. 684-693, 2014.

ROUT, S.; BANERJEE, R. Free radical scavenging, anti-glycation and tyrosinase inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind from Punica granatum. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 3159-3163, 2007.

RUSSO, M. *et al.* Reduced time HPLC analyses for fast quality control of citrus essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 4, p. 307-315, 2015.

RUSSO, R. *et al.* Role of D-Limonene in autophagy induced by bergamot essential oil in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e113682, 2014.

SAHOUBO, G. B. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activities: Chemical constituents of essential oils of Ocimum gratissimum, Eucalyptus citriodora and Cymbopogon giganteus inhibited lipoygenase L-1 and cyclooxygenase of PGHS. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 17, n. 2, 2003.

SAMANTA, S. *et al.* Antitumor activity of Nitronaphthal-NU, a novel mixed-function agent. **Journal of Experimental Therapeutics & Oncology**, v. 5, n. 1, 2005.

SANTIN, M. R. *et al.* In vitro activity of the essential oil of Cymbopogon citratus and its major component (citral) on Leishmania amazonensis. **Parasitology research**, v. 105, p. 1489-1496, 2009.

SANTORO, G. F. *et al.* Trypanosoma cruzi: activity of essential oils from Achillea millefolium L., Syzygium aromaticum L. and Ocimum basilicum L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental parasitology**, v. 116, n. 3, p. 283-290, 2007.

SARKER, S. D.; NAHAR, L. **Medicinal natural products: a disease-focused approach**. Academic Press, 2020.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current biology**, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.

SCHUMACKER, P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. **Cancer cell**, v. 10, n. 3, p. 175-176, 2006.

SHABNAM, B. *et al.* Sorcin a potential molecular target for cancer therapy. **Translational Oncology**, v. 11, n. 6, p. 1379-1389, 2018.

SHAFIQ, S. *et al.* Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 227-243, 2007.

SHARMA, P. R. *et al.* Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Chemico-biological interactions**, v. 179, n. 2-3, p. 160-168, 2009.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2021. **Ca Cancer J Clin**, v. 71, n. 1, p. 7-33, 2021.

SILVA, M. R. *et al.* Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 381, p. 415-426, 2010.

SINTHUSIRI, J.; SOONWERA, M. Efficacy of herbal essential oils as insecticides against the housefly, *Musca domestica* L. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 44, n. 2, p. 188-196, 2013.

SIROHI, B. *et al.* Advances in chemotherapy for pancreatic cancer. **Indian journal of surgical oncology**, v. 6, p. 47-56, 2015.

SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SUGUMAR, S. *et al.* Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. **Bulletin of entomological research**, v. 104, n. 3, p. 393-402, 2014.

SUN, J. D-Limonene: safety and clinical applications. **Alternative medicine review**, v. 12, n. 3, p. 259, 2007.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TALIB, W. H.; MAHASNEH, A. M. Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. **Molecules**, v. 15, n. 3, p. 1811-1824, 2010.

TAPIA, A. *et al.* Free radical scavengers from *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf plants cultivated in bioreactors by the temporary immersion (TIS) principle. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 5-6, p. 447-457, 2007.

TARIQ, S. *et al.* A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 134, p. 103580, 2019.

TAYEBOON, G. S. *et al.* Effects of *Cymbopogon citratus* and *Ferula assa-foetida* extracts on glutamate-induced neurotoxicity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 49, p. 706-715, 2013.

TORRES-ALVAREZ, C. *et al.* Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils. **CyTA-Journal of Food**, v. 15, n. 1, p. 129-135, 2017.

VAN DEN DOOL, H. A. N. D.; KRATZ, P. Dec. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of chromatography**, 1963.

VIEIRA, A. J. *et al.* Limonene: Aroma of innovation in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 97-106, 2018.



WANG, J. *et al.* Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

WANG, Z. *et al.* Eriocitrin from lemon suppresses the proliferation of human hepatocellular carcinoma cells through inducing apoptosis and arresting cell cycle. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 78, n. 6, p. 1143-1150, 2016.

WEI, M. C.; XIAO, J.; YANG, Y. C. Extraction of  $\alpha$ -humulene-enriched oil from clove using ultrasound-assisted supercritical carbon dioxide extraction and studies of its fictitious solubility. **Food chemistry**, v. 210, p. 172-181, 2016.

WRIGHT, J. S.; JOHNSON, E. R.; DILABIO, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 6, p. 1173-1183, 2001.

XIAO, H. *et al.* Monodemethylated polymethoxyflavones from sweet orange (*Citrus sinensis*) peel inhibit growth of human lung cancer cells by apoptosis. **Molecular nutrition & food research**, v. 53, n. 3, p. 398-406, 2009.

YANG, C. *et al.* Antioxidant and anticancer activities of essential oil from Gannan navel orange peel. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1391, 2017.

YANG, Y. C.; WEI, M. C.; HONG, S. J. Ultrasound-assisted extraction and quantitation of oils from *Syzygium aromaticum* flower bud (clove) with supercritical carbon dioxide. **Journal of Chromatography A**, v. 1323, p. 18-27, 2014.

YU, W. *et al.* Development of an Elongational-Flow Microprocess for the Production of Size-Controlled Nanoemulsions: Application to the Preparation of Monodispersed Polymer Nanoparticles and Composite Polymeric Microparticles. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 11, n. 1, p. 1600025, 2017.

YUAN, C. *et al.* Eriocitrin, a dietary flavonoid suppressed cell proliferation, induced apoptosis through modulation of JAK2/STAT3 and JNK/p38 MAPKs signaling pathway in MCF-7 cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 36, n. 1, p. e22943, 2022.

ZANNOU, A. *et al.* Antimicrobial activity of extracts from *Cymbopogon citratus* L. and of *Mentha spicata* L. against fungal and bacterial strains isolated from peuhl's cheese (Waragashi) produced in Benin. **Int J. Adv Res**, v. 3, n. 10, p. 1684-1695, 2015.

ZHANG, J.; PEPPARD, T. L.; REINECCIUS, G. A. Preparation and characterization of nanoemulsions stabilized by food biopolymers using microfluidization. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 30, n. 4, p. 288-294, 2015.

ZHANG, N. *et al.* Physical modifications of polysaccharide from *Inonotus obliquus* and the antioxidant properties. **International journal of biological macromolecules**, v. 54, p. 209-215, 2013.

ZHANG, Q. Y. *et al.* Natural product interventions for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1253, 2018.

ZU, Y. *et al.* Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. **Molecules**, v. 15, n. 5, p. 3200-3210, 2010.