



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

FERNANDO EUGÊNIO TEIXEIRA CUNHA

POTENCIAL ANTIMICROBIANO E TOXICOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
***Cymbopogon citratus*, TERPENÓIDES NATURAIS E SUAS NANOEMULSÕES**

FORTALEZA

2024

FERNANDO EUGENIO TEIXEIRA CUNHA

POTENCIAL ANTIMICROBIANO E TOXICOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Cymbopogon citratus, TERPENÓIDES NATURAIS E SUAS NANOEMULSÕES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Morais da Silva Ribeiro.

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C978p Cunha, Fernando Eugenio Teixeira.
Potencial Antimicrobiano e Toxicológico do Óleo Essencial de *Cymbopogon Citratus*, Terpenóides Naturais e suas Nanoemulsões / Fernando Eugenio Teixeira Cunha. – 2024.
99 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Mestrado Profissional em Avaliação de Políticas Públicas, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Larissa Moraes Ribeiro da Silva.
Coorientação: Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães.

1. Terpenos. 2. Citral. 3. Aplicação in vitro. 4. Ação antimicrobiana. I. Título.

CDD 320.6

FERNANDO EUGENIO TEIXEIRA CUNHA

POTENCIAL ANTIMICROBIANO E TOXICOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Cymbopogon citratus, TERPENÓIDES NATURAIS E SUAS NANOEMULSÕES

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos do Departamento de Engenharia de
Alimentos da Universidade Federal do Ceará,
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: 15/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Larissa Moraes da Silva Ribeiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães (Coorientador)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dra. Giovana Matias do Prado
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Maria Jaiana Gomes Ferreira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Celli Rodrigues Muniz
EMBRAPA

Aos meus pais, Fernando e Nazira.

A minha avó, Eridan.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará e ao órgão de fomento de bolsas Capes. Com a estrutura, o corpo docente e discente, e o apoio financeiro, consegui concluir o planejado para o presente trabalho.

À meus pais Fernando e Nazira, e minha avó Eridan por todo o seu apoio dado durante todo o meu percurso no mestrado, ao qual sem eles eu não estaria onde estou. Sou muito grato e feliz por poderem observar as minhas conquistas e se fazerem presentes.

À meu parceiro de vida Victor, por aguentar meus perrengues e meu desespero ao decorrer do projeto. Sua presença ao meu lado me deu forças para continuar e a conseguir me manter motivado.

Aos meus amigos de pós-graduação Rosenildo, Elizabeth e Susan, que acompanharam minhas frustrações durante todo o projeto.

À minha orientadora Prof. Dra. Larissa, por me cobrar e me orientar durante todos os perrengues do projeto. Sua orientação que nunca deixou de estar presente, me auxiliando, me fazendo continuar, além de me desesperar para chegar aonde devo estar.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Ernani pelo auxílio valioso de suas sugestões.

Ao Prof. Ícaro e seu aluno Victor do laboratório de P & D Princípios Ativos de Plantas do Parque de Desenvolvimento Tecnológico, por disporem de tempo e materiais para meu auxílio.

À Prof. Dra. Nágila do Laboratório de Química de Biopolímeros da Universidade Federal do Ceará e aos seus alunos Elano e Lohana por se dispuserem a orientar, analisar e a conceder materiais necessários para o desenvolvimento do presente projeto.

Aos meus colegas de laboratório de Microbiologia de Alimentos Marianne, Raynne, Letícia e Levi que se mostraram mais que bolsistas, mas amigos que puderam me apoiar e me estressar em determinada altura do projeto.

Aos membros da banca avaliadora pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A todos os envolvidos no desenvolvimento do presente trabalho, o meu mais sincero obrigado.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.” (Paulo Freire)

RESUMO

A indústria alimentícia visa promover a qualidade e segurança de seus produtos, adotando técnicas conservativas que empregam a aplicação de compostos que possuam princípios bioativos, especialmente daqueles que atuam no crescimento de microrganismos indesejáveis. O uso de conservantes sintéticos tradicionais muitas vezes está associado a fatores citotóxicos e antinutricionais ao consumidor, o que tem impulsionado a busca por novos compostos alternativos. Os terpenos, provenientes do metabolismo secundário das rotas biossintéticas das plantas, são reconhecidos por suas atividades bioativas diversas como antimicrobianas e antioxidantes, porém, sua aplicação é limitada devido às suas propriedades hidrofóbicas. Técnicas como o nanoemulsão surgem para fins de aumento da solubilidade e de melhorar as propriedades físico-químicas de matrizes lipídicas. Neste contexto, no presente estudo, objetivou-se avaliar o potencial antimicrobiano e toxicológico do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, citral, eucaliptol, bem como de suas respectivas nanoemulsões (NEs) em três distintas formulações. As amostras de NEs de citral apresentaram estabilidade em todas as suas formulações, enquanto óleo de capim-santo somente a formulação 02 manteve-se estável. As mesmas apresentaram fluidez pseudoplástica, alta eficiência de encapsulação ($\geq 99,6\%$), com conformações arredondadas de tamanho 227 a 200 nm, -13 a 22 mV e índice de polidispersividade $>0,09$. Pela caracterização física foi possível observar os teores de citral presente nas amostras lipídicas testadas por meio de seus isômeros (neral e geranial) e da predominância dos grupos funcionais aldeídicos. Tanto as amostras lipídicas e nanoemulsionadas apresentaram ação antimicrobiana significativa sobre os patógenos testados, em especial, as amostras de óleo de *C. citratus* (CBM 1,855 mg/mL) e a NF03CT (CBM 1,573 mg/mL) sobre *S. aureus*, com aumento da ação do ativo nas emulsões. As ações toxicológicas foram relativas a concentrações de ativos presentes, com as amostras de menor CL_{50} o eucaliptol (153,85 mg/mL) e a NE NF01CT ($CL_{50} > 25,18$ mg/mL). No teste de aplicação *in vitro* obteve-se diminuição de até 1 Log 10 ufc/g sobre a carga de microrganismos mesófilos presentes no queijo, ação antimicrobiana reduzida ao qual teve possível interferência dos macronutrientes e da variada carga microbiana presente no mesmo. Os resultados obtidos demonstraram potencial de se utilizar tanto as amostras de citral e óleo de *C. citratus* e suas NEs em produtos alimentícios, especialmente as que contém citral em sua composição, devido à sua ação bioativa superior ao ser comparado às demais amostras.

Palavras-chave: Terpenos; citral; aplicação *in vitro*; ação antimicrobiana.

ABSTRACT

The food industry increasingly aims to promote the quality and safety of its products by adopting conservative techniques that employ the application of compounds with bioactive principles, especially those that act on the growth of undesirable microorganisms. The use of traditional synthetic preservatives is often associated with cytotoxic and antinutritional factors for consumers, which has driven the search for new alternative compounds. Terpenes, derived from the secondary metabolism of plant biosynthetic pathways, are recognized for their diverse bioactive activities such as antimicrobial and antioxidant effects, but their application is limited due to their hydrophobic properties. Techniques such as nanoemulsification emerge to increase solubility and improve the physicochemical properties of lipid matrices. In this context, the present study aimed to evaluate the antimicrobial and toxicological potential of the essential oil of *Cymbopogon citratus*, citral, eucalyptol, as well as their respective nanoemulsions (NEs) in three distinct formulations. Citral NE samples demonstrated stability in all formulations, while lemongrass oil only remained stable in formulation 02. They exhibited pseudoplastic flow, high encapsulation efficiency ($\geq 99.6\%$), with rounded or approximate conformations ranging in size from 227 to 200 nm, -13 to 22 mV, and a polydispersity index > 0.09 . Through physical characterization, it was possible to observe the levels of the active component citral present in the lipid samples tested through its isomers (neral and geranial) and the predominance of aldehydic functional groups. Both lipidic and nanoemulsified samples demonstrated significant antimicrobial action against the tested pathogens, especially the samples of *C. citratus* oil (CBM 1,855 mg/mL) and NF03CT (CBM 1,573 mg/mL) against *S. aureus*, with an increase in the active's action in the emulsions. The toxicological actions were relative to the concentrations of active components, with the lowest LC50 values observed for eucalyptol (153.85 mg/mL) and the NEs NF01CT (LC50 > 25.18 mg/mL) and NF02CS (26.70 mg/mL). In the *in vitro* application test, a decrease of up to 1 Log10 CFU/g was obtained in the mesophilic microorganism load naturally present in cheese, with reduced antimicrobial action possibly due to interference from macronutrients and the varied microbial load present in the cheese. The results obtained demonstrated the potential use of both citral lipidic samples and *C. citratus* oil and their NEs in food products, especially those containing citral, due to their superior bioactive action compared to other samples.

Keywords: Terpenes; citral; *in vitro* application; antimicrobial action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Fórmula estrutural do Citral.	26
Figura 02 – Fórmula estrutural do Eucaliptol.	28
Figura 03 – Fluxograma de análises das amostras naturais.	38
Figura 04 – Perfil cromatográfico dos isômeros neral e geranial.	46
Figura 05 – Cromatografia HPLC do óleo de capim-santo.	46
Figura 06 – Espectro FT-IR para diferentes amostras lipídicas.	49
Figura 07 – Curvas de fluxo das nanoemulsões (A) e viscosidade aparente versus taxa de cisalhamento para as amostras de nanoemulsões (B).	53
Figura 08 – Gráfico de varredura de frequência dos módulos de armazenamento (G') e frequência da perda (G'') das nanoemulsões.	54
Figura 09 – Cromatografia HPLC das Nanoemulsões (A) NF01CT, (B) NF02CT, (C) NF03CT e (D) NF02CS.	56
Figura 10 – Micrografias obtidas por MEV (A) Amostra NF01CT, (B) Amostra NF02CT, (C) Amostra NF03CT, (D) Amostra NF02CS e (E) Nanoemulsão Controle sem ativo.	59
Figura 11 – Difratoograma de raios X das amostras de NEs com nanoemulsão controle. ...	61
Figura 12 – Difratoograma de raios X da amostra de NE com óleo de capim-santo.	62
Figura 13 – Atividade inibitória dos terpenóides citral e eucaliptol e do óleo de capim-santo.	68
Figura 14 – Atividade bactericida dos terpenóides citral e eucaliptol e do óleo de capim-santo.	70
Figura 15 – Atividade bactericida das nanoemulsões estáveis.	71
Figura 16 – Avaliação locomotora do <i>Danio rerio</i> sobre amostras lipídicas (A) citral, (B) óleo de capim-santo e (C) eucaliptol.	76
Figura 17 – Avaliação locomotora do <i>Danio rerio</i> sobre amostras de nanoemulsão (A) NF01CT, (B) NF02CT e (C) NF02CS.	77
Figura 18 – Análise do teor de mesófilos totais de queijo de ricota incorporado de NF02CT.	79
Figura 19 – Análise do teor de mesófilos totais de queijo de ricota incorporado de NF02CS.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Atividades Bioativas de Matrizes Vegetais.	23
Tabela 02 – Formulação 01 das nanoemulsões.	37
Tabela 03 – Formulação 02 das nanoemulsões.	37
Tabela 04 – Formulação 03 das nanoemulsões.	38
Tabela 05 – Verificação dos ativos através de OCS por Cromatografia Líquida.	47
Tabela 06 – Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região de infravermelho.	49
Tabela 07 – Caracterização física das nanoemulsões estáveis.	51
Tabela 08 – Verificação dos ativos através dos TNNs por Cromatografia Líquida.	57
Tabela 09 – Eficiência de Encapsulamento dos terpenos Neral e Geranial.	58
Tabela 10 – Resultados antimicrobianos por difusão em ágar dos terpenóides e do óleo essencial para diferentes microrganismos.	64
Tabela 11 – Resultados antimicrobianos por difusão em ágar das nanoemulsões para diferentes microrganismos.	66
Tabela 12 – Determinação da atividade toxicológica 96h dos terpenóides e do óleo essencial.	73
Tabela 13 – Determinação da atividade toxicológica 96h das nanoemulsões de formulação 01.	74
Tabela 14 – Determinação da atividade toxicológica 96h das nanoemulsões de formulação 02.	74
Tabela 15 – Determinação da atividade toxicológica 96h da nanoemulsão de formulação 03.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analysis of variance
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Reflexão total atenuada
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
C	Celsius
CBM	Concentração bactericida mínima
CEUA/UFC	Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará
CIM	Concentração inibitória mínima
CL	Cruzamento de linhas
CL ₅₀	Concentração letal média 50%
cm	Centímetros
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Controle-N	Nanoemulsão sem ativo
COVs	Compostos orgânicos voláteis
CS	Capim-santo
CT	Cítral
D	Diâmetro médio de De Brouckere
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
d.nm	Diâmetro de partícula
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
EE	Eficiência de encapsulação
EU	Eucaliptol
FDA	Food and Drug Administration
FSDA	European Food Safety Authority

FT-IR	Espectroscopia por Transformada de Fourier
g	Gramas
G'	Módulos de armazenamento
G''	Módulos de perda
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
NR-trans	Geranial
h	Horas
HLB	Balanço hidrofílico–lipofílico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Hz	Hertz
kg	Quilogramas
kV	Quilovolts
LQ	Limite quantificável
LTDA	Sociedade limitada
m	Metros
mA	Miliamperes
mAU	Mili - Unidade de Absorbância
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	minutos
mL	mililitro
mm	milímetro
mg	Miligramas
mV	Milivolts
n	Número
NC	Grupo controle negativo
NCS	Nanoemulsão contendo óleo essencial de capim-santo
NCT	Nanoemulsão contendo citral
NEs	Nanoemulsões

NEU	Nanoemulsão contendo eucaliptol
NF01CT	Formulação 01 de nanoemulsão com citral
NF02CS	Formulação 02 de nanoemulsão com óleo de capim santo
NF02CT	Formulação 02 de nanoemulsão com citral
NF03CT	Formulação 03 de nanoemulsão com citral
nm	nanometros
NR-cis	neral
OCS	Óleo essencial de capim santo
OG	Octil galato
OP	Óleo de pequi
Pa	Pascal
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons
Pdi	Índice de polidispersidade
PG	Galato de propila
pz.mV	Potencial zeta
s	segundo
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TBHQ	Terc-butil hidroquinona
Tne	Teor de ativo encapsulado
TNN	Terpenóides naturais nanoemulsionados
Tno	Teor de ativo inicial na nanoemulsão
TNP	Terpenóides naturais puros
TSA	Ágar triptona de soja
TSB	Caldo triptona de soja
UFC	Unidade formadora de colonias
UV	Ultravioleta
v.e.	Valores estimados
v.o.	Via oral

XRD	Difração em raio-X
Zfa	Zebrafish adulto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivo específico	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs)	20
3.2	Aditivos alimentares	21
3.2.1	<i>Aditivos alimentares sintéticos</i>	21
3.2.2	<i>Aditivos alimentares naturais</i>	22
3.3	Terpenóides	25
3.3.1	<i>Citral</i>	26
3.3.2	<i>Eucaliptol</i>	28
3.4	Capim Santo	30
3.5	Nanoemulsão	32
3.6	Toxicidade	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Materiais	36
4.1.1	<i>Terpenos</i>	36
4.1.2	<i>Óleo de pequi</i>	36
4.1.3	<i>Reagentes</i>	37
4.2	Preparo das nanoemulsões	37
4.3	Caracterização dos terpenóides naturais puros e do óleo de capim-santo	39
4.3.1	<i>Identificação de ativos principais através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para OCS</i>	39
4.3.2	<i>Análise estrutural de FT-IR</i>	39

4.4	Caracterização das nanoemulsões	39
4.4.1	<i>Tamanho da partícula</i>	39
4.4.2	<i>Potencial Zeta</i>	40
4.4.3	<i>Comportamento Reológico</i>	40
4.4.3.1	<i>Estudo de fluxo</i>	40
4.4.3.2	<i>Estudo de cisalhamento oscilatório</i>	40
4.4.4	<i>Identificação de ativos principais através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para TNNs</i>	41
4.4.5	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	41
4.4.6	<i>Difração em raio-X (XRD)</i>	41
4.5	Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro	41
4.5.1	<i>Preparo do inóculo</i>	42
4.5.2	<i>Difusão em ágar</i>	42
4.5.3	<i>Microdiluição em placas</i>	42
4.5.3.1	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	43
4.5.3.2	<i>Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)</i>	43
4.6	Avaliação da segurança não clínica em Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto ..	43
4.6.1	<i>Teste de Campo Aberto (Atividade Locomotora)</i>	44
4.6.2	<i>Toxicidade aguda 96h</i>	44
4.7	Aplicação do ativo no queijo de ricota	44
4.8	Análises Estatísticas	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Caracterização dos terpenóides naturais puros e do óleo de capim-santo	45
5.1.1	<i>Identificação de ativos principais através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para OCS</i>	45
5.1.2	<i>Análise estrutural de FT-IR</i>	48
5.2	Caracterização das nanoemulsões	50

5.2.1	<i>Tamanho da partícula e Potencial Zeta</i>	50
5.2.2	<i>Comportamento Reológico</i>	52
5.2.2.1	<i>Medições de fluxo</i>	52
5.2.2.2	<i>Medições de cisalhamento oscilatório</i>	53
5.2.3	<i>Identificação de ativos principais através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para TNNs</i>	55
5.2.3.1	<i>Eficiência de encapsulação (EE)</i>	57
5.2.4	<i>Caracterização Morfológica</i>	58
5.2.5	<i>Difração em Raio-X (XRD)</i>	61
5.3	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro</i>	63
5.3.1	<i>Difusão em ágar por profundidade</i>	63
5.3.2	<i>Microdiluição</i>	67
5.4	<i>Avaliação da segurança não clínica em Zebrafish (Danio rerio) adulto</i> ..	73
5.5	<i>Aplicação do ativo no queijo de ricota</i>	77
6	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

O rápido crescimento dos centros urbanos e o aumento exacerbado de suas populações trouxe às indústrias no geral e, em específico, a de alimentos um súbito desenvolvimento tecnológico a fim de suprir e dispor à sociedade produtos agregados cada vez mais de segurança e qualidade elevadas (Akparibo *et al.*, 2021).

No entanto, no âmbito alimentar existem incidentes envolvendo o consumo de alimentos contaminados que impactam a saúde do consumidor final, podendo, seu quadro clínico, ser mais leve, ou mais grave, dependendo do agente etiológico envolvido. Tal contaminação pode advir de fontes diversas e adversas, seja de origem física, química e/ou microbiológica (Talley *et al.*, 2021).

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), que se fazem presentes na sociedade atual, originam-se de uma contaminação microbiológica dos alimentos ou água manipulados e consumidos (Amaral *et al.*, 2021) e podem vir de qualquer estágio da cadeia produtiva, assim como do manuseio do alimento após a sua aquisição pelo consumidor (Talley *et al.*, 2021).

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN, 2022), os casos de surtos ocasionados por DTAs, em âmbito nacional, no ano de 2019, possuíram aumento considerável de, aproximadamente, 30% ao compará-los ao ano anterior, ao qual a Região Sudeste lidera as notificações de incidências, seguida das Regiões Sul e Nordeste. Os principais agentes etiológicos envolvidos nos casos são as bactérias *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, representando cerca de 81,4% dos casos.

A indústria alimentícia faz uso de técnicas de conservação e de aditivos, normalmente, de origem sintética, que possuem atividade antimicrobiana e possibilitam o combate a tais microrganismos patogênicos. O uso dos aditivos é regido por normas como a Instrução Normativa n°. 211 de 1 de março de 2023 (ANVISA, 2023), que define os princípios fundamentais da utilização dessas substâncias. Em contrapartida, a aplicação de compostos sintéticos tradicionais, em teores inadequados ou seu consumo recorrente, está vinculado a fatores citotóxicos e antinutricionais ao organismo do ser humano (Rodriguez-Garcia *et al.*, 2016).

Consequentemente, desta forma, surgem estudos de tratamentos emergentes de potencial antimicrobiano, seja seu foco complementar ou alternativo (Freire *et al.*, 2022). Técnicas de aplicação de compostos de origem natural nos produtos já estão sendo desenvolvidas, podendo possuir igual ou maior valor bioativo ao comparar esses produtos

naturais com os compostos tradicionalmente utilizados, mas que também necessitam de estudos antes e durante a sua aplicação, devido a possíveis efeitos indesejáveis quando destinados ao consumo humano.

Os terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) advém do metabolismo secundário das plantas e são produzidos naturalmente pelas suas rotas biossintéticas (Upadhyay; Bano, 2023). São considerados sinalizadores devido a suas características aromáticas, agindo como repelentes ou atrativos a predadores, além de eliciadores na síntese de compostos orgânicos voláteis e de serem caracterizados por suas atividades bioativas antimicrobianas (Tetali, 2019). Eles fazem parte das matrizes biológicas dos óleos essenciais, constituindo-os majoritariamente em sua forma pura ou derivada (Plata-Rueda *et al.*, 2020).

O óleo essencial de capim-santo (*Cymbopogon citratus*) e o terpenóide citral presente em sua constituição são muito utilizados na medicina fitoterápica, assim como o terpenóide eucaliptol, oriundo de vegetais como o eucalipto e cinnamomum (Rahaman *et al.*, 2022). Dentre suas propriedades já se é relatado efeitos antidepressivos, antioxidantes, antisépticos, antibacterianos, antifúngicos e ansiolíticos (Naik *et al.*, 2010; Juergens; Worth; Juergens, 2020; Ali *et al.*, 2023).

Na área industrial, é muito utilizado como um intensificador de odores, respectivo ao odor de limão, e já aplicado em processos, como, por exemplo, para produção de cosméticos, perfumes, fragrâncias, aromas, detergentes e produtos farmacêuticos (Ajayi; Sadimenko; Afolayan, 2016). Logo, muitos países do mundo os utilizam devido a suas diversas atividades biológicas relatadas e sua diversidade de aplicações, mas devido à sua hidrofobicidade, sua aplicação em alimentos ainda é restringida.

A utilização de nanoemulsões (NEs) surge como uma alternativa promissora para a dispersão adequada do ativo apolar no meio alimentar utilizado. Isso ocorre devido a interação entre os líquidos e o emulsificante presente nas NEs, de forma a melhorar a sua solubilidade e promover o surgimento de um sistema facilitador de entrega do próprio ativo (Shafiq *et al.*, 2007; Salvia-Trujillo *et al.*, 2017; Manzoor *et al.*, 2021).

Estudos envolvendo o uso de nanoemulsões aplicadas em matrizes alimentares com ativos apolares observaram a melhoria dos fatores intrínsecos ao sistema e a interação com os microrganismos presentes na matriz, aumentando a ação sobre os mesmos e a conservação dos alimentos respectivos (Donsì *et al.*, 2011; Donsì; Ferrari, 2016).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade de aplicação do óleo essencial de capim-santo, de dois terpenos distintos, citral e eucaliptol,

puros e nanoemulsionados, na indústria de alimentos por meio das suas atividades tóxicas e potencialidade antimicrobiana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial antimicrobiano e toxicológico do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, dos terpenos citral e eucaliptol e suas nanoemulsões.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar nanoemulsões estáveis das amostras [óleo de capim-santo (OCS), Citral (CT) e Eucaliptol (EU)];
- Determinar as concentrações bactericidas mínimas (CBM) e concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos terpenóides naturais puros (TNP), OCS e terpenóides nanoemulsionados (TNN) frente às bactérias *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*;
- Caracterizar os TNP e o OCS por avaliação estrutural, reológica e composição quantitativa;
- Avaliar a toxicidade aguda de TNP, OCS e TNN;
- Aplicar TNN selecionado em queijo ricota para avaliação da atividade bacteriana sobre sua carga microbiana de mesófilos totais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs)

A ingestão de água e/ou alimentos contaminados pode afetar a saúde do consumidor, ocasionando uma Doença Transmitida por Alimento (DTA). Estima-se que uma a cada 10 pessoas são acometidas por tal infortúnio. É datado cerca de 250 tipos de DTAs presentes no mundo todo, ocasionadas por agentes etiológicos variados e diversos, suas toxinas, parasitas (Amaral *et al.*, 2021) e, também, substâncias químicas nocivas à saúde como agrotóxicos, produtos químicos ou metais pesados (Nunes *et al.*, 2018).

Os casos de contágio das matrizes alimentares podem decorrer de acontecimentos acidentais, quando é inesperado o acontecimento ou não houve intenção da ocorrência, ou intencionais quando há ganho econômico envolvido ou propósito prejudicial (Talley *et al.*, 2021).

As DTAs podem advir de origens diversas e em situações adversas. Na indústria alimentícia, ao decorrer de todo o processamento, desde os estágios agropecuários, passando por todas as etapas de manipulação e preparo, até a distribuição e manejo por parte do consumidor final, pode ocorrer a contaminação, seja pela sua origem física, química ou microbiológica (Talley *et al.*, 2021).

O contágio microbiológico, em âmbito nacional, possui dentre os principais causadores das DTAs as bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. (Nunes *et al.*, 2018; Oliveira, 2021). Somente a primeira, foi responsável por cerca de quase 30% dos casos de surtos entre os anos de 2012 a 2021 (Sinan, 2022).

O maior pico de incidência de enfermidades ocasionadas por alimentos e/ou água contaminados nos últimos anos, foi em 2019, sendo relacionado a um aumento de 30% de casos quando comparado com os dados obtidos no ano anterior, com um total de 9586 surtos. A maior parcela destes casos foi decorrente do setor residencial, seguido de restaurantes, padarias e outros (Sinan, 2022).

A forma como se manifesta e o grau de severidade das DTAs no organismo do consumidor dependerá principalmente do agente etiológico presente, podendo seu quadro clínico ser mais brando ou mais crítico. As infecções ou síndromes de origem alimentar são vinculadas normalmente a sintomas de desregulação do sistema digestivo como anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia e febre, mas também podem conter os sintomas de afecções extraintestinais em diferentes órgãos, como rins, fígado, sistema nervoso central, entre outros (Nunes *et al.*, 2018; Sinan, 2022).

O diagnóstico é realizado de acordo com o caso em específico conforme os sintomas notificados para determinar os exames clínicos e laboratoriais que deverão se seguir. Infelizmente muitos dos casos não são notificados para um devido tratamento e coleta de dados referentes ao contágio de forma mais branda (Oliveira, 2021).

3.2 Aditivos alimentares

Aditivo é todo e qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem o propósito de nutrir, mas com o objetivo principal de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante o seu processamento e manipulação (ANVISA, 1997).

Há uma ampla variedade de aditivos disponíveis e aplicados nas indústrias com funções diversas e para numerosos fins. Uma forma de os classificar quanto a suas especificidades de uso são os plastificantes, lubrificantes, estabilizantes, edulcorantes, corantes, aromatizantes, emulsificantes, agentes antimicrobianos e antioxidantes, dentre outros (Khodjaeva *et al.*, 2013; Thbayh; Fise, 2022).

3.2.1 Aditivos alimentares sintéticos

Os aditivos sintéticos, diferentemente dos aditivos de origem natural, são compostos produzidos em laboratório. São substâncias artificiais que surgiram com o avanço tecnológico das indústrias e uma necessidade cada vez maior do consumo de alimentos industrializados, alimentos de consumo rápido e alimentos seguros (Honorato *et al.*, 2013).

O hidroxitolueno butilado (BHT), octil galato (OG), hidroxianisol butilado (BHA), galato de propila (PG), terc-butil hidroquinona (TBHQ) são alguns aditivos sintéticos utilizados na indústria química e alimentícia bem fundamentados pelas suas ações de melhoramento das propriedades dos produtos a serem adicionados (Thbayh; Fise, 2022).

Especificamente, na indústria alimentícia, sua aplicação tem como foco manter a qualidade e a validade dos alimentos industrializados de forma a atender as demandas do mercado consumidor que está cada vez mais exigente com a segurança dos produtos presentes em sua dieta (Honorato *et al.*, 2013).

O uso dos aditivos é regido por normas como a Instrução Normativa nº. 211 de 1 de março de 2023 (ANVISA, 2023), que define os princípios fundamentais e primordiais da utilização dessas substâncias. Uma substância só é liberada ao uso se submetida a uma

adequada avaliação toxicológica. Em contrapartida, já se é relatado que a aplicação dos compostos convencionais sintéticos, em teores inadequados ou seu consumo recorrente, está vinculado a fatores citotóxicos e antinutricionais ao organismo do ser humano consumidor (Rodriguez-Garcia *et al.*, 2016). A utilização e atualização de normas que regem seu uso e sua aplicação e englobam todos os seus riscos ainda estão em andamento, existindo uma grande preocupação quanto aos riscos toxicológicos potenciais decorrentes da exposição crônica a essas substâncias (ANVISA, 2016).

O nitrito, por exemplo, é um aditivo sintético muito utilizado na indústria alimentícia sobre produtos cárneos com foco em conservar suas características organolépticas e nutricionais pela sua ação de inibição sobre microrganismos e da oxidação do ferro, mantendo sua cor avermelhada característica, e retarda a rancidez oxidativa da fração lipídica. Por outro lado, seu uso é vinculado a síntese de compostos com efeitos tóxicos, as nitrosaminas e nitrosamidas, podendo ocasionar Hepatotoxicidade, câncer, nefrotoxicidade, desregulação da inflamação e lesão nos tecidos internos (Elshaer *et al.*, 2022).

3.2.2 Aditivos alimentares naturais

A crescente preocupação com o perfil de consumo alimentar da população brasileira tem gerado uma mudança significativa na mentalidade das pessoas, levando à necessidade de adotar uma dieta baseada em hábitos alimentares mais saudáveis (Volp; Renhe; Stringueta, 2009; Aguiar; Estevinho; Santos, 2016). Surge, então, uma grande preocupação em relação aos ingredientes presentes nos produtos alimentícios, suas origens e os benefícios nutricionais e funcionais que proporcionam ao organismo do consumidor (Pereira *et al.*, 2020).

Desta forma, um dos obstáculos na indústria de alimentos é a utilização de práticas seguras e alternativas às tradicionais que trazem os mesmos benefícios das comumente aplicadas ou agregadas de alta qualidade. O uso dos aditivos naturais têm sido umas das técnicas alternativas que está sendo impulsionada em substituição dos aditivos sintéticos (Ferrario *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2020; Freire *et al.*, 2022).

Os aditivos naturais são substâncias obtidas a partir da extração e/ou recuperação de algum ou alguns componentes de uma respectiva fonte natural de interesse (Pereira *et al.*, 2020). Pesquisas recentes têm demonstrado seu grande potencial de aplicação e seu uso no mercado consumidor, representando a imagem de uma indústria alimentar inovadora que se preocupa mais com a sustentabilidade e dispõe de produtos mais saudáveis e de rótulos mais

limpos, além de permitir o aproveitamento de subprodutos industriais (Kaderides *et al.*, 2021; Penna *et al.*, 2021).

A sua origem pode derivar de fontes vegetais, animais ou microbianas. Sua utilização está vinculada, principalmente, às atividades tecnológicas, sensoriais, conservativas e funcionais diversas, tornando-os muito visados na indústria de alimentos como alternativa ao uso dos aditivos tradicionais, e tendo igual ou maior valor de aplicação (Santos-Sánchez, *et al.*, 2017).

Desde a antiguidade as substâncias de origem vegetal têm sido utilizadas e aplicadas no consumo doméstico e informal, tanto na área gastronômica quanto na fitoterápica (Saqallah *et al.*, 2022). Especiarias como o açafrão, por exemplo, foram muito difundidas a partir da sua função de aprimoramento sensorial dos alimentos. A pigmentação era sua característica principal, mas recentes pesquisas têm demonstrado a presença de compostos bioativos conhecidos por promoverem ações anti-inflamatórias, antissépticas, antioxidantes, anticancerígenas, cardioprotetoras e hipoglicêmicas, etc. (Volp; Renhe; Stringueta, 2009; Pandey *et al.*, 2022).

As matrizes vegetais demonstram, em sua maioria, a presença de compostos bioativos, sendo os principais responsáveis por possuírem tais atividades. Essas atividades desempenham um papel crucial na promoção da conservação dos alimentos, prolongando sua vida de prateleira (Saqallah *et al.*, 2022). Na **tabela 01** podemos observar a presença de alguns compostos bioativos em determinadas matérias primas vegetais e algumas de suas respectivas propriedades relatadas.

Tabela 01 - Atividades Bioativas de Matrizes Vegetais.

Vegetais	Destino Tradicional	Compostos Majoritários	Atividade Relatada	Referência
Mirtilos / morangos / amoras	Consumidos <i>in natura</i> ou processados	Antocianinas	Antioxidante - prevenção e tratamento de doenças crônicas	Santos-Sánchez <i>et al.</i> , 2017
Alho (casca)	Resíduo	Compostos fenólicos	Antioxidante e antimicrobiano	Santos <i>et al.</i> , 2022
Romã (casca)	Resíduo	ácidos fenólicos / flavonóides / taninos	Antioxidante, anti-inflamatório, antimutagênico,	Kaderides <i>et al.</i> , 2021

			anticancerígeno, anti-hipertensivo	
Tomates / toranjas	Consumidos <i>in</i> <i>natura</i> ou processados	Licopeno / β -caroteno	Antioxidante - prevenção e tratamento de doenças crônicas e cancerígenas	Baç; Yemis; Özkan, 2023
Ameixa (polpa e sementes)	Consumidos <i>in</i> <i>natura</i> ou processados (polpa) e resíduo (semente)	Cianidina-3-glic osídeo / ácido elágico	Antioxidante e anti-hiperglicêmicos	Johnson <i>et al.</i> , 2022
Cevada (fração proteica pós processament o)	Resíduo Agroindustrial	Compostos fenólicos	Antioxidante, anti-inflamatória, anti trombótica e tecnológicas	Naibaho <i>et al.</i> , 2022
Batatas	Consumidos <i>in</i> <i>natura</i> ou processados	Compostos fenólicos	Antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, etc.	Fang <i>et al.</i> , 2022
Bagas de espinheiro	Consumidos <i>in</i> <i>natura</i> , processados ou em fármacos	Ácidos fenólicos / flavonóides	Antioxidante, anti-inflamatórias, antivirais, antimicrobianas, anticancerígenas e neuroprotetoras	Yang <i>et al.</i> , 2022
<i>Suaeda</i> <i>maritima</i> (folha e caule)	Fitoterapia e forragem para gado	-	Antioxidante, antivirais, antibacterianas, antioxidantes e hepatoprotetoras	Mohamed; Al-Touby; Hossain, 2022
Urucum (semente)	Corante	fenóis / flavonóides	Antimicrobiano	Carvalho <i>et al.</i> , 2022
Milho (Estigma)	Resíduo Agroindustrial	Polifenóis	Antimicrobiano e antioxidante	Boeira <i>et al.</i> , 2022
Kombu fermentada	Consumidos <i>in</i> <i>natura</i> ou processados	ácido γ -aminobutírico / flavonóides	Propriedades bioativas e intensificador de sabor	Nie <i>et al.</i> , 2022

Fonte: próprio autor.

3.3 Terpenóides

Os terpenos, isoprenóides ou terpenóides são hidrocarbonetos com cadeias lineares de compostos múltiplos de uma unidade de cinco carbonos denominados de isoprenos (2-metil 1,3-butadieno, isopenteno) (C5). O número de unidades repetidas determinará o tipo de terpeno a ser sintetizado, sendo, monoterpenos compostos por duas cadeias de isoprenos (C10), sesquiterpenos por três (C15), diterpeno por quatro (C20), triterpenos por seis (C30), e assim por diante. Tal regra nominal é denominada de “regra do isopreno” (Ruzicka, 1953; Hillier; Lathe, 2019; Upadhyay; Bano, 2023).

São derivados de dimetilalil difosfato (DMAPP) e seu isômero isopentenil difosfato (IPP) que originam-se a partir das rotas biossintéticas do ácido mevalônico no citoplasma ou a do ácido não-mevalônico por piruvato e 3-fosfoglicerato, decorrente nos cloroplastos (Schwarz, 1994; Eisenreich *et al.*, 2004).

Além disso, os terpenóides podem surgir tanto do metabolismo primário ou do metabolismo secundário dos organismos de seres vivos diversos, principalmente, das matrizes vegetais superiores, estando presentes na natureza como constituintes essenciais das células vivas (Eisenreich *et al.*, 2004; Hillier; Lathe, 2019; Tetali *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2022; Upadhyay; Bano, 2023).

Devido às suas estruturas estericamente restritas e às múltiplas formas quirais, engloba uma variedade de compostos que são dependentes da rota biossintética seguida, incluindo compostos acíclicos, monocíclicos e policíclicos (Eisenreich *et al.*, 2004). Os derivados do metabolismo primário das plantas são componentes básicos essenciais para as funções celulares, incluindo compostos como as quinonas, pigmentos fotossintéticos, esteróis, hormônios de crescimento e proteínas preniladas (Tetali *et al.*, 2019).

Já os terpenos oriundos de respostas de determinada planta a condições de estresse adversas, causadas por fatores bióticos e abióticos, são classificados como metabólitos secundários. Esses compostos compõem a maior parcela dos isoprenóides e são produzidos como mecanismo de suporte a defesa contra predadores ou pragas e possuem atividades bioativas diversas de combate aos mesmos. Há aqueles responsáveis pela sinalização, com ação de repelir e/ou atrair insetos, há aqueles compostos com propriedades medicinais, com atividades antimicrobianas, antioxidantes, dentre outras (Tetali *et al.*, 2019),

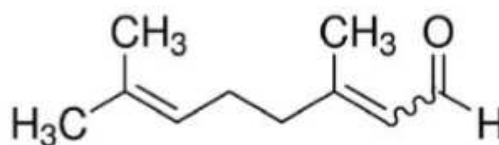
e há os eliciadores, ou indutores, na síntese de outros compostos específicos de defesa, seja em sua própria via ou na de plantas vizinhas (Delaney *et al.*, 2013).

Dentre os compostos orgânicos voláteis (COVs) oriundos do metabolismo secundário das plantas e emitidos por elas em momentos de estresse, aproximadamente, 40% são considerados isoprenos (Hillier; Lathe, 2019). Entre eles, destacam-se o citral e o eucaliptol.

3.3.1 Citral

O citral (CT) ou lemonal é um aldeído monoterpene cíclico insaturado (**Figura 01**), composto pelos isômeros neral (isômero *cis* de 3,7-dimetil-2,6-octadienal) e geranial (isômero *trans* de 3,7-dimetil-2,6-octadienal) (Freire *et al.*, 2022).

Figura 01 - Fórmula estrutural do Citral.



Fonte: Freire *et al.* (2022)

Sintetizado a partir de reações entre isobuteno e formaldeído (Simakova *et al.*, 2022), o citral está presente como um dos principais ingredientes ativos em diversos vegetais, seja em suas folhas, frutos ou em seus óleos essenciais (Schenk; Ferrario; Guerrero, 2018). É encontrado nos óleos de *Litsea cubeba* (*may chang*) (Shen *et al.*, 2022), *Cymbopogon citratus* (capim-santo), *Verbena officinalis* L. (verbena), *Citrus limonum* (limão) e *Citrus sinensis* (laranja) (Char; Guerrero; Alzamora, 2010; Ferrario *et al.*, 2020), entre outros.

É considerado um precursor na síntese de outros compostos, como o mentol (Trasarti; Marchi; Apesteguía, 2013) e as bases de Schiff (Bencela; Kumari, 2022).

O CT possui atividades ansiolíticas, sedativas e anti-inflamatórias (Bencela; Kumari, 2022), mas devido às suas fortes propriedades aromáticas, é comumente e amplamente utilizado como um agente aromatizante na perfumaria, cosméticos, em produtos de limpeza e de higiene (NTP, 2003). Por conter notas cítricas odoríferas é utilizado como aromatizante de bebidas e doces, além de demonstrar ter alto potencial a ser aplicado como

um possível aditivo conservativo em frutas, bebidas e em outros alimentos (Char; Guerrero; Alzamora, 2010; Schenk; Ferrario; Guerrero, 2018).

Em contrapartida, a adição do citral possui elevadas limitações de uso devido às suas propriedades físicas de baixa solubilidade e de baixa estabilidade, apresentando sensibilidade a diversos fatores ambientais como luz, calor, oxigênio, entre outros. (Prakash; Baskaran; Vadivel, 2020; Shen *et al.*, 2022).

A ingestão diária aceitável do CT é de 5 mg de citral por kg de peso corpóreo, recebendo o status de aditivo GRAS (Ferrante; Guerrero; Alzamora, 2007). Apesar de demonstrar baixa citotoxicidade, estudos sobre sua utilização ainda estão sendo desenvolvidos para avaliar sua toxicidade e genotoxicidade a fim de elucidar suas propriedades, seus mecanismos de ação e seu potencial de aplicação (Freire *et al.*, 2022).

Estudos com sua aplicação demonstram que bebidas à base de frutas elaboradas com a presença de citral apresentam aceitação e sabor consideravelmente bom (Ferrante; Guerrero; Alzamora, 2007). Além disso, purês de frutas adicionadas de citral apresentaram boa ação conservativa, caracterizando-o como um possível conservante alimentar (Char; Guerrero; Alzamora, 2010).

A atividade antimicrobiana do citral engloba tanto fungos quanto bactérias, e em sua forma pura ou combinada, é extensamente relatada na literatura. Estudos demonstram que sua atividade tem ação mais forte sobre fungos, resultado da sensibilidade dos microrganismos testados e da interação do terpeno com suas estruturas biológicas (Char; Guerrero; Alzamora, 2010).

Sua atividade antifúngica demonstra ação sobre fungos do gênero *Penicillium*, um dos gêneros que mais acometem os produtos alimentícios pós-colheita. O citral demonstrou ação relativa sobre as espécies *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum*, atividade atribuída a sua ação sobre as hifas e da ruptura da integridade e permeabilidade da membrana celular (Tao; OuYang; Jia, 2014). Além disso, o CT também demonstrou ação relatada sobre *Aspergillus flavus* (López-Malo; Alzamora; Palou, 2005), *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii* (Schenk; Ferrario; Guerrero, 2018) e fungos do gênero *Candida* (Freire *et al.*, 2022).

A sua atividade antibacteriana, há diversos relatos sobre seu efeito em microrganismos patogênicos causadores das principais DTAs que afetam o mercado consumidor. O CT, ao ser adicionado em sucos contendo *Listeria monocytogenes* apresentou efeito inibitório e bactericida (Ferrante; Guerrero; Alzamora, 2007). Em queijos envoltos com

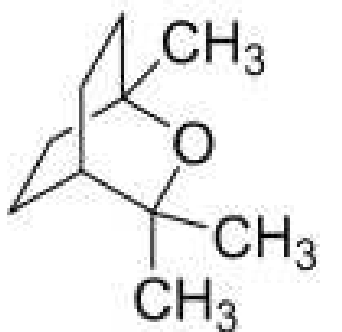
embalagem inteligente com citral encapsulado, contendo o mesmo microrganismo, só foi constatada atividade inibitória (Shen *et al.*, 2022).

Além disso, apresentou ação antimicrobiana considerável ou relativa, também, sobre as bactérias patogênicas *Listeria innocua* (Char; Guerrero; Alzamora, 2010), *Staphylococcus aureus* (Apolónio *et al.*, 2014), *Escherichia coli* (Ferrario *et al.*, 2020), *Cronobacter sakazakii* (Shi *et al.*, 2017), ao qual induziu alterações na concentração de ATP, hiperpolarização da membrana celular e redução do pH citoplasmático, e *Salmonella* Enteritidis (Schenk; Ferrario; Guerrero, 2018).

3.3.2 Eucaliptol

O eucaliptol (EU) (1,3,3-Trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octane ou 1,8-cineol) é um óxido monoterpênóide saturado (**Figura 02**), presente como produto das rotas biossintéticas em diversas matrizes vegetais aromáticas, principalmente, como um constituinte de espécies de eucalipto e cinnamomum e é comumente encontrado em altos teores em seus óleos essenciais e de outras plantas (Juergens *et al.*, 2003; Alfaro *et al.*, 2010; Worth; Dethlefsen, 2012; Qiu *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2022).

Figura 02 Fórmula estrutural do Eucaliptol.



Fonte: Rui *et al.* (2022)

Eucalyptus cinerea, *E. staigeriana*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. baueriana*, *E. smithii*, e *E. polybractea* são plantas normalmente ornamentais e exemplos de eucalipto que apresentam em sua constituição o 1,8-cineol, especificamente, em suas folhas e em seus frutos (Babu; Singh, 2009; Silva *et al.*, 2011).

Plantas como folhas de louro e cardamomo (Rahaman *et al.*, 2022) e resíduos da indústria papelreira (Campos; Ferreira; Berteina-Raboin, 2021) e óleos essenciais cineólicos de matrizes vegetais medicinais como *Artemisia annua* (Aggarwal *et al.*, 2011), *Melaleuca linarrifolia* (Padalia *et al.*, 2015), *Cinnamomum porrectum* (Qiu *et al.*, 2019) e *Rosmarinus officinalis* e *Psidium sp.* (Vijayakumar *et al.*, 2020) também apresentam em sua composição o EU.

O 1,8-cineol, em referência a suas propriedades odoríferas, possui um odor característico de picância e canforáceo, e é frequentemente associado e aplicado em produtos de fragrância, aromatizantes e cosméticos (Silva *et al.*, 2011; Vijayakumar *et al.*, 2020).

Além disso, já se é relatado pela literatura efeitos farmacêuticos diversos, incluindo ações anticancerígenas (Rahaman *et al.*, 2022), antimicrobianas, antivirais, anti-inflamatórias e antioxidantes. Seu uso está relacionado a efeitos sinérgicos aos de medicamentos (Babu; Singh, 2009; Juergens; Worth; Juergens, 2020).

Na fitoterapia o eucaliptol é muito utilizado no combate de doenças respiratórias por ser considerado um agente mucolítico, broncodilatador e anti-inflamatório (Juergens *et al.*, 2003; Worth; Dethlefsen, 2012; Rui *et al.*, 2022), além de, também, ser utilizado no combate de doenças pancreáticas e neurodegenerativas. Pesquisas recentes demonstram sua ação no combate à fibrose pulmonar, através da inibição da polarização de macrófagos (Rui *et al.*, 2022), bem como em complicações renais (Li *et al.*, 2022).

Em outras aplicações, o eucaliptol também está presente na ração de animais aquáticos, sua utilização está atrelada a diminuição dos efeitos indutores de intoxicação por cobre pelos organismos (Hoseini; Hoseinifar; Doan, 2018). Devido a suas características aromáticas e tóxicas sobre pragas, também demonstra potencial em adição como inseticida (Aggarwal *et al.*, 2011; Qiu *et al.*, 2019) e nematicida (Babu; Singh, 2009). Em processos químicos laboratoriais o EU pode ser utilizado como um solvente de base biológica reciclável em substituição dos solventes tradicionais que ocasionam graves impactos ecológicos ao serem utilizados e descartados (Babu; Singh, 2009; Campos; Ferreira; Berteina-Raboin, 2021).

Referente à atividade antimicrobiana do eucaliptol, ela foi observada sobre bactérias e fungos. Os óleos essenciais das folhas e frutos de *Artemisia annua*, ricos em EU, apresentaram atividades inibitórias elevadas sobre as bactérias patogênicas *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Silva *et al.*, 2011), *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* e atividade moderada contra *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus mutans* (Padalia *et al.*, 2015).

Além disso, sobre *Streptococcus pyogenes*, foi relatado sua ação de inibição quanto a formação de biofilme em simulação das superfícies industriais de aço inoxidável, titânio e silicone, afetando consideravelmente a hidrofobicidade da superfície celular, auto agregação, protease extracelular e hemólise (Vijayakumar *et al.*, 2020).

A atividade antifúngica do eucaliptol é relatada principalmente em relação aos fungos do gênero *Fusarium*. Dentre estes, podemos destacar sua atividade em *Fusarium subglutinans*, *F. cerealis*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides*,. Além deles, também apresentou ação sobre as espécies *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus carbonarius*, *Alternaria alternata*, *Penicillium sp.* (Morcia; Malnati; Terzi, 2012) e *Candida albicans* (Silva *et al.*, 2011), o que sugere seu potencial como agente terapêutico contra infecções fúngicas.

3.4 Capim-santo

O capim-santo (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf)(CS), também conhecido como capim-limão, citronela ou capim-cidreira, é uma gramínea da família Poaceae nativa da Índia, encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Sua estrutura morfológica é composta por folhas de coloração esverdeadas de tamanho reduzido, finas, alongadas e em formato de agulha. Sua planta pode atingir até aproximadamente 1,8 m de altura e 1,2 m de largura (Oladeji *et al.*, 2019; Chanthai *et al.*, 2012).

Devido às propriedades aromáticas de limão e às ações medicinais bem difundidas, o *Cymbopogon citratus* é um vegetal muito visado e utilizado pelo mercado industrial e consumidor. Do mesmo modo, tornou-se muito utilizado na culinária, incorporado como um ingrediente ou sendo consumido em forma de chás (Chanthai *et al.*, 2012; Ajayi; Sadimenko; Afolayan, 2016).

No campo medicinal, pesquisas realizadas com o capim-santo relatam que o consumo da infusão de suas folhas é responsável por aumentar o fluxo sanguíneo, sendo altamente eficaz no combate a diversos problemas de saúde como infecções e dores estomacais. Previne úlceras, estimula a digestão e a excreção por ser diurético, e é eficaz no tratamento de náuseas e antiespasmódico renal (Majewska *et al.*, 2019). Efeitos como atividade antifúngica, antibacteriana, antiprotozoário (Brügger *et al.*, 2019), anti-inflamatório, anticancerígeno, antioxidante, antireumático e cardioprotetor, igualmente já são ações bem descritas e interligadas a aplicação do capim-santo (Naik *et al.*, 2010; Oladeji *et al.*, 2019; Ali *et al.*, 2023).

As folhas de capim-santo possuem em sua composição química a forte presença de compostos aromáticos biossintetizados em sua matriz, como o citral e seus isômeros geométricos neral e geranial, aos quais são os principais responsáveis pelas atividades biológicas já descritas na literatura. Conjuntamente, compostos como acetato de geranil, limoneno, canfeno, citronelal, nonan-4-ol, β -cariofileno, citronelol, 6-metil-hept-5-en-2-um, óxido de cariofileno e γ -muuroleno, já são relatados a presença (Plata-Rueda *et al.*, 2020).

O material que compõe a estrutura química tanto dos extratos como do óleo essencial de capim-santo são estritamente afetados por fatores bióticos e abióticos. A origem geográfica, que vai caracterizar as condições geobotânicas do ambiente, as práticas de colheita, maturação, genética e o método de processamento da folha, irão espelhar os compostos presentes na solução ativa. Mas, apesar disso, determinados compostos como os hidrocarbonetos terpenos, álcoois, cetonas, ésteres e aldeídos estão sempre presentes e detectados nos materiais, variando somente seus teores (Majewska *et al.*, 2019).

Além disso, o óleo essencial extraído de sua matriz física possui grande importância por carrear as atividades biológicas e aromáticas do vegetal. O *Cymbopogon citratus*, em específico, e o *Cymbopogon exuosus* representam as principais espécies amplamente cultivadas para a extração de seus óleos essenciais nas diferentes regiões do mundo (Majewska *et al.*, 2019), ao qual seu óleo representa aproximadamente cerca de 1 a 2% de suas bases secas (Carlson *et al.*, 2001).

O óleo essencial é utilizado por diversas indústrias como um intensificador de odores, respectivo ao odor de limão. Este óleo tem sido utilizado em uma variedade de processos, incluindo a determinados alimentos, ao qual é empregado como flavorizante com sabor picante. O óleo do *C. citratus* também participa da produção de cosméticos, perfumes, fragrâncias, aromas, detergentes e produtos farmacêuticos (Ajayi; Sadimenko; Afolayan, 2016).

Ao observar seus efeitos antimicrobianos, pode-se constatar um grande espectro de ação, sendo ativo sobre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, tanto em bactérias quanto fungos (Naik *et al.*, 2010). Devido a tais efeitos o *C. citratus* está sendo amplamente pesquisado como um conservante em potencial para aplicação em alimentos (Majewska *et al.*, 2019).

Segundo a FDA (Food and Drug Administration) (21 CFR § 182.20, 2023), o óleo essencial de capim-santo já é reconhecido como um aditivo seguro (GRAS) e pode ser usado como uma alternativa ao uso dos aditivos sintéticos. Tal fato possibilita o alavancamento das

pesquisas voltadas à conservação de alimentos e interligadas a sua ação antimicrobiana já relatadas.

3.5 Nanoemulsão

As emulsões são sistemas dispersos e heterogêneos que consistem na presença de três componentes distintos em solução, dois líquidos imiscíveis e um estabilizante. O sistema de desenvolvimento da emulsão consiste nas gotículas do primeiro líquido (orgânica) (fase dispersa) entrarem em contato com o segundo líquido circundante (solvente) (fase contínua) e se dispersarem com a presença de um tensoativo (estabilizante) na solução (Tadros, 2013; Donsì; Ferrari, 2016).

O sistema mais comum é aquele ao qual temos a fase orgânica que contém o ativo a ser aplicado, composta da fase oleosa - a parte apolar da solução, e a fase contínua que é composta pelo solvente, a fase aquosa - polar, mas também há o sistema que o ativo a ser adicionado é a fase polar e o solvente é a fase apolar, e há o sistema bi-contínuo. Essa combinação, em determinadas condições de processo e com o estabilizante adequado, promove a mistura e a obtenção de um líquido homogêneo (Abismail *et al.*, 1999; Shafiq *et al.*, 2007; Jaiswal; Dudhe; Sharma, 2015).

Os processos de obtenção das emulsões são classificados de acordo com o método mecânico ou químico utilizado, ou de acordo com o índice de energia aplicado. A emulsificação de alta energia pode ser obtida por meio de métodos de agitação, emulsificação ultrassônica, homogeneização de alta pressão, microfluidização e emulsificação de membrana, enquanto os de baixa energia usam métodos como os de temperatura de inversão de fase, inversão de emulsão e emulsificação espontânea (Jaiswal; Dudhe; Sharma, 2015; Lima; Vaz; Borges, 2023).

O tamanho das partículas dispersas presentes no líquido irão caracterizar a emulsão em macro, micro ou nano. As gotas dispersas em escala nanométrica compreendida entre 10 e 100 nanômetros irão expressar o material como uma nanoemulsão (Kourniatis *et al.*, 2010; Tadros, 2013; Gupta *et al.*, 2016). Para ser caracterizado em macro, a emulsão precisa apresentar dimensionamento entre 100 nm a 100 µm, e em micro, 2 a 100 nm (McClements; Rao, 2011).

A escala nanométrica, em especial, tem vantagens de ser mais cineticamente estável, apresentando melhor estabilidade à agregação de partículas e separação gravitacional

(Sharma *et al.*, 2010; McClements; Rao, 2011) quanto às outras escalas, isso devido ao tamanho reduzido de suas gotículas em suspensão.

Além disso, as propriedades de uma emulsão são caracterizadas principalmente pelo tipo e concentração da fase orgânica a ser utilizada (Salvia-Trujillo *et al.*, 2017). Uma nanoemulsão (NE) ao ser aplicada se destaca, como dito anteriormente, devido ao tamanho reduzido de suas partículas, o que promove uma maior área superficial de contato, facilitando maior liberação de componentes do ativo no material aplicado e biodisponibilidade de compostos. Sua aplicação pode ser realizada em diversas áreas, tais como a de distribuição de medicamentos, alimentos e cosméticos (Gupta *et al.*, 2016).

A aplicação de NE em matrizes alimentícias para liberação de compostos com atividades bioativas diversas torna-se uma alternativa promissora para o aumento da conservação de propriedades microbiológicas, químicas e sensoriais dos alimentos. Nas indústrias químicas, farmacêuticas e alimentares há diversos compostos com baixa solubilidade em água e a formulação de nanoemulsões apresenta-se como uma ferramenta para aumento da solubilidade, meio facilitador de entrega de ativos (Shafiq *et al.*, 2007; Salvia-Trujillo *et al.*, 2017; Manzoor *et al.*, 2021), biodisponibilidade e encapsulamento (Yang *et al.*, 2023).

Estudos envolvendo o uso de NEs como meios facilitadores de compostos apolares em alimentos já estão sendo relatados. O uso de óleos essenciais é vinculado a uma forte ação bioativa, mas devido a sua alta hidrofobicidade, sua aplicação direta em alimentos torna-se um desafio. Sua utilização por meio de emulsões faz prática de um sistema de entrega nos alimentos que promove a dispersão do ativo nas áreas da matriz alimentar, melhorando seu contato sobre os microrganismos e, conseqüentemente, de sua ação antimicrobiana (Donsì *et al.*, 2011; Donsì; Ferrari, 2016). Donsi *et al.* (2011) observou o efeito antimicrobiano de nanoemulsões de D - Limonene e óleo de *Melaleuca alternifolia* em sucos de Laranja e Pêra sobre bactérias probióticas e patogênicas, e fungos, observando efeitos positivos sobre a dispersão do material e sobre a atividade bioativa visada.

Além disso, há estudos com a aplicação de NEs na conservação de vegetais minimamente processados como revestimentos, de forma a prolongar a vida útil dos mesmos. Manzoor *et al.* (2021) fez uso de kiwis revestidos de nanoemulsão de ácido ascórbico e vanilina e observou aumento da estabilidade microbiana, retardo de peso fisiológico e da atividade antioxidante dos vegetais. Uva, maçã, repolho, pepino, alface, laranja e abacaxi são outros vegetais envolvidos em pesquisas referentes ao seu aumento conservativo utilizando

nanoemulsões como revestimento e que obtiveram resultados positivos (Lima; Vaz; Borges, 2023), destacando o potencial de aplicação das nanoemulsões em matrizes alimentares.

3.6 Toxicidade

As substâncias complexas, sejam elas oriundas de fontes naturais ou produzidas sinteticamente, possuem componentes que irão interagir com matrizes externas e podem apresentar em sua interação efeitos individuais, sinérgicos ou antagônicos. Tais efeitos podem apresentar correlação com atividades tóxicas e antinutricionais (Gupta, 1987; Rodriguez-Garcia *et al.*, 2016).

Os metabólitos secundários são exemplos de substâncias complexas advindas das rotas biossintéticas dos organismos vivos que estão intrinsecamente ligados aos seus mecanismos de defesa. Suas atividades são diversas, podendo ser benéficas, com efeitos antimicrobianos, antiinflamatórios e antioxidantes, ou tóxicas, apresentando efeitos mutagênicos, cancerígenos, entre outras. (Gupta, 1987; Vélez *et al.*, 2018; Dhyani *et al.*, 2021; Ferreira *et al.*, 2022). Além deles, existem compostos essenciais para o desenvolvimento do ser humano como, por exemplo, os minerais, que possuem funções distintas e importantes para a nutrição quando consumidos adequadamente, mas, que sua exposição indevida, traz graves consequências toxicológicas (Capar; Mindak; Cheng, 2007).

Até mesmo substâncias já conhecidas e bem difundidas na indústria alimentícia quanto a sua aplicação podem apresentar atividades indesejáveis tóxicas. Em teores inadequados ou com um consumo recorrente, principalmente em exposições crônicas, um aditivo pode apresentar fatores citotóxicos. Ao pensar nos efeitos que a interação de mais de uma substância pode apresentar, seu risco é ainda maior (Burg *et al.*, 2022).

Por isso a importância de órgãos e legislações que regem suas utilizações e os limitem, e, que mesmo assim, deve-se existir preocupação quanto aos seus potenciais riscos toxicológicos (ANVISA, 2016), pois não há definição de diretrizes exatas que abordem quanto a todos os possíveis riscos de seus consumos.

Há órgãos responsáveis pela avaliação da toxicidade de substâncias utilizadas na indústria em todo país e no Brasil, em específico, seus limites de uso são regidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nos Estados Unidos temos a Food and Drug Administration (FDA) e na região da Europa, a European Food Safety Authority (EFSA) (Rodrigues *et al.*, 2019), aos quais são órgãos de importância internacional responsáveis por reger a utilização de substâncias em produtos industrializados em seus países e influenciando

a legislação de outros. E apesar de todos possuírem leis e normas para controle de aplicação de determinadas substâncias, todos possuem suas limitações.

Com isso, técnicas de ensaios biológicos sensíveis *in vivo* ou *in vitro*, a fim de avaliar a toxicidade de tais substâncias, foram e estão sendo desenvolvidas. Os ensaios *in vivo*, em específico, merecem atenção especial devido a sua funcionalidade, tendo em vista a utilização de Organismos Modelos Específicos (OME) como forma de “extrapolação” pensando no organismo humano. Neste sentido, bioensaios são elaborados a fim de avaliar, dimensionar ou prever os possíveis efeitos adversos advindos dos metabólitos sintetizados e demais substâncias presentes na matriz de um determinado organismo ou um fármaco (Cassar *et al.*, 2020).

Recentemente, a preocupação com o uso de organismos vivos, levou a aplicação do princípio de substituir, reduzir e refinar o uso de animais, sendo fundamental estabelecer a relevância ecológica e a adequação técnica de determinado bioensaio com o projeto a ser desenvolvido antes que o utilize (Finlayson; Leusch; Merwe, 2022).

O uso dos OMEs é diverso, englobando tanto mamíferos, artrópodes, aves, peixes e demais. Os camundongos, nas últimas décadas, têm sido o organismo modelo mais extensamente aplicado em ensaios toxicológicos devido a suas poderosas ferramentas e parâmetros genéticos, no entanto, devido a suas necessidades e estilo de desenvolvimento, exigiu-se sistemas alternativos paralelos (Choi *et al.*, 2021).

Logo, apesar de a aplicação dos bioensaios ser diversa, está tornando-se comumente a sua realização com organismos modelos aquáticos. Os animais aquáticos se destacam pois possuem simples manuseio e desenvolvimento, com análises que requerem baixo custo e possuem alta confiabilidade nos seus resultados expressos (Lima *et al.*, 2019).

O *Danio rerio* (zebrafish) ou *Brachydanio rerio* é um teleósteo ciprinídeo invertebrado de água doce e é uma espécie promissora utilizada como OME em bioensaios diversos (Santoro *et al.*, 2014). Ele possui alta sensibilidade a ensaios com substâncias, possuindo um pequeno tamanho que facilita seu manuseio, boa adaptabilidade e um ciclo reprodutivo curto, além de possuir 70% de genes ortólogos com os do ser humano que facilitam a extrapolação de resultados ao segundo organismo (Howe *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2022).

É empregado tanto em análises agudas como crônicas (Krupa *et al.*, 2022), sendo tratado via exposição a água, via oral ou intraperitoneal (Ferreira *et al.*, 2022), e utilizado em diferentes estágios de desenvolvimento, desde o embriológico ao adulto (Huang; Wu; Wu, 2022). Em seu estágio larval, devido a sua transparência, numerosos parâmetros

morfológicos, de desenvolvimento e comportamentais podem ser avaliados, sendo ideal para acompanhamento de estudos direcionados aos mecanismos de ação tóxica (Truong; Harper; Tanguay, 2010; Cassar *et al.*, 2020).

Recentes bioensaios de atividade locomotora e toxicidade aguda realizados com matrizes vegetais diversas obtiveram resultados satisfatórios ao aplicar o referido teste com o OME zebrafish adulto. Estudos com a casca do alho (Santos *et al.*, 2022), eugenol (Lemos *et al.*, 2021), ácido acetil aleuritólico (Bezerra *et al.*, 2020) e geoprópolis (Barboza *et al.*, 2019) demonstraram resultados promissores de atoxicidade e/ou baixa toxicidade, mesmo possuindo variação de ação sobre a locomoção dos peixes. Já testes comportamentais de claro/escuro observaram aumento da permanência na zona clara, caracterizando atividades ansiolíticas ao submeterem os peixes a ação de *Myconia albicas* (Castro *et al.*, 2022) e lectinas vegetais (Araújo *et al.*, 2022).

A sua ampla aplicabilidade o leva a ser utilizado em estudos de monitoramento ecoambiental, genética, desenvolvimento, toxicologia, reparo de danos ao DNA, câncer, dentre outras análises (Dai *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2022), tornando-o de grande valia para a indústria de alimentos e farmacológica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Terpenos

O Citral (pureza 95%) e o Eucaliptol (pureza 99%), foram adquiridos comercialmente na Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha).

O óleo essencial de capim-santo, extraído pelo método de hidrodestilação, foi cedido pelo laboratório de P & D Princípios Ativos de Plantas pelo Prof Icaro Gusmao Pinto Vieira, localizado no Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC), localizado da Universidade Federal do Ceará.

4.1.2 Óleo de pequi

O óleo de pequi, extraído da polpa da fruta *Caryocar brasiliense* pelo método de hidrodestilação, foi incluído no experimento com o objetivo de aumentar a solubilidade das nanoemulsões. Este óleo foi cedido pelo Laboratório de Química de Biopolímeros da Universidade Federal do Ceará.

4.1.3 Reagentes

O Pluronic® F127 (bloco de copolímero polyoxyethylenepropylene) foi adquirido da Sigma-Arldrich (Alemanha). O solvente acetonitrila grau HPLC utilizado nas análises cromatográficas foi adquirido da marca Tedia® (Ohio, USA) e a água ultrapura foi obtida do purificador Milli-Q.

4.2 Preparo das nanoemulsões

O preparo das nanoemulsões seguiu-se com a união da fase orgânica com a fase aquosa em três diferentes formulações. Os terpenóides foram, separadamente, adicionados ao óleo de pequi e homogeneizados. Após, o obtido foi incluído a uma solução contendo o agente surfactante, Pluronic® F127, e água nas quantidades conforme **Tabelas 02, 03 e 04** de modo que se obtivessem nanoemulsões com ativos em concentrações crescentes.

Tabela 02 - Formulação 01 das nanoemulsões.

Formulações	OCS (g)	CT (g)	EU (g)	Óleo de pequi (g)	Pluronic® F127 (g)	Água(g)	[C] (mg de ativo/ g de nanoemulsão)
NCS	0,25	-	-	1,75	0,40	17,46	25,18
NCT	-	0,25	-	1,75	0,40	17,46	25,18
NEU	-	-	0,25	1,75	0,40	17,46	25,18
Controle-N	-	-	-	2,00	0,40	17,46	0,00

OCS: óleo essencial de capim-santo; CT: citral; EU: eucaliptol; NCS: nanoemulsão contendo óleo essencial de capim-santo; NCT: nanoemulsão contendo citral; NEU: nanoemulsão contendo eucaliptol; Controle-N: nanoemulsão sem ativos.

Tabela 03 - Formulação 02 das nanoemulsões.

Formulações	OCS (g)	CT (g)	EU (g)	Óleo de pequi (g)	Pluronic® F127 (g)	Água (g)	[C] (mg de ativo/ g de nanoemulsão)
NCS	0,50	-	-	1,50	0,40	17,46	37,76
NCT	-	0,50	-	1,50	0,40	17,46	37,76
NEU	-	-	0,50	1,50	0,40	17,46	37,76
Controle-N	-	-	-	2,00	0,40	17,46	0,00

OCS: óleo essencial de capim-santo; CT: citral; EU: eucaliptol; NCS: nanoemulsão contendo óleo essencial de capim-santo; NCT: nanoemulsão contendo citral; NEU: nanoemulsão contendo eucaliptol; Controle-N: nanoemulsão sem ativos.

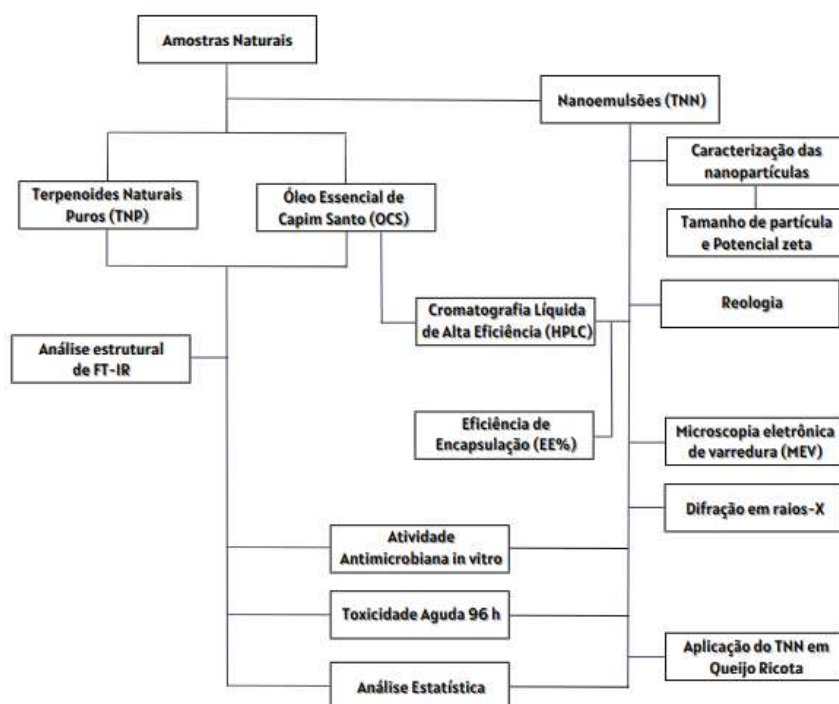
Tabela 04 - Formulação 03 das nanoemulsões.

Formulações	OCS (g)	CT (g)	EU (g)	Óleo de pequi (g)	Pluronic® F127 (g)	Água (g)	[C] (mg de ativo/ g de nanoemulsão)
NCS	1,00	-	-	1,00	0,40	17,46	50,35
NCT	-	1,00	-	1,00	0,40	17,46	50,35
NEU	-	-	1,00	1,00	0,40	17,46	50,35
Controle-N	-	-	-	2,00	0,40	17,46	0,00

OCS: óleo essencial de capim-santo; CT: citral; EU: eucaliptol; NCS: nanoemulsão contendo óleo essencial de capim-santo; NCT: nanoemulsão contendo citral; NEU: nanoemulsão contendo eucaliptol; Controle-N: nanoemulsão sem ativos.

As formulações foram então submetidas à sonicação utilizando um sonicador Branson Sonifier W-450D (Teltow, Alemanha, Hielsher) com presença de sonda, a uma amplitude de 70% e potência de 100-103 W. Ao decorrer de 2 min foi submetido a 12 ciclos de 10 s ligado e 10 s desligado, imersos em banho de gelo (Rebouças *et al.*, 2022). Ao final do processo, as nanoemulsões foram armazenadas sob refrigeração.

As amostras naturais, NEs após preparo das formulações, os terpenóides naturais (TNP), e o OCS, seguiram para as análises de acordo com o fluxograma da **Figura 03**.

Figura 03 - Fluxograma de análises das amostras naturais.

4.3 Caracterização dos terpenóides naturais puros e do óleo de capim-santo

4.3.1 Identificação de ativos principais através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para OCS

A técnica de quantificação de compostos por cromatografia líquida seguiu a metodologia descrita por Gaonkar *et al.* (2017) e Adekenov *et al.* (2021). O método de HPLC foi utilizado para a análise da quantificação do ativo citral presente no óleo essencial utilizado.

O sistema cromatográfico seguiu com aparelho cromatógrafo (Shimadzu) e detector de UV-Vis com Arranjo de diodos (SPD-M10AVP) (233 nm), com controlador (SCL-10AVP), desgaseificador on-line (DGU-14A), bomba (LC-10ADVP) e forno de coluna (CTO-10ASVP) (40°C). A separação foi obtida a partir da coluna Luna C18(2) (4,6 mm x 150 mm, 5 µm) e a fase móvel utilizada consistiu em H₂O:Acetonitrila (50:50 v/v). O tempo decorrido foi de 15 min, com injeção de 20 µL e vazão de 1,0 mL/minuto em modelo de eluição isocrático.

4.3.2 Análise estrutural de FT-IR

A análise foi realizada sob as amostras de TNP para determinação dos grupos funcionais presentes em sua matriz por espectrometria infravermelho por transformada de Fourier. As amostras foram analisadas na região infravermelha no intervalo de 4000–600 cm⁻¹ em espectrofotômetro IRTracer-100 (Shimadzu) por Reflexão Total Atenuada (ATR). Foram realizadas 64 varreduras por amostra na resolução 4 cm⁻¹.

4.4 Caracterização das nanoemulsões

4.4.1 Tamanho da partícula e índice de polidispersidade

O diâmetro e a dispersidade das partículas das amostras de TNN foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) usando um NanoZS® (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). As medições foram realizadas no ângulo de 90° após dispersão de 50 µL das TNN em 5,0 mL de água destilada a 25°C. Os dados obtidos foram calculados a partir de médias estatísticas e o diâmetro expresso como D (diâmetro médio de De Brouckere), que indica o ponto central ao qual gira a frequência volumétrica da distribuição.

4.4.2 Potencial Zeta

O potencial Zeta das amostras TNN foi obtido usando um NanoZS® (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) por medidas de potencial no plano de cisalhamento da dupla camada elétrica, com condutividade comparável e processo de mobilidade eletroforética (eletroforese) a 25°C.

4.4.3 Comportamento Reológico

As medições reológicas foram realizadas por meio de um reômetro de tensão controlada (AR 2000, TA Instruments – Advanced Rheometer), utilizando geometria de placa cônica (40 mm, cone de aço, ângulo 1° e gap de 47 µm). Para quantificação das medições, as amostras foram equilibradas por 3 min antes de cada medição a uma temperatura constante de 25 °C.

4.4.3.1 Estudo de fluxo

O efeito da taxa de cisalhamento na viscosidade aparente e o comportamento reológico das nanoemulsões foram avaliados no reômetro com taxas de cisalhamento na faixa de 1 s⁻¹ a 1000 s⁻¹ e frequência constante de 1 Hz foram aplicadas às amostras.

4.4.3.2 Estudo de cisalhamento oscilatório

O teste de varredura de tensão na faixa de 0,01 Pa a 20 Pa e frequência constante de 1 Hz, foi previamente realizado nas amostras para determinar a região viscoelástica linear. Os ensaios de varredura de frequência para determinação dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') foram então realizados na faixa de 0,1 Hz a 10 Hz e tensão de oscilação constante de 12 Pa.

Para cálculo aproximado do tempo de relaxação do material (λ_0), de acordo com Goes *et al.* (2020), define-se pela **equação 01** abaixo:

$$\lambda_0 = 2\pi/\omega_c$$

(Eq. 01)

λ_0 - tempo de relaxação

ω_c - ponto de frequência de cruzamento

4.4.4 Identificação de ativos principais através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para TNNs

O protocolo de análise seguiu conforme subitem 4.3.1 para a quantificação do ativo citral ou eucaliptol presente nas amostras de nanoemulsões. Para análise do valor de eficiência de encapsulação (EE%) dos terpenóides nanoemulsionados (TNN), seguiu metodologia de acordo com Rebouças *et al.* (2021). As amostras a serem analisadas passaram por ultrafiltro (Sartorius) de membrana vivaspin 500 (3000 MWCO).

A (EE%) foi obtida pela diferença do ativo presente no líquido com e sem ativo, quantificando o teor de ativo encapsulado pela **equação 2** abaixo:

$$EE\% = [(Tne/Tno)*100]$$

(Eq. 2)

EE% - eficiência de encapsulação

Tne - teor de ativo encapsulado

Tno - teor de ativo inicial na nanoemulsão

4.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O estudo morfológico das nanoemulsões foi realizado a partir do microscópio eletrônico de varredura Quanta 450-FEG (FEI, North America). As amostras foram adicionadas em lamínulas e a medição foi realizada nos intervalos de magnitude de 100 - 75000x.

4.4.6 Difração em Raio-X (XRD)

O método de identificação de partículas de materiais por difração em raios-X foi realizado utilizando o difratômetro Bruker D8 Advance (Alemanha). O equipamento emite radiação $K\alpha_1$ do Cu ($\lambda = 0,154$ nm) sob as condições de corrente de 40 mA e tensão de aceleração de 40 kV na geometria de Bragg Brentano. A varredura foi realizada na região do ângulo de difração (2θ) no intervalo de 5° a 90° com *step* de $0,02^\circ$. As amostras TNN foram previamente liofilizadas para análise.

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro

As atividades antimicrobianas dos TNNs, TNPs e OCS foram avaliadas sobre as cepas comerciais de bactérias patogênicas Gram-negativas, *Salmonella Enteritidis* IAL 1132, *Pseudomonas aeruginosa* IAL 1026 e *Escherichia coli* ATCC 11775, e sobre Gram-positivas,

Staphylococcus aureus ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, utilizando-se os métodos adaptados de difusão em ágar, conforme descrito por BrCAST/EUCAST (2021) e microdiluição em placas, conforme descrito por Branen e Davidson (2004).

4.5.1 Preparo do inóculo

As cepas bacterianas foram cultivadas no ágar de manutenção Triptona de Soja (TSA) e incubadas a 37 ± 2 °C, por 24 h. Após o período disposto, as colônias de tamanho característico foram inoculadas em tubos contendo 5 mL de caldo Peptona Caseína Soja (TSB) e incubadas a 37 ± 2 °C, por 24h para obtenção de uma suspensão bacteriana de 10^8 UFC/mL.

A partir da concentração de 10^8 UFC/mL foram realizadas diluições seriadas em tubos contendo água peptonada 0,1%, sendo o último preenchido de caldo TSB, a fim de se obter uma suspensão bacteriana de 10^5 UFC/mL para os ensaios de microdiluição, determinando-se a concentração bactericida mínima (CBM) e a concentração inibitória mínima (CIM) dos terpenos. Para a análise de difusão em ágar, o uso de diluição seriada não é necessário. As amostras lipídicas foram solubilizadas em dimetilsulfóxido 3% (DMSO) e as demais em água destilada.

4.5.2 Difusão em ágar

O ensaio utilizou o método de inoculação de semeadura em superfície por swab das suspensões bacterianas com contagens de 10^8 UFC/mL em ágar Mueller-Hinton. Em seguida, foram formados poços de, aproximadamente, 6 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade, aos quais foram adicionados o volume de 50 µL/poço nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 % das amostras. Os antibióticos amicacina e gentamicina foram utilizados como controles. As placas foram incubadas a 37 ± 2 °C / 48 h (BrCAST/EUCAST, 2021). Os agentes surfactantes e solubilizantes também foram testados quanto a sua atividade antimicrobiana.

O método foi realizado em duplicata e a atividade antibacteriana quantificada a partir da média obtida pela medição dos halos de inibição.

4.5.3 Microdiluição em placas

Foi determinada a concentração bactericida mínima (CBM) e a concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição, utilizando-se microplacas estéreis de 96 poços. (Microtest -Becton Dickinson and Co.), de acordo com Branen e Davidson (2004).

4.5.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As soluções TNNs, TNP's e OCS utilizadas foram diluídas em água destilada ou solução de DMSO 3% até a menor concentração desejada (0,039%) e adicionadas em alíquotas de 100 µL nos poços testes. Em seguida, adicionaram-se as suspensões bacterianas 10^5 UFC/mL em caldo TSB, com concentrações previamente determinadas por diluição seriada, em alíquotas de 100 µL. Como controle positivo foram utilizadas as alíquotas de 200 µL da suspensão bacteriana em TSB e de água estéril, e como controle negativo, foram utilizadas as alíquotas de 200 µL de soluções testes e caldo TSB.

Ao fim da distribuição, a placa foi submetida a leitura de densidade óptica a 630 nm no tempo inicial (T0) e no tempo após 24h de incubação (T24) a 37 ± 2 °C em leitor de absorbância de microplacas ELx808 (BioTek instruments).

Os resultados foram obtidos a partir da diferença de absorbância das leituras nos diferentes tempos (T24-T0). Foi considerado inibitório as variações que apresentarem $\leq 0,05$ nm (Branen; Davidson, 2004).

4.5.3.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Os poços testes que indicaram atividade antimicrobiana inibitória foram submetidos a determinação da CBM. Foi retirado 100 µL de cada poço respectivo e semeados em meio ágar triptícase de soja (TSA) pelo método de plaqueamento em superfície, *spread plate*. Após o procedimento, as placas foram incubadas a 37 ± 2 °C por 24h. Os resultados foram expressos a partir da menor concentração respectiva a aquela amostra que apresentou ausência de crescimento microbiano em sua extensão (Branen; Davidson, 2004).

4.6 Avaliação da segurança não clínica em Zebrafish (*Danio rerio*) adulto

Os peixes foram obtidos em fornecedor local, Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA (Ceará, Brasil), sendo selecionados zebrafishs adultos (ZFa), selvagens, de ambos os sexos, com idade aproximada de 60 - 90 dias, tamanhos de $3,5 \pm 0,5$ cm e peso $0,4 \pm 0,1$ g. Após recebimento, conforme descrito por Magalhães *et al.* (2017), os mesmos foram devidamente aclimatados em aquários de vidro retangulares (30 x 15 x 20 cm), por 24 h, contendo água previamente dechlorada (ProtecPlus®) e bombas de ar com filtros submersos, a 25 °C e pH neutro. Os peixes foram mantidos em ciclo circadiano de 14:10 h de claro/escuro e alimentados com ração *ad libitum* até 24 h antes dos experimentos.

Ao início do experimento, os peixes foram escolhidos randomicamente, imobilizados em esponja úmida e tratados via oral (v.o.) com 20 µL de amostra (TNN e TNP) ou veículo (controle) (Collymore; Rasmussen; Tolwani, 2013). A concentração respectiva das amostras terpenóides naturais e nanoemulsionadas a serem utilizadas foi baseada nos resultados da concentração bactericida mínima.

Ao fim dos experimentos, os animais seguiram para insensibilização por imersão em água gelada (2 - 4 °C), por 10 minutos, até a perda total de seus movimentos operculares (CONCEA, 2018). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UFC; 05299177/2021).

4.6.1 Teste de Campo Aberto (Atividade Locomotora)

Os peixes escolhidos (n=6/grupos) foram submetidos a tratamento via oral (v.o.) administrando-se 20 µL de amostra ou veículo e aclimatados individualmente em recipientes adequados durante 1 h, para devida absorção da solução ingerida. Um grupo sem tratamento (Naive) foi incluído na análise, assim como um grupo tratado com o agente ansiolítico diazepam e os solventes utilizados.

Os testes foram realizados em placas de petri (10 x 15) marcadas em quatro quadrantes e contendo a água do aquário, ao qual os peixes foram alocados e, por 0-5 min, avaliados quanto ao seu cruzamento de linhas (CL) para análise da atividade locomotora (Magalhães *et al.*, 2017).

4.6.2 Toxicidade aguda 96h

Os peixes escolhidos (n=6/grupos) seguiram ao bioensaio de toxicidade aguda, ao qual foram tratados via oral (v.o.), administrando-se 20µL de amostra ou veículo. Após tratamentos, foram repousados e avaliados durante o período determinado de 96h quanto a sua taxa de mortalidade, A partir de sua mortalidade determinou-se a concentração letal capaz de matar 50% dos animais (CL₅₀) (Arellano-Aguiar *et al.*, 2015).

4.7 Aplicação do ativo no queijo de ricota

O queijo de ricota foi obtido de forma comercial e previamente analisado quanto a sua qualidade microbiológica referente aos microrganismos *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e mesófilos totais (Silva *et al.* 2017).

Para o ensaio com a adição das amostras antimicrobianas, seguiu-se a metodologia descrita por Fancello *et al.* (2020), adaptada. A matéria prima foi fracionada em

amostras de 10 g e adicionada em frascos de vidro estéreis. A concentração dos TNN utilizados foi estabelecida a partir da determinação da CBM obtida anteriormente. O material foi testado nas CBM, CBMx2, CBMx3, CBMx5 (6,25; 12,5; 18,75 e 31,25%). Os TNN utilizados foram esterilizados em luz UV utilizando fina camada de material e adicionados nas amostras de queijo fracionado, homogeneizados com bastão de vidro e armazenados sob refrigeração.

As amostras foram analisadas quanto a sua carga microbiana de mesófilos totais no período de uma semana e divididas em 5 tempos (T0, T1, T24, T48, T168 horas). Foram utilizados os grupos Controle e Teste (Queijo+TNN). Os resultados obtidos foram expressos em UFC/g.

4.8 Análises Estatísticas

Os testes foram realizados em triplicata e seus resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA unidirecional), seguido do teste de Tukey com nível de significância estatística em 5% ($p < 0,05$), por meio do software GraphPad Prism 8.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos terpenóides naturais puros e do óleo de capim-santo

5.1.1 Identificação de ativos principais através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para OCS

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção espectroscópica UV é um método analítico aceito pela comunidade científica e muito utilizado para identificar e quantificar compostos em óleos essenciais e seus constituintes (Gaonkar *et al.*, 2016). O óleo de capim-santo possui em sua matriz química a presença de compostos orgânicos voláteis, ao qual se destaca o aldeído monoterpene citral, composto por dois isômeros, neral (NR-cis) e geranial (GR-trans) (Plata-Rueda *et al.*, 2020; Jin *et al.*, 2022).

No cromatograma de HPLC verifica-se a área referente à injeção de amostra (mAU) por o tempo de retenção (min) na coluna. O neral e o geranial, na detecção UV, foram obtidos no intervalo de resolução 210 a 270 nm. Utilizando a solução CT comercial foi possível observar a presença de dois picos distintos e proeminentes (**Figura 04**), equivalentes a presença dos isômeros NR-cis e GR-trans, respectivamente.

Figura 04 - Perfil cromatográfico dos isômeros neral e geranial.

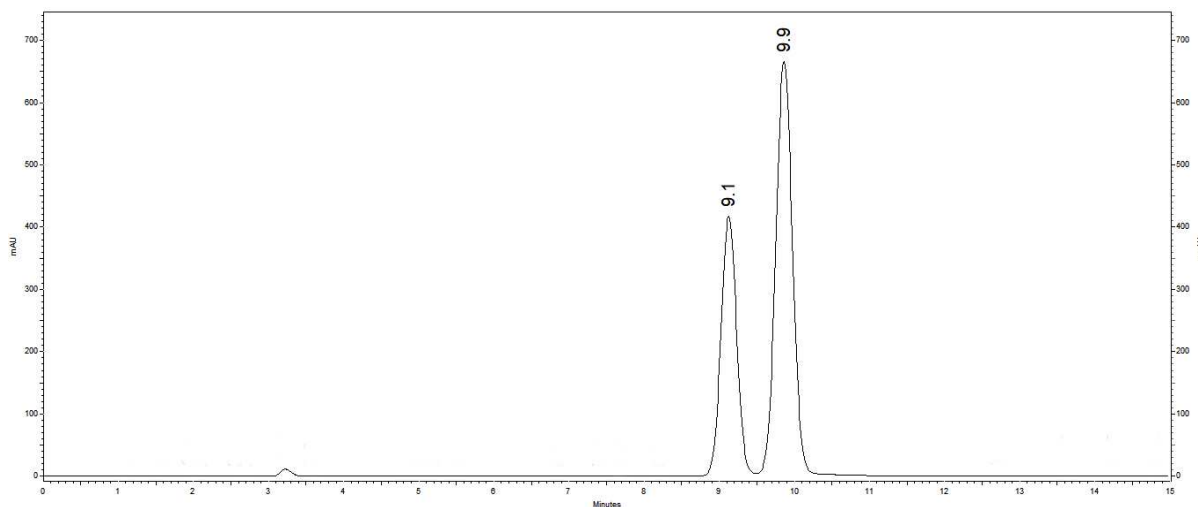
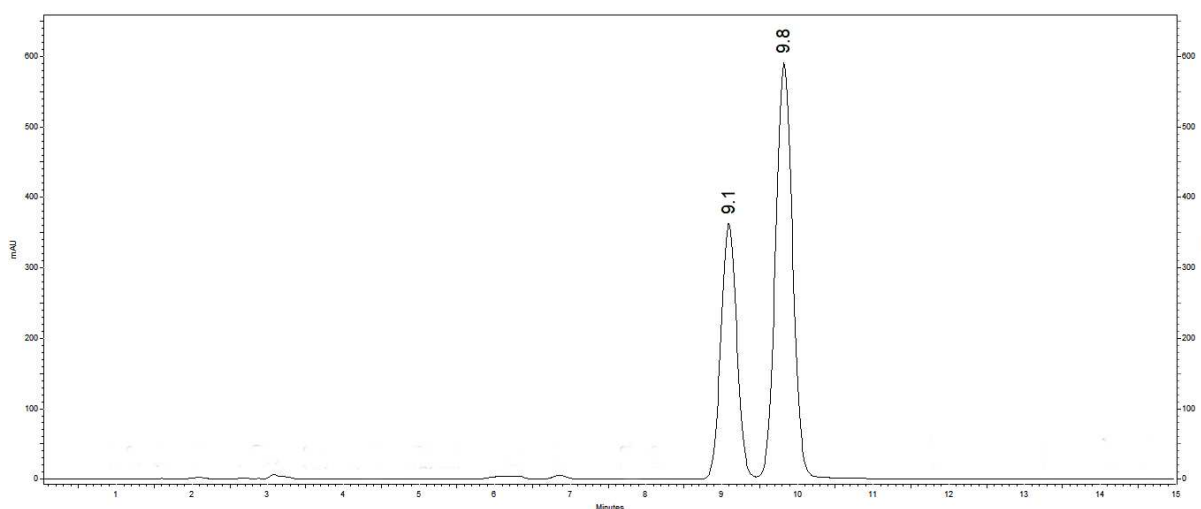


Gráfico de isômeros neral e geranial, respectivamente, presentes no padrão de Citral (pureza 95%) para calibração da coluna de separação.

Pelo método proposto de HPLC, o teor do ativo na amostra de OCS foi avaliado a partir da curva padrão obtida pelo citral comercial. Os picos obtidos após avaliação da amostra de OCS demonstraram grande semelhança aos picos do padrão, correspondendo aos constituintes neral e geranial e, dessa forma, caracterizando a presença do monoterpênóide CT em sua matriz (**Figura 05**).

Figura 05 - Cromatografia HPLC do óleo de capim-santo.



Verificou-se o teor de citral presente no óleo de capim-santo. O óleo essencial de capim-santo demonstrou a presença de 577,62 mg/g de citral em sua matriz (57,76 %), ao

qual, como pode-se visualizar na **Tabela 05**, 260,14 mg/g, 45,04% do citral obtido, é correspondente ao isômero neral e 317,48 mg/g, 54,96 % do citral obtido, é correspondente ao geranial.

Tabela 05 - Verificação dos ativos do OCS por Cromatografia Líquida.

Isômeros	Concentração (mg/g de OCS)	Porcentagem (%)
NR-cis	260,14 ± 0,11	45,04
GR-trans	317,48 ± 0,32	54,96

NR-cis - neral; GR-trans - geranial; OCS - óleo de capim santo.

Além disso, é possível observar um teor de GR-trans consideravelmente superior ao NR-cis. As soluções de citral compostas pela mistura desses dois isômeros possuem maior expressão do primeiro (Si *et al.*, 2012; Wang; Li; Wen, 2023), embora essa proporção pode variar de acordo com o método de extração e quantificação empregado. No entanto, a representação de GR-trans é superior ao NR-trans na maioria dos casos.

Paoli *et al.* (2023), avaliando os óleos essenciais de *Bakhousia citriodora* e *Zingiber officinalis* observaram a mesma diferença de representação, estando o primeiro óleo com teores bem aproximados do obtido no presente trabalho, com cerca de 59,60 % de geranial do citral encontrado e 40,40 % de neral. Já o segundo óleo, manteve a representação, mas possuiu valores superiores de geranial (65,52%). Wang, Li e Wen (2023), avaliando o citral presente em óleos essenciais de *Litsea cubeba*, observaram altos teores de citral, também com as presenças conjugadas de geranial (44,4–50,0 %) e neral (34,2–37,4 %).

Quanto ao teor total de citral presente na matriz orgânica apolar, Gaonkar *et al.* (2016), ao extrair o óleo essencial de folhas de capim-santo e compará-lo com o óleo comercial e submetê-los a análise cromatográfica (HPLC) quanto ao teor de citral, obtiveram resultados de 74,98% para o comercial e 48,92% do extraído. O material extraído, com teor inferior, corrobora com o resultado obtido no presente estudo.

Muala, Desobgo e Jong (2021) identificaram por cromatografia líquida a presença de 35 compostos aromáticos em extratos da folha de CS, dos quais relataram a proeminência do aldeído aromático citral, representando 35,77 % da composição.

Soonwera e Sittichok (2020), Plata-Rueda *et al.* (2020) e Jin *et al.* (2022), pelo método de cromatografia gasosa, identificaram no óleo essencial de *Cymbopogon citratus* diversos constituintes, dos quais, o citral estava entre os principais compostos presentes na

matriz apolar (70,15 %, 55,9 % e 67,93 %, respectivamente), seja em sua forma integral ou isomerizada.

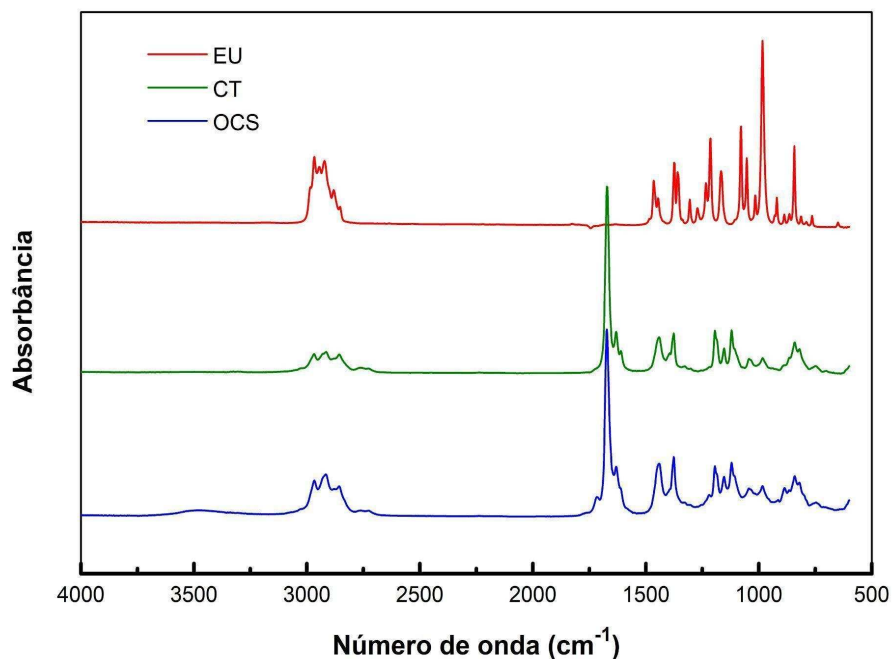
Os diferentes teores relatados na literatura quanto ao teor do ativo CT e de seus isômeros NR-cis e GR-trans, presentes no óleo essencial de CS extraído, são caracterizados pelas variações intraespecíficas que influenciam o seus valores e a sua composição presente mesmo sendo da mesma espécie de planta. Fatores como variações genotípicas, método extrativo, condições agrícolas e ambientais são alguns dos fatores que afetam a composição química do óleo essencial, tanto positiva quanto negativamente (Sarma *et al.*, 2019; Soonwera; Sittichok, 2020; Jin *et al.*, 2022). No caso do presente trabalho, os resultados de teores de citral obtidos mantiveram-se razoáveis e consideráveis ao compará-los com demais trabalhos da literatura.

5.1.2 Análise estrutural de FT-IR

O método de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier é um método de identificação de compostos moleculares. Os constituintes de cada amostra são caracterizados pela absorção e emissão de radiação infravermelha (IV) detectadas pelo equipamento e dispostos em frequências de vibração específicas de cada grupo funcional (Hamid, 2023).

O espectro FT-IR das amostras apolares está representado na **Figura 06** e na **Tabela 06**. A diferença entre os constituintes foi determinada com base no comprimento de onda da banda de absorção IR. Na **Figura 06** pode-se observar a representação de bandas mais intensas e menos intensas em cada amostra.

Os espectros infravermelhos das amostras de TNP (EU e CT) e OCS foram registrados na região infravermelha da faixa de 600–4000 cm^{-1} . Nas amostras do padrão terpenóide CT e de OCS, observa-se que as bandas apresentaram forte similaridade entre si. A frequência de vibração com forte intensidade foi observada no número de onda de 1377 cm^{-1} para as duas amostras. Tal banda é atribuída ao estiramento C - H presente em aldeídos, ligação que é característica do composto 3,7-dimetil-2,6-octadienal (citral), principal constituinte do capim-santo (Soltanzadeh *et al.*, 2021).

Figura 06 - Espectro FT-IR para diferentes amostras lipídicas.

EU - eucalipto; CT - citrão; OCS - óleo de capim-santo.

Tabela 06 - Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região de infravermelho.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição de banda		Referência
	Formula	Nomenclatura	
3000 - 2840	estiramentos C - H	alcanos	Lopes; Fascio, 2004
1820 - 1630	ligação de C = O	-	Lopes; Fascio, 2004
1672-1612	Estiramento C = C	alcenos	Hamid, 2023
	Estiramento C = C	alcenos	Hamid, 2023
1377	dobramento C - H	alcanos	Hamid, 2023
1300 - 1100	estiramentos C - O	-	Lopes; Fascio, 2004
1194 a 1048,64	Alongamento das ligações simples - C e - O e vibrações da ligação simples C - H	-	Jamuna <i>et al.</i> , 2017
990 - 983	estiramento C – O – C	éter	Akolade <i>et al.</i> , 2019

Fonte: próprio autor.

Além disso, no padrão de CT e no óleo de capim-santo, foram observadas bandas nas resoluções de 1672 e 1631 cm^{-1} , das quais podem ser atribuídas à ligação $\text{C} = \text{O}$ e, somente na amostra de citral, a presença da banda 1610 cm^{-1} correspondente a estiramentos $\text{C} = \text{C}$ de alcenos, confirmando a presença de ligações duplas conjugadas ($\text{C} = \text{C} - \text{CHO}$), comuns em monoterpenos acíclicos (Hamid, 2023; Jamuna *et al.*, 2017). Na amostra OCS na resolução de 1631 cm^{-1} , as insaturações também se fazem presentes.

As bandas de 2966 e 2916 cm^{-1} da amostra de óleo de capim-santo, são atribuídas a presença de estiramentos $\text{C} - \text{H}$ de alcanos. Grupos funcionais também foram encontrados por Kumar, Dev e Sourirajan (2021) ao analisar o espectro de amostras de óleos essenciais de capim-santo.

Na faixa de 1193 a 1120 cm^{-1} nas amostras OCS e CT, foi observado o alongamento da ligação simples C , ligação simples O e vibrações do esqueleto da ligação simples CH . Ligações interligadas a possível presença de geraniol como constituinte das amostras (Jamuna *et al.*, 2017), segundo monoterpenóide mais comum em amostras de plantas do gênero *Cymbopogon* (Wany *et al.*, 2014; Muala; Desobgo; Jong, 2021).

Na amostra do padrão terpenóide EU foram observados diversas bandas características. No comprimento de onda de 2966 cm^{-1} , atribuído ao estiramentos $\text{C} - \text{H}$ (grupo metil) de alcanos, assim como a banda de 2922 cm^{-1} , resultado também foi encontrado por Ahmed *et al.* (2021) ao analisarem a espectroscopia de amostras mixadas de óleos essenciais, com resultado similar ao obtido no presente estudo nas suas amostras que continham eucaliptol.

As bandas 1078 e 1053 cm^{-1} são representadas pelos estiramentos $\text{C} - \text{O}$. Nas bandas 1213 e 983 cm^{-1} , sendo a segunda a banda de maior intensidade na presente amostra, constatou-se a presença de estiramentos $\text{C} - \text{O} - \text{C}$ de grupos funcionais éter, ligações características do terpenóide eucaliptol (Akolade *et al.*, 2019; Rehman *et al.*, 2022).

5.2 Caracterização das nanoemulsões

5.2.1 Tamanho da partícula e Potencial Zeta

O uso de nanoemulsões é um atrativo do ponto de vista tecnológico. Seu uso promove a ampliação da aplicação de compostos apolares em produtos alimentícios pois é um método que aumenta a solubilidade do composto foco e é também um meio facilitador de entrega de ativos (Shafiq *et al.*, 2007; Salvia-Trujillo *et al.*, 2017; Manzoor *et al.*, 2021). O

tamanho de suas partículas, distribuição e diferença de densidade entre as gotas e o meio irão caracterizar a estabilidade de sua solução após sua preparação e a sua coalescência - aderência das partes antes separadas (Tadros, 2013).

A análise de avaliação e caracterização das nanoemulsões neste estudo foi conduzida somente com as emulsões que apresentaram estabilidade visual após o processo de homogeneização por ondas (sonicação). Uma combinação serial foi realizada utilizando os óleos, separadamente, dos terpenóides citral e eucaliptol e o óleo essencial de capim-santo, com surfactante F-127(Pluronic®), água e óleo estabilizante de pequi.

As formulações 01 e 03 de óleo de capim-santo não apresentaram estabilidade, assim como todas as formulações contendo o terpenóide EU. Por outro lado, as soluções com CT (NF01CT, NF02CT e NF03CT) e a formulação 02 com óleo de capim santo (NF02CS) apresentaram estabilidade superior a doze meses.

Sobre os parâmetros de caracterização das NEs, as formulações que se apresentaram estáveis demonstraram tamanhos de diâmetro de partícula (d.nm) no intervalo de 227 a 200 nm. As amostras estáveis apresentaram valores de índice de polidispersidade (Pdi) expressos na **Tabela 07** e tais valores são característicos de soluções estáveis, uma vez que Pdis inferiores a 0,5 são característicos de soluções estáveis (Bagale *et al.*, 2023). Referente ao potencial zeta (pz.mV), a presença do surfactante Pluronic F127 combinado com os mecanismos de estabilidade eletrostática e estérica, proporcionaram a nanoemulsão boa estabilidade coloidal (Wik *et al.*, 2020; Rebouças *et al.*, 2022).

Tabela 07 - Caracterização física das nanoemulsões estáveis.

Amostras	d.nm (nm)	Pdi	pz.mV (mV)
NF01CT	205,9 ± 2,921	0,079 ± 0,012	- 15,17 ± 0,643
NF02CT	220,2 ± 2,456	0,061 ± 0,021	- 14,33 ± 0,058
NF03CT	200,8 ± 2,747	0,082 ± 0,019	- 13,83 ± 0,839
NF02CS	207,0 ± 1,137	0,077 ± 0,013	- 21,87 ± 0,289

d.nm - ; Pdi - índice de polidispersidade; pz.mV - potencial zeta; NF01CT - amostra de formulação 01 de nanoemulsão de citral; NF02CT - amostra de formulação 02 de nanoemulsão de citral; NF03CT - amostra de formulação 03 de nanoemulsão de citral; NF02CS - amostra de formulação 02 de nanoemulsão de óleo de capim-santo; Resultados expressos em médias, seguidas de desvio padrão.

O índice de polidispersidade apresentado variou de 0,061 a 0,082. Quão menor a grandeza de dispersão, maior a homogeneidade das gotículas da emulsão, já valores superiores favorecem a sua instabilidade, ocasionando o fenômeno de amadurecimento de

Ostwald (Yu; Koroleva; Yurtov, 2021). Valores de Pdi abaixo de 0,2, como o obtido nas amostras em questão, indicam soluções com gotas aproximadamente do mesmo tamanho em seu sistema coloidal, e distribuição das partículas monomodal e estritamente monodispersas (Prakash; Vadivel, 2020; Rebouças *et al.*, 2022).

A estabilidade ou a sua falta, está interligada ao uso do tipo de surfactante e ao equilíbrio ligado aos constituintes presentes nas NEs (Yakoubi *et al.*, 2021). O processo de formação das nanoemulsões não é espontâneo, necessitando de energia (energia livre de Gibbs) para sua preparação. A presença do surfactante, além de reduzir significativamente a energia livre necessária, afeta, positivamente, a estabilidade da solução e controla o diâmetro do tamanho das gotas (Pereira *et al.*, 2021; Yakoubi *et al.*, 2021).

O equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) das NE é muitas vezes realizado de forma empírica. Para alcançar o HLB ideal, é necessário preparar diversas proporções e tipos dos constituintes tanto da fase oleosa, como dos surfactantes utilizados (Tadros, 2013). Para a amostra de óleo de capim-santo pode-se observar que o melhor equilíbrio foi encontrado na formulação 02, com proporção de 0,5 g de óleo essencial para 1,5 g de óleo de pequi, enquanto para as NCTs todas apresentaram equilíbrio adequado e para as NEUs nenhuma apresentou, necessitando de mais estudos com outros surfactantes para chegar em seu equilíbrio ideal.

5.2.2 Comportamento Reológico

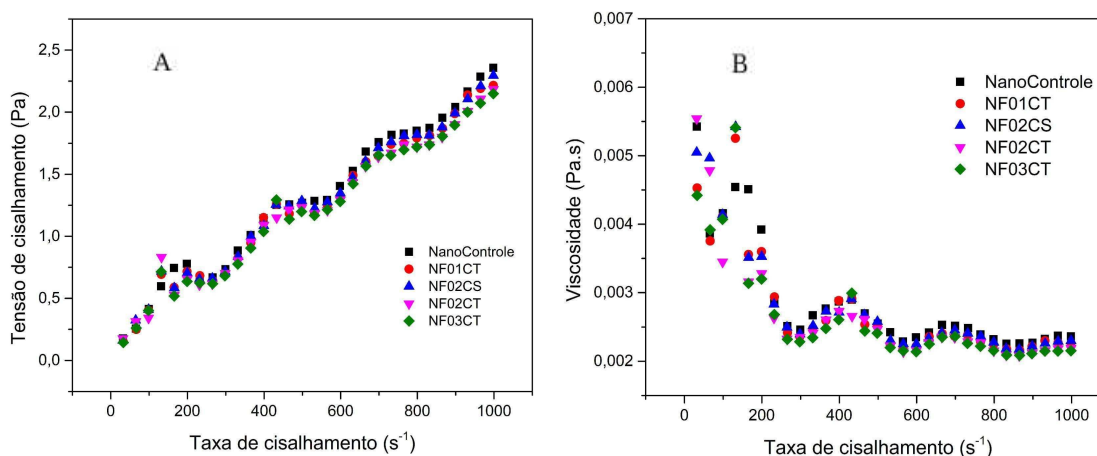
5.2.2.1 Medições de fluxo

A avaliação reológica de um fluido é de essencial importância com relação a obtenção de informações sobre o seu comportamento e de sua estabilidade como consequência do fluxo originado por uma deformação incidente (Prakash, Parida, 2023).

O estudo de fluxo das nanoemulsões do presente trabalho foi obtido a partir da modificação da viscosidade decorrente da variação da taxa de cisalhamento, isto é, o grau de deformação das partículas do fluido, dentro de uma faixa 1 a 1000 s⁻¹ a uma temperatura constante de 25°C. A partir do aumento da referida taxa, observa-se a modificação da tensão de cisalhamento (**Figura 07A**), que se mantém proporcionalmente ao crescimento do grau de deformação, ao passo que a viscosidade do fluido diminui (**Figura 07B**). A reação inversa, entre a taxa de cisalhamento e a viscosidade observada, é característica de fluidos não newtonianos e pseudoplásticos (Hosny *et al.*, 2019; Miastkowska; Kulawik-Pióro; Szczurek, 2020) e o fenômeno evidenciado inicialmente é denominado de afinamento por cisalhamento

e é comum em nanoemulsões do tipo óleo em água (Prakash; Parida, 2023; Wang *et al.*, 2023).

Figura 07 - Curvas de fluxo das nanoemulsões (A) e viscosidade aparente versus taxa de cisalhamento para as amostras de nanoemulsões (B).



Além disso, as nanoemulsões apresentaram ligeiras variações de valores iniciais (0,0065 - 0,0020 Pa.s) quanto ao parâmetro de viscosidade (**Figura 07B**) durante toda a faixa de cisalhamento até o grau de deformação 240 s^{-1} . Essa variação possivelmente está relacionada ao teor do ativo presente em suas matrizes. Em seguida, os valores começaram a apresentar grande similaridade de comportamento, independente do teor de ativo presente.

Paralelamente à similaridade do parâmetro de viscosidade, observa-se o início de um comportamento de espessamento por cisalhamento de forma sutil, aproximadamente, entre os graus de deformação de 300 a 420 s^{-1} e de 590 a 700 s^{-1} , em que se observa aumento da viscosidade das nanoemulsões com o aumento da taxa de cisalhamento. As partículas dos fluidos nesse ponto podem ter se agregado sob o efeito do cisalhamento, formando os chamados hidroclusters ou seu escoamento pode ter sofrido modificações, de um escoamento mais ordenado em camadas para um desordenado - fenômeno de transição ordem-desordem (Al-Sakkaf; Onaizi, 2022).

5.2.2.2 Medições de cisalhamento oscilatório

Os módulos de frequência de perda (G'') e o de armazenamento (G') são parâmetros de avaliação para identificar a estabilidade de uma emulsão por meio da reologia oscilatória (Goes *et al.*, 2020). O módulo G'' é interligado à viscosidade do fluido e a sua

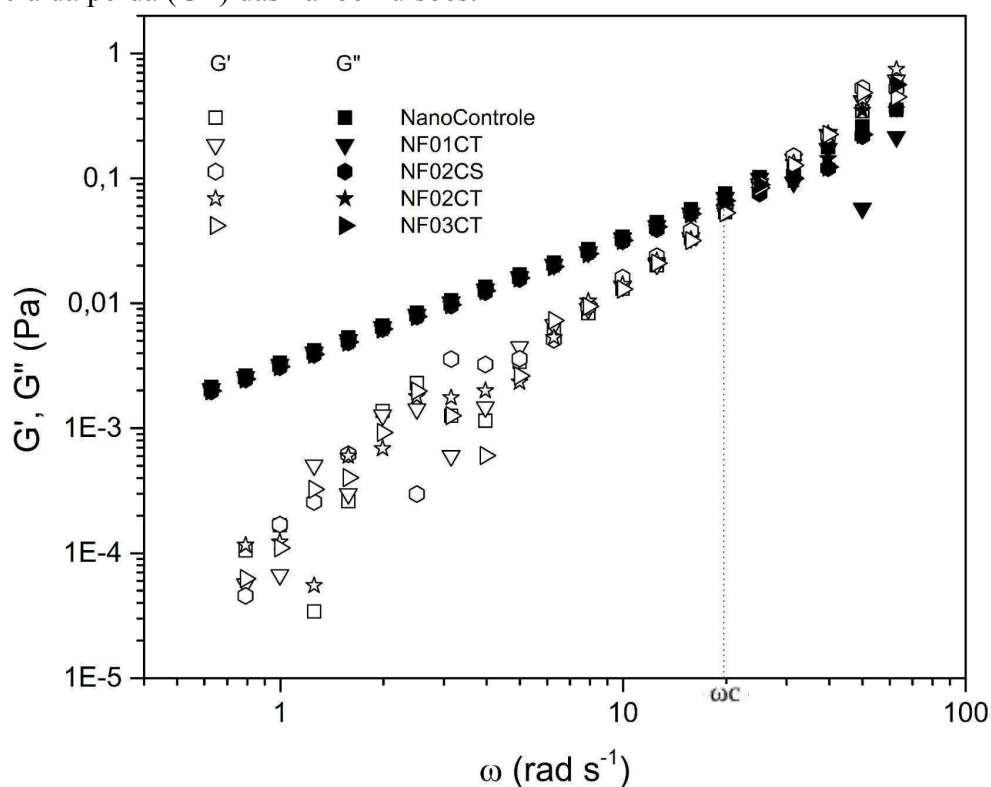
capacidade em dissipar energia pela forma de calor, enquanto o G' é interligado à capacidade elástica do material.

As nanoemulsões testadas exibiram comportamentos similares entre a amostra controle e as amostras com ativos (**Figura 08**), havendo crescimento gradativo dos módulos dinâmicos G'' e o G' com o aumento da frequência.

A partir de ensaios reológicos dentro do regime de viscoelasticidade linear, foram obtidos os módulos dinâmicos apresentados no gráfico de varredura de frequência. As grandezas de viscosidade e elasticidade apresentaram comportamento, em frequência reduzida, predominante de fluidos viscoelásticos líquidos, com G'' superior ao G' (Hassanzadeh *et al.*, 2023). Em valores de frequência superiores a 19 rad s^{-1} , as amostras apresentaram comportamento viscoelástico sólido, $G' > G''$, exibindo o ponto de interseção de frequência de cruzamento (ω_c) em $19,87 \text{ rad.s}^{-1}$ para todas as amostras. A partir do ω_c calculou-se o tempo de relaxamento do material como $0,316 \text{ s}$.

O tempo de relaxamento do material está relacionado ao tempo que o material leva a se equilibrar e reorganizar seu sistema por movimento de suas moléculas após a aplicação de determinada tensão. Líquidos com λ_0 mais próximos a zero apresentam comportamentos mais sólidos em processos de deformação muito rápidos. Goes *et al.* (2020), ao analisarem uma nanoemulsão do óleo de *Pterodon pubescens* obtiveram valor de tempo de $0,281 \text{ s}$, valor inferior ao obtido no presente trabalho para os ativos de OCS e CT.

Figura 08 - Gráfico de varredura de frequência dos módulos de armazenamento (G') e frequência da perda (G'') das nanoemulsões.



Quanto aos módulos dinâmicos, resultados semelhantes foram obtidos por Asensio *et al.* (2020), Santamaría *et al.* (2023) e Wang *et al.* (2023) ao avaliarem, respectivamente, nanoemulsões de óleo essencial de orégano argentino, nanoemulsão de carvacrol e nanoemulsão de conjugados de proteína de soro de leite-carboximetilquitosana, ao qual o módulo de perda foi maior que o de armazenamento em valores de frequência inferiores e, em valores superiores, houve a inversão de valores. A ocorrência do comportamento observado é caracterizado pela possível formação de micelas alongadas e emaranhadas, e sua formação confere ao material aumento de sua viscosidade, o que, conseqüentemente, determina, em parte, as propriedades viscoelásticas do fluido (Ezrahi; Tuval; Aserin, 2006; Mitrinova; Tcholakova; Denkov, 2018; Asensio *et al.*, 2020)

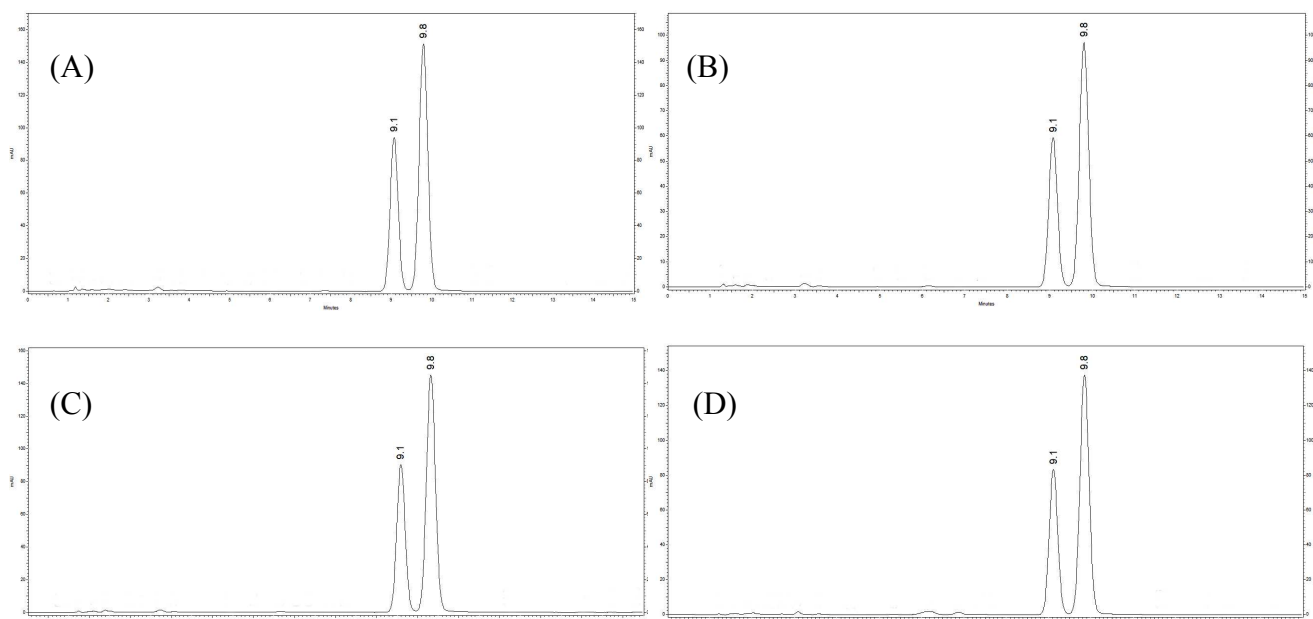
5.2.3 Identificação de ativos principais através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para TNNs

Como mencionado anteriormente, o monoterpene citral é composto por dois isômeros, neral (NR-cis) e geranial (GR-trans) (Plata-Rueda *et al.*, 2020; Jin *et al.*, 2022). A quantificação do citral pelo método de cromatografia líquida é realizada a partir da presença dos seus constituintes isoméricos.

A partir da identificação dos compostos por análise dos cromatogramas obtidos por HPLC deu-se continuidade as amostras de nanoemulsões para quantificação do teor de citral presente. Novamente, o gráfico mostra a área referente à injeção de amostra (mAU) em função do tempo de retenção (min) na coluna, sendo que a solução CT comercial foi utilizada como padrão para observar a presença dos isômeros NR-cis e GR-trans.

Assim como na amostra de OCS, o neral e o geranial, na detecção UV das amostras NF01CT, NF02CT, NF03CT, NF02CS, foram obtidos no intervalo de resolução 210 a 270 nm. Os picos obtidos após avaliação cromatográfica das amostras de TNN demonstraram também grande semelhança aos picos do padrão, com a forte presença de picos característicos dos constituintes do citral, NR-cis e GR-trans (**Figura 09**).

Figura 09 - Cromatografia HPLC das Nanoemulsões (A) NF01CT, (B) NF02CT, (C) NF03CT e (D) NF02CS.



Gráficos cromatográficos das amostras (A) NF01CT, (B) NF02CT, (C) NF03CT e (D)-NF02CS, com a presença dos picos dos isômeros neral e geral, respectivamente, e seus tempos de retenção de 9,1 e 9,8 para todas as amostras. O padrão de Citral (pureza 95%) foi utilizado para calibração da coluna de separação.

O presente ensaio também foi utilizado para a averiguação do teor de citral contidos nas amostras de nanoemulsão. Os valores obtidos por HPLC, apresentados na **Tabela 08**, mostram determinada discrepância com os volumes estimados adicionados nas NEs. Os valores estimados (v.e.) foram pressupostos pela porcentagem do encontrado para averiguação do teor adicionado do citral padrão nas amostras. Os valores variaram de acordo com os teores de ativo presentes na solução, quanto maior o teor de ativo, menor foi a sua perda.

O processamento das amostras para as nanoemulsões vai direcionar suas características e sucesso quanto a homogeneização dos compostos presentes. Como é um método que envolve a aplicação de compostos aromáticos voláteis, a perda durante o processo de preparação da NE é inerente. Embora haja poucos relatos na literatura sobre a perda durante o processo dos compostos voláteis, existem fatores decorrentes do processo que podem afetar o teor final de ativo na solução. A sonólise e as condições extremas de processo da sonicação, por exemplo, podem promover a perda de compostos. A oxidação por radicais livres ou pela oxigenação (Tiwari *et al.*, 2009) e a aquisição de calor (Rehman *et al.*, 2021) durante o desenvolvimento das NEs, são fatores que podem favorecer a perda do ativo nas nanoemulsões durante o processo de sonicação.

Tabela 08 - Verificação dos ativos através dos TNNs por Cromatografia Líquida.

Amostras		V.e. adicionado (mg/g)	Concentração obtida (mg/g)	Porcentagem de perda (%)
NF01CT	NR-cis	11,51	6,72 ± 0,027	41,62 %
	GR-trans	13,67	7,98 ± 0,039	41,62 %
NF02CT	NR-cis	17,07	12,50 ± 0,013	26,77 %
	GR-trans	20,69	15,15 ± 0,074	26,78 %
NF03CT	NR-cis	23,06	20,87 ± 0,031	9,50 %
	GR-trans	27,29	23,44 ± 0,029	14,11 %
NF02CS	NR-cis	11,19	6,97 ± 0,041	37,71 %
	GR-trans	13,99	8,72 ± 0,033	37,67 %

NF01CT - nanoemulsão de citral formulação 01; NF02CT - nanoemulsão de citral formulação 02; NF03CT - nanoemulsão de citral formulação 03; NF02CS - nanoemulsão de óleo essencial de capim-santo formulação 02; V.e. - valor estimado de isômeros adicionados em cada nanoemulsão; Nr-cis - isômero neral; Gr-trans - isômero geranial.

Independente do teor perdido, valores de citral continuaram presentes nas amostras. Desses teores de CT, a proporção quanto ao teor de GR-trans presente em sua composição foi consideravelmente superior ao NR-cis. Tal resultado foi observado em todas as amostras testadas, variando pouquíssimo entre amostras, e é condizente com os valores obtidos também na amostra de OCS.

5.2.3.1 Eficiência de encapsulação (EE)

A análise da eficiência de encapsulação (EE) é um método utilizado para averiguar a taxa de sucesso do processo disposto para proteção do ativo. O método de HPLC é utilizado para averiguar o teor de amostra presente nas amostras ultrafiltradas de nanoemulsão, levando em consideração o teor de ativo adicionado na formulação da solução a fim de obter-se o resultado desejado (Rehman *et al.*, 2021; Rebouças *et al.*, 2022).

Para a obtenção do material filtrado, as NEs devem passar por ultrafiltro durante centrifugação. O filtro usado tem como finalidade reter o material encapsulado e recuperar o material livre, seja solvente ou algum ativo não encapsulado. Os teores de ativos encontrados nas amostras filtradas possuíram valores abaixo dos limites quantificáveis (LQ - 0,00005) do HPLC, não sendo possível estimar os seus valores nelas.

Devido aos baixos teores do material ativo nas amostras filtradas, os EE obtidos possuíram altíssimo índice de sucesso na encapsulação e baixíssima variação (99,99 - 99,96), como pode-se observar na **Tabela 09**.

Tabela 09 - Eficiência de Encapsulamento dos terpenos Neral e Geranial.

Amostra Nanoemulsão	Ativo Total Adicionado no TNN (mg/g)	Ativo filtrado		EE Neral (%)	EE Geranial (%)
		Neral (µg/mL)	Geranial (µg/mL)		
NF01CT	25,18	< LQ	< LQ	> 99,99	> 99,99
NF02CT	37,76	11,6	< LQ	99,96	> 99,99
NF03CT	50,35	< LQ	< LQ	> 99,99	> 99,99
NF02CS	25,18	< LQ	< LQ	> 99,99	> 99,99

NF01CT - nanoemulsão de citral formulação 01; NF02CT - nanoemulsão de citral formulação 02; NF03CT - nanoemulsão de citral formulação 03; NF02CS - nanoemulsão de óleo essencial de capim-santo formulação 02; TNN - terpenóide natural nanoemulsionado; EE - eficiência de encapsulação.

Tal resultado pode ser relacionado à alta solubilidade do ativo no agente solubilizante utilizado (Rebouças *et al.*, 2022), o óleo de pequi, e ao aumento de sua solubilidade pela presença de um sistema anfifílico (surfactante) adequado (Zhou *et al.*, 2018). Tais fatores promovem maior estabilidade da nanoemulsão utilizada e favorecem a retenção das moléculas hidrofóbicas (Yoplac *et al.*, 2021). A perda de ativos por processo de homogeneização não afetou o resultado da EE.

Feng *et al.* (2023) e Zhou *et al.* (2018), utilizando microcápsulas de citral com, respectivamente, carreadores lipídicos nanoestruturados (Monoestearato de glicerila e Triglicerídeos de cadeia média) e mistos de metilcelulose, quitosana e alginato de sódio, obtiveram resultados muito inferiores (78,37%; 60,9 - 82,2%) ao do presente estudo.

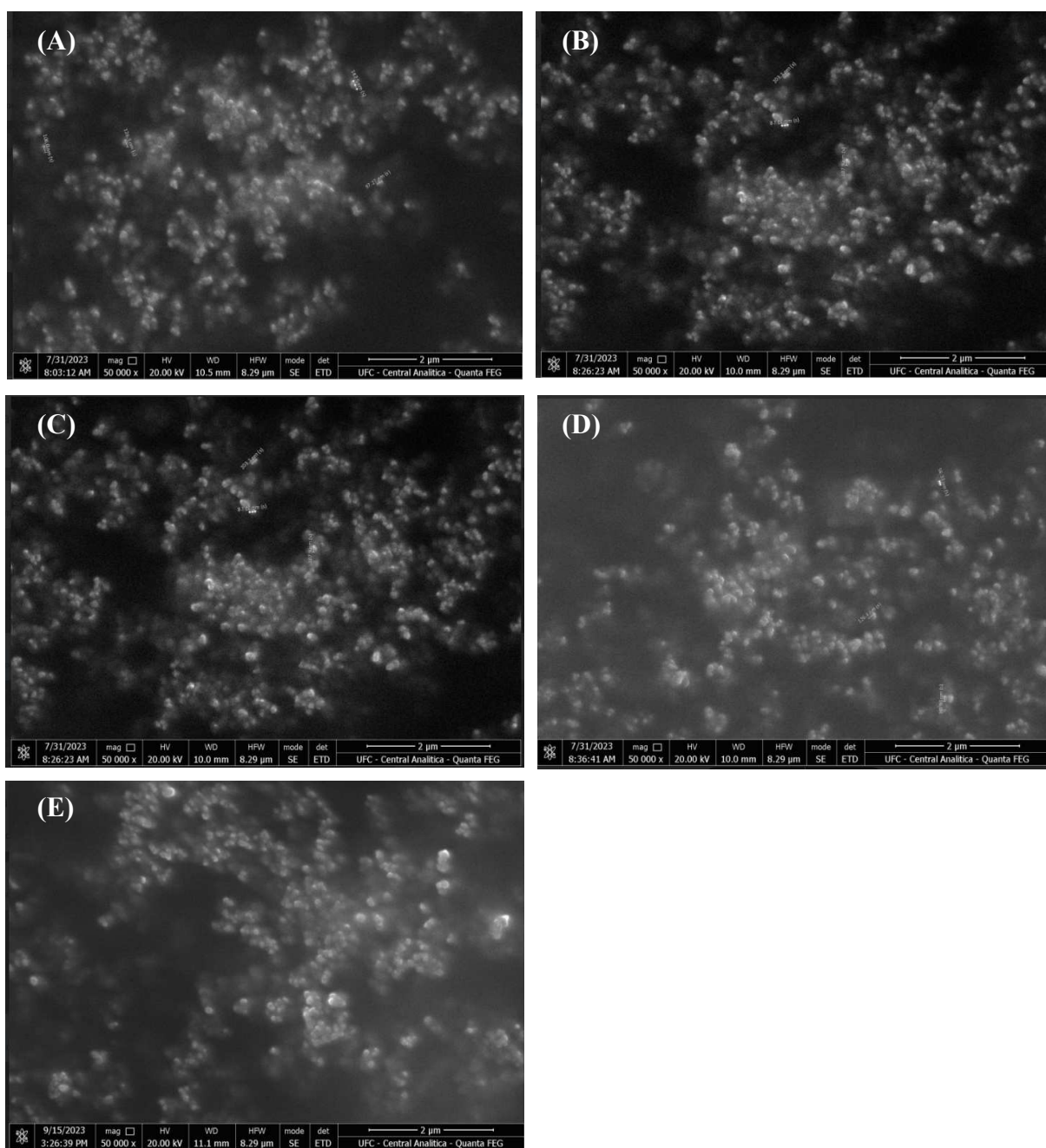
Já Yoplac *et al.* (2021), alcançou resultados de eficiência de encapsulação similares (99,9%) aos obtidos neste estudo com microcápsulas de citral e dextrina. Observa-se, dessa forma, determinadas condições ideais ao seu processo utilizado e, em especial, ao método utilizado para as nanos de CT.

5.2.4 Caracterização Morfológica

As emulsões são formadas por partículas em formato de gota, estando-as em suspensão (Tadros, 2013; Gupta *et al.*, 2016) em um líquido forçadamente homogêneo. Na

Figura 10, as imagens das partículas em suspensão dos terpenóides e óleo de capim-santo nanoemulsionados são apresentadas.

Figura 10 - Micrografias obtidas por MEV (A) Amostra NF01CT, (B) Amostra NF02CT, (C) Amostra NF03CT, (D) Amostra NF02CS e (E) Nanoemulsão Controle sem ativo.



Leituras realizadas em ampliação de 50.000x, escala de 2 µm.

As amostras micrografadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresentaram-se compactadas no filtro do microscópio e sobre sua superfície pode-se observar

a dispersão das partículas, em sua maioria, de formato esférico. A não uniformidade das partículas possivelmente é devido a dificuldade de espalhamento da massa líquida das NEs por todo o filtro do microscópio.

Em pequenos volumes, as gotículas das NEs são caracterizadas pelo seu formato esférico, ocasionado pela presença da tensão superficial, mas em volumes mais densos, as fases dispersas das gotículas se deformam, aumentando a área superficial do material e ao armazenamento de energia elástica (Goes *et al.*, 2020).

Com relação ao tamanho da partícula, observou-se valores variados nas amostras contendo citral (105,5 - 65,6 nm). Pelos valores apresentados, o tamanho da partícula foi dependente da concentração, pois o menor valor foi correspondente a amostra NF01CT, que possui menor teor de terpeno em comparação com as demais formulações. Resultado também observado por Marei, Rabea e Badawy (2018), Rys *et al.* (2022) e Fernandes *et al.* (2023), que utilizaram a técnica de MEV, respectivamente, em nanoemulsões de citral, óleo essencial de capim-marmadu (*Urochloa brizantha*) e óleo essencial de hortelã-pimenta e observaram a relação concentração das amostras com a modificação de sua morfologia.

As nanoemulsões com concentrações superiores não apresentaram tanta diferenciação quanto ao tamanho de partícula, mas a amostra NF02CS (116,0 nm) destacou-se por conter a maior partícula. Como visto anteriormente, a utilização de um surfactante também irá caracterizar o tamanho da partícula estruturada (Pereira *et al.*, 2021; Yakoubi *et al.*, 2021) e, diferente das NEs com ativo citral, pode-se observar que a interação da amostra de nanoemulsão de OCS com o surfactante escolhido promoveu o surgimento de uma partícula levemente superior às outras.

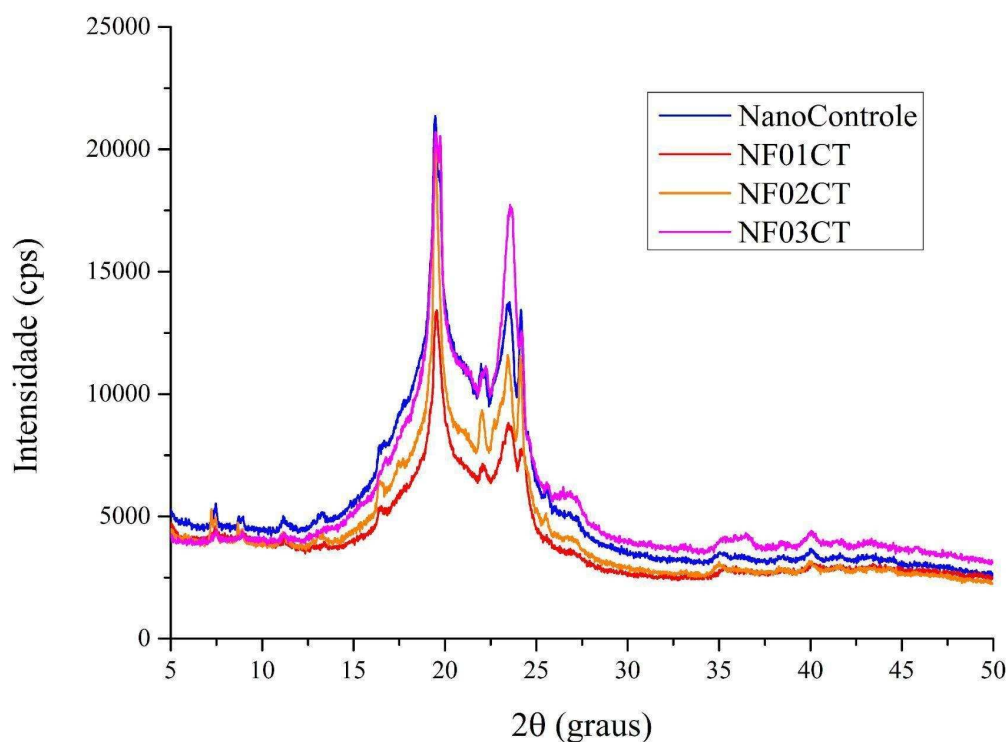
Além disso, os resultados obtidos para a técnica de PCS e os resultados no MEV foram consideravelmente variados, com tamanho observado de partículas reduzidas para o segundo método em todas as amostras. A técnica de correlação de fótons baseia-se no espalhamento dinâmico de luz nas partículas em suspensão, obtendo-se o diâmetro hidrodinâmico (Tosi *et al.*, 2020), enquanto a técnica de microscopia incide elétrons em condições a vácuo diretamente na amostra, aos quais muitas vezes pode trazer instabilidade ao seu contraste e encolhimento das partículas (Wightman, 2022). Vinculado a diferença dos métodos, a fase da amostra utilizada para análise possui diferenciações para cada método, enquanto para o PCS foi utilizado a amostra líquida, para a leitura do MEV foi necessário ela estar em seu estado semi-sólido para devida visualização das partículas.

5.2.5 Difração em Raio-X (XRD)

A análise de difração em Raio-X é um método de caracterização que permite conhecer o tipo de estrutura cristalina dos materiais pelos feixes difratados na estrutura dos cristais presentes em sua matriz, possibilitando estimar seu parâmetro de rede e identificar demais domínios físicos importantes do cristal (Rabiei *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2020), facilitando, por sua vez, a utilização de técnicas de aplicação, por exemplo, de revestimentos em alimentos, mais apropriadas para aquele determinado material (Ali; Chiang; Santos, 2022).

Os difratogramas das amostras de NE estão representados nas **Figuras 11 e 12**. As amostras de nanoemulsões testadas apresentaram similaridade de seus picos entre si e com a NE controle (amostra sem ativo) utilizada. A semelhança de picos indica a não modificação das cristalinidades originais (Ma *et al.*, 2020), presentes na amostra controle, pela adição do ativo nas diferentes concentrações.

Figura 11 - Difratograma de raios X das amostras de NEs com nanoemulsão controle.



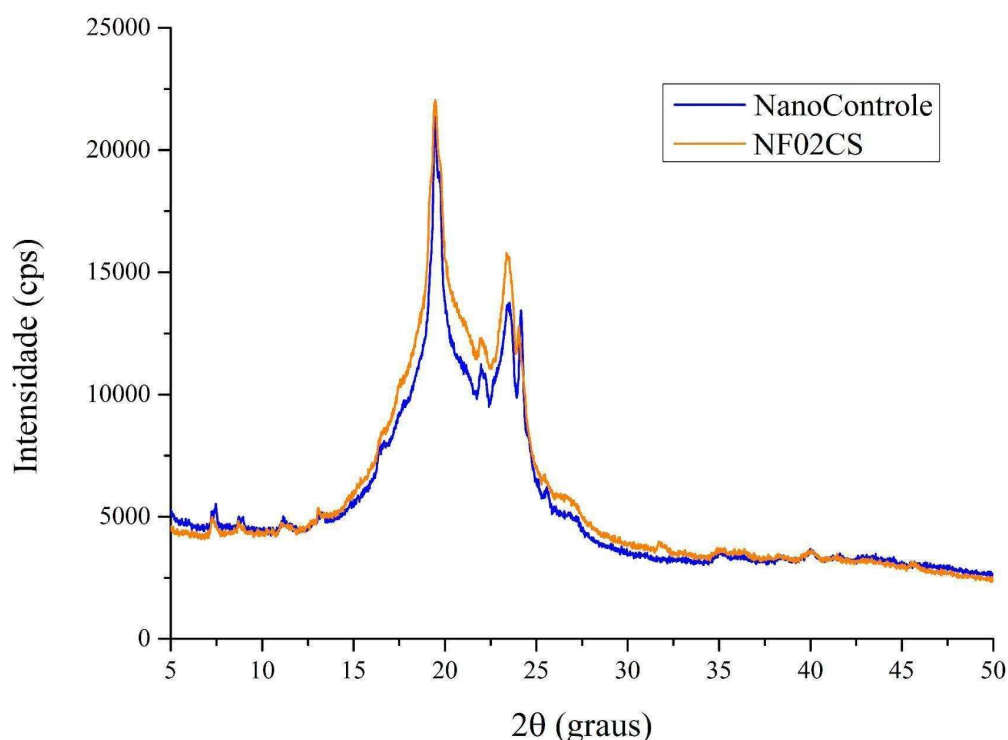
A amostra NanoControle apresentou pico largo característico em $2\theta = 20^\circ$, com a presença de picos de menor intensidade em $2\theta = 23^\circ$ e 24° ao compará-los com o primeiro. Picos entre $2\theta = 20^\circ$ e 24° são característicos a presença do F-127(Pluronic®) (Takashima *et*

al., 2022), ao qual apresentou aspecto amorfo com características de cristalinidade. As amostras de nanoemulsão com ativo também apresentaram picos nos presentes graus características de amostras amorfas com certo grau de cristalinidade.

Apesar das semelhanças de rede entre as amostras, a intensidade dos picos é diferenciada. Ao adicionar baixo teor de citral em uma solução, como realizado na amostra NF01CT, ocorreu a diminuição da intensidade dos picos de difração observados no presente ensaio. Resultado também observado por Jin, Wang e Bai (2009) ao substituir ligações com átomos de nitrogênio com citral, em sua amostra de quitosana. A diminuição da intensidade de uma amostra baixa a sua cristalinidade, tornando o material mais disperso, devido ao arranjo desorganizado de seus átomos, mais amorfo e menos opaco.

As demais amostras, mais concentradas de terpenóide, de forma crescente ao aumento da concentração de ativo, possuíram aumento da intensidade dos picos. Este resultado indica o aumento do índice de cristalinidade das amostras, tornando-as mais regulares, pelo arranjo padronizado de seus átomos, menos amorfas e mais opacas. A amostra de capim-santo (NF02CS), na **Figura 12**, também apresentou comportamento equivalente a NanoControle e a nanoemulsão semelhante contendo CT (NF02CT).

Figura 12 - Difratoograma de raios X da amostra de NE com óleo de capim-santo.



5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

5.3.1 Difusão em ágar por profundidade

O método de difusão em ágar é um método de sensibilidade *in vitro* de bactérias patogênicas aos agentes antimicrobianos, podendo estimar-se suas respectivas ações (BrCAST/EUCAST, 2021).

O presente teste seguiu com as amostras TNNs, OCS e TNPs sobre as cepas de *Salmonella* Enteritidis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

Para viabilidade do ensaio, segundo a BrCAST/EUCAST (2022), as cepas testadas devem apresentar um determinado limite de halo de inibição, pela ação dos antibióticos controles, característico aos microrganismos fastidiosos. Os dados são restringidos a ação da amicacina sobre *Staphylococcus aureus* (18 - 24 mm) e a gentamicina sobre *Pseudomonas aeruginosa* (17 - 23 mm) e *Escherichia coli* (19 - 26 mm). A cepa de *E. coli* foi a única que apresentou resistência maior do que o descrito aceitável, mas mesmo assim pode-se observar ações respectivas dos terpenóides citral e eucaliptol testados sobre a mesma.

A **Tabela 10** indica o potencial antimicrobiano obtido referente às amostras utilizadas no ensaio de difusão em ágar. As amostras puras foram mais eficazes para todos os microrganismos testados. A amostra eucaliptol foi a que possuiu menor ação, tanto contra microrganismos Gram-positivos quanto Gram-negativos. Os microrganismos que apresentaram maior sensibilidade às amostras de TNPs e OCS foram *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Especificamente para *S. aureus*, a amostra CT destacou-se quanto a seu halo de inibição, enquanto para *L. monocytogenes* a amostra OCS que se destacou. Além disso, destaca-se a ação superior do terpenóide citral e do óleo de *C. citratus* puros sobre os microrganismos Gram-positivos. Os halos das referidas amostras foram superiores às zonas de inibição correspondentes a ação do antibiótico controle (Amicacina - 30 µg) sobre *S. aureus*.

Muitos trabalhos relatam a ação que o óleo de capim-santo e o citral têm sobre microrganismos diversos. As duas amostras possuem amplo espectro de ação, a primeira, a amostra lipídica (Naik *et al.*, 2010; Subramaniam; Yew; Sivasamugham, 2020; Dimri *et al.*, 2020; Shendurse *et al.*, 2021) e a segunda, a amostra padrão (Ferrario *et al.*, 2020; Shi *et al.*,

2017; Schenk; Ferrario; Guerrero, 2018; Shen *et al.*, 2022; Freire *et al.*, 2022), englobam bactérias sejam elas Gram-positivas ou Gram-negativas, e fungos (bolores ou leveduras).

Tabela 10 - Resultados antimicrobianos por difusão em ágar dos terpenóides e do óleo essencial para diferentes microrganismos.

Amostras	Microrganismo				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CT					
100,00%	24,00 ± 1,41 aA	10,00 ± 0,00 cA	10,00 ± 0,00 cA	20,75 ± 0,35 bA	0 ± 0,00
50,00%	22,50 ± 0,71 aB	9,00 ± 0,00 cAB	9,00 ± 0,00 cA	18,50 ± 0,71 bB	0 ± 0,00
25,00%	7,50 ± 0,71 bC	8,00 ± 0,00 bB	7,00 ± 0,00 bB	13,75 ± 0,35 aC	0 ± 0,00
Amostras	Microrganismo				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EU					
100,00%	10,50 ± 0,71 bA	8,75 ± 0,35 cA*	8,75 ± 0,35 cA*	13,50 ± 0,71 aA	0 ± 0,00
50,00%	10,00 ± 0,00 aA	6,75 ± 0,35 cB*	0 ± 0,00	9,00 ± 0,00 bB	0 ± 0,00
25,00%	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Amostras	Microrganismo				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
OCS					
100,00%	21,75 ± 0,35 aA	0 ± 0,00	8,75 ± 0,35 bA	23,00 ± 1,41 aA	7,30 ± 0,35 bA
50,00%	18,75 ± 1,06 aB	0 ± 0,00	7,75 ± 0,35 bA	20,50 ± 0,71 aB	0 ± 0,00
25,00%	14,50 ± 0,00 aC	0 ± 0,00	0 ± 0,00	16,00 ± 1,41 aC	0 ± 0,00
Controle DMSO 3%	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
** Amicacina (30 µg)	21,50 ± 0,71	ND	ND	24,00 ± 1,41	ND
*** Gentamicina (10 µg)	ND	13,50 ± 0,71	15,50 ± 0,71	ND	22,5 ± 2,12

Médias seguidas de desvio padrão.

* Amostras com crescimento reduzido; CT - óleo do terpenóide citral; EU - óleo do terpenóide eucaliptol; CS - óleo essencial de capim-santo; ND - não determinado.

Médias seguidas com as mesmas letras minúsculas na linha ou mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ($p < 0,05$).

Resultados expressos em milímetros (mm).

Muitos trabalhos relatam a ação que o óleo de capim-santo e o citral têm sobre microrganismos diversos. As duas amostras possuem amplo espectro de ação, a primeira, a amostra lipídica (Naik *et al.*, 2010; Subramaniam; Yew; Sivasamugham, 2020; Dimri *et al.*, 2020; Shendurse *et al.*, 2021) e a segunda, a amostra padrão (Ferrario *et al.*, 2020; Shi *et al.*,

2017; Schenk; Ferrario; Guerrero, 2018; Shen *et al.*, 2022; Freire *et al.*, 2022), englobam bactérias sejam elas Gram-positivas ou Gram-negativas, e fungos (bolores ou leveduras).

Também nas amostras de CT e OCS, a presença de seus constituintes isoméricos, neral e geranial, são caracterizados pelas suas ações antimicrobianas. NR-cis e GR-trans já possuem relatos de suas ações sobre microrganismos patogênicos como *S. aureus* e *Salmonella enterica* (Peichel *et al.*, 2019; Subramaniam; Yew; Sivasamugham, 2020; Shendurse *et al.*, 2021).

Quanto à sensibilidade dos microrganismos Gram-positivos, em específico *S. aureus* e *L. monocytogenes*, pode-se observar que algumas de suas características morfológicas caracterizam o seu grau de estímulo a agentes antimicrobianos. A parede celular das bactérias Gram-negativas são mais resistentes do que das Gram-positivas e isso se deve a presença de diversas camadas complexas em sua matriz (Jia *et al.*, 2023). As camadas são constituídas de fosfolipídios, lipopolissacarídeos e uma espessa camada de peptidoglicano, tornando-as menos permeáveis e menos suscetíveis à ação de soluções externas (Agnish; Sharma; Kaur, 2022).

Para os microrganismos Gram-negativos *E. coli* e *S. Enteritidis*, a melhor ação retratada foi na amostra de citral. Os halos obtidos para citral puro ou diluído apresentaram ação decrescente, de acordo com a diminuição da concentração, com exceção para a amostra de *S. Enteritidis*, a qual não houve diferença estatística nas duas primeiras concentrações. A amostra OCS não apresentou nenhuma ação sobre *E. coli*.

O microrganismo mais resistente testado foi a *Pseudomonas aeruginosa*. Somente a amostra de óleo de capim-santo puro apresentou ação relativa, que foi relativamente inferior ao comparar seu halo com os demais. A presença de uma ação antimicrobiana relativa de óleo de *C. citratus* também foi obtido por Subramaniam, Yew e Sivasamugham (2020). Naik *et al.* (2010) e Shendurse *et al.* (2021), com a mesma amostra e o mesmo microrganismo, os autores não obtiveram nenhuma ação relativa. A *P. aeruginosa* é caracterizada pela sua alta resistência a antibióticos de amplo espectro e há múltiplos mecanismos de ação (Liao *et al.*, 2022) devido a sua baixa permeabilidade da parede celular (Valková *et al.*, 2022), logo o presente resultado não foi singular.

O ensaio com as nanoemulsões somente seguiu com as amostras que apresentaram estabilidade (NF01CT, NF02CT, NF03CT e NF02CS). A atividade antimicrobiana de uma nanoemulsão pode ser caracterizada pela sua interação com a membrana celular do microrganismo. Conjuntamente a este fator, a fusão e a estabilidade dos constituintes das NEs, assim como a forma de liberação e a interação eletrostática dos ativos

presentes em sua matriz, com a parede celular microbiana, irão definir a ação em questão (Moradi; Barati, 2019; Agnish; Sharma; Kaur, 2022).

Na **Tabela 11** é expressado os resultados das amostras TNNs. Os controles de nanoemulsão sem ativo (Controle N) e o de óleo de pequi (Controle OP) não apresentaram ação relativa sobre os microrganismos testados. Os resultados obtidos para as nanoemulsões com ativos foram inferiores aos obtidos para as TNPs e OCS devido à concentração do referente ativo presente, muito superior nas duas últimas.

Tabela 11 - Resultados antimicrobianos por difusão em ágar das nanoemulsões para diferentes microrganismos.

Amostras	Microrganismo				
NF01CT	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
100,00%	8,50 ± 0,70 aA	0 ± 0,00	0 ± 0,00	8,50 ± 0,70 aA	0 ± 0,00
50,00%	8,00 ± 0,00 aA*	0 ± 0,00	0 ± 0,00	7,75 ± 0,35 aA*	0 ± 0,00
25,00%	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Amostras	Microrganismo				
NF02CT	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
100,00%	10,00 ± 0,00 bA	0 ± 0,00	0 ± 0,00	10,75 ± 0,35 aA	0 ± 0,00
50,00%	8,00 ± 0,00 bB	0 ± 0,00	0 ± 0,00	9,25 ± 0,18 aB	0 ± 0,00
25,00%	7,75 ± 0,35 aB	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Amostras	Microrganismo				
NF03CT	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
100,00%	14,75 ± 0,35 bA	8,25 ± 0,35 cA	0 ± 0,00	18,50 ± 0,70 aA	0 ± 0,00
50,00%	10,5 0 ± 0,70 bB	7,5 ± 0,00 abC	0 ± 0,00	12,00 ± 0,00 aB	0 ± 0,00
25,00%	7,75 ± 0,35 bC	7,0 ± 0,00 bB	0 ± 0,00	10,50 ± 0,70 aC	0 ± 0,00
Amostras	Microrganismo				
NF02CS	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
100,00%	8,50 ± 0,70 aA	0 ± 0,00	0 ± 0,00	8,75 ± 0,35 aA	0 ± 0,00
50,00%	6,50 ± 0,00 bB	0 ± 0,00	0 ± 0,00	8,25 ± 0,35 aA	0 ± 0,00
25,00%	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Controle OP	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Controle N	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
** Amicacina (30 µg)	21,50 ± 0,71	ND	ND	24,00 ± 1,41	ND

*** Gentamicina (10 µg)	ND	13,50 ± 0,71	15,50 ± 0,71	ND	22,5 ± 2,12
-------------------------	----	--------------	--------------	----	-------------

Médias seguidas de desvio padrão. Resultados expressos em milímetros (mm).

* Amostras com crescimento reduzido; NF01CT - amostra de nanoemulsão de citral formulação 01; NF02CT - amostra de nanoemulsão de citral formulação 02; NF03CT - amostra de nanoemulsão de citral formulação 03; NF02CS - amostra de nanoemulsão de óleo de capim-santo formulação 02; Controle OP - controle óleo de pequi; Controle N - controle nanoemulsão sem terpenóide; ND - não determinado.

Médias seguidas com as mesmas letras minúsculas na linha ou mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ($p < 0,05$).

A amostra de nanoemulsão NF03CT foi a que apresentou as maiores zonas de inibição, resultado ao qual é correspondente aos microrganismos *L. monocytogenes* e *S. aureus*. O resultado obtido é manifestado devido a formulação 03 de NEs ser a que apresentou maior concentração de ativo quando comparada às demais. Além disso, foi a única amostra que apresentou ação sobre *E. coli* nas suas três concentrações testadas, mas não sobre *S. Enteritidis* e *P. aeruginosa*. As demais amostras de NEs não apresentaram nenhuma ação relativa sobre os microrganismos Gram-negativos. Resultado condizente com a resistência superior das bactérias de morfologia mais complexa.

Quanto às demais formulações, a nanoemulsão NF02CT possuiu resultados superiores a nanoemulsão NF02CS. Os halos da amostra NF02CS possuíram maior similaridade com o obtido para a amostra NF01CT. Assim como na **Tabela 10**, os ensaios com a presença do ativo CT tiveram zonas de inibição mais expressivas do que o ativo OCS.

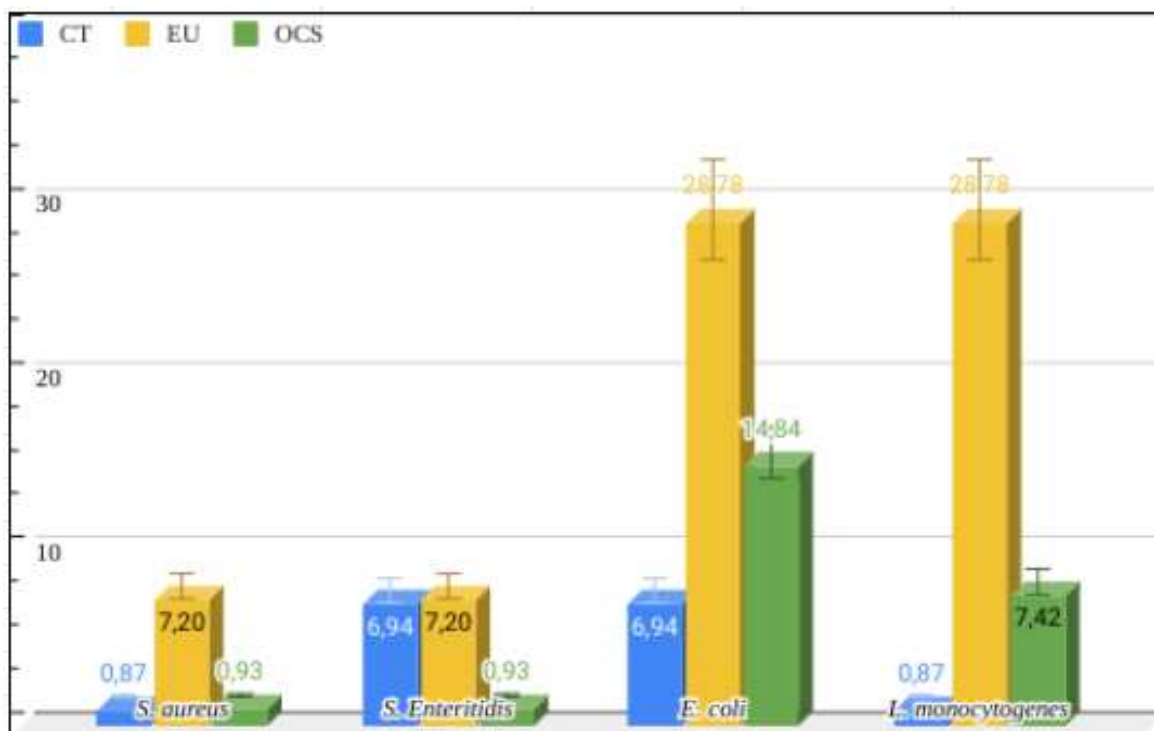
5.3.2 Microdiluição

O ensaio de microdiluição é um método sensível, baseado na utilização de meios líquidos para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM). Pelo presente ensaio ser realizado em meio líquido e utilizar medições espectrofotométricas, espera-se que os resultados obtidos sejam superiores aos obtidos pelo teste de difusão em poços, que muitas vezes é considerado um ensaio preliminar para constatação da atividade antimicrobiana. O ensaio de difusão em ágar depende de fatores como a difusividade da amostra no meio, quantidade de amostra aplicada e a espessura do meio (Sari *et al.*, 2022) que levam a determinada influência nos resultados dos testes de atividade antibacteriana, ao qual o presente ensaio de microdiluição não possui.

Na **Figura 13** são expressados os resultados de CIM encontrados para as amostras de TPNs e o OCS. Os resultados possuíram variação considerável de valores. A interação das amostras com a parede celular do microrganismo e a presença de compostos diversos pode

caracterizar essa diversificação de resultados (Costa *et al.*, 2021). Dessa forma, alguns compostos apresentam maior afinidade de interação com determinados microrganismos do que outros.

Figura 13 - Atividade inibitória dos terpenóides citral e eucaliptol e do óleo de capim-santo.



O microrganismo *S. aureus* apresentou as menores concentrações inibitórias para as amostras de citral (0,87 mg/mL), eucaliptol (7,20 mg/mL) e óleo de capim-santo (0,93 mg/mL) seguido pela *S. Enteritidis* com, valores, 6,94; 7,20 e 0,93 mg/mL, respectivamente. Quanto menor a concentração, mais efetivo é a amostra em questão.

Oliveira *et al.* (2019), Xiao *et al.* (2020) e Costa *et al.* (2021), analisando óleo de *C. citratus* em diferentes cepas isoladas de *Staphylococcus* spp., obtiveram, respectivamente, resultados de concentração inibitória de 0,63 mg/mL, 50 mg/mL e 27,81 mg/mL para todas as cepas testadas. Os valores de CIM encontrados foram próximos ou bem superiores ao do presente estudo e, as duas últimas pesquisas possuíam seus efeitos sobre o crescimento microbiológico, consideravelmente, inferiores.

Os resultados inibitórios obtidos para a amostra de citral condizem com o resultado obtido no ensaio de difusão em ágar. A amostra apresentou resultados muito superiores para atividade antimicrobiana referente aos microrganismos Gram-positivos, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e superiores também a amostra de OCS. Além disso, as amostras

CT e OCS demonstraram resultados melhores que os obtidos para a amostra de EU para todos os microrganismos, o que também condiz com os dados obtidos até o momento.

A atividade mais reduzida observada no estudo para a amostra de eucaliptol pode ser atribuída a sua constituição orgânica. Na estrutura química do EU há grupos funcionais distintos presentes e, de forma geral, suas ligações são caracterizadas pela presença e destaque do composto éter (R-O-R) (Akolade *et al.*, 2019; Rehman *et al.*, 2022). O grupamento éter possui baixa atividade antimicrobiana ao comparar com as demais amostras lipídicas, citral e óleo de capim-santo, que possuem grupamentos aldeídicos responsáveis por parte de sua ação elevada (Neto *et al.*, 2022). A análise de FT-IR realizada no presente estudo identificou picos de alta intensidade de éter, confirmando a sua presença na amostra de EU.

A amostra de eucaliptol possuiu menor ação para os microrganismos *E. coli* e *L. monocytogenes*. A *E. coli*, por ser um microrganismo Gram-negativo, apresentou resultado esperado quando comparado a bactéria Gram-positiva. Em relação a *L. monocytogenes*, Öztürk, Gündüz e Sürengil (2021), ao avaliarem óleos essenciais de manjerição, coentro, alecrim e louro, observaram a presença de 1,8 - cineol como composto majoritário dos mesmos e observaram que suas concentrações inibitórias também eram bastante elevadas, como observado no presente ensaio para o TNP EU.

O óleo de capim-santo, por sua vez, é uma amostra com citral majoritariamente em sua constituição, sendo também o composto principal responsável pela sua ação antimicrobiana (Ortega-Cuadros *et al.*, 2018; Shendurse *et al.*, 2021). O óleo essencial de *C. citratus*, e seus constituintes, atuam diretamente na permeabilidade da membrana celular, podendo ocasionar vazamentos de materiais intracelulares (Valková *et al.*, 2022) e inibindo suas atividades essenciais (Costa *et al.*, 2021) realizadas por seus componentes enzimáticos e proteicos, ao qual participam da captação e obtenção de nutrientes essenciais para a sobrevivência e crescimento das bactérias. O citral, em específico, é considerado um agente alquilante devido à presença de aldeídos em sua constituição química, atuando diretamente no DNA do microrganismo (Peichel *et al.*, 2019).

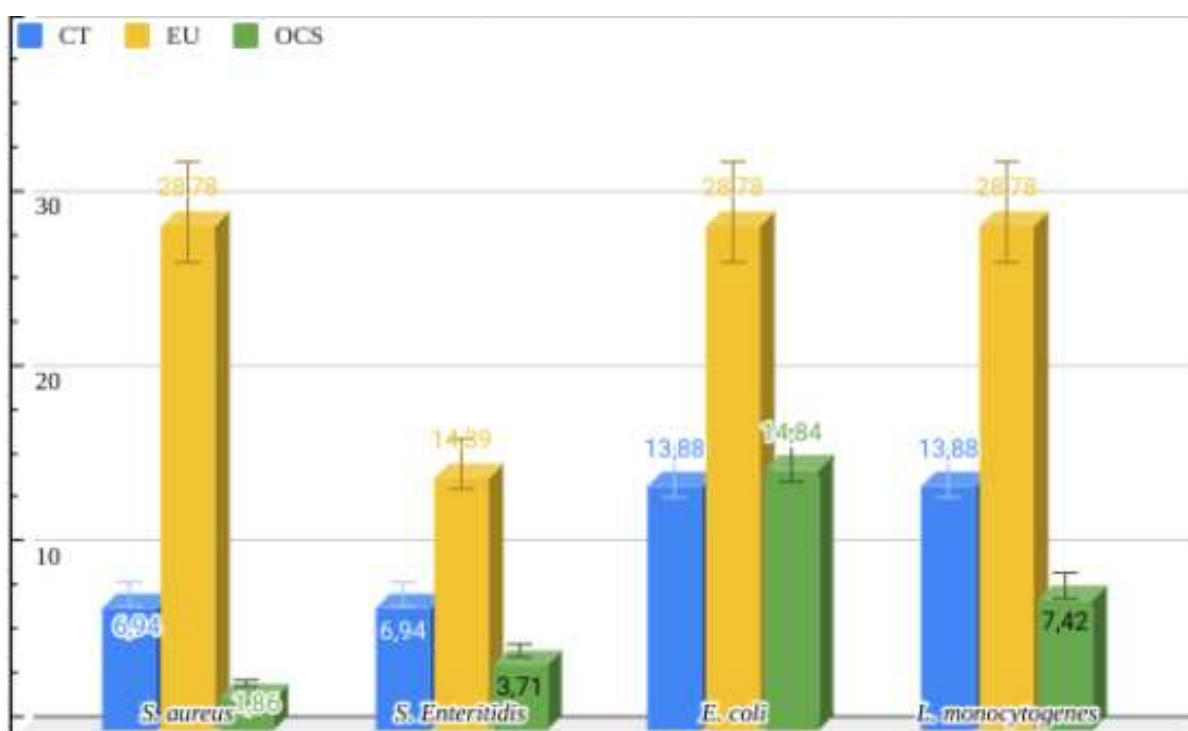
A fração lipofílica do óleo essencial, em especial, possui grande afinidade pela membrana externa lipídica de tais microrganismos, o que pode promover seu efeito antimicrobiano contra as bactérias Gram-negativas (Kiarsi *et al.*, 2020). Ocorrência observada nas amostras de TNPs e OCS sobre a espécie *S. Enteritidis*.

Neto *et al.* (2022), também obteve destaque na ação bactericida e bacteriostática contra *S. Enteritidis* utilizando óleo de *C. citratus* por meio de métodos de otimização e validação de proporções de compostos.

Para o microrganismo *E. coli*, os resultados apresentaram grande variação para as amostras testadas. A atividade antimicrobiana das amostras para *E. coli* foram bem inferiores ao compará-las com os outros microrganismos. A amostra do padrão CT (6,94 mg/mL) foi a que apresentou melhor ação inibitória. Scotti *et al.* (2021), ao observar a ação de variados óleos essenciais, em específico o OCS, sobre diferentes cepas de *E. coli*, obtiveram resultados de baixa ação em algumas cepas utilizadas. De acordo com a BrCAST/EUCAST (2022), a cepa do presente ensaio apresentou resistência superior ao ideal, logo, o resultado inferior obtido das amostras, sobre o microrganismo, pode ser atribuído a esta ocorrência.

Quanto à atividade bactericida das amostras testadas, os resultados foram representados na **Figura 14**. Novamente as amostras de CT e OCS se destacaram para os microrganismos *S. Enteritidis* e *S. aureus* com valores de, respectivamente 1,86 e 6,94 mg/mL para OCS e 3,711 e 6,94 mg/mL para CT.

Figura 14 - Atividade bactericida dos terpenóides citral e eucaliptol e do óleo de capim-santo.



Embora o citral tenha apresentado grande afinidade pela *L. monocytogenes*, promovendo ótima ação inibitória, ele possuiu baixa ação bactericida quando comparado a amostra de OCS. A atividade da amostra de CT contra bactérias está associada a sua ligação com os componentes das células bacterianas, de forma a modificar suas funções celulares, e

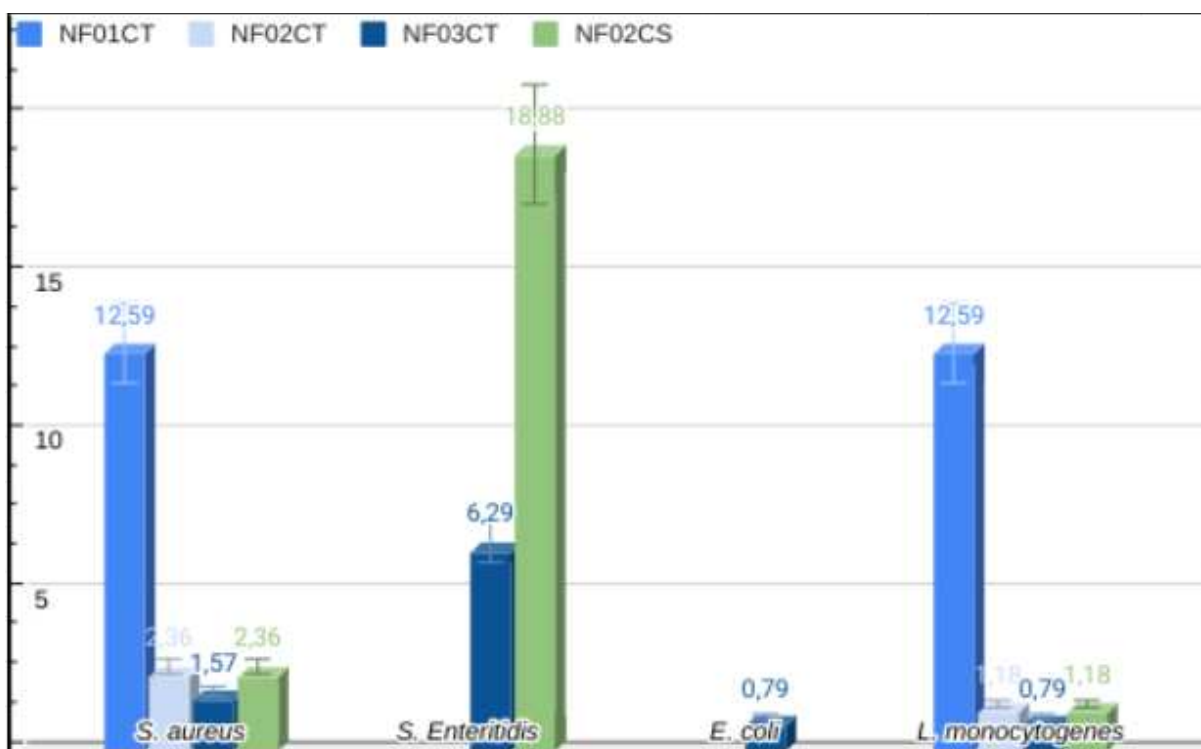
ligando-se potencialmente aos nucleófilos presentes (Peichel *et al.*, 2019), o que, no estudo em questão, levou somente a inibição do crescimento celular e não a efeitos bactericidas.

Resultado semelhante foi observado em quase todas as amostras, com exceção de citral para *S. Enteritidis* e eucaliptol para *E. coli* e *L. monocytogenes*, nas quais seu resultado inibitório foi igual ao bactericida. A melhor ação bactericida para a amostra EU (14,39 mg/mL) foi observada sobre *S. Enteritidis*, provavelmente caracterizada pela sua interação da estrutura lipofílica com a camada lipídica da parede celular.

Para a bactéria *P. aeruginosa*, não foi possível quantificar a concentração inibitória, e nem a bactericida, pois a mesma não apresentou sensibilidade às concentrações testadas de óleo de capim-santo. A concentração máxima testada para o presente ensaio de microdiluição foi 475,0 mg/mL, limite imposto pelo método (1/1; amostra/meio líquido) e na análise de difusão em ágar, a única concentração que a amostra apresentou ação foi na sua concentração pura de 950,0 mg/mL.

No ensaio com as nanoemulsões, **Figura 15**, seguiu-se o método com as NEs estáveis. Devido à coloração opaca considerável dessas emulsões, a medição que o espectrofotômetro gera foi comprometida e não se pode constatar suas atividades inibitórias, somente pôde-se determinar suas concentrações bactericidas.

Figura 15 - Atividade bactericida das nanoemulsões estáveis.



As amostras de NEs testadas possuíram resultados característicos das suas proporções de ativos presentes. Para os microrganismos Gram-positivos, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente, as amostras NF01CT (12,59 mg/mL; 12,59 mg/mL) e NF02CT (2,36 mg/mL; 1,18 mg/mL), que possuem menor teor de ativo citral, apresentaram concentrações bactericidas, mas não pode-se determinar para os microrganismos Gram-negativos, *S. Enteritidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. A *P. aeruginosa*, em especial, não apresentou sensibilidade bactericida a nenhuma das amostras testadas.

Entre as amostras de NF02CT e a NF02CS houve grande semelhança de valores de CBM sobre microrganismos Gram-positivos. Mas a segunda amostra ainda apresentou uma particularidade em sua ação sobre a *S. Enteritidis*. com CBM de 18,88 mg/mL, concentração máxima testada da respectiva amostra.

A NF03CT apresentou atividade bactericida contra as bactérias *S. aureus* (1,57 mg/mL), *L. monocytogenes* (0,79 mg/mL), *S. Enteritidis* (6,29 mg/mL) e *E. coli* (0,79 mg/mL). Seu teor de ativo é superior aos demais e apresentou destaque.

As amostras de nanoemulsão, como dito anteriormente, possuem sua atividade antimicrobiana interligada a fatores de interação com a membrana celular dos microrganismos, conjuntamente a fusão e a estabilidade dos seus constituintes, assim como a forma de liberação e a interação eletrostática dos ativos presentes em sua matriz com a parede celular microbiana (Moradi; Barati, 2019; Agnish; Sharma; Kaur, 2022).

Além disso, as nanoemulsões, em sua maioria, apresentaram ações bactericidas superiores aos seus respectivos agentes ativos puros. De acordo com os resultados obtidos para as amostras de TNNs, as NEs podem ter possibilitado a melhora do seu fluxo e sua dispersão, permeando efetivamente a membrana celular das bactérias testadas e impulsionando a ação antimicrobiana (Donsì *et al.*, 2011; Donsì; Ferrari, 2016). A formulação de NEs tem o objetivo de infundir aos compostos aumento da solubilidade, biodisponibilidade e como meio facilitador de entrega de ativos (Shafiq *et al.*, 2007; Salvia-Trujillo *et al.*, 2017; Manzoor *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2023).

Tais resultados obtidos demonstram a melhoria tecnológica dos ativos testados de forma a possibilitar e potencializar sua aplicação em determinados produtos, em especial, os alimentares, como conservantes ou coadjuvantes antimicrobianos.

5.4 Avaliação da segurança não clínica em Zebrafish (*Danio rerio*) adulto

A avaliação da segurança não clínica é utilizada para avaliação da toxicidade de diversos compostos, dentre os quais temos em destaque a avaliação dos originados por metabolização vegetal, e potencialmente à sua biossegurança (Silva *et al.*, 2023a). A análise segue com a utilização de organismos modelos ideias para o uso nos bioensaios requisitados para o parecer toxicológico adequado, havendo destaque nos últimos anos na utilização do peixe *Danio rerio*.

O Organismo Modelo Zebrafish foi submetido a dois bioensaios de toxicidade: o teste de campo aberto, para avaliação de possíveis modificações locomotoras no peixe, e o teste de toxicidade aguda 96h, para determinação da concentração letal média capaz de matar metade da população (CL₅₀). As amostras utilizadas no presente estudo foram as amostras TNPs, OCS e as TNNs. A curva experimental de suas concentrações foi baseada nas concentrações bactericidas de cada amostra.

Na **Tabela 12** pode-se observar os resultados de concentração letal para as amostras lipídicas. As amostras apresentaram mortalidade de 100% em suas maiores concentrações testadas (50 mg/mL para CT e OCS; 250 mg/mL para EU). A amostra de citral apresentou a maior atividade tóxica com CL₅₀ de 15,23 mg/mL, enquanto eucaliptol apresentou a menor atividade com CL₅₀ de 153,85 mg/mL. É importante ressaltar que quanto menor for a concentração letal capaz de matar 50% de uma população, maior será sua atividade tóxica da substância.

Tabela 12 - Determinação da atividade toxicológica 96h dos terpenóides e do óleo essencial.

Amostras	Mortalidade Zebrafish Adulto									96h
	CN	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CL ₅₀ (mg/mL) IV
CT	0	0	1	0	1	6	-	-	-	15,23 mg/mL (9,17 - 25,31)
EU	0	-	-	-	1	2	2	0	6	153,85 mg/mL (70,52 - 335,63)
OCS	0	0	0	0	0	6	-	-	-	22,36 mg/mL

CT - citral; EU - eucaliptol; OCS - óleo de capim-santo; CN – Grupo controle negativo: água destilada estéril e DMSO(3%) ; C1 – grupo concentração 0,5 mg/mL; C2 – grupo concentração 1,0 mg/mL; C3 – grupo concentração 5,0 mg/mL; C4 – 10,0 mg/mL; C5 – grupo concentração 50,0 mg/mL; C6 – grupo concentração 100,0 mg/mL; C7 – grupo concentração 150,0 mg/mL; C8 – grupo concentração 250,0 mg/mL; CL₅₀ – concentração letal para matar 50% dos Zebrafish adultos; IV – intervalo de confiança.

Nas **Tabelas 13, 14 e 15** estão expressos os resultados de concentração letal das amostras de nanoemulsões. As amostras de NEs com ativo citral possuíram toxicidade

proporcional ao teor de terpenóide presente. Na amostra de NF03CT (CL₅₀ 4,45 mg/mL) houve a maior atividade toxicológica, com mortalidade total em quase todas as suas concentrações, com exceção de sua menor, seguida da amostra NF02CT (CL₅₀ 13,35 mg/mL) e da amostra NF01CT (CL₅₀ > 25,18 mg/mL).

Tabela 13 - Determinação da atividade toxicológica 96h das nanoemulsões de formulação 01.

Amostras	Mortalidade Zebrafish Adulto							96h
	CN	CNE	C1	C2	C3	C4	C5	CL ₅₀ (mg/mL) IV
NF01CT	0	0	0	0	0	0	0	> 25,18 mg/mL

NF01CT - amostra de nanoemulsão de citral formulação 01; CN – Grupo controle negativo: água destilada estéril e DMSO(3%); CNE - Grupo controle negativo: nanoemulsão controle; C1 – grupo concentração 1,57 mg/mL; C2 – grupo concentração 3,15 mg/mL; C3 – grupo concentração 6,29 mg/mL; C4 – grupo concentração 12,59 mg/mL; C5 – grupo concentração 25,18 mg/mL; CL₅₀ – concentração letal para matar 50% dos Zebrafish adultos; IV – intervalo de confiança.

Tabela 14 - Determinação da atividade toxicológica 96h das nanoemulsões de formulação 02.

Amostras	Mortalidade Zebrafish Adulto							96h
	CN	CNE	C1	C2	C3	C4	C5	CL ₅₀ (mg/mL) IV
NF02CT	0	0	0	0	0	6	6	13,35 mg/mL
NF02CS	0	0	0	0	0	0	6	26,70 mg/mL

NF02CT - amostra de nanoemulsão de citral formulação 02; NF02CS - amostra de nanoemulsão de óleo de capim-santo formulação 02; CN – Grupo controle negativo: água destilada estéril e DMSO(3%); CNE - Grupo controle negativo: nanoemulsão controle; C1 – grupo concentração 2,36 mg/mL; C2 – grupo concentração 4,72 mg/mL; C3 – grupo concentração 9,44 mg/mL; C4 – grupo concentração 18,88 mg/mL; C5 – grupo concentração 37,76 mg/mL; CL₅₀ – concentração letal para matar 50% dos Zebrafish adultos; IV – intervalo de confiança; Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 15 - Determinação da atividade toxicológica 96h da nanoemulsão de formulação 03.

Amostras	Mortalidade Zebrafish Adulto							96h
	CN	CNE	C1	C2	C3	C4	C5	CL ₅₀ (mg/mL) IV
NF03CT	0	0	0	6	6	6	6	4,45 mg/mL

NF03CT - amostra de nanoemulsão de citral formulação 03; CN – Grupo controle negativo: água destilada estéril e DMSO(3%); CNE - Grupo controle negativo: nanoemulsão controle; C1 – grupo concentração 3,15 mg/mL; C2 – grupo concentração 6,29 mg/mL; C3 – grupo concentração 12,59 mg/mL; C4 – grupo concentração 25,17 mg/mL; C5 – grupo concentração 50,35 mg/mL; CL₅₀ – concentração letal para matar 50% dos Zebrafish adultos; IV – intervalo de confiança; Fonte: elaborado pelo autor.

Resultados semelhantes foram observados por Silva *et al.* (2023a) ao analisarem a toxicidade de óleo de capim-santo em embriões de *Danio rerio*. Além de constatar o nível de toxicidade de acordo com a concentração de ativo presente, observou toxicidade de 100% em

suas maiores concentrações testadas e interligou a tal ocorrência aos teores de citral presentes em suas amostras.

Hacke *et al.* (2022) também observaram a toxicidade do óleo de *C. citratus* e seu terpenóide citral pelo método por *Artemia salina* e por citotoxicidade em leucócitos humanos. Foi observado alta toxicidade para suas amostras oleosas pelos dois métodos e, os mesmos, atribuíram seus resultados à presença dos efeitos do terpenóide citral e demais compostos e grupos funcionais (como álcoois e aldeídos) majoritários presentes na matriz das amostras.

A toxicidade dos óleos essenciais do gênero *Cymbopogon* é caracterizada pela presença de seu terpenóide majoritário, o citral, como um composto tóxico em altas concentrações (Silva *et al.*, 2023b).

Entre as nanoemulsões de formulação 02, NF02CT e NF02CS, assim como o teste com suas amostras puras lipídicas, a nanoemulsão com ativo citral apresentou maior toxicidade. Resultado que corrobora com o relatado na literatura.

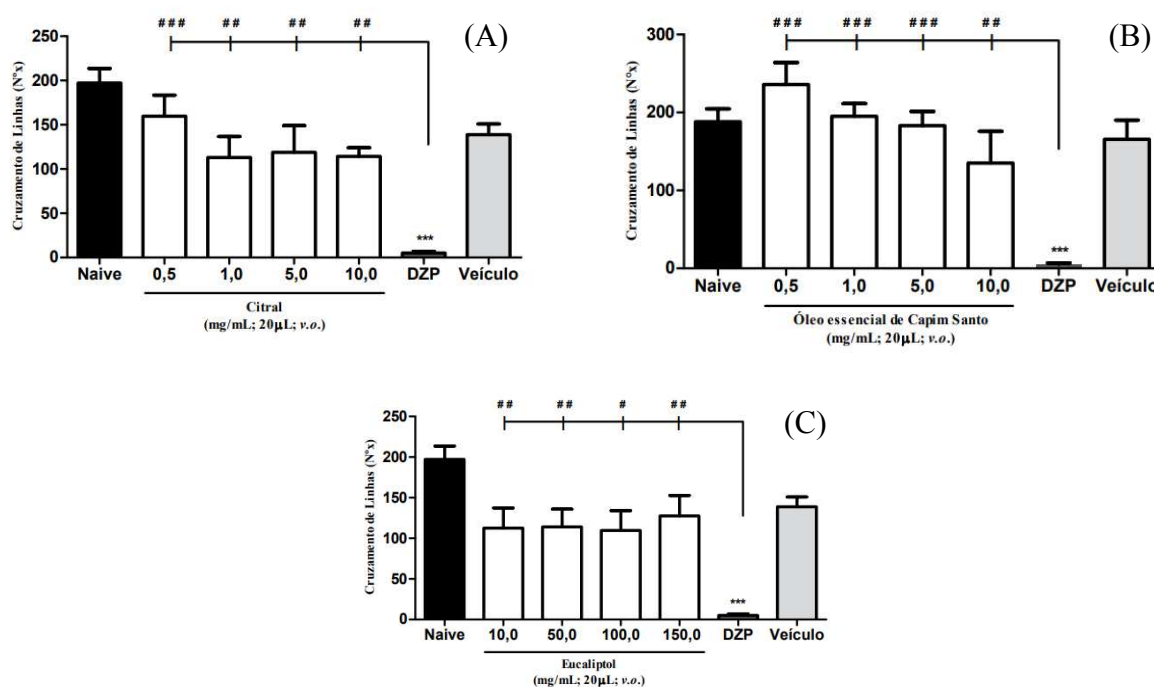
Quanto aos teores gerais de ativo presentes nas nanoemulsões e nas amostras lipídicas, observaram-se resultados variados. Nas amostras lipídicas, as concentrações de OCS e CT que apresentaram mortalidade total foram na concentração de 50 mg/mL, enquanto a partir de 10 mg/mL, houve uma elevada sobrevivência dos peixes. Nas nanoemulsões, a menor concentração de ativo que apresentou mortalidade total foi de 6,29 e 18,88 mg/mL, valores respectivos as amostras de NF03CT e NF02CT, enquanto a amostra de NF01CT não apresentou taxa de mortalidade em 25,18 mg/mL.

A diferença entre as amostras de nanoemulsões testadas foi o teor de ativo e o teor de matriz lipídica estável - óleo de pequi (OP) - utilizada na NEs. Desta forma, constata-se, pelo presente resultado, que o aumento da toxicidade na amostra de NF03CT pode ser devido ao aumento da biodisponibilidade do ativo, como pode-se observar também no ensaio de atividade antimicrobiana.

Além disso, o óleo de pequi pode ter agido como um neutralizante da ação tóxica dos ativos presentes, por isso nas amostras com menor teor de OP, houve maior toxicidade, enquanto nas de maior teor de OP, houve menor toxicidade. A presente matriz lipídica estável possui efeitos relatados na literatura como anti-inflamatório, cardioprotetor, antioxidante, antinociceptivo e agente desintoxicante (Figueiredo *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2016; Pinheiro *et al.*, 2022) que podem ter conjecturado nessa neutralização de efeitos tóxicos. Apesar do constatado, maiores estudos são necessários para se determinar ao certo as propriedades do OP.

Na análise dos efeitos das amostras de citral, óleo de capim-santo e eucaliptol e das amostras de nanoemulsão sobre a atividade locomotora do OME utilizado, o comportamento dos peixes não demonstrou comprometimento de sua coordenação motora, equilíbrio ou comportamento exploratório, nem efeito estressantes ou ansiolíticos, como pode ser observado nas **Figura 16 e 17**.

Figura 16 - Avaliação locomotora do *Danio rerio* sobre amostras lipídicas (A) citral, (B) óleo de capim santo e (C) eucaliptol.

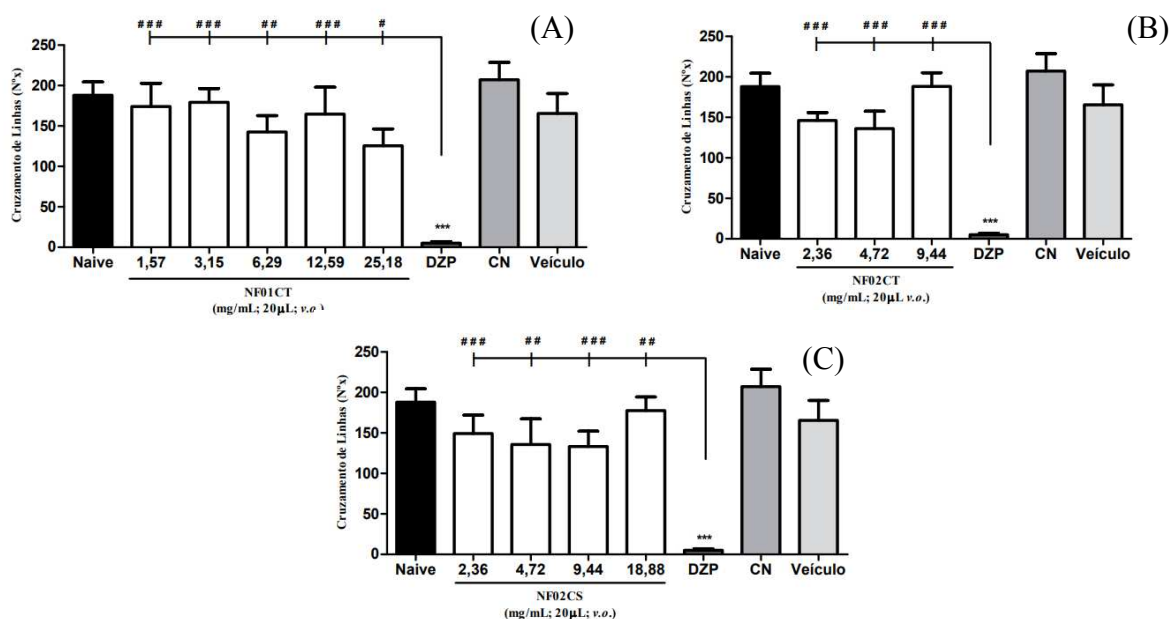


Para as amostras que apresentaram alta taxa de mortalidade em vários dos grupos concentração de amostra não foi dada continuidade ao ensaio locomotor. Os grupos de amostras testadas não demonstraram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) em nenhuma de suas concentrações aos grupos naive (sem tratamento) e veículo (grupo controle negativo: água destilada estéril e DMSO(3%)) e, no caso das amostras de NEs, ao grupo NC (grupo controle negativo: nanoemulsão controle sem ativo). Todas as amostras demonstraram diferenças estatísticas significativas no grupo diazepam.

Silva *et al.* (2023b), por sua vez, já relataram modificações no comportamento dos OMEs testados (embriões de peixes zebra, respectivamente) com efeitos retardantes ao avaliarem o óleo de *C. citratus*. A diferença da fase de desenvolvimento do peixe pode caracterizar tal diferenciação de resultados ao compará-lo com o presente trabalho que utilizou o peixe zebra adulto.

Blanco *et al.* (2009) ao avaliarem o óleo de *C. citratus* obtiveram resultados locomotores, no teste de campo aberto em camundongos, que condizem com os obtidos no presente estudo, ao qual a sua amostra não apresentou diferenças significativas ao grupo controle.

Figura 17 - Avaliação locomotora do *Danio rerio* sobre amostras de nanoemulsão (A) NF01CT, (B) NF02CT e (C) NF02CS.



Com os resultados obtidos, observa-se potencial ao utilizar as presentes amostras como conservantes em produtos alimentícios. A falta de possíveis efeitos colaterais nos testes prévios realizados nos organismos modelos adultos, nas concentrações inferiores à suas respectivas CL50%, demonstra mais um parâmetro de viabilização ao uso das NEs na indústria alimentícia.

5.5 Aplicação do ativo no queijo de ricota

Para atestar que um material é considerado um potencial conservante alimentar, são utilizados bioensaios *in vitro* para averiguar sua atividade antimicrobiana. Desta forma, foi utilizado no presente ensaio um queijo tipo ricota adquirido em comércio local e submetido previamente às análises de *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de acordo com a Instrução Normativa nº161 de 1 de julho de 2022 (ANVISA, 2022) e, também, mesófilos totais, antes de se aplicar a amostra antimicrobiana em análise.

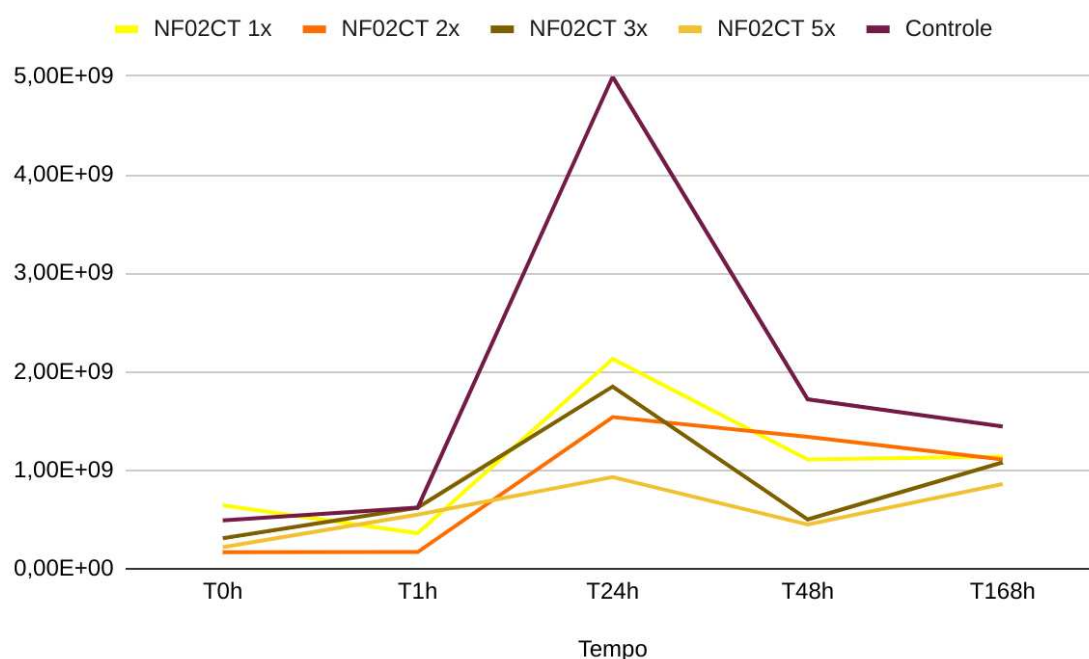
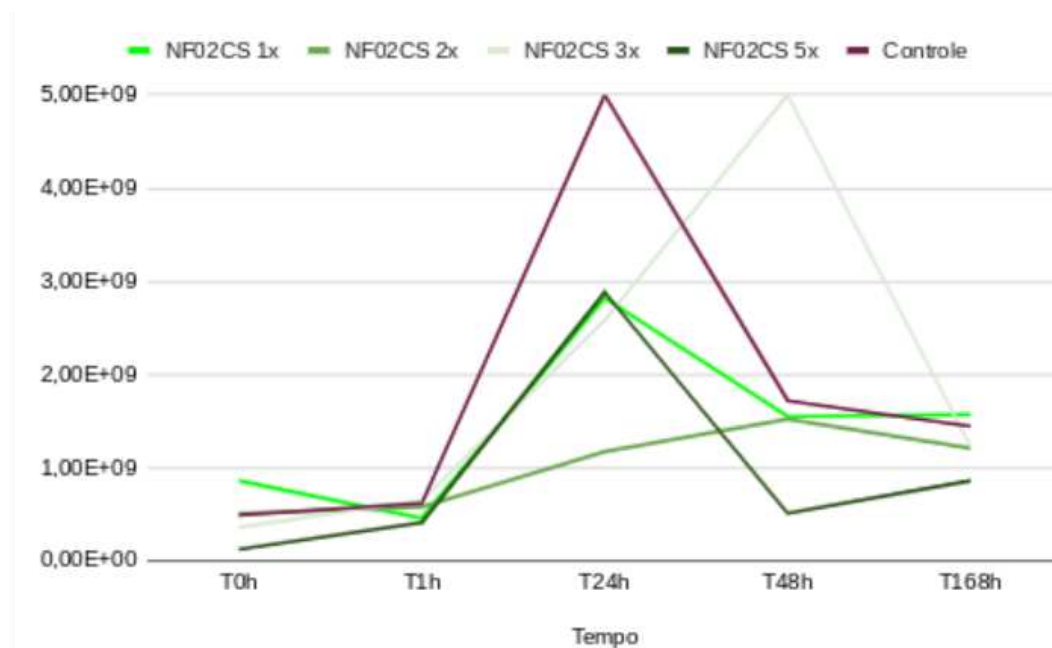
O uso da ricota em especial ocorre devido à sua limitada conservação, pois a mesma possui carga de nutrientes diversa e elevada, pH próximo à neutralidade e teores elevados de umidade (70% a 73%), fatores que favorecem a multiplicação de microrganismos contaminantes (Cereser *et al.*, 2011; Tripaldi *et al.*, 2020; Ricciardi *et al.*, 2022), necessitando de métodos conservativos mais eficazes.

O queijo utilizado apresentou para *Salmonella* (Ausência/25g) e para *S. aureus* (< 10 UFC/g) teores no intervalo disposto na Instrução Normativa nº161 de 1 de julho de 2022 (ANVISA, 2022), mas, para *E. coli* ($1,78 \times 10^6$ UFC/g), os valores já foram bem superiores aos da legislação, que estabelece os padrões microbiológicos para produtos ofertados ao consumidor.

Além disso, a contagem inicial para mesófilos totais do queijo apresentou valores elevados referentes a $4,90 \times 10^8$ UFC/g (amostra controle). Os mesófilos em específico não são abordados na legislação, mas sua carga elevada não é desejável para alimentos com conservação reduzida (Cereser *et al.*, 2011; Goulart *et al.*, 2019). Pierro *et al.* (2011) dispuseram de um limite microbiológico para mesófilos de aceitabilidade em 7 log UFC/g após sete dias de armazenamento, valor abaixo do obtido inicialmente no presente trabalho, com 8 log UFC/g inicialmente e 9 log UFC/g após sete dias de armazenamento.

Ricciardi *et al.* (2022), por sua vez, encontraram valores de 8 log UFC/g após seis dias de armazenamento, afirmando normalidade em tais valores para a carga microbiana de mesófilos totais. Cereser *et al.* (2011), analisando duas marcas de queijo de ricota da cidade de Bela Vista, encontraram valores de mesófilos entre 16 e 17 log UFC/g, ressaltando a possível má qualidade de processamento dos presentes queijos devido à sua enorme carga microbiana, muito superior ao do presente estudo.

A sobrevivência dos microrganismos mesófilos foi avaliada ao longo de uma semana, com retirada de amostragens nos tempos 0, 1, 24, 48 e 168 horas com diferentes concentrações de ativo baseadas na concentração inicial que foi bactericida (6,25% - 2,36 mg de ativo/mL de nanoemulsão), seu dobro (12,5 % - 4,72 mg/mL), triplo (18,75% - 7,08 mg/mL) e quádruplo (31,25% - 11,8 mg/mL), respeitando o limite de ativo estabelecido pela análise de toxicidade aguda de 96 horas. A partir das **Figuras 18 e 19**, podemos observar o crescimento microbiano da matriz alimentar e os efeitos do ativo sobre ela.

Fig. 18 - Análise do teor de mesófilos totais de queijo de ricota incorporado de NF02CT.**Fig. 19** - Análise do teor de mesófilos totais de queijo de ricota incorporado de NF02CS.

Do tempo de 0h a 1h todas as amostras apresentaram similaridade quanto a sua carga microbiana, diferenciando-se após incubação mais prolongada. O queijo controle apresentou taxa de crescimento considerável de sua carga microbiana até o tempo 24h e, a partir do primeiro dia de incubação, deu-se início a fase de morte celular. Após 48h houve

crescimento microbiológico da maioria das amostras com ativo, mas não aumentando de forma considerável.

Já o crescimento microbiano dos queijos aplicados de NEs foi mais sutil, ao qual as nanoemulsões com ativo citral apresentaram maior atividade de redução da carga microbiana quando comparadas às amostras com ativo óleo de capim santo. Dentre as NEs com ativo citral, destacou-se a amostra de NF02CT 5x ($9,30 \times 10^8$ UFC/g), apresentando inibição de 1 Log 10 ufc/g de microrganismos mesófilos no tempo 24h quando comparada à amostra controle ($5,00 \times 10^9$ UFC/g) e leve aumento com a carga microbiana ao comparar com a amostra controle ($4,90 \times 10^8$ UFC/g) no tempo inicial.

Além disso, o queijo aplicado com a amostra de formulação 02 de óleo de capim-santo em questão, manteve sua carga microbiana até o tempo de 168h, sem crescimento logarítmico significativo, enquanto a maioria das amostras não apresentou decréscimo significativo da carga microbiana. As amostras NF02CT 3x e NF02CS 5x também apresentaram inibição de 1 Log 10 ufc/g da carga microbiana após 48h de exposição do queijo com as amostras antimicrobianas.

Entre os testes *in vitro*, assim como no ensaio antimicrobiano, as amostras com ativo de citral apresentaram ações superiores às do ativo de óleo de capim-santo. Tal resultado é caracterizado pela carga microbiana presente no queijo, a qual, em grande parte, demonstrou forte presença de *E. coli*, microrganismo que é mais resistente a ação de compostos antibacterianos por ser Gram-negativo (Majewska *et al.*, 2019; Agnish; Sharma; Kaur, 2022; Jia *et al.*, 2023) e que não demonstrou grande sensibilidade às amostras de OCS nos ensaios antimicrobianos.

A presença de ação sobre os mesófilos no presente ensaio ocorreu nas maiores concentrações das NEs testadas, fator ao qual é interligado ao maior teor de ativos presentes nas amostras. A necessidade de concentrações maiores e da promoção de uma baixa redução da carga microbiana também é influenciada pela interação dos ativos com os componentes orgânicos do próprio queijo. O ativo interage com as gorduras e proteínas presentes no queijo, dificultando sua ação e protegendo o microrganismo (Jones, 2011; Peichel *et al.*, 2019).

Ademais, ao comparar a concentração das nanoemulsões que apresentaram melhor ação (5x), a presença de ativo é aproximadamente de 11,8 mg/mL, sem considerar a perda de ativo pela sonificação observado anteriormente. Nos testes *in vitro* de microdiluição as presentes amostras (NF02CT e NF02CS) não demonstraram afinidade de ação sobre a *E. coli*. O decréscimo da carga microbiana do queijo pode ser associado a ação das amostras sobre o restante da carga mesófila presente, observada nos ensaios prévios do queijo controle.

Outros estudos com nanotecnologias são realizados utilizando embalagens ou filmes comestíveis à base de ativos e compostos polissacarídeos. Hosseinzadeh *et al.* (2020) e Ali, Noh e Mustafa (2015) avaliaram filmes de quitosana com óleo essencial de *C. citratus* sobre o armazenamento de alimentos, carnes picadas e pimentões, respectivamente, e obtiveram bons resultados de estabilidade da carga microbiana.

A forma de inserção do material ativo na amostra, o mecanismo de ação do material e da interação entre compostos (ativo/alimento) que irá caracterizar, em grande parte, o tipo de ação obtido (Khaneghah; Hashemi; Limbo, 2018). A inserção do óleo no presente trabalho ocorre de forma líquida enquanto, nos trabalhos utilizando o filme, ela ocorre de maneira gasosa, além de no filme existirem outras propriedades antimicrobianas de barreira que protegem os alimentos (Durán; Marcato, 2012), diferenciando em muito os resultados obtidos.

Em contrapartida, no presente trabalho, mesmo com a dificuldade oriunda do teor de macrocomponentes da matriz alimentar, as amostras mais concentradas apresentaram ação relativa sobre a carga microbiana da mesma, demonstrando a potencialidade de aplicar as nanoemulsões de óleos de *C. citratus* em alimentos.

6 CONCLUSÃO

A avaliação cromatográfica das amostras confirmou a presença do ativo citral, por meio de seus isômeros neral e geranial, evidenciado pela predominância dos grupos funcionais aldeídicos presentes em sua matriz estrutural, e de uma possível perda do ativo pelo processo de formação das nanoemulsões.

Todas as formulações de NEs contendo citral em sua composição e a de óleo de *C. citratus*, formulação 02, apresentaram-se estáveis em tabela, com conformações arredondadas, enquanto as nanoemulsões de eucaliptol desestabilizaram.

A atividade antimicrobiana dos terpenos naturais puros e nanoemulsionados foi constatada de forma elevada contra os microrganismos patogênicos testados, com afinidades variadas entre as amostras e as bactérias. A maior ação inibitória e bactericida constatada foi observada para *S. aureus* com a amostra de citral. Nas amostras de NEs foi possível observar aumento da ação dos ativos, aos quais em menores concentrações do que eles puros, demonstraram ação bactericida.

Na atividade toxicológica, pode-se observar que as amostras não modificaram a atividade locomotora dos peixes e foi possível constatar suas CL50%, ao qual a NF03CT (4,45 mg/mL) foi a que apresentou maior atividade tóxica, enquanto a amostra de eucaliptol (153,85 mg/mL) apresentou a menor atividade. As demais amostras, citral (15,23 mg/mL), OCS (22,36 mg/mL), NF01CT (> 25,18 mg/mL), NF02CT (13,35 mg/mL), NF02CS (26,70 mg/mL), apresentaram variação em suas CL50%.

Ao aplicar o material em queijo comercial, foi possível observar determinada inibição de sua carga microbiana inicial e estabilidade ao longo do tempo. Estima-se a inclusão das amostras em matrizes alimentares, pois pode-se favorecer a manutenção da microbiota inicial do produto, como observado no presente trabalho, e, desde que o produto esteja dentro dos limites impostos pela legislação, ao decorrer de seu prazo de validade, garantindo sua comercialização, segurança e reduzindo riscos de deterioração.

Devido a suas ações antimicrobianas *in vitro* e à ausência de fatores tóxicos colaterais *in vivo* nas concentrações bactericidas, sugere-se a potencialidade em dar-se continuidade aos testes tanto com as amostras lipídicas, quanto suas emulsões, em diferentes matrizes alimentares. Sugere-se, também para as análises futuras, a realização de testes sensoriais para avaliação da aceitação do produto adicionado de ativo.

REFERÊNCIAS

- ABISMAIL, B.; *et al.* Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 6, p. 75–83, 1999.
- ADEKENOV, S. M.; *et al.* Modeling and Optimization of Chromatographic Purification of Argabin from CO₂ Extract of *Artemisia glabella* Kar. et Kir. **Chromatographia**, [S. l.], v. 84, n. 11, p. 1077-1086, 2021.
- AGGARWAL, K. K.; *et al.* Toxicity of 1,8-cineole towards three species of stored product coleopterans. **International Journal of Tropical Insect Science**, [S. l.], v. 21, p. 155-160, 2011.
- AGNISH, S.; SHARMA, A. D.; KAUR, I. Nanoemulsions (O/W) containing *Cymbopogon pendulus* essential oil: development, characterization, stability study, and evaluation of *in vitro* anti-bacterial, anti-inflammatory, anti-diabetic activities. **BioNanoScience**, [S. l.], v. 12, p. 540–554, 2022.
- AGUIAR, J.; ESTEVINHO, B.N.; SANTOS, L. Microencapsulation of natural antioxidants for food application – The specific case of coffee antioxidants – A review. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 58, p. 21-39, 2016.
- AHMED, Q.; *et al.* Evaluation of Aphicidal Effect of Essential Oils and Their Synergistic Effect against *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Molecules**, [S. l.], v. 26, n. 10, 3055, 2021.
- AJAYI, E. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J.. GC–MS evaluation of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf oil obtained using modified hydrodistillation and microwave extraction methods. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 209, p. 262-266, 2016.
- AKOLADE, J. O.; *et al.* Microencapsulation of eucalyptol in polyethylene glycol and polycaprolactone using particles from gas-saturated solutions. **RSC Advances**, [S. l.], v. 9, p. 34039-34049, 2019.
- AKPARIBO, R.; *et al.* Food Security in Ghanaian Urban Cities: A Scoping Review of the Literature. **Nutrients**, [S. l.], v. 13, 2021.
- ALFARO, P.; *et al.* Thermophysical properties of the binary mixtures (1,8-cineole + 1-alkanol) at T = (298.15 and 313.15) K and at atmospheric pressure. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, [S. l.], v. 42, p. 291-303, 2010.
- ALI, A.; CHIANG, Y. W.; SANTOS, R. M. X-ray Diffraction Techniques for Mineral Characterization: A Review for Engineers of the Fundamentals, Applications, and Research Directions. **Minerals**, [S. l.], v. 12, n. 2, 205, 2022.
- ALI, A.; *et al.* Formulation of lemongrass oil (*Cymbopogon citratus*)-loaded solid lipid nanoparticles: an *in vitro* assessment study. **3 Biotech**, [S. l.], v. 13, 318, 2023.

ALI, A.; NOH, N. M.; MUSTAFA, M. A. Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. **Food Packaging and Shelf Life**, [S. l.], v. 3, p. 56-61, 2015.

ALJABRI, N. M.; SHI, N.; CAVAZOS, A. Nanoemulsion: An emerging technology for oilfield applications between limitations and potentials. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, [S. l.], v. 208, 109306, 2022.

AL-SAKKAF, M. K.; ONAIZI, S. A. Rheology, characteristics, stability, and pH-responsiveness of biosurfactant-stabilized crude oil/water nanoemulsions. **Fuel**, [S. l.], v. 307, 121845, 2022.

AMARAL, S. M. B.; *et al.* **Panorama dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil no Período de 2009 a 2019**. RECIMA21 -Ciências Exatas e da Terra, Sociais, da Saúde, Humanas e Engenharia/Tecnologia, [S. l.], v. 2, n. 11, 2021.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe nº 70 de 2016 - **Esclarecimentos sobre a declaração de alegações de conteúdo para aditivos alimentares na rotulagem de alimentos e bebidas**. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/informes/copy_of_70de2016. Acesso em: 16 ago. 2022.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 161, de 1º de Julho de 2022 - **Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos**. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br>. Acesso em: 06 nov. 2023.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 211, de 1 de março de 2023 - **Estabelece as funções tecnológicas, os limites máximos e as condições de uso para os aditivos alimentares e os coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em alimentos**. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br>. Acesso em: 19 fev. 2024.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 540, de 27 de outubro de 1997 - **Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego**. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br>. Acesso em: 16 ago. 2022.

APOLÓNIO, J.; *et al.* No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. **FEMS Microbiol Lett**, [S. l.], v. 354, n. 2, p. 92-101, 2014.

ARAÚJO, J. R. C.; *et al.* Dioclea Altissima Seed Lectin (DAL) Prevents Anxiety-like Behavioral Responses in Adult Zebrafish (*Danio Rerio*): Involvement of GABAergic and 5-HT Systems. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, [S. l.], v. 21, p. 95-103, 2022.

ARELLANO-AGUIAR, O.; *et al.* Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal Fisheriesciences.com**, [S. l.], v. 94, p. 052–062, 2015.

ASENSIO, C. M.; *et al.* Rheological Behavior, Antimicrobial and Quorum Sensing Inhibition Study of an Argentinean Oregano Essential Oil Nanoemulsion. **Frontiers Nutritional**, [S. l.], v. 7, 2020.

BABU, G. D. K.; SINGH, B. Simulation of *Eucalyptus cinerea* oil distillation: A study on optimization of 1,8-cineole production. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 44, p.226–231, 2009.

BAÇ, H. S.; YEMIŞ, O.; ÖZKAN, M. Thermal stabilities of lycopene and β -carotene in tomato pulp and pink grapefruit juice. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 337, 2023.

BAGALE, U.; *et al.* Prospect of Bioactive Curcumin Nanoemulsion as Effective Agency to Improve Milk Based Soft Cheese by Using Ultrasound Encapsulation Approach. **International Journal Molecular Science**, [S. l.], v. 24, n. 3, 2663, 2023.

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

BARBOZA, J. R.; *et al.* Abordagem química e toxicidade em modelo zebrafish de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith / Chemical approach and toxicity in zebrafish model of geipropolis of melipona fasciculata Smith. **Brazilian Journal of health Review**, [S. l.], v. 2, n. 6, p. 5582-5594, 2019.

BENCELA, M.; KUMARI, S. S. Biologically active Cu(II), Ni(II) & Co(II) complexes of a tridentate N, O, O-donor Schiff base from citral and l-alanine: Synthesis, characterization and antimicrobial activity. **Polyhedron**, [S. l.], v. 219, 2022.

BEZERRA, A. J. N.; *et al.* Avaliação da segurança não clínica do triterpeno ácido acetil aleurítico (AAA) isolado de *Croton zehntneri* zebrafish (*Danio rerio*) adulto. **Brazilian Journal of health Review**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 55932-55940, 2020.

BOEIRA, C. P.; *et al.* Extraction of antioxidant and antimicrobial phytochemicals from corn stigma: a promising alternative to valorization of agricultural residues. **Ciência Rural**, [S. l.], v.52, n. 9, 2022.

BRANEN, J. K.; DAVIDSON, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], Amsterdam, v. 90, p. 63-74, 2004.

BrCAST/EUCAST. **Teste de sensibilidade aos antimicrobianos**: Método de disco-difusão, 2021. Disponível em: <http://brcast.org.br/>. Acesso: em 22 ago. 2022.

BrCAST/EUCAST. **Antibiograma - Interpretação das Zonas de Inibição e Concentração Inibitória Mínima**. 2022. Disponível em: <http://brcast.org.br/>. Acesso: em 22 out. 2023.

BRÜGGER, B. P.; *et al.* Bioactivity of the *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoid constituents on the predatory bug, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, 8358, 2019.

BURG, B.; *et al.* Improving infant food safety by avoiding hazards of chemical mixture effects using novel integrated methods based on bioassays and analytical chemistry. **Global Pediatrics**, [S. l.], v. 2, 2022.

CAMPOS, J. F.; FERREIRA, V.; BERTEINA-RABOIN, S. Heterocycles. Application to Hiyama Coupling, Cyanation, and Multicomponent Reactions. **Catalysts**, [S. l.], v. 11, p. 222, 2021.

CAPAR, S. G.; MINDAK, W. R.; CHENG, J. Analysis of food for toxic elements. Analytical and Bioanalytical. **Chemistry**, [S. l.], v. 389, p. 159–169, 2007.

CARLSON, L. H. C.; *et al.* Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 33-39, 2001.

CARVALHO, I. O.; *et al.* Perfil químico, atividade antimicrobiana do extrato das sementes de urucum (*Bixa orellana*). **Conjecturas**, [S. l.], v. 22, n. 2, 2022.

CASSAR, S.; *et al.* Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 95–118, 2020.

CASTRO, F. M.; *et al.* Evaluation of the ethanolic extract of *Myconia albicas* (Old Cinnamon) in the alternative model of anxiety in zebrafish. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. e50811125048, 2022.

CERESER, N. D.; *et al.* Avaliação da Qualidade Microbiológica da Ricota Comercializada em Supermercados do Estado de São Paulo. **Ciência Animal Brasileira**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 149-155, 2011.

CHANTHAI, S.; *et al.* Influence of Extraction Methodologies on the Analysis of Five Major Volatile Aromatic Compounds of Citronella Grass (*Cymbopogon nardus*) and Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Grown in Thailand. **Journal of AOAC International**, [S. l.], v. 95, n. 3, 2012.

CHAR, C.; GUERRERO, S.; ALZAMORA, S. M. Mild Thermal Process Combined with Vanillin Plus Citral to Help Shorten the Inactivation Time for *Listeria innocua* in Orange Juice. **Food and Bioprocess Technology**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 752-761, 2010.

CHOI, T.; *et al.* Zebrafish as an animal model for biomedical research. **Experimental & Molecular Medicine**, [S. l.], v. 53, p. 310–317, 2021.

COLLYMORE, C.; RASMUSSEN, S.; TOLWANI, R. J. Gavaging adult zebrafish. **Journal Vis Experiments**, [S. l.], v. 78, e50691, 1-5, 2013.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. **Diretrizes da Prática de Eutanásia**.

Disponível em:

http://www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22_02_18.pdf.

Acesso: em 22 abr. 2023.

COSTA, G. M.; *et al.* Minimum inhibitory concentration of essential oils against *Staphylococcus aureus* isolated from dogs with external otitis. **Seminário Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 42, n. 6, p. 3837-3854, 2021.

COSTA, J. A. V.; *et al.* Biosynthesis and potential applications of terpenes produced from microalgae. **Bioresource Technology Reports**, [S. l.], v. 19, 2022.

DAI, Y.; *et al.* Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S. l.], v. 33, p. 11-17, 2013.

DELANEY, K. J.; *et al.* Synthetic Cis-Jasmone Exposure Induces Wheat and Barley Volatiles that Repel the Pest Cereal Leaf Beetle, *Oulema melanopus* L.. **Journal of Chemical Ecology**, [S. l.], v. 39, p. 620–629, 2013.

DHYANI, R.; *et al.* A chemical genetic approach using genetically encoded reporters to detect and assess the toxicity of plant secondary metabolites against bacterial pathogens. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 418, 2021.

DIMRI, A. G.; *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of Lemon grass oil by MIC and agar well diffusion method. **UJPAH**, [S. l.], v. 1, n. 28, 2020.

DONSÌ, F.; *et al.* Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 44, n. 9, p. 1908-1914, 2011.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 233, p. 106-120, 2016.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D. Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 6, p. 1127-1134, 2013.

EISENREICH, W.; *et al.* Review - Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. CMLS, Cell. **Molecular Life Science**, [S. l.], v. 61, 2004.

ELSHAER, S. E.; *et al.* Root extracts of *Saussurea costus* as prospective detoxifying food additive against sodium nitrite toxicity in male rats. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 166, 2022.

EZRAHI, S.; TUVAL, E.; ASERIN, A. Properties, main applications and perspectives of worm micelles. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 128–130, p. 77-102, 2006.

FANCELLO, F.; *et al.* Antimicrobial activity of gaseous *Citrus limon* var pompia leaf essential oil against *Listeria monocytogenes* on ricotta salata cheese. **Food Microbiology**, [S. l.], v. 87, 103386, 2020.

FANG, H.; *et al.* Cooking methods affected the phytochemicals and antioxidant activities of potato from different varieties. **Food Chemistry: X**, [S. l.], v. 14,, 2022.

FENG, S.; *et al.* Encapsulation and release of citral using nanostructured lipid carriers: A study on the impact of different preparation methods. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 56, 103185, 2023.

FERNANDES, S. Y.; *et al.* Pre-emergent bioherbicide potential of Schinus terebinthifolia Raddi essential oil nanoemulsion for *Urochloa brizantha*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 47, 102598, 2023.

FERRANTE, S.; GUERRERO, S.; ALZAMORA, S. M. Combined Use of Ultrasound and Natural Antimicrobials To Inactivate *Listeria monocytogenes* in Orange Juice. **Journal of Food Protection**, [S. l.], v. 70, n. 8, p.1850–1856, 2007.

FERRARIO, M.; *et al.* Hurdle processing of turbid fruit juices involving encapsulated citral and vanillin addition and UV-C treatment. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 332, 2020.

FERREIRA, I. J.; *et al.* Assessment of deep eutectic solvents toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, [S. l.], v. 299, 2022.

FIGUEIREDO, P. R. L.; *et al.* *Caryocar coriaceum* Wittm. (Pequi) fixed oil presents hypolipemic and anti-inflammatory effects *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 191, p. 87–94, 2016.

FINLAYSON, K. A.; LEUSCH, F. D. L.; Merwe, J. P. Review of ecologically relevant *in vitro* bioassays to supplement current *in vivo* tests for whole effluent toxicity testing - Part 1: Apical endpoints. **Science of The Total Environment**, [S. l.], 2022.

FDA - Food and Drug Administration. 21 CFR 182.20 **Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates)**, 2023.

FREIRE, J. C. P.; *et al.* Atividade antimicrobiana e efeitos do Citral em espécies causadoras de doenças bucais: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n.5, 2022.

GAONKAR, R.; *Et al.* Development and validation of reverse phase high performance liquid chromatography for citral analysis from essential oils. **Journal Of Chromatography B**, [S. l.], v. 1036-1037, p. 50-56, nov. 2016.

GOES, P. R. N.; *et al.* Rheological behavior and antiarthritic activity of *Pterodon pubescens* nanoemulsion. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 10, e179108119, 2020.

GOULART, E. M.; *et al.* Application of functional edible films in ricotta cheese. **Acta Scientiarum**, [S. l.], v. 41, 2019.

GUPTA, Y. P. Anti-nutritional and toxic factors in food legumes: a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, [S. l.], v. 37, p. 201-228, 1987.

GUPTA, A.; *et al.* Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, [S. l.], v. 12, p. 2826-2841, 2016.

HACKE, A. C. M.; *et al.* Cytotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf fractions, essential oil, citral, and geraniol in human leukocytes and erythrocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 291, 115147, 2022.

HAMID, H. A. *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon nardus* Essential Oil Components – FTIR, Chemometrics Assessment and Identification Using GC-MS. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 641 - 652, 2023.

HASSANZADEH, H.; *et al.* The garlic extract-loaded nanoemulsion: Study of physicochemical, rheological, and antimicrobial properties and its application in mayonnaise. **Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 3799-3810, 2023.

HILLIER, S. G.; LATHE, R. Review - Terpenes, hormones and life: isoprene rule revisited. **Journal of Endocrinology**, [S. l.], 2019.

HONORATO, T. C.; *et al.* Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde**, [S. l.], v. 8, n. 5, 2013.

HOSEINI, S. M.; HOSEINIFAR, S. H.; DOAN, H. V. Effect of dietary eucalyptol on stress markers, enzyme activities and immune indicators in serum and haematological characteristics of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to toxic concentration of ambient copper. **Aquaculture Research**, [S. l.], v. 49, p.. 3045-3054, 2018.

HOSSEINZADEH, S.; PARTOVI, R.; TALEBI, F.; BABAEI, A. Chitosan/TiO₂ nanoparticle/*Cymbopogon citratus* essential oil film as food packaging material: Physico-mechanical properties and its effects on microbial, chemical, and organoleptic quality of minced meat during refrigeration. **Journal of Food Processing and Preservation**, [S. l.], v. 44, n. 7, e14536, 2020.

HOSNY, M. K.; *et al.* Preparation, Optimization, and Evaluation of Hyaluronic Acid-Based Hydrogel Loaded with Miconazole Self-Nanoemulsion for the Treatment of Oral Thrush. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 20, 297, 2019.

HOWE, K.; *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, [S. l.], v. 496, p. 498–503, 2013.

HUANG, W.; WU, T.; WU, K. Zebrafish (*Danio rerio*): A potential model to assess developmental toxicity of ketamine. **Chemosphere**, [S. l.], v. 291, n. 3, 2022.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. v.4, p. 103, 2008.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K.. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **Biotech**, [S. l.], v. 5, p. 123–127, 2015.

JAMUNA, S.; *et al.* Potential antioxidant and cytoprotective effects of essential oil extracted from *Cymbopogon citratus* on OxLDL and H₂O₂ LDL induced Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). **Food Science and Human Wellness**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 60-69, 2017.

JIA, Y.; *et al.* Multi-armed antibiotics for Gram-positive bacteria. **Cell Host & Microbe**, v. 31, [S. l.], p. 1101–1110, 2023.

JIN, C.; *et al.* Toxicity, Behavioral Effects, and Chitin Structural Chemistry of *Reticulitermes flaviceps* Exposed to *Cymbopogon citratus* EO and Its Major Constituent Citral. **Insects**, [S. l.], v. 13, n. 9, 812, 2022.

JIN, X.; WANG, J.; BAI, J. Synthesis and antimicrobial activity of the Schiff base from chitosan and citral. **Carbohydrate Research**, [S. l.], v. 344, p. 825–829, 2009.

JOHNSON, J. N.; *et al.* Identification of phenolics responsible for the high antioxidant activity in Burdekin plum (*Pleiogynium timoriense*) fruit. **Food Chemistry Advances**, [S. l.], v. 1, 2022.

JONES, F. T. A review of practical Salmonella control measures in animal feed. **Journal of Applied Poultry Research**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 102-113, 2011.

JUERGENS, L. J.; WORTH, H.; JUERGENS, U. R. New Perspectives for Mucolytic, Anti-inflammatory and Adjunctive Therapy with 1,8-Cineole in COPD and Asthma: Review on the New Therapeutic Approach. **Advance in Therapy**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 1737-1753, 2020.

JUERGENS, U. R.; *et al.* Anti-inflammatory activity of 1,8 -cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory Medicine**, [S. l.], v. 97, p. 250-256, 2003.

KADERIDES, K.; *et al.* Potential of pomegranate peel extract as a natural additive in foods. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 115, p. 380-390, 2021.

KHANEGHAH, A. M.; HASHEMI, S. M. B.; LIMBO, S. Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. **Food and Bioproducts Processing**, [S. l.], v. 111, p. 1-19, 2018.

KHODJAEVA, U.; *et al.* Review - About Food Additives as Important Part of Functional Food. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, [S. l.], 2013.

KIARSI, Z.; *et al.* *In vitro* antimicrobial effects of *Myristica fragrans* essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage. **Journal of Food Safety**, [S. l.], v. 40, n. 3, e12782, 2020.

KOURNIATIS, L. R.; *et al.* Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Química Nova**, [S. l.], v. 33, n. 2, 2010.

KRUPA, P. M.; *et al.* Chronic aquatic toxicity of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) to *Ceriodaphnia dubia*, *Chironomus dilutus*, *Danio rerio*, and *Hyaella azteca*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 241, 2022.

KUMAR, A.; DEV, K.; SOURIRAJAN, A. Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., and the phyto-compounds, delta-carene and alpha-pinene

mediate cell cycle arrest at G2/M transition in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **South African Journal of Botany**, [S. l.], v. 141, p. 296-305, 2021.

LEMOS, C. G.; *et al.* Avaliação da atividade locomotora e teste de toxicidade do eugenol utilizando zebrafish (*danio rerio*) adulto. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 1, n. 1, 2021.

LIMA, K. O.; VAZ, G. R.; BORGES, C. D. Conservação de vegetais minimamente processados utilizando nanoemulsões: Uma revisão. **Tecnologias Avançadas e suas Abordagens**, [S. l.], v. 1.

LIMA, M. F. F.; *et al.* Avaliação toxicológica através do bioensaio com *Artemia salina* Leach de espécimes vegetais pertencentes à caatinga. **Brazilian Journal Health Review**, Curitiba, v. 2, n. 6, p. 5950-5963, 2019.

LIAO, C.; *et al.* Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 12, 926758, 2022.

LI, X.; *et al.* Eucalyptol relieves imidacloprid-induced autophagy through the miR-451/Cab39/AMPK axis in *Ctenopharyngodon idellus* kidney cells. **Aquatic Toxicology**, [S. l.], v. 249, 2022.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, [S. l.], v. 27, n. 4, 2004.

LÓPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S. M.; PALOU, E. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 99, p. 119-128 2005.

MAGALHÃES, F.E.A.; *et al.* Adult Zebrafish (*Danio rerio*): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. **Zebrafish**. [S. l.], v.14, p. 422-429, 2017.

MA, H.; *et al.* Citral-loaded chitosan/carboxymethyl cellulose copolymer hydrogel microspheres with improved antimicrobial effects for plant protection. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 164, p. 986-993, 2020.

MAJEWSKA, E.; *et al.* Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Essential Oil: Extraction, Composition, Bioactivity and Uses for Food Preservation | a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, [S. l.], v. 69, n. 4, p. 327-341, 2019.

MANZOOR, S.; *et al.* Improving the shelf life of fresh cut kiwi using nanoemulsion coatings with antioxidant and antimicrobial agents. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 41, 101015, 2021.

MAREI, G. I. K.; RABEA, E. I.; BADAWY, M. E. I. Preparation and Characterizations of Chitosan/Citral Nanoemulsions and their Antimicrobial Activity. **Applied Food Biotechnology**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 69-78, 2018.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011.

MENG, Z.; *et al.* Toxicity effects of chlorantraniliprole in zebrafish (*Danio rerio*) involving in liver function and metabolic phenotype. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 187, 2022.

MIASKOWSKA, M.; KULAWIK-PIÓRO, A.; MARIOLA, S. Nanoemulsion Gel Formulation Optimization for Burn Wounds: Analysis of Rheological and Sensory Properties. **Processes**, [S. l.], v. 8, n. 11, 1416, 2020.

MITRINOVA, Z.; TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N. Control of surfactant solution rheology using medium-chain cosurfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 537, p. 173-184, 2018.

MOHAMED, N. A. F.; AL-TOUBY, S. S.; HOSSAIN, M. A. Evaluation of cytotoxic and antioxidant activities of different polarities extracts of *Suaeda maritima*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 42, 2022.

MORADI, S.; BARATI, A. Essential Oils Nanoemulsions: Preparation, Characterization and Study of Antibacterial Activity against *Escherichia Coli*. **International Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 199-210, 2019.

MORCIA, C.; MALNATI, M.; TERZI, V. *In vitro* antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [S. l.], v. 29, 2012.

MUALA, W. C. B.; DESOBGO, Z. S. C.; JONG, N. E. Optimization of extraction conditions of phenolic compounds from *Cymbopogon citratus* and evaluation of phenolics and aroma profiles of extract. **Heliyon**, [S. l.], v. 7, e06744, 2021.

NAIBAHO, J.; *et al.* Techno-functional properties of protein from protease-treated brewers' spent grain (BSG) and investigation of antioxidant activity of extracted proteins and BSG residues. **Journal of Cereal Science**, [S. l.], v. 107, 2022.

NAIK, M. I.; *et al.* Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [S. l.], p. 535-538, 2010.

National Toxicology Program. 2003. NTP toxicology and carcinogenesis studies of citral (microencapsulated) (CAS no. 5392-40-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). **National Toxicology Program Technical Report Series**, [S. l.], p. 1-268, 2003.

NETO, L. T.; *et al.* An Optimization of Oregano, Thyme, and Lemongrass Essential Oil Blend to Simultaneous Inactivation of Relevant Foodborne Pathogens by Simplex-Centroid Mixture Design. **Antibiotics**, [S. l.], v. 11, n. 11, 1572, 2022.

- NIE, J.; *et al.* Impact of *Monascus purpureus* fermentation on antioxidant activity, free amino acid profiles and flavor properties of kelp (*Saccharina japonica*). **Food Chemistry**, [S. l.], 2022.
- NUNES, P.I.G.; *et al.* Uma breve caracterização dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Estado do Ceará no período de 2014 a 2016. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, [S. l.], v. 2, 2018.
- OLADEJI, O. S.; *et al.* Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*: A review. **Scientific African**, [S. l.], v. 6, e00137, 2019.
- OLIVEIRA, F. S. Análise epidemiológica do perfil bacteriano envolvido nas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), na região Nordeste do Brasil para o ano de 2019. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n.11, 2021.
- OLIVEIRA, J. B.; *et al.* *In Vitro* and *In Vivo* Antimicrobial Activity of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Against *Staphylococcus* spp. Isolated from Newborn Babies in an Intensive Care Unit. **Microbial Drug Resistance**, [S. l.], v. 25, n. 10, 2019.
- ORTEGA-CUADROS, M.; *et al.* Antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) on *Streptococcus mutans* biofilm and its cytotoxic effects. **Revista Biologia Tropical**, [S. l.], v. 66, n. 4, 2018.
- ÖZTÜRK, F; GÜNDÜZ, H; SÜRENGİL, G. The effects of essential oils on inactivation of *Listeria monocytogenes* in rainbow trout cooked with sous-vide. **Journal of Food Processing and Preservation**, [S. l.], v. 45, n. 10, e15878, 2021.
- PADALIA, R. C.; *et al.* Chemical composition of *Melaleuca linarrifolia* Sm. from India: a potential source of 1,8-cineole. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 63, p. 264-268, 2015.
- PANDEY, S.; *et al.* Curcumin loaded core-shell biopolymers colloid and its incorporation in Indian Basmati rice: An enhanced stability, anti-oxidant activity and sensory attributes of fortified rice. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 387, 2022.
- PAOLI, M.; *et al.* A fast and reliable method to quantify neral and geranial (citral) in essential oils using 1H NMR spectroscopy. **Flavour and Fragrance Journal**, [S. l.], v. 38, p. 405-482, 2023.
- PEICHEL, C.; *et al.* Effect of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Essential Oil on the Survival of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in Contaminated Poultry Drinking Water. **Journal of Applied Poultry Research**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 1121-1130, 2019.
- PENNA, A. C. G.; *et al.* Aplicabilidade de Corantes Naturais Como Alternativas ao Uso de Aditivos Sintéticos em Produtos Lácteos. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, [S. l.], v. 2, n.2, 2021.
- PEREIRA, J. M. G.; *et al.* Aditivos alimentares naturais emergentes: Uma revisão. **Realidades e Perspectivas em Ciência dos Alimentos**, [S. l.], p. 47-85, 2020.

PEREIRA, S. F.; *et al.* A Low Energy Approach for the Preparation of Nano-Emulsions with a High Citral-Content Essential Oil. **Molecules**, [S. l.], v. 26, n. 12, 3666, 2021.

PIERRO, P. D.; *et al.* Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 44, n. 10, p. 2324-2327, 2011.

PINHEIRO, A. C.; *et al.* Evaluation of Biocompatibility, Anti-Inflammatory, and Antinociceptive Activities of Pequi Oil-Based Nanoemulsions in *In Vitro* and *In Vivo* Models. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 12, v. 23, 4260, 2022.

PLATA-RUEDA, A.; *et al.* Insecticidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoids (citral and geranyl acetate) against *Ulomoides dermestoides*. **Crop Protection**, [S. l.], v. 137, 105299, 2020.

PRAKASH, A.; BASKARAN, R.; VADIVEL, V. Citral nanoemulsion incorporated edible coating to extend the shelf life of fresh cut pineapples. **LWT**, [S. l.], v. 118, 2020.

PRAKASH, V.; PARIDA, L. Characterization and rheological behavior of vitamin E nanoemulsions prepared by phase inversion composition technique. **Results in Engineering**, [S. l.], v. 18, 101175, 2023.

PRAKASH, A.; VADIVEL, V. Citral and linalool nanoemulsions: impact of synergism and ripening inhibitors on the stability and antibacterial activity against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 57, p. 1495–1504. 2020.

QIU, F.; *et al.* Full-Length Transcriptome Sequencing and Different Chemotype Expression Profile Analysis of Genes Related to Monoterpenoid Biosynthesis in *Cinnamomum porrectum*. **International Journal Molecular Science**, [S. l.], v. 20, n. 24, p. 6230, 2019.

RABIEI, M.; *et al.* Comparing Methods for Calculating Nano Crystal Size of Natural Hydroxyapatite Using X-Ray Diffraction. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 10, n. 9, 1627, 2020.

RAHAMAN, A.; *et al.* Eucalyptol targets PI3K/Akt/mTOR pathway to inhibit skin cancer metastasis. **Carcinogenesis**, [S. l.], v. 43, p. 571–583, 2022.

REBOUÇAS, L. M.; *et al.* Linseed Oil Nanoemulsion with Pluronic® F127 Loaded with Betulinic Acid: Preparation, Rheology, MTT Assay and *in vitro* Release Kinetics. **Journal Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 33, n. 11, 2022.

REHMAN, A.; *et al.* Spray dried nanoemulsions loaded with curcumin, resveratrol, and borage seed oil: The role of two different modified starches as encapsulating materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 186, p. 820-828, 2021.

REHMAN, A.; *et al.* Fabrication, *In Vitro*, and *In Vivo* Assessment of Eucalyptol-Loaded Nanoemulgel as a Novel Paradigm for Wound Healing. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 14, n.9, 1971, 2022.

RICCIARDI, E. F.; *et al.* Effects of plasma treatments applied to fresh ricotta cheese. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [S. l.], v. 76, 102935, 2022.

RODRIGUES, M. C. G; *et al.* Estudo comparativo da legislação vigente para aditivos em produtos lácteos no Brasil, Estados Unidos da América e Europa. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação**, [S. l.], v.4, n.1, p. 95 - 111, 2019.

RODRIGUEZ-GARCIA, I.; *et al.* Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 56, 2016.

RUI, Y.; *et al.* Eucalyptol prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis and M2 macrophage polarization. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 931, 2022.

RUZICKA, L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. **Experientia**, [S. l.], v. 9, p. 357–367, 1953.

RYS, M.; *et al.* Bio-Herbicidal Potential of Nanoemulsions with Peppermint Oil on Barnyard Grass and Maize. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 11, 3480, 2022.

SALVIA-TRUJILLO, L.; *et al.* Edible Nanoemulsions as Carriers of Active Ingredients: A Review. **Annual Review of Food Science and Technology**, [S. l.], v.8, p. 439-466, 2017.

SANTAMARÍA, E.; *et al.* Rheological Study of the Formation of Pullulan Hydrogels and Their Use as Carvacrol-Loaded Nanoemulsion Delivery Systems. **Gels**, [S. l.], v. 9, n. 8, 644, 2023.

SANTORO, M. M. Zebrafish as a model to explore cell metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, [S. l.], v. 25, n. 10, p. 546-54, 2014.

SANTOS, P. C. M.; *et al.* Garlic (*Allium sativum* L.) peel extracts: From industrial by-product to food additive. **Applied Food Research**, [S. l.], v. 2, 2022.

SANTOS-SÁNCHEZ, N. F.; *et al.* Natural Antioxidant Extract as Food Preservatives. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**. [S. l.], v.16, p. 361–370 , 2017.

SAQALLAHAB, F. G.; *et al.* Antimicrobial Activity and Molecular Docking Screening of Bioactive Components of *Antirrhinum majus* (Snapdragon) Aerial Parts. **Heliyon**, [S. l.], 2022.

SARI, I.; *et al.* Antibacterial Activity of Citronella Essential Oil from *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle) Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Indonesian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 16–22, 2022.

SARMA, R.; *et al.* Combinations of plant essential oil based terpene compounds as larvicidal and adulticidal agent against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n.1, 9471, 2019.

SCHENK, M.; FERRARIO, M.; GUERRERO, S. Antimicrobial Activity of Binary and Ternary Mixtures of Vanillin, Citral, and Potassium Sorbate in Laboratory Media and Fruit Purées. **Food and Bioprocess Technology**, [S. l.], v. 11, p. 324–333, 2018.

SCHWARZ, M. K. Terpen-Biosynthese in Ginkgo biloba eine überraschende Geschichte. **ETH Zürich**, 1994.

SCOTTI, R.; *et al.* Effects of Essential Oils from *Cymbopogon* spp. and *Cinnamomum verum* on Biofilm and Virulence Properties of Escherichia coli O157:H7. **Antibiotics**, [S. l.], v. 10, n. 2, 113, 2021.

SHAFIQ, S.; *et al.* Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 66,, n. 2, p. 227-243, 2007.

SHARMA, N.; *et al.* Nanoemulsion: A new concept of delivery system. **Chronicles of Young Scientists**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 2-6, 2010.

SHEN, C.; *et al.* Preparation and physicochemical effects of zein nanofiber membrane encapsulated with citral/HP- β -CD inclusion complex and its application on cheese. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 50, A, 2022.

SHENDURSE, A. M.; *et al.* Phytochemical screening and antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) leaves essential oil. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 445-449, 2021.

SHI, C.; *et al.* Inhibition of *Cronobacter sakazakii* Virulence Factors by Citral. **Scientific Reports**. [S. l.], v. 7, 2017.

SILVA, I. I.; *et al.* Essential Oils Produce Developmental Toxicity in Zebrafish Embryos and Cause Behavior Changes in Zebrafish Larvae. **Biomedicines**, [S. l.], v. 11, n. 10, 2821, 2023b.

SILVA, K. C. D.; *et al.* Embriotoxic and Antioxidant Effects of *Cymbopogon citratus* Leaf Volatile Oil on Zebrafish. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 33, p. 778–789, 2023a.

SILVA, N.; *et al.* **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água – 5. ed.** São Paulo, Blucher, 2017.

SILVA, S. M.; *et al.* Essential Oils from Different Plant Parts of *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) as a Source of 1,8-Cineole and Their Bioactivities. **Pharmaceuticals (Basel)**, [S. l.], v. 4, n. 12, p. 1535-50, 2011.

SIMAKOVA, I.; *et al.* Continuous synthesis of menthol from citronellal and citral over Ni-beta-zeolite-sepiolite composite catalyst. **Applied Catalysis A: General**, [S. l.], v. 636, 2022.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Banco de dados 2000 a 2019 Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil Informe 2022.**

Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/search?SearchableText=dt>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SI, L.; *et al.* Chemical Composition of Essential Oils of *Litsea cubeba* Harvested from Its Distribution Areas in China. **Molecules**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 7057-7066, 2012.

SOLTANZADEH, M.; *et al.* Chitosan nanoparticles encapsulating lemongrass (*Cymbopogon commutatus*) essential oil: Physicochemical, structural, antimicrobial and in-vitro release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**. [S. l.], v. 192, p. 1084-1097, 2021.

SOONWERA, S.; SITTICHOK, S. Adulticidal activities of *Cymbopogon citratus* (Stapf.) and *Eucalyptus globulus* (Labill.) essential oils and of their synergistic combinations against *Aedes aegypti* (L.), *Aedes albopictus* (Skuse), and *Musca domestica* (L.). **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 27, p. 20201–20214, 2020.

SUBRAMANIAM, G.; Yew, X. Y.; Sivasamugham, L. A. Antibacterial activity of *Cymbopogon citratus* against clinically important bacteria. **South African Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 34, p. 26–30, 2020.

TALLEY, J.; *et al.* Quantifying the impact of consumer behavior on foodborne illness using a compartment model. **Computers & Industrial Engineering**, [S. l.], v. 151, 2021.

TADROS, T. F. Emulsion Formation, Stability, and Rheology. **Emulsion Formation and Stability**, [S. l.], v. 1, 2013.

TAKASHIMA, H.; TAGAMI, T.; KATO, S.; PAE, H.; OZEKI, T.; SHIBUYA, Y. Three-Dimensional Printing of an Apigenin-Loaded Mucoadhesive Film for Tailored Therapy to Oral Leukoplakia and the Chemopreventive Effect on a Rat Model of Oral Carcinogenesis. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 14, 1575, 2022.

TAO, N.; Ouyang, Q.; Jia, L. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. **Food Control**, [S. l.], v. 41, p. 116-121, 2014.

TETALI, S. D.; *et al.* Review - Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, [S. l.], v. 249, 2019.

THBAYH, D. K.; FISER, B. Computational study of synthetic and natural polymer additives — Antioxidant potential of BHA, TBHQ, BHT, and curcumin. **Polymer Degradation and Stability**, [S. l.], v. 201, 2022.

TIWARI, B. K.; *et al.* Effect of sonication on orange juice quality parameters during storage. **Food Science Technology**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 586-595, 2009.

TORRES, L. R. O.; *et al.* Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 97, p. 205-216, 2016.

- TOSI, M. M.; RAMOS, A. P.; ESPOSTO, B. S.; JAFARI, S. M. Chapter Six - Dynamic light scattering (DLS) of nanoencapsulated food ingredients. **Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients**, [S. l.], v. 4, p. 191-211, 2020.
- TRASARTI, A. F.; MARCHI, A. J.; APESTEGUÍA, C. R. Synthesis of menthols from citral on Ni/SiO₂-Al₂O₃ catalysts. **Catalysis Communications**, [S. l.], v. 32, p. 62-66, 2013.
- TRIPALDI, C.; *et al.* Chemical and Microbiological Characteristics of Homogenised Ricotta Cheese Produced From Buffalo Whey. **Italian Journal of Food Science**, [S. l.], v. 32, 2020.
- TRUONG, L.; HARPER, S.L.; TANGUAY, R.L. Evaluation of Embryotoxicity Using the Zebrafish Model. **Drug Safety Evaluation**, [S. l.], p. 271-279, 2010.
- UPADHYAY, R.; BANO, S. A Review on Terpenoid Synthesized Nanoparticle and It's Antimicrobial Activity. **Oriental Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 452-462, 2023.
- VALKOVÁ, V.; *et al.* *Cymbopogon citratus* Essential Oil: Its Application as an Antimicrobial Agent in Food Preservation. **Agronomy**, [S. l.], v. 12, n. 1, 155, 2022.
- VÉLEZ, R.; *et al.* Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil). **FACSALUD-UNEMI**, [S. l.], v. 2, n. 2, 2018.
- VIJAYAKUMAR, K.; *et al.* Eucalyptol inhibits biofilm formation of *Streptococcus pyogenes* and its mediated virulence factors. **Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], v. 69, 2020.
- VOLP, A. C. P.; Renhe, I.R.T.; Stringueta, P.C. Pigmentos Naturais Bioativos. **Alimentos e Nutrição**, [S. l.], v. 20, n.1, p. 157-166, 2009
- XIAO, S.; *et al.* Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, 99, 2020.
- YAKOUBI, S.; *et al.* Essential-Oil-Loaded Nanoemulsion Lipidic-Phase Optimization and Modeling by Response Surface Methodology (RSM): Enhancement of Their Antimicrobial Potential and Bioavailability in Nanoscale Food Delivery System. **Foods**, [S. l.], v. 10, n. 12, 3149, 2021.
- YANG, C.; *et al.* Comparative metabolomic analysis of different-colored hawthorn berries (*Crataegus pinnatifida*) provides a new interpretation of color trait and antioxidant activity. **LWT**, [S. l.], v. 163, 2022.
- YANG, H.; *et al.* Synergistic bactericidal effect of ultrasound combined with citral nanoemulsion on *Salmonella* and its application in the preservation of purple kale. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 92, 106269, 2023.
- YOPLAC, I.; *et al.* Characterization and antimicrobial activity of microencapsulated citral with dextrin by spray drying. **Heliyon**, [S. l.], v. 7, e06737, 2021.
- YU., M.; KOROLEVA; YURTOV, E. V. Ostwald ripening in macro- and nanoemulsions. **Russian Chemical Reviews**, [S. l.], v. 90, n. 3, p. 293 - 323, 2021.

WANG, L.; *et al.* The rheological/interfacial behavior and stability properties of nanoemulsions prepared using whey protein-carboxymethyl chitosan conjugates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 662, 130924, 2023.

WANG, X.; LI, B.; WEN, Z. Volatile constituents of the leaf and fruit essential oils of *Litsea cubeba* (Lour.) Pers. growing wild in Baoshan region, China. **Natural Product Research**, [S. l.], v. 1, 2023. Natural Product research. Molecules 2012, 17(6), 7057-7066.

WANY, A.; *et al.* Extraction and characterization of essential oil components based on geraniol and citronellol from *Java citronella* (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). **Plant Growth Regulation**, [S. l.], v. 73, p. 133–145, 2014.

WIGHTMAN, R. An Overview of Cryo-Scanning Electron Microscopy Techniques for Plant Imaging. **Plants**, [S. l.], v. 11, n. 9, 1113, 2022.

WIK, J.; BANSAL, K. K.; ASSMUTH, T.; ROSLING, A.; ROSENHOLM, J. M.. Facile methodology of nanoemulsion preparation using oily polymer for the delivery of poorly soluble drugs. **Drug Delivery and Translational Research**, [S. l.], v. 10, p. 1228–1240, 2020.

WORTH, H.; DETHLEFSEN, U. Patients with asthma benefit from concomitant therapy with cineole: a placebo-controlled, double-blind trial. **Journal Asthma**, [S. l.], v.49, p. 849-853, 2012.

ZHOU, Y.; *et al.* Encapsulation efficiency and release of citral using methylcellulose as emulsifier and interior wall material in composite polysaccharide microcapsules. **Advance in Polymer Technology**, [S. l.], v. 37, n. 8, p. 3199-3209, 2018.