



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

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

G. O. Everton^{1*}; A. P. M Pereira²; V. E. Mouchrek Filho³; O. S. Monteiro⁴

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

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

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

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

*gustavooliveiraeverton@gmail.com

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

Este artigo apresenta o efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (EOCC) e sua nanoemulsão na atividade antioxidante e anticâncer *in vitro*. As folhas de *C. citratus* foram coletadas no estado do Maranhão e seu óleo essencial foi extraído por hidrodestilação. Os compostos presentes no EOCC foram identificados e quantificados por CG-EM com detector de ionização de chama. A nanoemulsão do EOCC foi formulada por método de inversão de fases. A atividade antioxidante foi realizada para o EOCC e NEOCC pelos ensaios de eliminação de radicais ABTS e DPPH. A atividade anticâncer *in vitro* foi avaliada também para o EOCC e NEOCC frente a células de tecido: cólon, pulmão, fígado, colo do útero, próstata, oral e neuroblastoma. O rendimento obtido foi de 0,92%, sendo geranial e neral identificados como majoritários dessa composição através do ensaio de CG-EM. A nanoemulsão obtida foi estável com tamanho de gota de 57 nm, potencial zeta -21,15 mV, índice de polidispersão de 0,21 e pH 4,77. O EOCC e NEOCC apresentaram atividade antioxidante forte com IC₅₀ variando de 14,84 a 38,36 µg/mL. O EOCC e NEOCC apresentaram atividade citotóxica significativa frente a todas as linhagens celulares utilizadas no estudo, sendo os maiores efeitos frente a linhagem celular 502713 (cólon), IMR-32 (neuroblastoma), Hep-2 (fígado) e SiHa (colo do útero) com valores de IC₅₀ de 1,96; 2,20; 2,24 e 3,04 µg/mL, respectivamente. Estas descobertas sugerem que o EOCC e NEOCC podem ser alternativas para terapias inovadoras. Palavras-chave: bioatividade, células, geranial.

This article presents the effect of *Cymbopogon citratus* essential oil (EOCC) and its nanoemulsion on antioxidant and anticancer activity *in vitro*. The leaves of *C. citratus* were collected in the state of Maranhão and its essential oil was extracted by hydrodistillation. The compounds present in the EOCC were identified and quantified by GC-MS with flame ionization detector. The EOCC nanoemulsion was formulated by phase inversion method. The antioxidant activity was performed for EOCC and NEOCC by the ABTS and DPPH root elimination assays. The *in vitro* anticancer activity was also evaluated for EOCC and NEOCC against tissue cells: colon, lung, liver, cervix, prostate, oral and neuroblastoma. The yield obtained was 0.92%, being geranial and neral identified as the majority of this composition through the GC-MS assay. The nanoemulsion obtained was stable with droplet size of 57 nm, zeta potential -21.15 mV, polydispersity index of 0.21 and pH 4.77. The EOCC and NEOCC showed strong antioxidant activity with IC₅₀ ranging from 14.84 to 38.36 µg/mL. The EOCC and NEOCC showed significant cytotoxic activity against all cell lines used in the study, with the greatest effects against the cell line 502713 (colon), IMR-32 (neuroblastoma), Hep-2 (liver) and SiHa (cervix) with IC₅₀ values of 1.96; 2,20; 2.24 and 3.04 µg/mL, respectively. These findings suggest that EOCC and NEOCC may be alternatives to innovative therapies. Palavras-chave: bioactivity, cells, geranial.

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e identificação do material vegetal

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

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

Para extração dos OEs foi utilizada a técnica de hidrodestilação com um extrator de Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo acondicionado em manta elétrica como fonte geradora de calor, utilizando-se água destilada como solvente (1:10). A hidrodestilação foi conduzida a 100°C por 2h30 recolhendo-se o OE extraído, sendo seco por percolação com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e centrifugado. As amostras serão armazenadas em vials de vidro âmbar sob refrigeração a 4°C e os ensaios realizados em triplicata.

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

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

2.3 Preparo e caracterização do tamanho de gota das nanoemulsões

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

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

O método utilizado para determinar a capacidade antioxidante de OEs e nanoemulsões foi adaptado de Brand-Williams et al. (1995) [20]. 50 µL de soluções de OE e nanoemulsões foram misturadas com 950 µL de etanol e 3 mL de solução de radical DPPH. A mistura foi deixada reagir no escuro durante 30 minutos. A absorbância das amostras foi registrada com espectrofotômetro UV-Vis a 540 nm. A eliminação do radical DPPH foi expressa em porcentagem, e a concentração inibitória 50% (IC₅₀) capaz de impedir a eliminação de 50% foi expressa em µg/mL.

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

A determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS [ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] foi adaptado de Re et al. (1999) [21]. Com base nas concentrações de OEs e nanoemulsões (5-150 µg/mL), a mistura reacional foi preparada com cátion radical ABTS. Em ambiente escuro, uma alíquota de 30 µL contendo 3,0 mL de cátion radical ABTS foi transferida de cada concentração de amostra e homogeneizada em tubo agitador, e após 6 minutos a absorbância da mistura reacional foi lida junto com um espectrofotômetro. 760 nm. Os testes foram realizados em triplicado. A eliminação do radical ABTS foi expressa em porcentagem e a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) capaz de impedir a eliminação de 50% foi expressa em µg/mL.

2.6 Atividade anticâncer

As linhagens celulares de câncer humano utilizadas neste estudo foram: cólon (HT-29, HCT-15, SW-620, 502713), pulmão (A549, HOP-62, H-226), células cervicais (SiHa), células orais (KB), próstata (DU-145) e leucemia promielocítica (HL-60), cultivadas e mantidas em meio RPMI-1640 (pH 7,4), enquanto MEM para neuroblastoma (IMR-32) e fígado (Hep-g-2). O meio foi suplementado com 10% de soro fetal de vitelo, glutamina (2 mM), penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100 µg/mL). As culturas celulares foram cultivadas numa incubadora de CO₂ (Heraeus, GmbH, Alemanha) a 37°C, 90% de umidade e 5% de CO₂ como descrito [22, 23].

Uma solução estoque de EOCC (10%, v/v) foi preparada em DMSO e as nanoemulsões foram diluídas serialmente em meio de cultura para obter a concentração desejada. A citotoxicidade em concentrações variando de 0,89 a 890 µg/mL foi determinada por um ensaio semiautomático [24] utilizando sulforodamina-B (SRB) como descrito anteriormente por Samanta et al. (2005) [22]. As culturas de controle não tratadas receberam apenas veículo (DMSO, < 0,1%). Os resultados são relatados como valores IC₅₀.

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.3 Análise da atividade antioxidante in vitro

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

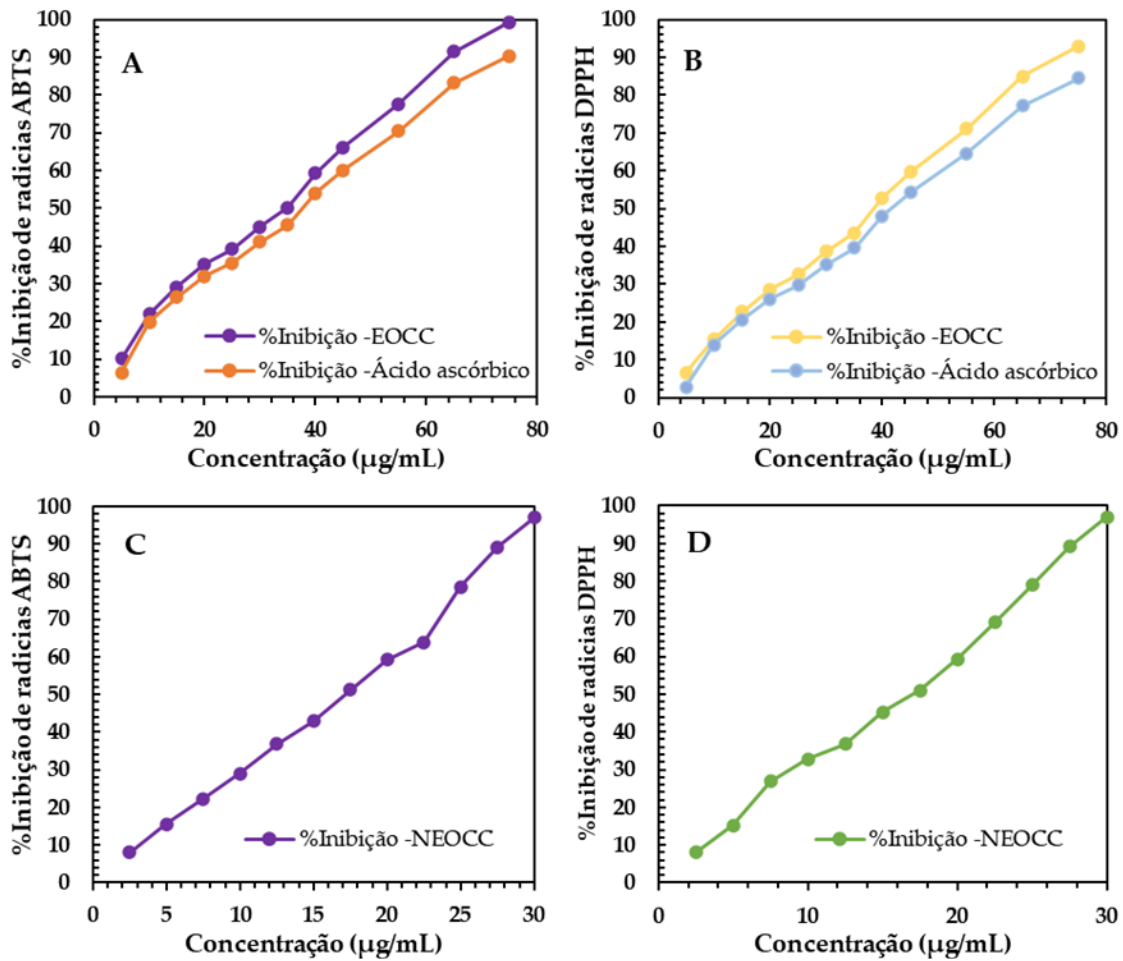


Figura 1: Atividade antioxidante dependente da concentração do EOCC usando ensaio de eliminação de radicais DPPH (A), atividade de eliminação de radicais ABTS (B), eliminação de radicais DPPH para NEOCC (C) e eliminação de radicais ABTS para NEOCC (D). O ácido ascórbico foi utilizado como controle em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

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

Tabela 3: Metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) do EOCC e NEOCC. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo.

Ensaio	Concentração Inibitória 50% (µg/mL)		
	EOCC	NEOCC	Ácido ascórbico
ABTS	34,60 ± 3,01	14,84 ± 2,99	37,53 ± 2,22
DPPH	38,36 ± 3,88	16,01 ± 3,14	42,52 ± 3,45

Diferentemente do nosso estudo, Guerrini et al. (2023) [47] relataram baixa capacidade antioxidante do óleo essencial de *C. citratus* com ensaio DPPH com IC₅₀ de 2,270 mg/mL e ABTS com IC₅₀ de 4,322 mg/mL. Fatunmibi et al. (2023) [48] mostraram poder redutor significativo e atividade antioxidante no óleo essencial de *C. citratus* na concentração de 4 mg/mL que foi comparável ao ácido ascórbico de mesma concentração com DPPH (71,82 µg/mL), ensaio de poder antioxidante redutor de ferro (10208,16 µg/mL), ensaio de peroxidação lipídica (94,25 µg/mL) e atividade sequestradora de óxido nítrico (24,9 µg/mL). A atividade antioxidante observada para o EOCC pode ser devida à presença de compostos químicos identificados na CG-EM, segundo Kulisic et al. (2004) [49].

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

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

3.4 Citotoxicidade in vitro contra linhagens celulares de câncer humano

O EOCC e NEOCC apresentaram atividade citotóxica significativa frente a todas as linhagens celulares utilizadas no estudo. O EOCC e NEOCC apresentaram maiores efeitos frente a linhagem celular 502713 (cólon), IMR-32 (neuroblastoma), Hep-2 (fígado) e SiHa (colo do útero) com valores de IC₅₀ de 1,96; 2,20; 2,24 e 3,04 µg/mL, respectivamente, conforme a Tabela 4.

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

Tecido	Linhagem celular	IC ₅₀ (µg/mL)	
		EOCC	NEOCC
Cólon	HT-29	19,81±0,05	10,3±0,03
	HCT-15	28,13±0,07	14,6±0,04
	SW-620	13,13±0,03	6,8±0,02
	502713	1,96±0,01	1,0±0,01
	H-226	28,69±0,07	14,9±0,04
Pulmão	A-549	23,22±0,06	12,1±0,03
	Hop-62	36,92±0,09	19,2±0,05
Fígado	Hep-2	2,24±0,01	1,2±0,02
Colo do útero	SiHa	3,04±0,01	1,6±0,01
Próstata	DU-145	19,35±0,05	10,1±0,03
Oral	KB	23,74±0,06	12,3±0,03
Neuroblastoma	IMR-32	2,20±0,01	1,1±0,02

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

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

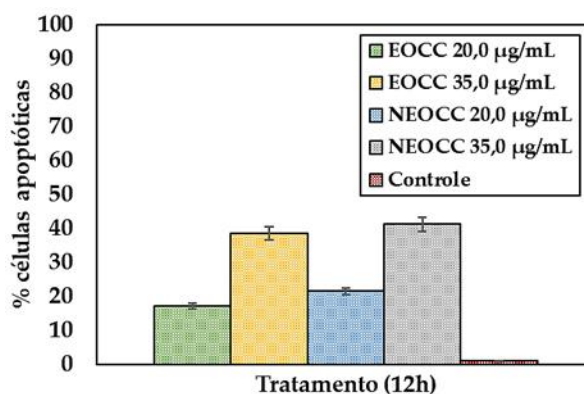


Figura 2: Efeito do EOCC e NEOCC no ensaio de quantificação de apoptose em células HL-60.

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

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

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

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

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

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

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

4. CONCLUSÃO

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

5. AGRADECIMENTOS

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

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

7. Rodrigues ABL, Martins RL, Rabelo EDM, Tomazi R, Santos LL, Brandão LB, et al. Development of nano-emulsions based on *Ayapana triplinervis* essential oil for the control of *Aedes aegypti* larvae. PLoS one. 2021 Jul;16(7):e0254225. doi: 10.3390/pharmaceutics13071030
8. Barradas TN, de Holanda e Silva KG. Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review. Environm Chem Lett. 2021 Nov;19(2):1153-71. doi: 10.1007/s10311-020-01142-2
9. Anton N, Saulnier P. Adhesive water-in-oil nano-emulsions generated by the phase inversion temperature method. Soft Matter. 2013 May;9(28):6465-74. doi: 10.1039/C3SM51064F
10. Balakrishnan B, Paramasivam S, Arulkumar A. Evaluation of the lemongrass plant (*Cymbopogon citratus*) extracted in different solvents for antioxidant and antibacterial activity against human pathogens. Asian Pacific J Trop Dis. 2014 Feb;4(1):S134-9. doi: 10.1016/S2222-1808(14)60428-X
11. Zielińska A, Martins-Gomes C, Ferreira NR, Silva AM, Nowak I, Souto EB. Anti-inflammatory and anti-cancer activity of citral: Optimization of citral-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) using experimental factorial design and LUMiSizer®. Int J Pharm. 2018 Dec;553(1-2):428-40. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.065
12. Chaouki W, Leger DY, Liagre B, Beneytout JL, Hmamouchi M. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. Fundam Clin Pharmacol. 2009 Sep;23(5):549-56. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00738.x
13. Thomas ML, Antueno R, Coyle KM, Sultan M, Cruickshank BM, Giacomantonio MA, et al. Citral reduces breast tumor growth by inhibiting the cancer stem cell marker ALDH1A3. Mol Oncol. 2016 Nov;10(9):1485-96. doi: 10.1016/j.molonc.2016.08.004
14. Nordin N, Yeap SK, Rahman HS, Zambari NR, Abu N, Mohamad NE, et al. In vitro cytotoxicity and anticancer effects of citral nanostructured lipid carrier on MDA MBA-231 human breast cancer cells. Sci Rep. 2019 Feb;9(1):1614. doi: 10.1038/s41598-018-38214-x
15. Sheikh BY, Sarker MMR, Kamarudin MNA, Mohan G. Antiproliferative and apoptosis inducing effects of citral via p53 and ROS-induced mitochondrial-mediated apoptosis in human colorectal HCT116 and HT29 cell lines. Biomed Pharmacother. 2017 Dec;96:834-46. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.038
16. Van den Dool HA, Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J Chromatogr. A. 1963 Dec;11:463-47. doi: 10.1016/S0021-9673(01)80947-X
17. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. Gruver (US): Texensis Publishing; 2017.
18. Sugumar S, Clarke SK, Nirmala MJ, Tyagi BK, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. Bull Entomol Res. 2014 Jun;104(3):393-402. doi: 10.1017/S0007485313000710
19. Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK, Ali M. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. Eur. J Pharm Biopharm. 2007 May 1;66(2):227-43. doi: 10.1016/j.ejpb.2006.10.014
20. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT. 1995 Jan;28(1):25-30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5
21. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. FRBM. 1999 Jun;26(9-10):1231-7. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3
22. Samanta S, Pain A, Dutta S, Saxena AK, Shanmugavel M, Pandita RM, et al. Antitumor activity of Nitronaphthal-NU, a novel mixed-function agent. JETO. 2005 Mar;5(1):15-22. doi: 16416597/pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
23. Sharma PR, Mondhe DM, Muthiah S, Pal HC, Shahi AK, Saxena AK, et al. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. Chem Biol Interact. 2009 May;179(2-3):160-8. doi: 10.1016/j.cbi.2008.12.004
24. Shekan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McHahon J, Vis-Tica D, et al. New colometric assay for anticancer drug screening. J Nat Cancer Inst. 1990 Jul;82(13):107-12. doi: 10.1093/jnci/82.13.1107
25. Washo-Stultz D, Crowley-Weber CL, Dvorakova K, Bernstein C, Bernstein H, Kunke K, et al. Role of mitochondrial complexes I and II, reactive oxygen species and arachidonic acid metabolism in deoxycholate-induced apoptosis. Cancer Lett. 2002 Mar;177(2):129-44. doi: 10.1016/S0304-3835(01)00786-8
26. Zaman FQ, Jaffel K, Abdelmageed AH. The effects of post-harvest drying period on the yield and chemical composition of leaf essential oil from *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Essent. Oil-Bear Plants. 2022 May;25(3):571-80. doi: 10.1080/0972060X.2022.2084349

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

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